Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Antoine TRONNET

Le 22 mars 2022

Analogues polymériques de peptides antimicrobiens à potentiel thérapeutique anti-Clostridioides difficile.

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :
LCC - Laboratoire de Chimie de Coordination

Thèse dirigée par
Pierre VERHAEGHE et Colin BONDUELLE

Jury

M. Gad Fuks, Rapporteur
Mme Cécile Gueiffier, Rapporteure
M. Nicolas Fabre, Examinateur
Mme Florence Bedos-Belval, Examinatrice
Mme Amanda GARRIDO, Examinatrice
M. Pierre VERHAEGHE, Directeur de thèse
M. Colin Bonduelle, Co-directeur de thèse

Remerciements

*Je remercie tout d'abord le Pr **Pierre Verhaeghe**, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et permis de travailler sur ce magnifique projet. Je vais garder tous les précieux conseils tant au niveau professionnel que personnel que tu m'as partagé. Ta bienveillance, ta patience en toutes circonstances et surtout ta rigueur scientifique m'ont fait progresser tout au long de ces 3 années de thèse.*

*Je remercie également le Dr **Colin Bonduelle**, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche. Je te suis très reconnaissant d'avoir toujours été présent dans les moments où j'en ai eu le plus besoin malgré la distance. Ta curiosité scientifique et les innombrables idées que tu as à chaque instant font de toi un excellent chercheur et j'espère suivre tes traces.*

*Je tiens à remercier le Dr **Bruno Dupuy**, Directeur du Laboratoire de Pathogenèse des Bactéries Anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris, qui m'a accueilli plusieurs fois au sein de son équipe et qui m'a initié à la microbiologie et à l'évaluation biologique sur Clostridioides difficile. Je te suis reconnaissant pour le temps que tu as pris pour me former malgré ton emploi du temps chargé et je te remercie aussi d'être présent en tant qu'invité à ma soutenance de thèse.*

*Je remercie **Pedro Salas**, docteur de l'Université de Bordeaux, avec qui nous avons travaillé en étroite collaboration, permettant à ce projet d'obtenir de nombreux résultats mais qui est surtout devenu un ami proche.*

*J'adresse tous mes remerciements à Madame **Cécile Gueiffier**, Professeur à l'Université de Tours, ainsi qu'à Monsieur **Gad Fuks**, Maitre de conférences à l'Université de Perpignan Via Domitia, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse*

Remerciements

*Je remercie aussi Monsieur **Nicolas Fabre**, Professeur de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier et Madame **Amanda Garrido**, Maitresse de conférences de l'Université de Lyon I, qui ont accepté d'être examinateur de cette thèse.*

*Je remercie Madame **Florence Bedos-Belval**, Maitresse de conférences de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier, d'être présente en tant que membre invitée à ma soutenance de thèse.*

*Je remercie tout particulièrement ma famille et mes amis, à commencer par **Marion**, ma compagne, qui a toujours été là pour moi et qui m'a toujours soutenu dans les bons et les mauvais moments. Tu m'as suivi à Toulouse sans hésiter en laissant ta famille et tes amis derrière toi et je t'en serai à jamais reconnaissant. J'espère vivre à tes côtés pour toujours et avec ce petit bonhomme qui va bientôt pointer le bout de son nez. Je t'aime.*

*Je remercie tout particulièrement **mes parents**, sans qui je n'en serai pas là. Tout au long de mon parcours universitaire, vous m'avez poussé, soutenu et toujours accordé votre confiance. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les sacrifices que vous avez faits pour m'offrir les conditions de vie propices à la réussite.*

*Je remercie également **mes sœurs** et **mon frère**, que je n'oublie pas malgré la distance et ma tendance à ne pas prendre de nouvelles.*

*Je souhaite remercier tous mes amis, **Sofiane**, **Amandine**, **Guillaume**, **Julien, Michel** et **Clément** qui malgré la distance et les années ont toujours été présents, que ce soit pour sortir, aller boire une bière ou tout simplement pour discuter.*

*Pour finir, je tiens à remercier mes **grands-parents**, **oncles**, **tantes**, **cousins**, **cousines** et toutes les personnes qui composent notre belle famille que je ne pourrais nommer sous peine de devoir rajouter des dizaines de pages.*

Remerciements

*Je remercie tous mes collègues de l'**Equipe K** : **Geneviève Pratviel**, **Jean-Luc Stigliani** et **Jean Bernadou** pour ces 5 années qui m'ont permis de travailler dans d'excellente condition.*

*Je remercie également **l'Equipe F** du LCC pour m'avoir recueilli dans cette dernière année de thèse lors de la fermeture de l'équipe K et tous les membres du **laboratoire de pathogenèse des bactéries anaérobies** de l'Institut Pasteur qui m'ont accueilli pendant mes missions et qui m'ont aidé et apporté leurs précieuses connaissances en microbiologie.*

Abréviations

A. baumannii :	*Acinetobacter baumannii*
AcOH :	Acide acétique
APD :	Antimicrobial Peptide Database
B. fragilis :	*Bacteroides fragilis*
B. subtilis :	*Bacillus subtilis*
B. toyonensis :	*Bacillus toyonensis*
BHI :	Brain-Heart Infusion
Bn :	Benzyle
Boc :	*tert*-butyloxycarbonyle
Boc_2O :	Dicarbonate de di-tert-butyle
C. albicans :	*Candida albicans*
C. difficile :	*Clostridioides difficile*
Cbz :	Carboxybenzyle
CC_{50} :	Concentration cytotoxique médiane
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CCNA :	cell cytotoxicity neutralization assay
CDC :	Centre pour le contrôle et la prévention des maladies
$CDCl_3$:	Chloroforme deutéré
CDT :	*C. difficile* transférase
CH_3I :	Iodométhane
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CO_2 :	Dioxyde de carbone
CT :	Culture toxinogène
D_2O :	Oxyde de deutérium
DCM :	Dichlorométhane
DIPEA :	*N*,*N*-Diisopropyléthylamine
DMF :	*N*,*N*-diméthylformamide
DMS :	Sulfate de diméthyle
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DP :	Degré de polymérisation
DPA :	Acide dipicolinique
E. coli :	*Escherichia coli*
E. faecalis :	Enterococcus faecalis
ECDC :	Centre européen de prévention et de contrôle des maladies
Equiv. :	Equivalent
ESCMID :	Société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses
Et_2O :	Ether diéthylique
ET_3N :	Triéthylamine
EtOAc :	Acétate d'éthyle
EtOH :	Ethanol
Fmoc :	Fluorénylméthoxycarbonyle
FMT :	Transplantation fécale
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GDH EIA :	Glutamate dehydrogenase enzyme immunoassay
H. pylori :	*Helicobacter pylori*
H/C :	Rapport hydrophobe/cationique
H_3PO_4 :	Acide phosphorique
HAS :	Haute autorité de santé
HBr :	Acide bromhydrique
HCCA :	Acide *α*-cyano-4-hydroxycinnamique
HCl :	Acide chloridrique

Abréviations

HFIP :	Hexafluoropropan-2-ol
IAS :	Infections associées aux soins
ICD :	Infection à *Clostridioides difficile*
IDSA :	Infectious Diseases Society of America
iPr :	Isopropyle
K_2CO_3 :	Carbonate de potassium
L. monocytogenes :	*Listeria monocytogenes*
LiHMDS :	bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
M/I :	Rapport monomère/amorceur
MALDI :	désorption-ionisation laser assistée par matrice
Me :	Méthyle
MeOH :	Méthanol
$MgSO_4$:	Sulfate de magnésium
Mn :	Masse molaire moyenne en nombre
Mw :	Masse molaire moyenne en masse
NAAT :	Nucleic Acid Amplification Test
$NaBH_3CN$:	Cyanoborohydrure de sodium
$NaBH_4$:	Tetrahydruroborate
NaCl :	Chlorure de sodium
NaH :	Hydrure de sodium
$NaHCO_3$:	Bicarbonate de sodium
NaI :	Iodure de sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NCA :	*N*-Carboxyanhydride
NGC :	Negative Gaussian Curvature
NHC :	Carbène *N*-hétérocyclique
NNCA :	*N*-carboxyanhydride *N*-alkylé
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
P. aeruginosa :	*Pseudomonas aeruginosa*
PAM :	Peptide antimicrobien
PBr_3 :	Tribromure de phosphore
PCl_3 :	Trichlorure de phosphore
PCl_5 :	Pentachlorure de phosphore
$POCl_3$:	Trichlorure de phosphoryle
PtO_2 :	Dioxyde de platine
RAM :	Résistance aux antimicrobiens
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROP :	Polymérisation par ouverture de cycle
RSA :	Relations structure/activité
S. aureus :	*Staphylococcus aureus*
S. marcescens :	*Serratia marcescens*
S. pneumoniae :	*Streptococcus pneumoniae*
Sar-NCA :	*N*-Méthyl-*N*-carboxyanhydride
SEC :	Chromatographie d'exclusion stérique
SHEA :	Society for Healthcare Epidemiology of America
$SOCl_2$:	Chlorure de thionyle
SPPS :	Synthèse peptidique sur support solide
T3P :	Anhydride propylphosphonique
TcdA :	Toxine A
TcdB :	Toxine B
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
Toxin EIA :	Toxin A/B immunoassay
UFC :	Unité formant colonie

Introduction **1**

Chapitre 1 : Analogues polymériques de peptides antimicrobiens dans la lutte contre les infections à *Clostridioides difficile* **8**

1. Résistance aux antimicrobiens **8**

2. Infection à *Clostridioides difficile* **12**

2.1. Epidémiologie des infections à *C. difficile* **14**

2.2.* Pathogénèse de l'infection à *C. difficile **16**

2.2.1. Germination et croissance de *C. difficile* 16

2.2.2. Sporulation de *C. difficile* 17

2.2.3. Les facteurs de risque de l'infection à *C. difficile* 18

2.2.4. Les facteurs de virulence de l'infection à *C. difficile* 19

2.3. Dépistage de l'infection à *C. difficile* **23**

2.4. Les traitements de l'infection à *C. difficile* en 2021 ..... **25**

2.4.1. Le métronidazole 26

2.4.2. La vancomycine 27

2.4.3. La fidaxomicine 28

2.4.4. Le bezlotoxumab 29

2.4.5. La fécalothérapie ou transplantation fécale 30

2.5. Les molécules en essai clinique en 2021 ..... **31**

2.5.1. Les molécules en prévention de l'infection à *C. difficile* 31

2.5.2. Les molécules contre une première infection à *C. difficile* 32

3. Les peptides antimicrobiens (PAM) **35**

3.1. Structure des peptides antimicrobiens **37**

3.2. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens **41**

3.3. Interactions et déstabilisation membranaire **43**

3.4. Les limitations des peptides antimicrobiens **47**

4. Les analogues polymériques de peptides antimicrobiens **49**

4.1. Relations structure-activité **51**

4.1.1. Les groupements cationiques 53

4.1.2. Les groupements hydrophobes 54

4.1.3. Les espaceurs et les groupements satellites 55

4.2. **Analogues polymériques de peptides antimicrobiens contre *C. difficile*.....57**

5. Analogues peptidiques de PAM.....57

5.1. Les limitations des analogues peptidiques.....62

5.2. Perspectives.....63

Chapitre 2 : Préparation de *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés.....64

1. Synthèse de N-carboxyanhydrides (NCA) : état de l'art.....64

1.1. Synthèse des NCA à partir des acides aminés à fonction amine primaire 64

1.1.1. La méthode de Leuchs 64

1.1.2. La méthode de Fuchs-Farthing 65

1.1.3. Les méthodes alternatives..... 66

1.2. Application aux NCA *N*-alkylés (NNCA) : données de la littérature.....68

1.2.1. NCA *N*-alkylés dérivés de la glycine..... 68

1.2.2. NCA *N*-alkylés dérivés des autres acides aminés..... 69

2. Synthèse des précurseurs de NNCA : acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés.....71

2.1. Dérivés d'acides aminés « hydrophobes ».....71

2.1.1. Séquence carbamoylation/*N*-méthylation..... 72

2.1.2. Séquence *N*-méthylation/carbamoylation..... 73

2.1.3. Choix de la meilleure stratégie et optimisation..... 74

2.2. Dérivés d'acides aminés « cationiques » 79

2.2.1. Application du protocole précédent à la L-Lysine..... 79

2.2.2. Stratégie alternative à partir de la L-Glutamine..... 82

3. Synthèse des *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés (NNCA) 83

3.1. Optimisation de la synthèse de NNCA.....84

3.2. Synthèse d'une bibliothèque de NNCA 87

4. Conclusion.....89

5. Matériels et méthodes.....89

5.1. Matériels 89

5.2. Equipements.....90

5.3. Préparation des intermédiaires *N*-Boc-*N*-méthylés 90

5.4. Préparation des *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés (NNCA).....102

Chapitre 3 : Synthèse de polypeptides *N*-méthylés par polymérisation par ouverture de cycle et étude de l'activité biologique sur *Clostridioides difficile* 107

1. Synthèses de polypeptides par ROP à partir de NCA *N*-méthylés.....109

1.1. Cinétique de la ROP de NCA d'acides aminés *N*-méthylés 111

1.1.1. Cinétique de formation du poly(*N*-Me-L-Ala)..... 112
1.1.2. Cinétique de formation d'autres pseudo-polypeptides *N*-méthylés..... 116
1.1.3. Influence d'une base sur la cinétique de formation de la poly(*N*-Me-L-Phe) 120

1.2. Préparation de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys] 123

2. Essais de synthèse de copolypeptides *N*-méthylés avec un rapport hydrophobe/cationique contrôlé 125

2.1. Préparation de copolymères cationiques avec des rapports hydrophobes/cationiques variables 126

2.2. Essai de préparation de copolymères cationiques avec une hydrophobie accrue 130

***3.* Etude de l'activité antimicrobienne des copolymères sur *C. difficile* 134**

3.1. Etude de l'activité antimicrobienne d'une série de copolypeptoïdes.....135

3.2. Etude de l'activité antimicrobienne d'un copolypeptoïde macrocyclique 144

3.3. Etude de l'activité antimicrobienne sur diverses bactéries Gram positif et Gram négatif.....145

4. Conclusion.....147

5. Matériels et méthodes.....148

5.1. Matériels 148

5.2. Equipements.....149

5.3. Etude cinétique par spectrométrie IR 150

5.4. Préparation d'homopolymères.....150

5.5. Préparation de copolymères 152

5.5.1. Copolymères avec des rapports hydrophobes/cationiques variables 152
5.5.2. Copolymère avec des chaines hydrophobes variables 158
5.5.3. Copolymères avec des chaines hydrophobes et des M/I variables 160

5.6. Etude de l'activité antimicrobienne.....161

5.7. Etude de l'activité antimicrobienne après un traitement par la trypsine.....162

5.8. Cytotoxicité.....162

Conclusion.....164

Perspectives.....168

Bibliographie.....170

Introduction

La résistance aux antimicrobiens (RAM) est la capacité d'un micro-organisme à contrer l'action d'une ou plusieurs molécules(s) antimicrobienne(s) au(x)quelle(s) il était auparavant sensible. La RAM est considérée par la communauté scientifique comme l'un des plus grands défis de santé publique de notre époque, imposant une recherche globalisée, multi- et trans-disciplinaire. En effet, l'émergence de bactéries multi-résistantes couplée au faible développement de nouveaux antibiotiques pourrait faire de la RAM la première cause de mortalité d'ici 2050.

Clostridioïdes difficile (*C. difficile*) est un bacille Gram positif, anaérobie strict et sporulé qui se développe souvent dans la flore intestinale de patients dont le microbiote est déstabilisé par une antibiothérapie à spectre large. L'infection à *C. difficile* (ICD) est la conséquence de la colonisation du tube digestif par une souche toxinogène de *C. difficile*. Aujourd'hui, *C. difficile* fait partie des principales causes d'infections associées aux soins, aussi appelées infections nosocomiales. L'antibiothérapie anti-*C. difficile* repose principalement sur trois molécules qui offrent des résultats contrastés et depuis quelques années, les ICD deviennent plus fréquentes, plus sévères et le risque de récidives a très largement augmenté.

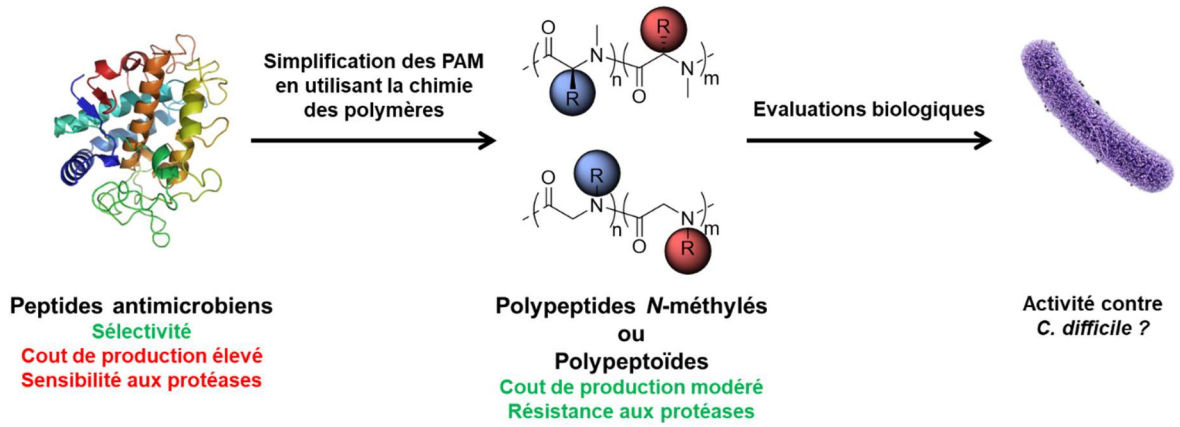
Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des biomolécules constituées d'acides aminés notamment produites par certains micro-organismes et ciblant virus, bactéries, fungi et parasites. L'efficacité des PAM s'explique par leur capacité à déstabiliser les membranes, une propriété physico-chimique liée à leur caractère amphiphile. A ce jour, le développement industriel des PAM reste assez limité à cause de leur cout de production élevé et de leur sensibilité aux peptidases, empêchant leur administration par voie orale. Ce dernier point est une limitation majeure pour traiter les infections causées par des pathogènes se trouvant dans le tube digestif comme *C. difficile*.

Les polymères synthétiques comme mimes simplifiés des PAM sont certainement des candidats thérapeutiques intéressants pour apporter une réponse efficace aux limites des PAM. Dans cette optique, la chimie des polymères permet la production de grandes quantités de produits à faible cout qui pourraient mimer les propriétés physico-chimiques des PAM. Parmi les polymères développés comme analogues de PAM, ceux constitués d'acides aminés, appelés polypeptides, semblent être de très bons supports à considérer pour se rapprocher des PAM. Cependant, bien que certains polypeptides aient démontré des activités antimicrobiennes prometteuses, ils possèdent la même sensibilité aux peptidases que les PAM.

Dans le but de produire des composés résistants aux peptidases, les polypeptides *N*-méthylés sur la liaison peptidique semblent être une option intéressante afin de conférer une résistance aux peptidases. La préparation de ces polypeptides implique l'utilisation de monomères appelés *N*-carboxyanhydrides-*N*-méthylés (NNCA) qui peuvent être polymérisés par une réaction de polymérisation par ouverture de cycle (ROP). Cette méthodologie de synthèse permet d'obtenir des copolymères sans aucun contrôle de séquence, mais modulant facilement la composition chimique, la taille et la topologie.

Dans ce travail de thèse, l'objectif a été de préparer de nouveaux copolypeptides amphiphiles pouvant résister aux peptidases avec une potentielle activité anti-*C. difficile* en utilisant la ROP de NNCA. Les copolymères ont été synthétisés à partir d'acides aminés issus de la biomasse possédant une chaine latérale « hydrophobe » ou « cationique », capables de mimer la capacité des PAM à déstabiliser la paroi bactérienne. Nous avons préparé une petite bibliothèque de copolypeptides obtenue en modulant leurs paramètres structuraux (hydrophobicité, taille, ratio hydrophobe/cationique) et nous avons étudié leur activité antibactérienne sur *C. difficile* en déterminant leur concentration minimum inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution ainsi que leur cytotoxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2.

En parallèle, dans le cadre d'une collaboration avec le doctorant Pedro Salas, nous avons testé l'activité vis-à-vis de *C. difficile* d'une bibliothèque de copolypeptoïdes amphiphiles, isomères de position de nos copolypeptides. Nous avons étudié l'influence de certains paramètres structuraux tels que l'hydrophobicité, la nature de la chaine latérale, de la nature de l'amorceur ou le degré de polymérisation. Ces tests ont été réalisés au laboratoire de pathogenèse des bactéries anaérobies (LPBA) de l'Institut Pasteur de Paris sous la supervision du Dr Bruno Dupuy. Pour l'ensemble de ces molécules, nous avons déterminé des CMI selon la méthode de microdilution sur plaque et, pour les meilleures d'entre-elles, nous avons mesuré les concentrations minimales vis-à-vis de la sporulation. De plus, nous avons étudié la résistance de certains de ces copolypeptoïdes à la protéolyse en déterminant des CMI après un traitement par la trypsine, une peptidase qui participe à la digestion des protéines.



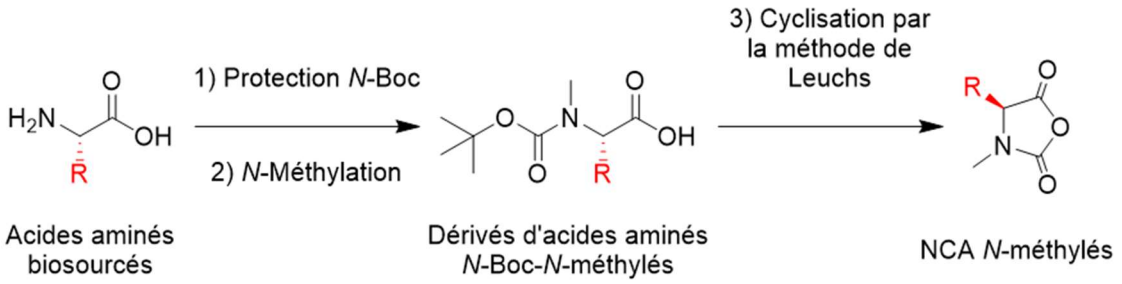
Le plan de cette thèse s'articule autour de 3 chapitres :

Le **chapitre 1** présente l'état de l'art concernant la bactérie *C. difficile*, une des principales causes d'infections nosocomiales mortelles chez les patients dont le microbiote est déstabilisé par une antibiothérapie à spectre large. Dans un second temps, nous présentons les peptides antimicrobiens (PAM) en détaillant les mécanismes par lesquels ils déstabilisent les membranes ainsi que les différents avantages et inconvénients que présentent ces biomolécules. Enfin nous décrivons comment la chimie des polymères permet d'obtenir des

analogues structuraux de PAM en apportant une étude bibliographique détaillée de l'utilisation de polymères et plus particulièrement de polypeptides comme agents antibactériens.

Le **chapitre 2** est consacré à la synthèse multi-étape de nouveaux monomères NNCA à partir d'acides aminés bio-sourcés possédant une chaine latérale hydrophobe (L-Alanine, D-Alanine, L-Leucine et L-Phénylalanine) ou une chaine latérale « cationique » à pH physiologique (L-Lysine). La méthodologie de synthèse peut être divisée en deux temps : 1) la synthèse d'intermédiaires *N*-Boc-*N*-méthylés en 2 étapes et 2) la cyclisation en NNCA par la méthode de Leuchs. La première étape a permis la synthèse de 4 acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés « hydrophobe » et 1 acide aminé *bis N*-méthylés « cationique » avec des rendements et des puretés élevés, une attention particulière ayant porté sur la vérification du caractère non racémisant du procédé de synthèse. Une méthodologie de synthèse a été étudiée pour préparer un second acide aminé *N*-méthylés « cationique » à partir de la L-Glutamine. La seconde étape a permis la synthèse de 5 NNCA dont la première description d'un NNCA de Lysine *bis N*-méthylée. Enfin, une brève optimisation de la purification des monomères NNCA a été effectuée, basée sur une filtration sur célite.

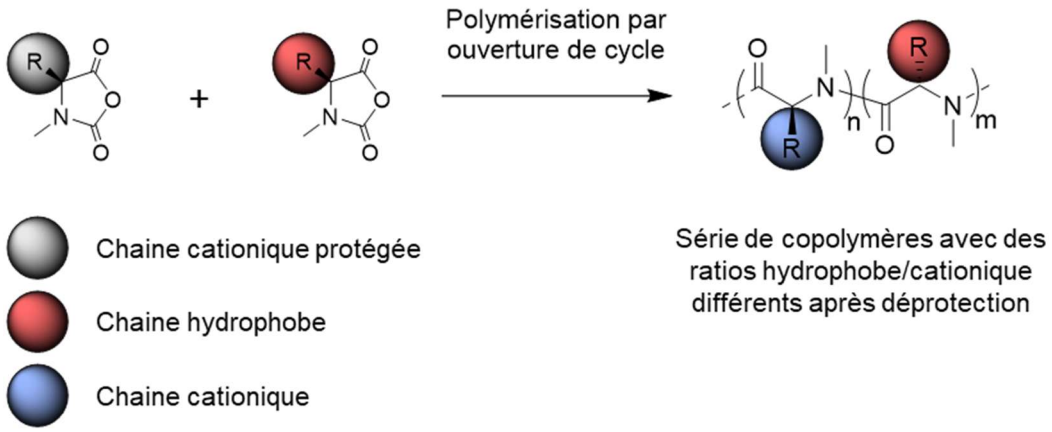
Objectif du chapitre 2



Le **chapitre 3** est d'abord consacré à l'étude de la polymérisation par ouverture de cycle des monomères NNCA préparés dans le chapitre 2. Nous avons d'abord étudié la cinétique de polymérisation d'homopolymères hydrophobes obtenus à partir de certains NNCA présentés dans le chapitre 2. Ces premières études ont permis d'étudier l'influence de la chaine latérale (encombrement stérique, structuration secondaire) sur la cinétique de la ROP. Ensuite, nous avons mis en œuvre des réactions de copolymérisation, en modulant certains

paramètres structuraux tels que l'hydrophobicité, la nature du monomère hydrophobe et le degré de polymérisation. Dans un second temps, nous avons évalué l'activité biologique d'une bibliothèque de copolypeptoïdes amphiphiles en déterminant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de *C. difficile* et des cytotoxicités vis-à-vis de la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2, comme modèle de la barrière intestinale. Ces études biologiques ont permis d'évaluer l'influence de divers paramètres structuraux (nature des monomères, hydrophobicité, nature de l'amorceur, degré de polymérisation, etc.) et, grâce à une approche RSA, d'optimiser les activités contre *C. difficile* en modulant ces paramètres.

Objectif du chapitre 3



Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration entre différentes équipes spécialisées en chimie thérapeutique, en chimie des polymères et en microbiologie, sous la co-direction des Pr Pierre Verhaeghe et Dr Colin Bonduelle.

Les travaux de synthèse organique ont été effectués par nos soins au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de Toulouse (UPR CNRS 8241), dans l'équipe K « Agents anti-infectieux Moléculaires et Macromoléculaires » dirigée par le Pr Pierre Verhaeghe. Les analyses RMN ont été réalisées au service de Résonance Magnétique Nucléaire du LCC, dirigée par le Dr Yannick Coppel. Les analyses Infrarouge ont été réalisées au service de spectroscopies électronique et vibrationnelle du LCC, dirigée par le Dr Jean-François Meunier.

Les analyses de diffraction des rayons X ont été réalisées au service de diffraction des rayons X du LCC, dirigée par le Dr Laure Vendier

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées par le Dr Valérie Bourdon et le Dr Eric Leroy au service de spectrométrie de masse de l'institut de Chimie de Toulouse (ICT FR2599).

Les analyses de chromatographie par exclusion stérique ont été réalisées par Dr Pedro Salas, le Dr Amélie Vax-Weber et le Dr Colin Bonduelle au laboratoire de Chimie des polymères organiques (LCPO) de Bordeaux (UMR 5629) dans l'équipe « Polymer self-assembly and life sciences » dirigée par le Pr Sébastien Lecommandoux.

La détermination des CMI sur *C. difficile,* sur les spores de *C. difficile* et les études de protéolyse ont été réalisées par nos soins sous la supervision du Dr Bruno Dupuy au Laboratoire de Pathogénèse des Bactéries Anaérobies (LPBA) de l'Institut Pasteur de Paris.

Les études de cytotoxicité ont été réalisées par le Dr Sandra Bourgeade-Delmas au Laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le Développement (PHARMA-DEV) de Toulouse (UMR 152 IRD-UPS) dans l'équipe « CHIPS : Chimiodiversité et biologie des pathologies du sud » dirigée par les Dr Agnès Aubouy et Valérie Jullian.

A ce jour, ce travail de thèse a contribué à l'écriture d'une revue, de 4 articles scientifiques et d'un brevet licencié à la société Vibiosphen :

- P. Salas-Ambrosio, **A. Tronnet**, P. Verhaeghe and C. Bonduelle, Synthetic polypeptide polymers as simplified analogues of antimicrobial peptides, *Biomacromolecules*, **2021**, 22, 57 – 75

- P. Salas-Ambrosio, **A. Tronnet**, M. Since, S. Bourgeade-Delmas, J.-L. Stigliani, B. Dupuy, P. Verhaeghe and C. Bonduelle, Cyclic poly(α-peptoid)s by LIHMDS-mediated ring-

expension polymerization: simple access to bioactive backbones, *Journal of the American Chemican Society*, **2021**, 143, 3697 – 3702.

- P. Salas-Ambrosio, **A. Tronnet**, M. Badreldin, L. Reyes, M. Since, S. Bourgeade-Delmas, B. Dupuy, P. Verhaeghe and C. Bonduelle, Star-like poly(peptoid)s with antimicrobial potency, *Polym. Chem.*, **2022**, 13, 600-612

- P. Salas-Ambrosio, **A. Tronnet**, M. Badreldin, S. Ji, S. Lecommandoux, S. Harrisson, P. Verhaeghe and C. Bonduelle, Effect of N-alkylation in N-carboxyanhydride (NCA) ring opening polymerization kinetics, *Polym. Chem*., **2022**, 13, 6149 – 6161

- C. Bonduelle, P. Verhaeghe, B. Dupuy, **A. Tronnet** and P. Salas-Ambrosio, Antimicrobial Cationic Peptoid and *N*-substituted Peptidic Copolymers, Preparation and Uses Thereof. EP 21305198.0, **2021**

Chapitre 1 : Analogues polymériques de peptides antimicrobiens dans la lutte contre les infections à *Clostridioides difficile*

1. Résistance aux antimicrobiens

Les antimicrobiens sont des substances chimiques naturelles ou de synthèse utilisées pour traiter les infections microbiennes d'origine bactérienne, mycosique, virale ou parasitaire. Les antibiotiques sont une classe d'antimicrobiens qui sont utilisés pour traiter les infections bactériennes. Depuis la découverte des premiers antibiotiques entre 1930 et 1940, leur utilisation croissante permet chaque année de sauver des millions de vies.[1] Malheureusement, leur efficacité est menacée par la capacité des bactéries à s'adapter et à développer des résistances.[2] Cette résistance aux antimicrobiens (RAM) se définit donc comme la capacité d'un micro-organisme à contrer l'action d'un ou plusieurs agent(s) antimicrobien(s) au(x)quel(s) il était auparavant sensible. La RAM peut être induite par des modifications génétiques qui, par exemple, vont modifier l'enveloppe bactérienne, la cible de l'agent antimicrobien, induire la production d'enzyme inhibitrice de l'agent antimicrobien ou encore la production de pompes à efflux (**Figure 1**). La RAM est l'un des plus grands défis de santé publique de notre époque qui implique la mise en place d'une stratégie collective et totale de tous les domaines de recherche.[3] Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les principaux facteurs de risque de la RAM sont un usage inadapté des antibiotiques et une utilisation excessive ou abusive d'antibiotiques, tant en médecine humaine que vétérinaire. D'autres éléments tels que le manque d'accès à l'eau potable, le manque de contrôle et de prévention dans les établissements de soins de santé et le manque d'accès à des médicaments, vaccins ou à des diagnostics abordables sont aussi des facteurs de risque accélérant l'émergence et la

[1] WHO, *Antibiotic resistance*, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance. Consulté le 15/09/21
[2] Fair, R. J.; Tor, Y., *Perspect Medicin Chem,* **2014**, *6*, 25-64
[3] WHO. (**2021**). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021*. WHO. https://apps.who.int/iris/handle/10665/341666. Consulté le 15/09/21

propagation de RAM.[4] Ainsi, au niveau mondial, près de 700 000 décès par an sont imputés aux RAM à ce jour[5] et on estime à 10 millions le nombre de ces décès annuels d'ici 2050, ce qui ferait de la RAM l'une des premières causes de mortalité.[6] En Europe, le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC, pour European Centre for Disease Prevention and Control) estime que 33000 décès sont dus chaque année à des bactéries résistantes aux antibiotiques.[7] Au-delà du nombre de décès, la RAM a un fort impact sur les budgets des systèmes de santé ; par exemple, aux USA, selon les centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC, pour Centers for Disease Control and Prevention), le coût annuel des soins de santé attribuable aux RAM est estimé à 20 milliards de dollars auxquels viennent s'ajouter 35 milliards de dollars liés à la perte de productivité.[8] En Europe, le coût annuel des soins de santé pour lutter contre la RAM est estimé à 1,2 milliard d'euros.[9]

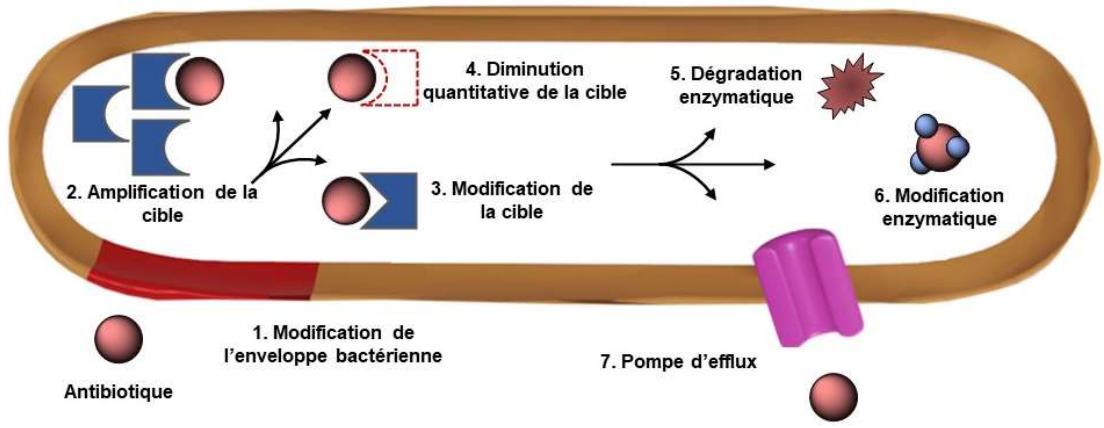


Figure 1 *: Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (1) modification de l'enveloppe bactérienne, (2) amplification de la cible, (3) modification de la cible, (4) diminution quantitative de la cible (ou des enzymes activatrices pour certaines prodrogues), (5) dégradation enzymatique, (6) modification enzymatique de la structure de l'antibiotique et (7) des pompes d'efflux.*

En plus de la surconsommation d'antibiotique, d'autres facteurs expliquent l'accélération exponentielle de la RAM. Par exemple, la relation entre la RAM et les infections

[4] WHO, *Antimicrobial resistance*, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. Consulté le 15/09/21
[5] ECDC. (**2020**). *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) – Annual Epidemiological Report for 2019. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019*. Consulté le 15/09/21
[6] de Kraker, M. E. A. *et al*., S. *PLoS Med,* **2016**, *13* (11), e1002184.
[7] Cassini, A. *et al., The Lancet Infectious Diseases,* **2019**, *19* (1), 56-66.
[8] Dadgostar, P. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3903-3910.
[9] Reigadas Ramírez, E.; Bouza, E. S. Economic Burden of Clostridium Difficile Infection in European Countries. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; *1050*, 1-12.

nosocomiales, aussi appelées infections associées aux soins, constitue un grave problème de santé publique depuis le début de la commercialisation et de l'utilisation des antibiotiques.[10,11] Une infection est dite nosocomiale si elle se déclare au minimum 48 heures après l'admission dans un établissement de santé (hôpital, clinique, maison de retraite…). Ces infections surviennent lors de prestations de soins (procédures chirurgicales, utilisation de dispositifs médicaux, traitement médicamenteux) dans un environnement hospitalier soumis à une très forte pression antibactérienne. Bien que cette pression contrôle la prolifération des bactéries, elle impose également une sélection non naturelle favorisant l'émergence de souches multirésistantes.[12]

La formation de biofilms représente un autre paramètre clé de la résistance aux antimicrobiens.[13] Les biofilms sont un assemblage structuré de cellules bactériennes maintenues ensemble par une matrice glycoprotéique comparable aux tissus formés par les cellules eucaryotes.[14] Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries qui composent le biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et possèdent une résistance accrue aux anti-infectieux (antibiotiques et désinfectants).[15] Les antibiotiques tuent généralement les bactéries planctoniques qui sont libérées du biofilm mais sont souvent incapables de détruire le biofilm en lui-même.[16] Plus grave, la résistance du biofilm aux biocides pourrait favoriser l'apparition de résistance chez les bactéries dormantes protégées au cœur du biofilm, ce qui engendrerait la propagation de « superbactéries » multi-résistantes.[14,17]

Un dernier problème réside dans l'insuffisance des travaux de recherche pour développer de nouveaux antibiotiques. En 2021, l'OMS a déclaré que la recherche de

[10] Stewart, S. *et al*., *J. Hosp. Infect.,* **2021**, *114*, 10-22.
[11] Stewart, S. *et al., J. Hosp. Infect.,* **2021**, *114*, 32-42.
[12] Haque, M. *et al., Infect. Drug. Resist.,* **2018**, *11*, 2321-2333.
[13] Folliero, V. *et al., Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 1-11.
[14] Hall-Stoodley, *et al., Nat. Rev. Microbiol.,* **2004***, 2* (2), 95-108.
[15] Gebreyohannes, G. *et al.*, *Heliyon,* **2019***, 5* (8), e02192.
[16] Li, J. *et al*., *Nano Lett.,* **2018***, 18* (7), 4180-4187.
[17] Frost, L. R. *et al*., *PLOS Pathog.,* **2021***, 17* (3), e1009348.

nouveaux antibiotiques manquait cruellement d'investissements et de développements technologiques pour faire face au problème de la RAM (**Figure 2**).[18] En effet, l'OMS a recensé 43 antibiotiques en développement clinique en 2020, dont 7 seulement ont été considérés comme innovants. La plupart des nouveaux antibiotiques en cours de développement apportent en effet peu d'avantages significatifs par rapport aux médicaments existants, notamment du fait de structures chimiques trop proches de celles des substances actives commercialisés.[19,20]

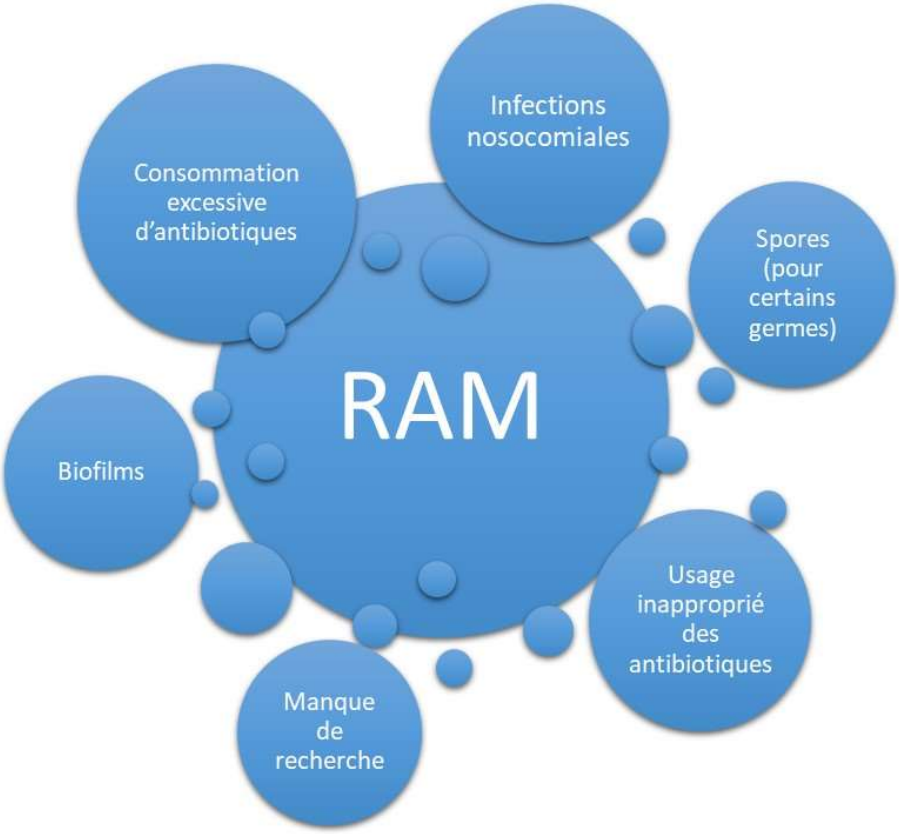


Figure 2 : *Les principales causes de la RAM*

Actuellement, nous faisons donc face à des bactéries multi-résistantes, que l'on peut considérer comme de nouvelles « superbactéries », avec un arsenal thérapeutique largement insuffisant. En 2020, l'OMS et le CDC ont publié une liste de pathogènes présentant des

[18] WHO, *Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infection*, https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections. Consulté le 15/09/21

[19] *2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis,* World Health Organization: Geneva, **2021**

[20] Miethke, M. *et al*., *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5*, 726-749.

risques importants pour la santé à cause de leurs multirésistances (**Tableau 1**).[21] Ainsi, des projets de recherche sur de nouvelles molécules présentant des mécanismes d'action innovants doivent être développés afin de lutter contre la RAM.[22,23,24]

Tableau 1 : *Liste des micro-organismes résistants présentant une menace pour la santé selon l'OMS*

MENACES URGENTES	
Acinetobacter résistantes aux carbapénèmes	Bactérie Gram négatif
Candida auris résistant aux antifongiques	Champignon
Clostridioides difficile	**Bactérie Gram positif**
Enterobacteriaceae résistantes aux carbapénèmes	Bactérie Gram négatif
Neisseria gonorrhoeae résistante aux antibiotiques	Bactérie Gram négatif
MENACES SERIEUSES	
Campylobacter résistantes aux antibiotiques	Bactérie Gram négatif
Candida résistantes aux antifongiques	Champignon
Enterobacteriaceae productrices des *β*-lactamases à spectre large	Bactérie Gram négatif
Enterococci résistantes à la vancomycine	Bactérie Gram positif
Pseudomonas aeruginosa multi-résistante	Bactérie Gram négatif
Salmonella résistantes aux antibiotiques	Bactérie Gram négatif
Staphylococcus aureus résistante à la méticilline (MRSA)	Bactérie Gram positif
Streptococcus pneumoniae résistante aux antibiotiques	Bactérie Gram positif
M. tuberculosis résistante aux antibiotiques	Mycobactérie
Shigella résistantes aux antibiotiques	Bactérie Gram négatif
MENACES PREOCCUPANTES	
Streptococcus du groupe A résistante à l'érythromycine	Bactérie Gram positif
Streptococcus du groupe B résistante à la clindamycine	Bactérie Gram positif
MENACES EN SURVEILLANCE	
Aspergillus fumigatus résistant aux antifongiques azolés	Champignon
Mycoplasma genitalium résistante aux antibiotiques	Bactérie Gram positif
Bordetella pertussis résistante aux antibiotiques	Bactérie Gram négatif

2. Infection à *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile, anciennement *Clostridium difficile* ou *C. difficile*, est un bacille anaérobie strict Gram positif (**Figure 3**). *C. difficile* fût identifié pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole dans la flore intestinale de nouveau-né.[25] A cette époque, il est surnommé

[21] WHO, *Biggest Threats and Data*, https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html. Consulté le 15/09/21
[22] Cattoir, V.; Felden, B. *J., Infect. Dis.* **2019**, *220* (3), 350-360.
[23] Kauss, T. *et al., Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1054.
[24] Claudel, M. *et al*., *Chemistry* **2020**, *2* (4), 849-899.
[25] Hall, I.; O'toole, E. *Am. J. Diseases Child.* **1935**, *49*, 390.

« *Bacillus difficilis* » du fait de son isolement et de sa culture *in vitro* difficile. Ce n'est qu'à la fin des années 1970 et la caractérisation détaillée de la bactérie, renommée *C. difficile* entre temps, qu'il a été possible d'établir son implication dans la survenue de colites pseudomembraneuses liées à la prise d'antibiotique.[26] En effet, les travaux de Bartlett *et al.* ont montré que la prise de lincomycine ou de clindamycine, deux antibiotiques de la famille des lincosamides, pouvait engendrer des colites pseudomembraneuses dues à la présence de *C. difficile*.[27]

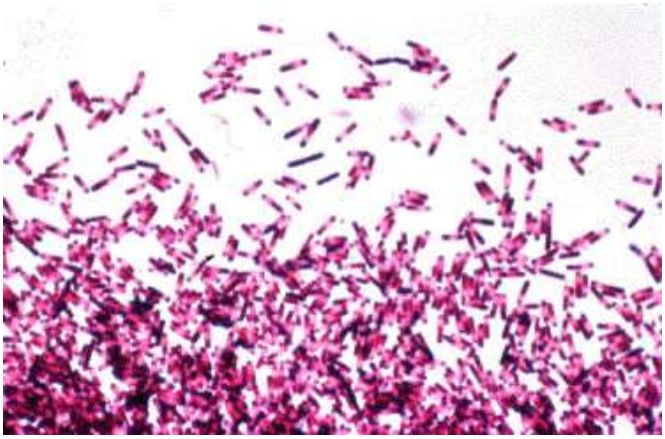


Figure 3 : *Microscopie optique x1000 d'une culture de C. difficile en coloration de Gram*[28]

L'infection à *Clostridioides difficile* (ICD) est la principale conséquence de la colonisation du tube digestif par une souche toxinogène de *C. difficile*. Cette colonisation peut se manifester par des diarrhées, avec ou sans melaena, accompagnées de fièvre et de douleurs abdominales. Plus rarement, des complications souvent létales comme des inflammations sévères du colon (colite pseudo-membraneuse ou mégacôlon toxique) (**Figure 4**), une perforation intestinale, une septicémie et/ou un dysfonctionnement de plusieurs organes, peuvent survenir.[29] Aujourd'hui, *C. difficile* est considérée comme l'une des principales causes d'infections associées aux soins (IAS), aussi appelées infections nosocomiales. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), en France, *C. difficile* serait

[26] Tedesco, F. J. *Ann. Intern. Med.* **1974**, *81* (4), 429.
[27] Bartlett, J. G. *et al*., *J. Infect. Dis.* **1977**, *136* (5), 701-705.
[28] Buyse, S. *et al*., *Réanimation* **2005**, *14* (4), 255–263.
[29] Vaishnavi, C. *Indian J. Med. Res*. **2010**, *131* (4), 487-499.

responsable de 10 à 25% des cas de diarrhées post-antibiotiques, de 10% des cas de diarrhées nosocomiales et de plus de 95% des cas de colites pseudo-membraneuses.[30]

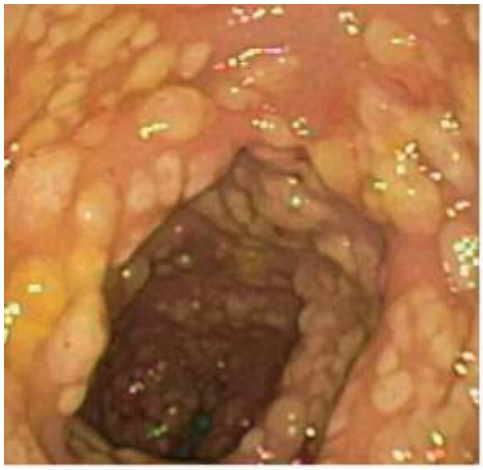


Figure 4 : *Image par endoscopie d'une colite pseudomembraneuse causée par une infection à C. difficile. En rose les tissus sains et en jaune les pseudomembranes dues à C. difficile.*[31]

2.1. Epidémiologie des infections à *C. difficile*

Avant les années 2000, la surveillance des ICD n'était pas systématique. Ce n'est qu'après l'observation d'une augmentation des taux d'incidences des ICD en Amérique du nord et en Europe que plusieurs agences ont décidé de mettre en place une surveillance épidémiologique.[32,33] Ces études reposent sur le typage moléculaire de *C. difficile* et ont mis en évidence plusieurs souches hypervirulentes dont le ribotype PCR 027, principal responsable de nombreuses épidémies en Amérique du Nord et en Europe.[34] Ce ribotype a été associé à une infection plus grave, avec un risque accru de récurrence et de décès.[35] D'autres souches hypervirulentes de *C. difficile*, tel que le ribotype PCR 078, sont également responsables d'épidémies en Europe, en Amérique centrale, en Asie et en Australie.[36]

[30] Eckert, C.; Barbut, F. *Médecine/sciences* **2010**, *26* (2), 153-158.
[31] Smits, W. K. *et al*., *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2* (1), 16020
[32] Archibald, L. K. *et al*., *J. Infect. Dis.* **2004**, *189* (9), 1585-1589.
[33] Kuijper, E. J. *et al*., *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 2-18.
[34] Couturier, J.; Davies, K.; Gateau, C.; Barbut, F. Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; Vol. 1050, 45-58.
[35] O'Connor, J. R. *et al., Gastroenterology* **2009**, *136* (6), 1913–1924.
[36] Balsells, E. *et al*., *J. Glob. Health* **2019**, *9* (1).

L'ICD est une pathologie qui intervient majoritairement chez des patients âgés de plus de 65 ans, hospitalisés sur une longue période et sous traitement antibiotique à large spectre. Pendant longtemps considérée comme une infection se développant presque exclusivement dans les établissements de santé, l'ICD est de plus en plus souvent détectée chez des personnes n'ayant pas séjourné récemment dans un hôpital.[37] Aujourd'hui, *C. difficile* est l'agent pathogène le plus fréquemment signalé aux USA.[38] Selon une étude menée par le CDC, il y aurait dans ce pays plus de 476 000 ICD par an dont 170 000 d'origine communautaire avec un nombre de décès d'environ 30 000. Entre 2011 et 2017, le nombre d'ICD déclarées dans les établissements de santé aux USA a diminué, passant de 306 500 cas en 2011 à 235 700 en 2017, tandis que le nombre de cas d'origine communautaire a lui augmenté de plus de 30%, passant de 170 000 en 2011 à 226 400 en 2017.[37] En Europe, selon l'ECDC, il y a près de 150 000 nouveaux cas d'ICD chaque année pour 8500 décès.[39] Le cout des soins de santé associés à une ICD est estimé à 5 milliards de dollar par an aux Etats-Unis et entre 870 millions et 1,7 milliards d'euros pour l'Europe.[40,9] En France, depuis 2018, il n'y a plus de surveillance systématique des ICD. Les dernières données épidémiologiques qui couvrent la période de 2010 à 2016 ont montré une augmentation du nombre annuel de cas d'ICD passant de 9000 cas à près de 20 000 cas. Ainsi, l'incidence de l'ICD est passée de 1,5 pour 10 000 jours-patients en 2010 à 3,6 pour 10 000 jours-patients en 2016 soit une augmentation d'environ 14% par an.[41] De ce fait, *C. difficile* est aujourd'hui l'un des micro-organismes qui suscitent le plus de préoccupations. Récemment, *C. difficile* a

[37] Fu, Y. *et al*., *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2021**, *14*, 1-11.
[38] Lessa, F. C. *et al*., *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372* (9), 825-834.
[39] Wiuff, C. *et al*., The Need for European Surveillance of CDI. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; Vol. 1050, 13-25
[40] Guh, A. Y. *et al*., *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (14), 1320-1330.
[9] Reigadas Ramírez, E.; Bouza, E. S. Economic Burden of Clostridium Difficile Infection in European Countries. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; Vol. 1050, 1-12.
[41] Colomb-Cotinat, M. *et al*., *Eurosurveillance* **2019**, *24* (35), 7-16.

été placé par l'OMS et le CDC sur la liste des pathogènes nécessitant une action urgente que ce soit dans la surveillance épidémique et la prise en charge (**Tableau 1**).[21]

2.2. Pathogénèse de l'infection à *C. difficile*

2.2.1. Germination et croissance de *C. difficile*

Comme toutes les clostridies, *C. difficile* est une bactérie qui a la faculté de sporuler, facilitant sa propagation d'hôte en hôte par voie oro-fécale. Les spores sont des cellules dormantes capables de résister à des conditions environnementales hostiles, comme des températures élevées, à la présence d'oxygène mais aussi à certains désinfectants et antibiotiques.[42,43,44] On retrouve fréquemment ces spores dans les établissements de santé lors d'épidémie à *C. difficile*, notamment sur les poignées de portes. En effet, sous sa forme métaboliquement active, appelée forme végétative, *C. difficile* n'a aucune chance de survivre à l'environnement oxygéné extérieur. Après ingestion, la germination des spores est initiée au niveau du duodénum lorsque des récepteurs spécifiques, présents sur la surface de la spore, détectent des petites molécules appelées germinants (**Figure 5**).[45] Dans le cas des spores de *C. difficile*, il semble que le récepteur soit une protéine de type sérine-protéase appelée CspC. Ce récepteur est activé en présence d'acides biliaires primaires : l'acide taurocholique et d'un co-germinant, la L-glycine.[46] Suite à l'activation du processus de germination, une cascade protéolytique s'enclenche, conduisant à la dégradation du peptidoglycane qui compose la spore, à la libération d'acide dipicolinique (DPA) et d'ions calcium suivie par la réhydratation de la spore (**Figure 6**).[45] La transformation d'une spore de *C. difficile* en forme végétative est un mécanisme extrêmement rapide (< 5 minutes). Il est important de noter que tous les acides biliaires ne sont pas favorables à la germination de la spore ou à la croissance de la cellule végétative. Ainsi, l'acide désoxycholique, un acide biliaire secondaire, favorise la germination

[21] WHO, *Biggest Threats and Data*, https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html. Consulté le 15/09/21.
[42] Setlow, P.; Johnson, E. A. Spores and Their Significance. In *Food Microbiology*; Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., Hill, C., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, **2019**, 23-63.
[43] Paredes-Sabja, D. *et al.*, *Trends Microbiol.* **2014**, *22* (7), 406-416.
[44] Zhu, D. *et al.*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 29.
[45] Kochan, T. J. *et al.*, *J. Bacteriol.* **2018**, *200* (16).
[46] Kochan, T. J. *et al.*, *PLOS Pathog.* **2017**, *13* (7), e1006443.

mais limite fortement la croissance végétative tandis que l'acide chenodésoxycholique, un acide biliaire primaire, inhibe la germination des spores de *C. difficile* en agissant comme inhibiteur compétitif de l'acide taurocholique.[47] En plus de l'acide taurocholique et de la glycine, il est important de noter que l'ion calcium joue un rôle critique dans la germination des spores. Dans une étude récente, Kochan et ses collaborateurs ont en effet constaté que les spores de *C. difficile* ne peuvent pas germer dans un milieu riche en acide taurocholique privé d'ions calcium, prouvant son rôle essentiel dans la germination.[46]

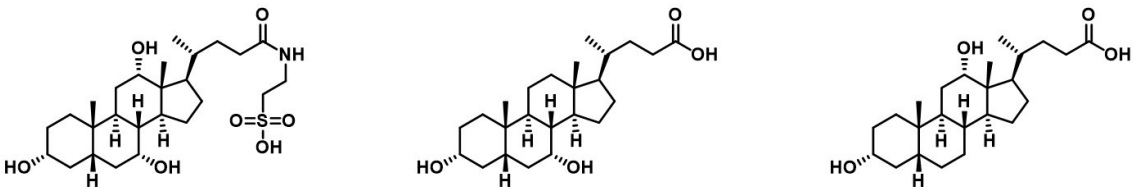


Figure 5 : *Structures des acides biliaires jouant un rôle dans la germination des spores de C. difficile.*

2.2.2. Sporulation de *C. difficile*

Quand elle se trouve dans la phase stationnaire de son développement au niveau du colon et que les nutriments deviennent limitants, *C. difficile* peut déclencher un mécanisme appelé sporulation (**Figure 6**).[45] Au même titre que la germination, la sporulation est une étape critique dans l'apparition de l'ICD. Bien qu'elle ne soit pas une forme métaboliquement active, la spore est essentielle dans le cycle de vie de *C. difficile*.[44] En réponse au stress, *C. difficile* forme 2 compartiments : un petit compartiment, appelé pré-spore, et un grand compartiment appelé cellule mère, qui accompagnera la pré-spore dans sa maturation. La pré-spore est libérée dans l'environnement suite à la lyse de la cellule mère et donne une spore qui contient l'ensemble du matériel génétique de *C. difficile*. La spore peut alors germer et reformer une nouvelle cellule végétative quand les conditions extérieures redeviennent favorables à sa

[47] Sorg, J. A.; Sonenshein, A. L. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (7), 2505-2512
[46] Kochan, T. J. *et al*., *PLOS Pathog.* **2017**, *13* (7), e1006443
[45] Kochan, T. J. *et al*., *J. Bacteriol.* **2018**, *200* (16).
[44] Setlow, P.; Johnson, E. A. Spores and Their Significance. In *Food Microbiology*; Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., Hill, C., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, **2019**, 23-63.

survie.[48] La spore participe activement au développement et à la propagation de l'ICD en étant le point de départ de l'infection et l'agent qui revêt souvent un caractère épidémique.[31] Dans les services hospitaliers et les unités de soins intensifs, 49% des surfaces des chambres occupées par des patients atteints d'ICD sont contaminées par des spores de *C. difficile*. Ce chiffre descend à 29% pour des chambres occupées par des patients asymptomatiques.[49]

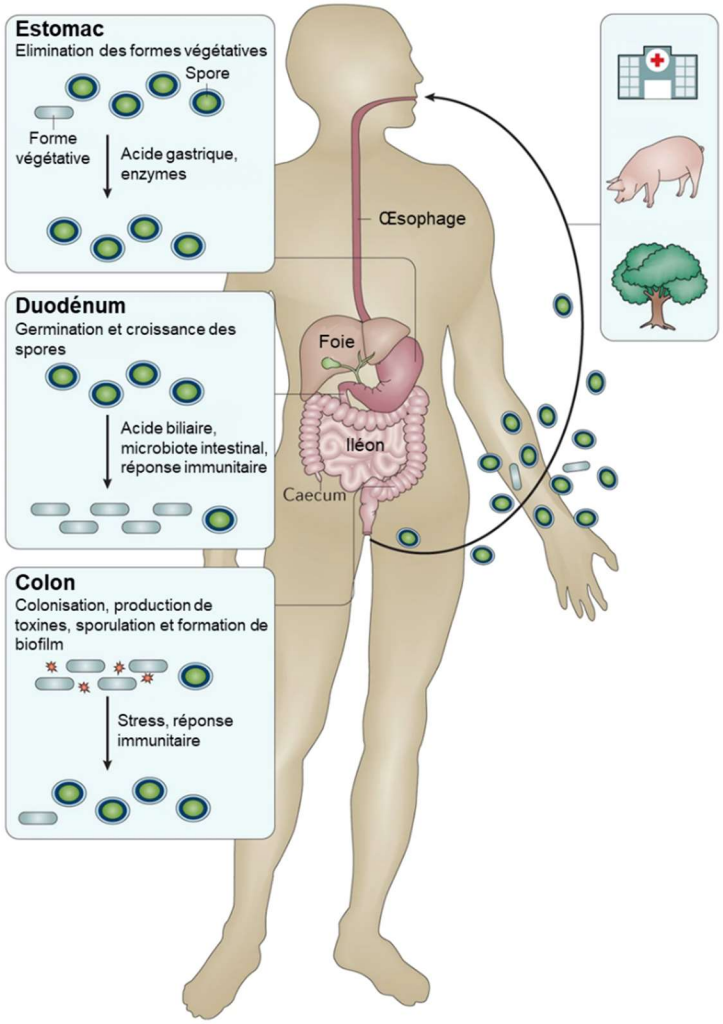


Figure 6 : Le c*ycle de vie de C. difficile : de la colonisation à la sporulation d'après Smits et al*[31]

2.2.3. Les facteurs de risque de l'infection à *C. difficile*

Il existe plusieurs facteurs de risque qui favorisent l'apparition de l'ICD chez un patient.[50,51] La prise d'antibiotique est un élément important dans l'augmentation du risque

[48] Paredes-Sabja, D. *et al.*, *Trends Microbiol.* **2011**, *19* (2), 85-94.
[31] Smits, W. K. *et al.*, *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2* (1), 16020.
[49] Gerding, D. N. *et al.*, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46* (s1), S43–S49.
[50] Eze, P. *et al.*, *J. Glob. Health* **2017**, *7* (1), 010417.
[51] Davies, K. *et al.*, *Front. Public Health* **2020**, *8*, 293.

d'apparition d'une ICD. En effet, le microbiote intestinal est un écosystème complexe composé de plus d'un millier d'espèces de bactéries. Chez un adulte sain, il joue notamment un rôle essentiel dans la protection contre les agents pathogènes. Cependant, l'utilisation d'antibiotiques, plus particulièrement des antibiotiques à large spectre, peut entrainer une perturbation de l'équilibre du microbiote intestinal, appelée dysbiose intestinale. Les changements dans la flore intestinale peuvent en effet entrainer une dégradation de la résistance du tube digestif face à la colonisation, la germination, la croissance et la propagation de *C. difficile*.[52] Parmi les antibiotiques les plus souvent associés au développement d'une ICD, on retrouve les aminopénicillines comme l'amoxicilline, les céphalosporines, la clindamycine et les fluoroquinones.[53] Ainsi, le risque de développer une ICD est 10 fois plus élevé pendant un traitement antimicrobien jusqu'à 4 semaines suivant l'arrêt de cette antibiothérapie. Ce risque demeure 3 fois plus élevé pendant les 3 mois suivant l'arrêt de l'antibiothérapie.[31] Il existe d'autres facteurs de risque d'ICD reconnus comme une hospitalisation récente ou de longue durée et un âge élevé (> 65 ans).[54,55] Des études ont montré que le risque de contracter une ICD était 10 fois plus important chez des patients hospitalisés âgés de plus de 65 ans que chez des patients hospitalisés plus jeunes.[56] De même, une hospitalisation de longue durée augmente le risque d'être exposé aux spores de *C. difficile*.[50]

2.2.4. Les facteurs de virulence de l'infection à *C. difficile*

2.2.4.1. Les toxines A et B

Plusieurs facteurs de virulence[57] sont associés au développement d'une ICD, le plus connus étant la production de deux toxines : la toxine A (TcdA) et la toxine B (TcdB) codées

[52] Schäffler, H.; Breitrück, A. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 646
[53] Leffler, D. A., Lamont, J. T. *N. Engl. J. Med*. **2015**, *371*, 1539-1548
[31] Smits, W. K. *et al*., *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2* (1), 16020
[54] Miller, M. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50* (2), 194-201.
[55] Lessa, F. C. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, S65-S70.
[56] Pepin, J. *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, *173* (9), 1037-1042
[50] Eze, P. *et al*., *J. Glob. Health* **2017**, *7* (1), 010417.
[57] Janoir, C. *Anaerobe* **2016**, *37*, 13-24.

dans le locus de pathogénicité de *C. difficile*.[58,59] TcdA et TcdB sont deux grandes protéines (308 et 270 kDA respectivement) homologues à des glucosyl-transférases qui désactivent les GTPases de la famille Rho et Rac présentes dans le cytosol des cellules ciblées.[60] Cette désactivation perturbe le cytosquelette et entraine la perte des jonctions serrés entre les cellules épithéliales du colon conduisant à la nécrose des tissus et à une réponse inflammatoire (**Figure 7**). La contribution précise de TcdA et TcdB dans l'ICD a fait l'objet de nombreux travaux récents.[61] Des études par délétion de gènes ont montré que TcdB seule est capable de provoquer une ICD au contraire de TcdA.[62,63] Des différences existent dans les séquences des gènes qui codent TcdB parmi les souches de *C. difficile*, ce qui contribue à des différences de virulence entre chaque souche. Des études sur la souche hypervirulente de ribotype 027 ont mis en évidence une toxicité 4 fois plus importante par rapport à des souches dites typiques.[64]

Dans le locus de pathogénicité de *C. difficile*, on retrouve, en plus des gènes codant pour TcdA et TcdB, des gènes codant pour 3 autres protéines : TcdR (parfois appelée TcdD), TcdC et TcdE. TcdR est un facteur *sigma* qui favorise l'expression de TcdA et TcdB en facilitant la liaison de l'ARN polymérase aux promoteurs des gènes de TcdA et TcdB.[65] Au contraire, TcdC est un facteur *anti-sigma* qui régule négativement l'expression des gènes de TcdA et TcdB en s'associant directement à l'ADN simple brin pour inhiber la transcription de TcdA et TcdB.[66] L'hypervirulence a été associée à des délétions dans la séquence de TcdC, mettant en lumière son rôle dans la régulation de TcdA et TcdB. La dernière protéine, TcdE,

[58] Lyerly, D. M. *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1*, 18.
[59] Chandrasekaran, R.; Lacy, D. B. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41* (6), 723-750.
[60] Chen, S. *et al.*, *Toxins* **2015**, *7* (12), 5254-5267.
[61] Kuehne, S. A. *et al.*, *Nature* **2010**, *467* (7316), 711-713.
[62] Lyras, D. *et al.*, *Nature* **2009**, *458* (7242), 1176-1179.
[63] Kuehne, S. A. *et al.*, *J. Infect. Dis.* **2014**, *209* (1), 83-86.
[64] Lanis, J. M. *et al.*, *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (8), e1003523.
[65] Mani, N.; Dupuy, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (10), 5844-5849.
[66] Matamouros, S. *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2007**, *64* (5), 1274-1288.

est une protéine de type porine qui semble faciliter la libération de TcdA et TcdB en perméabilisant la paroi cellulaire de *C. difficile*.[67]

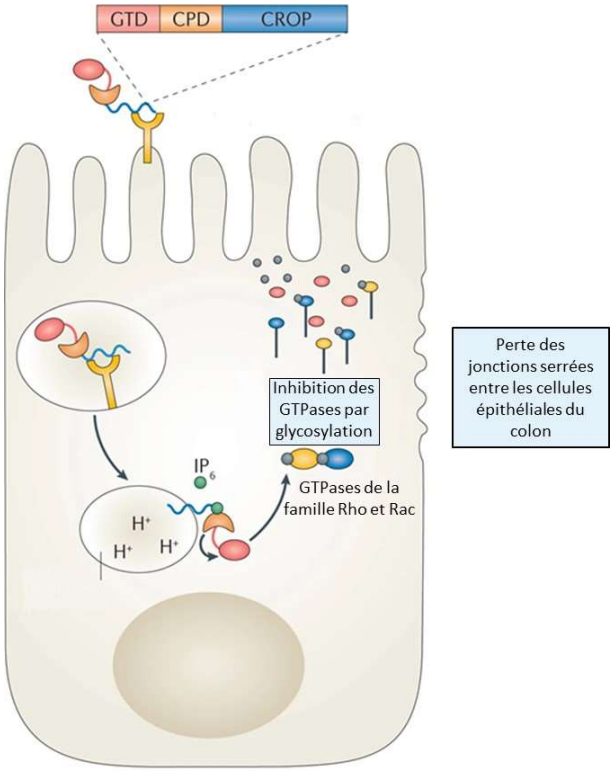


Figure 7 : *Mécanisme d'action de TcdA et TcdB sur une cellule épithéliale du colon d'après Abt et al*[68]

2.2.4.2. La toxine binaire ou *C. difficile* transférase

Certaines souches de *C. difficile*, dont la souche ribotype 027, produisent une autre toxine appelée toxine binaire ou *C. difficile* transférase (CDT).[66] Elle n'est pas codée dans le locus de pathogénicité et semble renforcer la virulence de certaines souches. Même si son rôle dans la virulence n'a pas été parfaitement démontré, des corrélations ont été faites entre son expression et une mortalité plus élevée.[69] CDT est composée de 2 protéines. La première est une ADP-ribosyltransférase (CdtA) qui réalise une ADP-ribosylation de l'actine des cellules eucaryotes. Cette modification perturbe la polymérisation du réseau d'actine ce qui a pour conséquence principale de favoriser l'adhésion de *C. difficile*. La seconde protéine appelée

[67] Govind, R.; Dupuy, B. *et al*., *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (6), e1002727.
[68] Abt, M. C. *et al*., *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (10), 609-620.
[66] Kuehne, S. A. *et al*., *J. Infect. Dis.* **2014**, *209* (1), 83-86.
[69] Gerding, D. N. *et al*., *Gut Microbes* **2014**, *5* (1), 15-27.

CdtB favorise l'insertion de CdtA dans le cytosol en perméabilisant les cellules ciblées (**Figure 8**).[67]

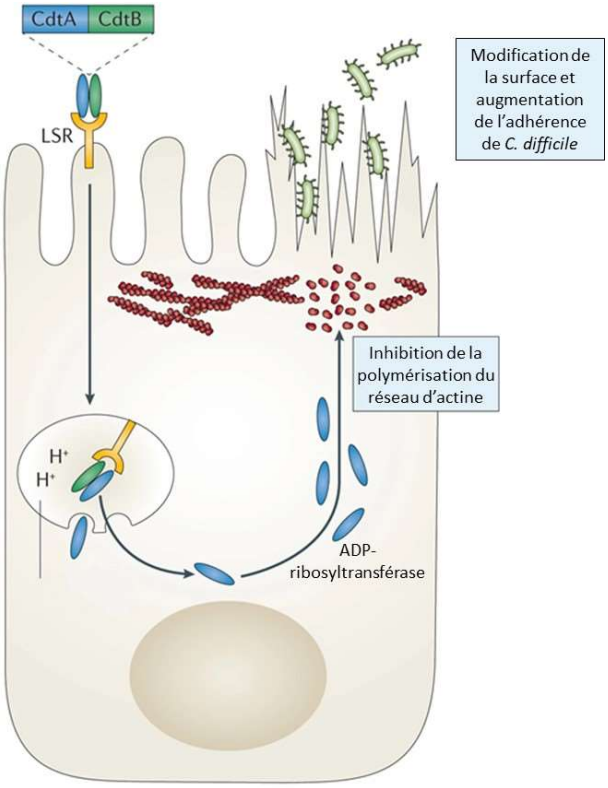


Figure 8 : *Mécanisme d'action de la toxine binaire CDT sur une cellule épithéliale du colon d'après Abt et al*[68]

2.2.4.3. Les autres facteurs de virulence

Un autre facteur de virulence repose sur la capacité de *C. difficile* à former des biofilms.[17] Les biofilms sont un assemblage structuré de cellules bactériennes maintenues ensemble par une matrice adhésive et protectrice. Au sein du biofilm, les bactéries peuvent survivre dans des conditions hostiles, résister à la réponse immunitaire d'un hôte et développer une résistance accrue aux antibiotiques.[13] Dans le cas de *C. difficile*, le biofilm assure la protection des cellules végétatives en les isolant du stress oxydatif, des anticorps et des

[67] Govind, R.; Dupuy, B. *et al*., *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (6), e1002727.
[68] Abt, M. C. *et al*., *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (10), 609-620.
[17] Frost, L. R. *et al*., *PLOS Pathog.*, **2021**, *17* (3), e1009348.
[13] Folliero, V. *et al., Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 1-11

antibiotiques.[70] Le biofilm joue aussi le rôle de réservoir à cellule végétative et à spore et participe ainsi activement aux récidives de l'ICD.[71] Les propriétés de motilité de *C. difficile* ainsi que sa faculté à adhérer à l'épithélium intestinal sont aussi des éléments importants et contribuent à l'augmentation de la virulence.

2.3. Dépistage de l'infection à *C. difficile*

La gestion de l'ICD repose sur des diagnostics rapides et précis afin d'apporter une réponse thérapeutique adaptée. Ces diagnostics permettent avant tout, de prévenir les épidémies ou de suivre les taux d'incidences des ICD de différents établissements de santé dans le temps. Le diagnostic de l'ICD reste un défi important car, malgré les nombreux progrès fait dans ce domaine, il n'existe pas de test de référence. Les laboratoires appliquent souvent des stratégies de tests différentes malgré des directives souvent mises à jour par l'Infectious Diseases Society of America (IDSA)[72,73] ou la Société Européenne de Microbiologie Clinique et des Maladies Infectieuses (ESCMID).[74]

Il existe 2 tests de référence pour diagnostiquer une ICD (**Tableau 2**).[75] Le premier test, appelé essai de neutralisation de la cytotoxicité cellulaire (CCNA, pour cell cytotoxicity neutralization assay), a pour but de démontrer la présence de toxine dans un échantillon de selles d'un patient. Ce test consiste à inoculer sur des lignées cellulaires le filtrat d'un échantillon de selles à observer toutes les 24-48 heures si des dommages liés à la présence de toxine B apparaissent.[76] Le second test, appelé culture toxinogène (CT), vise à démontrer la présence de souche toxinogène de *C. difficile*. Pour cela, on inocule sur des milieux sélectifs un échantillon de selles d'un patient puis on isole les colonies de *C. difficile*. Ensuite, on évalue

[70] Vuotto, C. *et al*., Clostridium Difficile Biofilm. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**, *1050*, 97-115.
[71] Tijerina-Rodríguez, L. *et al*., *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2019**, *2019*, 1–7.
[72] McDonald, L. C. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66* (7), e1-e48.
[73] Johnson, S. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *73* (5), e1029-e1044.
[74] Gateau, C. *et al*., *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24* (5), 463–468.
[75] Crobach, M. J. T. et al., Diagnostic Guidance for *C. difficile* Infections. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**, *1050*, 27-44.
[76] Planche, T.; Wilcox, M. *J. Clin. Pathol.* **2011**, *64* (1), 1-5.

la présence de toxine *in vitro* par CCNA.[77] Là où le test CCNA permet la détection de *toxine in vivo*, le test CT détecte la production de toxine *in vitro*. Cependant, avec le test CT, il est impossible de faire la différence entre une infection asymptomatique et une véritable infection.[75]

Tableau 2 *: Les différents tests existants pour le diagnostic de C. difficile*

Test	Cout par test	Délai de résultat	Sensibilité	Spécificité
CCNA	€€	24 – 48 h	65 – 85%	> 90%
CT	€€	48 h à 7 jours	> 90%	> 90%
Toxin EIA	€	1 h	40 – 100%	90 – 95%
GDH EIA	€	< 4 h	> 90%	80%
NAAT	€€€	30 min à 2 h	90 – 100	90 - 100

Les tests de référence disposent d'une très bonne sensibilité mais les longs délais pour obtenir un résultat sont un frein à leur application clinique. C'est pourquoi, de nouveaux tests rapides et faciles d'utilisation sont maintenant disponibles (**Tableau 2**).[77] Ils sont devenus les outils privilégiés du diagnostic de l'ICD malgré quelques inconvénients.[78,79] Le Toxin A/B immunoassay (Toxin EIA) est un test rapide qui détecte directement la présence de toxine(s) dans un échantillon de selles. Le principal défaut de ce test est sa sensibilité largement inférieure aux tests de référence (60% par rapport à un test TC).[79] Le Glutamate dehydrogenase enzyme immunoassay (GDH EIA) détecte la présence d'une enzyme, la glutamate déshydrogénase, produite par *C. difficile*. Comme pour le test Toxin EIA, il s'agit d'une méthode rapide mais moins spécifique car elle ne permet pas de faire la différence entre

[77] Guery, B. *et al*., *BMJ,* **2019**, *488*, l4609
[75] Crobach, M. J. T. et al., Diagnostic Guidance for C. Difficile Infections. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**, *1050*, 27-44.
[78] Lee, H. S. *et al*., *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10* (2), 687-697.
[79] Crobach, M. J. T. *et al*., *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, S63-S81.

une souche toxinogène et non toxinogène.[79] Le dernier test rapide est le Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) qui détecte les gènes codant pour TcdA et TcdB et dans le cas du ribotype 027, le gène codant pour CDT.[79] Le NAAT est un test extrêmement sensible et plus spécifique que les autres tests rapides. Cependant, en cas d'infection asymptomatique par une souche toxinogène, le résultat sera positif.

2.4. Les traitements de l'infection à *C. difficile* en 2021

L'objectif principal du traitement à l'ICD est la résolution de la diarrhée et la prévention des récidives dans le but de diminuer la charge de la maladie sur les systèmes de santé. La réduction ou, si possible, l'arrêt du ou des antibiotiques en cause, jouent un rôle essentiel dans la prise en charge de l'ICD. Dans une grande majorité des cas, l'utilisation d'antibiotique n'est pas considérée comme utile en cas de suspicion d'ICD. L'utilisation d'antibiotique est par contre fortement recommandée dans le cas d'une ICD fulminante et pour tout patient âgé.[80] Il existe deux stratégies thérapeutiques pour lutter contre l'ICD : l'antibiothérapie en 1ère intention et la fécalothérapie en 2nd intention et uniquement en cas de récidives.

En 2021, l'antibiothérapie anti-ICD repose sur quatre molécules : le métronidazole, la vancomycine, la fidaxomicine et le bezlotoxumab.[81] Des directives sur la prise en charge de l'ICD sont régulièrement mises à jour par la Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) et l'IDSA pour les Etats-Unis et par l'ESCMID pour l'Europe.[72,82] Ces dernières années, de nombreux changements ont eu lieu dans les stratégies de prise en charge thérapeutique de l'ICD, que ce soit pour un premier épisode ou en cas de récidive.[85] En effet, pendant longtemps le métronidazole a été le traitement de première intention mais depuis quelques années, la vancomycine et la fidaxomicine lui sont préférées.[83] De plus, avant de

[79] Crobach, M. J. T. *et al*., *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, S63-S81
[80] Khurana, S. *et al*., *Fac. Rev.* **2020**, *9*.
[81] Rao, K.; Malani, P. N. *JAMA* **2020**, *323* (14), 1403.
[72] McDonald, L. C. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66* (7), e1-e48.
[82] Fitzpatrick, F. *et al*., European Practice for CDI Treatment. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp 117-135.
[83] Igarashi, Y. *et al*., *J. Infect. Chemother.* **2018**, *24* (11), 907-914.

commencer un traitement contre l'ICD, il est primordial d'en évaluer la gravité. Une ICD peut être considérée comme légère à modérée, sévère ou fulminante. Il n'existe pas de normes permettant de catégoriser les ICD, cette classification se fait en fonction de l'état clinique du patient et des facteurs de risques communément connus de l'ICD.[84] Une ICD est considérée comme sévère si au moins deux des critères suivants se développent au cours de la maladie : un nombre de globule blanc dans le sang > 15 000.10^6/L, une hypoalbuminémie (albumine sérique < 3 g/dL), un taux de créatinine dans le sang > 1,5 mg/dL ou encore une température > 38,5 °C. Une ICD est considérée comme fulminante si au moins un des critères suivants se développe au cours de la maladie : admission en soin intensif, hypotension, une occlusion intestinale (iléus), une colectasie ou encore tout signe de défaillance en phase terminale d'un organe.[85]

2.4.1. Le métronidazole

Le métronidazole, appartenant à la famille des 5-nitroimidazole, est une prodrogue synthétique dérivée de l'azomycine, qui a été utilisée pour la première fois en 1959 dans le traitement de la trichomonase, une infection causée par le protozoaire *Trichomonas vaginalis* (**Figure 9**).[86] C'est en 1982 qu'une étude faite sur 13 patients a démontré une efficacité du métronidazole contre l'ICD.[87] Une fois le métronidazole absorbé par la bactérie anaérobie, le groupement nitro est réduit, notamment par des enzymes bactériennes de type nitroréductases, en métabolite électrophiles cytotoxiques de type nitroso et hydroxylamine qui forment des adduits covalents avec l'ADN.[88] Le métronidazole a été pendant longtemps le traitement de première intention pour traiter les ICD légères ou modérées avec une prise orale recommandée de 500 mg, 3 fois par jour sur une durée de 10 à 14 jours.[89] De nombreuses raisons expliquent le remplacement du métronidazole comme traitement de 1ère intention d'un

[84] Jarmo, O. *et al*., *Ann. Med.* **2020**, *52* (1–2), 12-20.
[85] Planche, T, Cusinato, M. **2021**, *49*, 643-647
[86] Cosar, C., Julou, L. *annales institut pasteur*, **1958**, *96*, 238-241
[87] Cherry, R. D. *et al*., *Gastroenterology* **1982**, *82* (5), 849-851
[88] Freeman, C. D. *et al*., *Drugs* **1997**, *54* (5), 679-708.
[89] Ceruelos, A. H. *et al*., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. **2019**, *23* (1), 397-401.

premier épisode d'ICD : une efficacité inférieure par rapport à la vancomycine et la fidaxomicine, des taux de récidive plus élevés dans les 30 jours suivant le traitement, une antibiothérapie plus longue avec une réponse au traitement plus tardive et un passage dans la circulation sanguine au niveau du tube digestif. De plus, le cout global d'un traitement à base de métronidazole tend à être supérieur aux traitements à base de vancomycine ou de fidaxomicine du fait d'une posologie plus longue et du risque plus important de récidive.[83]

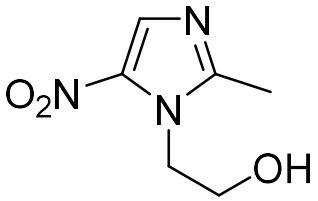


Figure 9 : *Structure du métronidazole*

2.4.2. La vancomycine

La vancomycine est un glycopeptide naturel qui a été isolé pour la première fois en 1953 de *Streptomyces orientalis* et commercialisé en 1956 en raison de son efficacité contre des infections à staphylocoques résistants à la pénicilline (**Figure 10**).[90] Au milieu des années 1960, la vancomycine était utilisée pour traiter l'entérocolite associée aux staphylocoques et la diarrhée associée à la prise de clindamycine, bien avant que l'on découvre que *C. difficile* en était la véritable cause.[91] La vancomycine inhibe la synthèse de la paroi cellulaire en se liant à la partie acyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane. Cette liaison bloque la biosynthèse de la paroi bactérienne. La vancomycine crée un encombrement stérique bloquant la réticulation de la paroi ce qui entraine une production excessive de précurseurs du peptidoglycane. Cet excès entraine l'activation d'enzymes de dégradation du peptidoglycane contribuant ainsi à la destruction de la paroi.[92] La vancomycine a une activité sélective vis-à-vis des bactéries Gram positif car sa taille ainsi que sa charge globale positive empêchent son passage à travers la membrane externe des bactéries Gram négatif. Dans le cas du traitement

[83] Igarashi, Y. *et al*., *J. Infect. Chemother.* **2018**, *24* (11), 907-914.
[90] Griffith, R. S. *Rev. Infect. Dis*. **1981**, *3*, s200-4.
[91] Rubinstein, E.; Keynan, Y. *Front. Public Health* **2014**, *2*, 217.
[92] Silva, J. *et al*., *Am. J. Med*. **1981**, *71* (5), 815-822.

à l'ICD, la vancomycine doit être administrée par voie orale avec une prise de 125 mg, 4 fois par jour pendant 10 jours.[93] Dans les dernières mises à jour de la prise en charge de l'ICD, la vancomycine est devenue le traitement de première intention au détriment du métronidazole. Les études comparatives entre le métronidazole et la vancomycine n'ont pas mis en évidence de grandes différences entre ces deux antibiotiques que ce soit dans le taux de guérison ou dans le risque de récidive. Cependant, la vancomycine a montré une meilleure efficacité en cas d'ICD sévère d'où son positionnement actuel en tant que traitement initial.[83]

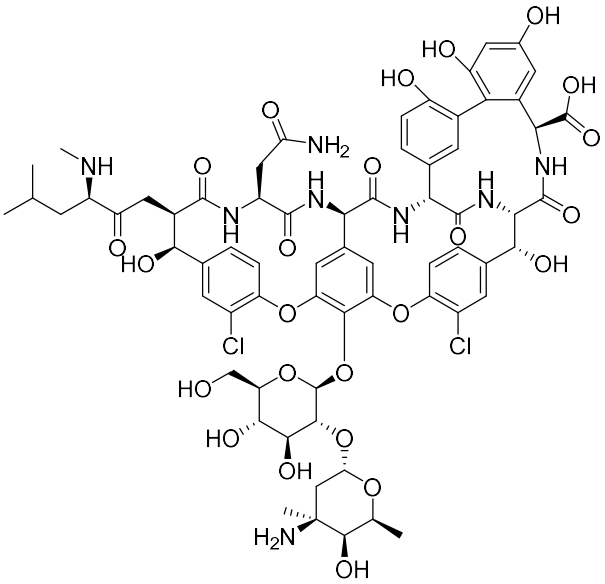


Figure 10 : *Structure de la vancomycine*

2.4.3. La fidaxomicine

La fidaxomicine est un antibactérien macrocyclique polyénique lactonique étudié depuis les années 1970 mais qui n'est utilisé dans le traitement de l'ICD que depuis 2011 (**Figure 11**).[94] Il s'agit d'un produit de la fermentation de métabolites de tiacumicine provenant de l'actinomycète *Dactylosprangium aurantiacum*. La fidaxomicine semble inhiber la synthèse des acides nucléiques en bloquant l'initiation de la synthèse et de la transcription de l'ARN. Bien que son mode d'action exact ne soit pas parfaitement compris, la fidaxomicine semble

[93] Aslam, S. *et al*., *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5* (9), 549-557.
[83] Igarashi, Y. *et al*., *J. Infect. Chemother.* **2018**, *24* (11), 907-914.
[94] Venugopal, A. A.; Johnson, S. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (4), 568-574.

agir comme un inhibiteur de l'ARN polymérase.[95] La fidaxomicine a une activité biologique sélectivement dirigée contre les bactéries Gram positif. Des études comparatives entre la fidaxomicine et la vancomycine ont montré une efficacité semblable en cas de première ICD mais le risque de récidive serait beaucoup plus faible avec la fidaxomicine : environ 13% *versus* 25% pour la vancomycine.[96] Pour le traitement de l'ICD, la fidaxomicine est administrée par voie orale avec une prise de 200 mg, 2 fois par jour pendant 10 jours.

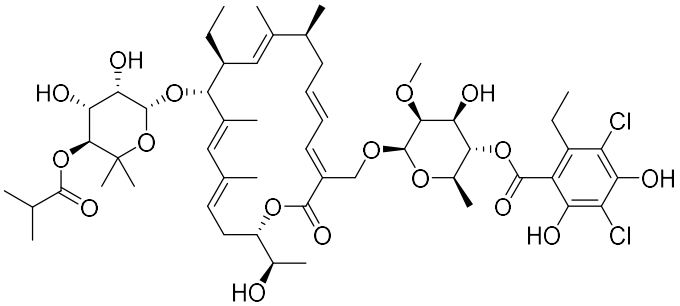


Figure 11 : *Structure de la fidaxomicine*

2.4.4. Le bezlotoxumab

Le bezlotoxumab est un anticorps monoclonal humain commercialisé depuis 2017 sous le nom ZINPLAVA et capable de se lier à la toxine B produite par *C. difficile* avec une haute affinité, neutralisant ainsi son activité.[97] Malgré une utilisation encore marginale, le bezlotoxumab est généralement utilisé en prévention des récidives d'ICD chez les adultes à haut risque de récidive et il a particulièrement démontré son efficacité en association au métronidazole et à la vancomycine. Il est donc important de noter que le bezlotoxumab n'est pas un traitement de l'ICD. Le bezlotoxumab peut être administré en une perfusion intraveineuse en plus d'un traitement anti-ICD ou en une perfusion intraveineuse seule mais est limité à des patients n'ayant eu qu'une seule récidive d'ICD.[98]

[95] Artsimovitch, I. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55* (2), S127-S131.
[96] Okumura, H. *et al*., *J. Infect. Chemother.* **2020**, *26* (1), 43-50.
[97] Giacobbe, D. R. *et al*. *Infect. Dis. Ther.* **2020**, *9* (3), 481–494.
[98] Johnson, S.; Gerding, D. N. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68* (4), 699–704.

2.4.5. La fécalothérapie ou transplantation fécale

Depuis quelques années, les ICD deviennent plus fréquentes, plus sévères et le nombre de récidives a très largement augmenté. Comme présenté dans le paragraphe précédent, les antibiotiques actuellement utilisés offrent des résultats contrastés. En effet, malgré un spectre plutôt étroit, ces traitements peuvent altérer le microbiote intestinal et conduire à une récidive de l'infection. Le risque de rechute dans les 8 semaines post traitement est d'environ 25% dans le cas d'une première infection et peut aller jusqu'à 65% en fonction du traitement utilisé ou en cas d'infections multiples.[99] L'utilisation de la fécalothérapie, aussi appelée transplantation fécale (FMT, pour Fecal microbiota transplantation) s'avère être une solution intéressante pour restaurer le microbiote intestinal et traiter l'ICD en cas de récidive multiple.[100] La première utilisation de la FMT comme thérapie remonte à la fin des années 1950 pour traiter une infection à *Pseudomembranous enterocolitis*. Depuis 2013, la FMT est préconisée en cas de récidive multiple à l'ICD.[101] La FMT consiste à « greffer » le microbiote fécal d'un donneur sain chez un patient souffrant d'ICD. Le matériel fécal d'un donneur sain, dans lequel on vérifie préalablement l'absence d'organismes pathogènes et multirésistants, est prélevé et mis en forme de gélules ou de solution pour sonde nasogastrique. En parallèle, un traitement antibiotique précède l'administration du matériel fécal pour réduire le nombre de *C. difficile*.[102] Des études contrôlées ont montré que la FMT est efficace à plus de 80% dans le traitement des récidives multiples.[103] Il est important de noter que la FMT n'est pas une procédure standardisée et que les conséquences à long terme sur le microbiote intestinal sont inconnues. De plus, il s'agit de procédure longue et couteuse qui nécessite de recruter des donneurs « sains » et du personnel technique qualifié.

[99] Bakken, J. S. *et al*., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *9* (12), 1044–1049.
[100] Wang, J.-W. *et al*., *J. Formos. Med. Assoc.* **2019**, *118*, S23-S31.
[101] Debast, S. B. *et al*., *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1-26.
[102] Khoruts, A. *et al*., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18* (1), 67-80.
[103] Baunwall, S. M. D. et al., *Clinical Medicine* **2020**, *29-30*, 100642.

2.5. Les molécules en essai clinique en 2021

De nombreux progrès restent à faire dans la prise en charge de l'ICD puisque 19% à 27% des patients ne répondent pas aux traitements actuels et connaissent un échec thérapeutique.[104] De plus, l'augmentation de la sévérité et du taux d'incidence des ICD et le risque important de récidive ont conduit à rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques contre *C. difficile*. Le nombre d'essais cliniques relatifs aux ICD a largement augmenté depuis le début des années 2000.[104] Ces essais cliniques visent à proposer des stratégies innovantes dans la prévention, le traitement d'une première ICD et/ou la réduction et le traitement des récidives.

2.5.1. Les molécules en prévention de l'infection à *C. difficile*

La prévention des ICD vise à développer des stratégies capables de limiter la germination, la colonisation ou la production de toxine de *C. difficile* dans le tube digestif. Pour cela, des thérapies émergentes sont proposées pour réduire les changements dans le microbiote intestinal. Parmi ces stratégies, on retrouve les *β*-lactamases, les probiotiques et les vaccins.[104]

Les *β*-lactamines sont une vaste famille d'antibiotique comprenant l'amoxicilline et l'ampicilline et dont l'utilisation a été associée à un risque accru d'ICD. Les *β*-lactamases ont pour objectif de réduire la quantité de *β*-lactamines atteignant les bactéries intestinales tout en préservant leur activité. La molécule SYN-004 (ribaxamase) est une *β*-lactamase produite par Synthetic Biologics® qui se trouve actuellement en essai clinique de phase II et qui montre des résultats prometteurs chez l'animal.[105] Cependant, cette stratégie fonctionne uniquement pour les antibiotiques de type *β*-lactamines mais pas pour les autres antibiotiques associés à un risque élevé d'ICD comme la clindamycine et les fluoroquinones.

[104] Dieterle, M. G. *et al*., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435* (1), 110-138.
[105] Kokai-Kun, J. F. *et al*., *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19* (5), 487-496.

Alternativement, les probiotiques[#] ont pour mission de restaurer la flore qui protège contre la colonisation de *C. difficile* suite à la prise d'antibiotiques.[106] Bio-K est un probiotique fabriqué par Bio-K Plus International® contenant 3 espèces de bactéries : *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus.* Une étude qui s'est déroulée sur 10 ans et comprenant près de 45 000 patients dans un hôpital du Québec a montré que, suite à la prescription de Bio-K dans les 12 heures suivant un traitement antibiotique, les taux d'ICD ont chuté, passant de 18 cas pour 10 000 jours-patients à 2,3 cas pour 10 000 jours-patients.[107] D'autres probiotiques sont actuellement à l'étude comme VSL3 produit par Alfasigma® et HOWARU restore produit par DuPont® cependant des recherches supplémentaires restent nécessaires pour standardiser ces protocoles et mieux connaître les effets secondaires à long terme.

Enfin, la vaccination consiste à inoculer un pathogène vivant, atténué ou mort dans le but de conférer une immunité contre une maladie. Dans le cas de *C. difficile*, la colonisation asymptomatique est associée à une diminution du risque d'ICD d'où la mise au point d'un vaccin contre le pathogène ou contre ses toxines comme un moyen prometteur d'éviter les ICD.[108] Actuellement, 3 vaccins contre les toxines A et B sont en développement : VLA84 développé par Valneva®, ACAM-CDIFF développé par Sanofi® et PF-06425090 développé par Pfizer®. Par ailleurs, 1 vaccin contre la forme végétative de *C. difficile* (CDVAX) est également à l'étude.

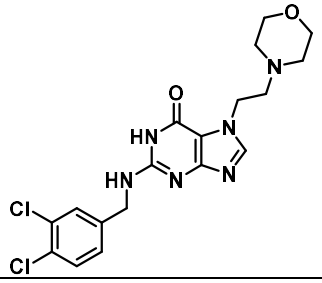
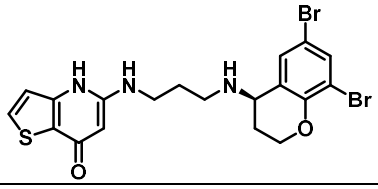
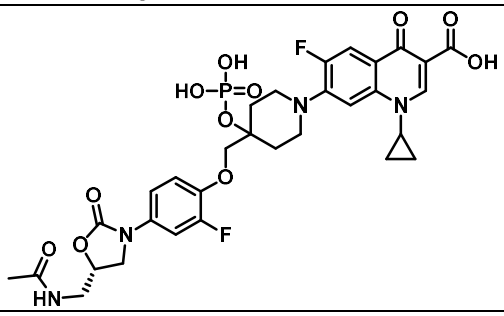
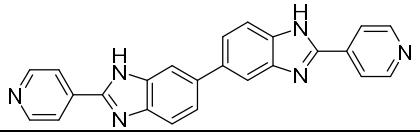
2.5.2. Les molécules contre une première infection à *C. difficile*

Les traitements préventifs des ICD sont des solutions prometteuses mais il reste important de développer des nouvelles thérapies en cas d'infection et plus particulièrement dans le cas d'infections fulminantes. L'axe de recherche le plus étudié est le développement

[#] Les probiotiques sont, selon l'OMS, des « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ».
[106] Mills, J. P. *et al*., *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34* (1), 3-10.
[107] Maziade, P.-J. *et al*., *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60* (2), S144-S147
[108] Sánchez-Hurtado, K. *et al*., *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57* (6), 717-724.

de nouveaux antibiotiques ayant un spectre d'action le plus étroit possible, dans le but de limiter les effets néfastes sur le microbiote intestinal (**Tableau 3**).[104]

Tableau 3 : *Molécules synthétiques en essai clinique contre l'infection à C. difficile en 2021*

Traitement en développement	**Structure**	**Mécanisme d'action**
Ibezapolstat (Acurx Pharmaceuticals®)		Inhibe l'ADN polymérase IIIC
CRS3123 (Creston Inc.®)		Inhibe la méthionyl-ARNt synthétase (MetRS)
DNV3837 (Deinove®)		Inhibe l'ADN gyrase et inhibe la traduction génétique
Ridinilazole (Summit Therapeutics®)		Inhibe la division cellulaire, la sporulation et la production de toxine

L'ibezapolstat (ACX-362E) est un candidat antibiotique en essai clinique de phase II développé par Acurx Pharmaceuticals® pour le traitement des ICD et possédant une CMI de 0,325 µM contre *C. difficile*.[109] Il s'agit du 1er antibiotique en essai clinique contre *C. difficile* qui cible l'ADN polymérase IIIC, une enzyme essentielle dans la réplication de l'ADN chez la bactérie. Un essai clinique de phase I a montré que l'ibezapolstat était faiblement absorbé au niveau du tractus digestif et qu'il présentait de faibles concentrations systémiques pour une

[104] Dieterle, M. G. *et al*., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435* (1), 110-138.
[109] Murray, B. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75* (8), 2149-2155

dose de 300 mg. De plus, par rapport à la vancomycine, l'ibezapolstat provoque moins de perturbation dans le microbiote intestinal.

CRS3123 est un antibiotique produit par Creston® qui inhibe la méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) et qui possède une activité sélective sur les bactéries Gram positifs. De plus, des études sur modèle animal ont rapporté une diminution de la sporulation de *C. difficile* et une diminution de la production de toxines suite à son administration. Les résultats de la phase I ont montré une bonne tolérance pour des doses orales allant de 100 à 1200 mg (2 doses toutes les 12 heures pendant 10 jours).[110] Depuis mars 2021, CRS3123 est en phase clinique II dans le but d'évaluer son efficacité par rapport à la vancomycine chez des patients de plus de 18 ans.

DNV3837 est une « prodrogue 2 en 1 » développé par la société Deinove®. Il s'agit d'une molécule qui combine deux composés actifs appartenant à des familles chimiques bien connues : une fluoroquinone, qui inhibe l'ADN gyrase bactérien et une oxazolidinone qui inhibe la synthèse protéique. Le DNV3837 est rapidement déphosphorylé, *in vivo*, en DNV3681, la forme active du médicament. Le DNV3837 est actuellement testé dans un essai clinique multicentrique de phase II aux Etats-Unis afin d'évaluer son efficacité, sa sécurité et sa pharmacocinétique chez des patients souffrants d'ICD modérées à graves.[111] Cependant, le DNV3837 n'est pas innovant tant sur sa structure que sur son mécanisme d'action. De plus, il s'agit de la seule molécule administrée par voie intra-veineuse alors que les autres molécules en étude sont administrées par voie orale.[19]

Le ridinilazole (SMT19969) est un nouvel antibiotique à spectre étroit produit par Summit Therapeutics® qui semble agir lors de la division bactérienne. Selon 2 essais cliniques multicentriques de phase II, le ridinilazole a montré une activité sur *C. difficile* 10% supérieure

[110] Nayak, S. U. *et al*., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (8).
[111] DNV3837 | DEINOVE, https://www.deinove.com/fr/pipeline/dnv3837 consulté le 19/09/21
[19] *2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis,* World Health Organization: Geneva, **2021**.

à celle de la vancomycine pour un taux de récidive de 14,3% (34,8% pour la vancomycine) et une tolérance équivalente.[112] Depuis mars 2021, le ridinilazole est entré en essai clinique de phase III dans le but d'évaluer sa sécurité, sa tolérance et sa pharmacocinétique chez des sujets adolescents. Il s'agit de la seule molécule en phase III pour le traitement de l'ICD.

D'autres stratégies thérapeutiques ont été étudiées pour traiter les premières ICD comme les « toxin binders » qui séquestrent les toxines produites par *C. difficile* ou les anticorps anti-toxines. Par exemple, IM-01 est un anticorps polyclonal anti-*C. difficile* fabriqué par ImmuniMed® et qui se trouve en phase II.[104]

Malgré de nombreuses recherches sur de nouveaux traitements contre *C. difficile*, il existe, à ce jour, très peu de molécules en étude qui propose des mécanismes d'actions innovants.

3. Les peptides antimicrobiens (PAM)

Le système immunitaire acquis joue un rôle important dans la lutte contre les infections microbiennes, en apportant une réponse spécifique dirigée contre un antigène particulier et en gardant en mémoire cette réponse afin d'obtenir une action plus efficace en cas de réinfection.[113] Bien que cette réponse immunitaire acquise n'existe pas chez les plantes et les insectes, ces derniers ne sont pas plus fréquemment infectés.[114] A l'opposé, le système immunitaire inné existe chez toutes les espèces vivantes et constitue leur première ligne de défense. Parmi les réponses immunitaires innées, on retrouve les peptides antimicrobiens ou PAM (AMP en anglais), également appelés peptides de défense de l'hôte.[115,116,117] Il s'agit de

[112] Cho, J. *Ann. Gastroenterol.* **2018**, *32*, 1-7
[104] Dieterle, M. G. *et al*., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435* (1), 110-138.
[113] Marshall, J. S. *et al., Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 49.
[114] Phoenix, D. A. *et al., Antimicrobial Peptides*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2013**.
[115] Hancock, R. E. W.; Diamond, G., *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (9), 402-410.
[116] Wiesner, J.; Vilcinskas, A., *Virulence* **2010**, *1* (5), 440-464.
[117] Mookherjee, N. *et al., Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 311-332.

biomolécules composées d'acides aminés qui présentent un panel de cibles allant des virus aux parasites en passant par les champignons et les bactéries.[118,119]

Les premières preuves de l'existence des PAM remontent au début du XXème siècle. En 1926, une première observation d'une molécule provenant du blé (*Triticum astivum*) capable d'inhiber la croissance de phytopathogènes a été faite. Ce n'est que plusieurs années plus tard que cette molécule a été décrite comme étant un peptide (nommé purothionine) et classée dans la famille des thionines qui sont répandues dans tout le règne végétal.[120] Au même moment, des PAM ont également été découverts chez l'animal : Le lysozyme est considéré par beaucoup comme le premier PAM caractérisé chez l'homme. Il a été identifié en 1922 à partir du mucus nasal par Alexander Fleming et sa capacité à tuer les bactéries a établi l'intérêt des PAM en infectiologie.[121] En parallèle, René Dubos isole en 1939 une substance antimicrobienne extraite d'une culture de *Bacillus brevis* qu'il nomme tyrothricine.[122] Quelques années plus tard, avec l'aide de Rollin D. Hotchkiss, il démontre qu'il s'agit en réalité d'un mélange de deux polypeptides : la gramicidine et la tyrocidine qui se sont révélées actives à la fois *in vitro* et *in vivo* contre une large gamme de bactéries Gram positif.[123] La gramicidine est considérée comme le premier PAM commercialisé comme un antibiotique.[124] Néanmoins, ces découvertes ont été éclipsées par celle de la pénicilline en 1928.[125] En effet, les avènements de la pénicilline et de la streptomycine au début des années 1940 ont marqué le début de « l'âge d'or des antibiotiques », entrainant une perte d'intérêt pour les PAM.[126]

A partir de la fin des années 1950, l'augmentation de la RAM entraine un regain d'intérêt pour les PAM.[114] Depuis, plus de 3.000 PAM ont été répertoriés et plusieurs bases de

[118] Jenssen, H. *et al., Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 491-511.
[119] Huan, Y. *et al*., *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 582779.
[120] Bohlmann, H.; Broekaert, W., *Crit. Rev. Plant Sci.* **1994**, *13* (1), 1-16.
[121] Fleming A.; Allison V. D., *Br. J. Exp. Pathol.* **1922**, *3* (5), 252-260.
[122] Dubos, R. J. *J. Exp. Med.* **1939**, *70* (1), 1-10.
[123] Dubos, R. J.; Hotchkiss, R. D., *J. Exp. Med.* **1941**, *73* (5), 629-640.
[124] Van Epps, H. L., *J. Exp. Med.* **2006**, *203* (2), 259-259.
[125] Fleming, A., *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226-236
[126] Hutchings, M. I. *et al*., *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72-80.
[114] Phoenix, D. A. *et al., Antimicrobial Peptides*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2013**.

données bio-informatiques ont été créées pour les cataloguer. Les PAM peuvent être isolés à partir de micro-organismes unicellulaires, d'insectes ou d'autres invertébrés, de plantes, d'amphibiens, d'oiseaux, de poissons et de mammifères, y compris l'homme.[127,128,129,130] Par exemple, l'« Antimicrobial Peptide Database » (APD) de l'Université du Nebraska contient plus de 3200 PAM originaires de six règnes (369 bactériocines/antibiotiques peptidiques de bactéries, 5 d'archées, 8 de protistes, 22 de champignons, 361 de plantes et 2424 d'animaux).[131] Chez l'homme, les trois groupes les plus représentés sont les *α*- et *β*-défensines, les cathélicidines et les Histatines. [132,133,134]

3.1. Structure des peptides antimicrobiens

Les PAM sont des peptides qui peuvent être classés en fonction de leur origine, de leur activité, de leur structure ou de leur composition en acides aminés.[119,135] Certaines de leurs caractéristiques structurales clefs sont identifiées comme essentielles à leur activité biologique : la nature des acides aminés qui constituent le squelette peptidique, l'hydrophobie et la charge globale de la molécule notamment.[136,137] Pour simplifier, les PAM peuvent se répartir en trois catégories :

1) Les PAM qui sont des protéines et qui ont une structure tertiaire. Ce sont souvent des enzymes avec des activités hydrolytiques. Il s'agit de structures complexes qui ne seront pas d'avantage développées dans la suite de ce manuscrit. Les lecteurs

[127] Bahar, A.; Ren, D., *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1543-1575.
[128] Zhang, L.; Gallo, R. L., *Curr. Biol.* **2016**, *26* (1), 14-19.
[129] Li, J. *et al*., *Bot. Stud.* **2021**, *62* (1), 5.
[130] Manniello, M. D. *et al*., *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78* (9), 4259-4282.
[131] Wang, G.; Li, X.; Wang, Z., *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D1087-D1093.
[132] Ganz, T., *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (9), 710-720.
[133] Kościuczuk, E. M. *et al*., *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39* (12), 10957-10970.
[134] Oppenheim, F. G. *et al., Biol. Chem.* **1988**, *263* (16), 7472-7477.
[119] Huan, Y. *et al*., *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 582779.
[135] Lee, H.-T. *et al., BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1-6.
[136] Li, S. *et al., Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *109*, 103-115.
[137] Lee, J. *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (2), 170-173.

sont invités à lire des références plus spécifiques sur ce sujet pour obtenir de plus amples informations.[138,139,140]

2) Les PAM qui adoptent une structuration secondaire associée à une activité antimicrobienne et qui sont plus petits que des protéines (moins de 80 acides aminés).[141] Typiquement, les PAM qui composent cette catégorie ont une longueur minimale de 22 résidus pour les peptides *α*-hélicoïdaux (magainine 2, LL37, Buforine, dermcidine, etc..) ou 8 résidus pour les peptides en feuillet *β* (défensine)[132]

3) Les PAM qui n'adoptent pas de structuration. Il peut s'agir de PAM cycliques et ils sont souvent conjugués avec des fragments non peptidiques. Dans ce groupe, l'activité est généralement directement liée à la séquence primaire du PAM (darobactine, indolicidine, pyrrhocoricine, etc.) [136,142,143]

La structure chimique des PAM dépend en grande partie de six caractéristiques structurales : l'amphipathie, la charge, la séquence, la taille et la conformation (**Figure 12**).[136,144] D'autres paramètres qui ne sont pas toujours observés peuvent également jouer un rôle important : la présence d'acides aminés appartenant à la série D, la présence de structures macrocycliques et la présence d'acides aminés non conventionnels (Acide *β*-aminobutyrique par exemple).[145] Malgré leur grande diversité chimique, certains acides aminés spécifiques sont conservés dans la plupart des séquences peptidiques. En particulier, la lysine et l'arginine sont fortement représentées dans les PAM ainsi que certains résidus hydrophobes (valine, phénylalanine, leucine et alanine, etc.).[146,147] Dans la majorité des PAM, l'activité antibactérienne ne dépend pas d'un seul paramètre mais plutôt d'une contribution

[138] Saurabh, S.; Sahoo, P. K. *Aquac. Res.* **2008**, *39* (3), 223-239.
[139] Harder, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5707-5713.
[140] Thallinger, B. *et al*., *Biotechnol. J.* **2013**, *8* (1), 97-109.
[141] Kumar, P. *et al*., *Biomolecules* **2018**, *8* (1), 4.
[132] Ganz, T. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (9), 710-720.
[136] Li, S. *et al., Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *109*, 103-115.
[142] Powers, J. P. S.; Hancock, R. E. W. *Peptides* **2003**, *24* (11), 1681–1691.
[143] Imai, Y. *et al*., *Nature* **2019**, *576* (7787), 459-464.
[144] Ahmed, T. A. E.; Hammami, R. *J. Food Biochem.* **2019**, *43* (1), e12546.
[145] Kapil, S.; Sharma, V. *Can. J. Microbiol.* **2021**, *67* (2), 119-137.
[146] Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238-250.
[147] Epand, R. M.; Vogel, H. J. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462*, 11-28.

multifactorielle incluant plusieurs groupements chimiques au sein d'un même squelette macromoléculaire. Dans les PAM, il n'y a pas de règle précise sur le nombre idéal de résidus hydrophobes ou de résidus chargés pour maximiser l'activité antimicrobienne, car cet équilibre varie largement et semble être associé à une certaine forme de sélectivité anti-infectieuse.[136,147]

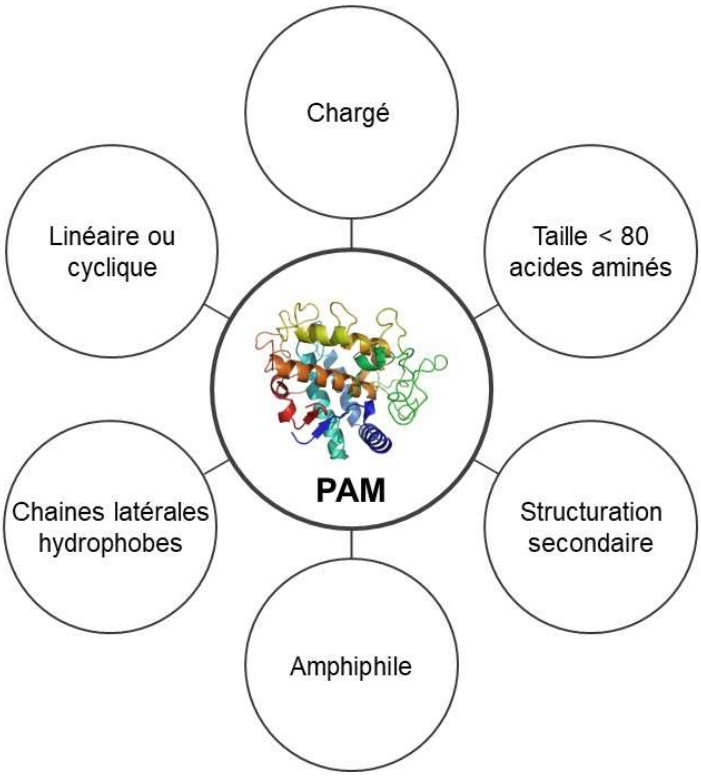


Figure 12 : *Principales caractéristiques chimiques des PAM*

Malgré quelques exceptions où les structures peptidiques sont chargées négativement ou ne sont pas chargées (environ 10% des PAM sont anioniques avec par exemple la mersacidine[148] ou la dermcidine[149]), la grande majorité des PAM sont chargés positivement.[150,151] La nature cationique des peptides antimicrobiens est utilisée pour induire une interaction avec les membranes bactériennes anioniques, ce qui entraîne souvent leur

[136] Li, S. *et al., Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *109*, 103-115.
[147] Epand, R. M.; Vogel, H. J. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462*, 11-28.
[148] Brötz, H. *et al., Eur. J. Biochem.* **1997**, *246* (1), 193-199.
[149] Schittek, B. *et al*., *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (12), 1133-1137.
[150] Hancock, R. E. W.; Lehrer, R. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (2), 82-88.
[151] Zhou, C.; Wang, Y. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *45*, 28-43.

déstabilisation.[152] Plusieurs études ont montré des corrélations entre la charge nette et sa distribution avec l'activité biologique ou la sélectivité envers certaines bactéries.[153,154] Lorsque la structure secondaire est impliquée, la présence d'une quantité excessive de charges électrostatiques peut affecter négativement l'activité biologique en interférant avec la structuration.[155] Il est important de noter que l'efficacité des PAM dépend aussi du pH : les activités antimicrobiennes sont souvent renforcées par un pH légèrement acide car la protonation de certains acides aminés est favorisée, comme l'histidine, l'acide aspartique ou l'acide glutamique.[156,157,158]

La plupart des PAM contiennent environ 50% de résidus hydrophobes dans leurs séquences primaires (**Tableau 4**).[159] Cette hydrophobie peut moduler de manière significative à la fois l'activité antibactérienne et sa spécificité.[144,160] Globalement, l'hydrophobie est un levier chimique permettant de contrôler l'efficacité avec laquelle un peptide peut pénétrer les bicouches lipidiques bactériennes.[161,162] De plus, il a été démontré qu'une augmentation de l'hydrophobie du peptide au détriment de la quantité de charges positives nettes peut moduler significativement l'activité antimicrobienne.[163] Les effets observés sont souvent empiriques et les corrélations observées dépendent fréquemment des bactéries étudiées. Au-delà d'un certain niveau, l'hydrophobie entraîne une diminution de l'activité antimicrobienne et une augmentation de la toxicité pour les cellules eucaryotes.[164,166]

La longueur des peptides antimicrobiens varie le plus souvent de 6 à environ 60 acides aminés (**Tableau 4**), mais on sait peu de choses sur la corrélation entre la taille, la densité de

[152] Lee, T.-H. *et al*., *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16* (1), 25-39.
[153] Findlay, B. *et al*., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (10), 4049-4058
[154] Wimley, W. C. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (10), 905-917.
[155] Huang, H. W. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8347-8352.
[156] McDonald, M. *et al*., *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (7), 1451-1461.
[157] Malik, E. *et al*., *Pharmaceuticals* **2016**, *9* (4), 67
[158] Hitchner, M. A. *et al*., *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2019**, *1861* (10), 182984.
[159] Pasupuleti, M. *et al*., *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32* (2), 143-171.
[144] Ahmed, T. A. E.; Hammami, R. *J. Food Biochem.* **2019**, *43* (1), e12546
[160] Edwards, I. A. *et al*., *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2* (6), 442-450.
[161] Matsuzaki, K. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (8), 1687-1692.
[162] Chen, Y. *et al*., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1398-1406.
[163] Stark, M.; Liu, L. P.; Deber, C. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (11), 3585-3590.

charge et l'activité antimicrobienne.[146] La majorité des PAM sont amphipathiques : ils sont à la fois hydrophiles (interaction avec les têtes phosphatées des phospholipides) et hydrophobes (interaction avec les queues aliphatiques des phospholipides).[127,164] Très souvent, les peptides antimicrobiens adoptent des conformations amphipathiques lorsqu'ils interagissent avec les membranes bactériennes (magainine 2, indolicidine, etc.) et sont donc des squelettes sensibles aux stimuli.[152,165] Ils ne deviennent actifs que lors de l'interaction avec la membrane, ce qui les rend moins toxiques pour d'autres types de cellules pour lesquelles l'interaction est plus faible.[149] Enfin, il est à noter que l'incorporation d'acides aminés non conventionnels (par exemple de D-acides aminés) ou le fait que certains PAM soient macrocycliques semblent être des caractéristiques chimiques clés pour minimiser la dégradation de ces peptides par les bactéries qui sécrètent des protéases pour se défendre.[166,167]

Tableau 4 : *Exemples de peptides antimicrobiens et représentation de leurs caractéristiques chimiques*

PAM	Structure secondaire	Séquence (Nombre d'acides aminés)	Charge	Acides aminés hydrophobes
Magainine	**Hélice *α***	**GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS (23)**	**+3**	**43%**
LL-37	**Hélice *α***	**LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES (37)**	**+6**	**35%**
Buforine II	**Hélice *α***	**TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK (21)**	**+6**	**33%**
θ-Defensine	**Feuillet *β***	**GFCRCLCRRGVCRCICTR (18)**	**+5**	**22%**
HNP-1	**Feuillet *β***	**ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC (30)**	**+3**	**43%**
HNP-3	**Feuillet *β***	**DCYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC (30)**	**+2**	**40%**
Nisine A	**-**	**ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK (34)**	**+3**	**29%**
Indolicidine	**-**	**ILPWKWPWWPWRR (13)**	**+3**	**54%**
Mersacidine	**-**	**CTFTLPGGGGVCTLTSECIC (20)**	**-1**	**25%**
Daptomycine	**-**	**WNDTGKDADGSEY (13)**	**-3**	**23%**
Darobactine	**-**	**WNWSKSF (7)**	**+1**	**43%**

3.2. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens

Il existerait trois modes d'action principaux qui permettent aux PAM de tuer les bactéries : 1) ils peuvent interagir et perturber la membrane bactérienne[168] ; 2) ils peuvent être

[146] Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238-250.
[127] Bahar, A.; Ren, D., *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1543-1575.
[164] Makhlynets, O. V.; Caputo, G. A. *Biophys. Rev.* **2021**, *2* (1), 011301.
[152] Lee, T.-H. *et al.*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16* (1), 25-39.
[165] Wieprecht, T. *et al.*, *FEBS Lett.* **1997**, *417* (1), 135-140.
[149] Schittek, B. *et al.*, *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (12), 1133-1137.
[166] Hamamoto, K. *et al.*, *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46* (11), 741-749.
[167] Lee, D. L. *et al., Biopolym. Pept. Sci. Sect.* **2003**, *71* (1), 28-48.
[168] Matsuzaki, K. Membrane Permeabilization Mechanisms. In *Antimicrobial Peptides*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, **2019**; Vol. *1117*, pp 9-16

internalisés et cibler une fonction importante du métabolisme bactérien[169] ou 3) stimuler le système immunitaire pour tuer plus efficacement les bactéries[170] (**Figure 13**).[141,171] Parmi les PAM capables de cibler les fonctions internes des bactéries, le peptide antimicrobien buforine II de grenouille, se lie à la fois à l'ADN et à l'ARN en ciblant les acides nucléiques pour tuer *E. coli*.[172] Chez l'homme, la défensine HNP1, le PR-39 et l'indolicidine agissent en inhibant la synthèse de l'ADN.[173,174,175] La mersacidine interfère avec la transglycosylation du lipide II, une étape nécessaire à la synthèse du peptidoglycane des Gram-positifs.[148] Globalement, il existe des dizaines de cibles métaboliques potentielles des PAM, de nombreuses étant spécifiques des bactéries mais dont beaucoup demeurent à étudier. Dans ce contexte, l'activité biologique des PAM peut être une source d'inspiration en chimie médicinale, dans le but de développer de nouvelles substances actives médicamenteuses.

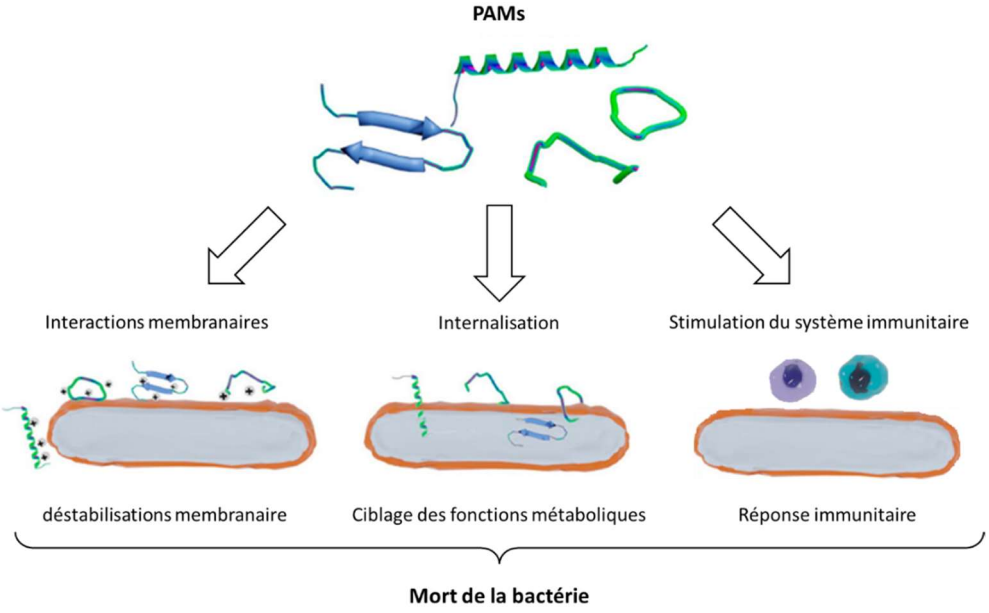


Figure 13 : *Les différents mécanismes d'action antibactériens des PAM*

[169] Graf, M. *et al*., *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34* (7), 702-711.
[170] van der Does, A. *et al*., Antimicrobial Host Defence Peptides: Immunomodulatory Functions and Translational Prospects. In *Antimicrobial Peptides*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, **2019**; Vol. *1117*, pp 149-171
[141] Kumar, P. *et al*., *Biomolecules* **2018**, *8* (1), 4.
[171] *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, **2019**; Vol. *1117*.
[172] Park, C. B. *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244* (1), 253-257.
[173] Subbalakshmi, C.; Sitaram, N. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *160* (1), 91-96.
[174] Lehrer, R. I. *et al*., *J. Clin. Invest.* **1989**, *84* (2), 553-561.
[175] Boman, H. G. *et al*., *Infect. Immun.* **1993**, *61* (7), 2978-2984.
[148] Brötz, H. *et al., Eur. J. Biochem.* **1997**, *246* (1), 193-199.

La capacité d'interaction et de déstabilisation des membranes par les PAM peut constituer un mécanisme d'action intéressant dans la lutte contre la RAM. Les PAM présentent une charge positive nette et une proportion élevée d'acides aminés hydrophobes (**Tableau 4**), leur permettant de se lier sélectivement aux membranes cytoplasmiques chargées négativement.[128] A titre d'exemple, LL-37, un peptide d'origine humaine appartenant à la famille des cathélicidines, est efficace pour se lier aux membranes bactériennes : il est cationique et dispose d'une structure *α*-hélicoïdale. Le LL-37 se lie aux membranes par des interactions électrostatiques avant d'induire la lyse des bactéries par différents mécanismes qui sont présentés et largement développés dans la section 3.3.[176,177]

3.3. Interactions et déstabilisation membranaire

La paroi cellulaire des bactéries est une structure complexe qui joue diverses fonctions de protection et d'adaptation.[178] Le principal composant conservé dans toutes les parois cellulaires bactériennes est le peptidoglycane.[179,180] Il joue un rôle essentiel dans la stabilisation de la membrane cellulaire contre les pressions osmotiques internes élevées.[181,182] Les bactéries Gram positif sont entourées d'une couche de peptidoglycane beaucoup plus épaisse que celles des bactéries Gram négatif.[182] Sous le peptidoglycane, on retrouve la membrane plasmique de la bactérie.[183] Typiquement, de nombreux PAM combinent des acides aminés cationiques et hydrophobes de façon à posséder la capacité d'interagir et de perturber les parois bactériennes.[154]

Pour les PAM structurés en hélice *α* ou en feuillet *β*, il existe plusieurs mécanismes physico-chimiques qui expliquent comment ils peuvent déstructurer des membranes

[128] Zhang, L.; Gallo, R. L., *Curr. Biol.* **2016**, *26* (1), 14-19.
[176] Wang, G. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (47), 32637-32643.
[177] Engelberg, Y.; Landau, M. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 3894.
[178] Silhavy, T. J. *et al*., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (5), a000414-a000414.
[179] Schleifer, K. H.; Kandler, O. *Bacteriol. Rev*. **1972**, *36* (4), 407-477.
[180] Meroueh, S. O. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (12), 4404-4409.
[181] Wood, J. M. *J. Gen. Physiol.* **2015**, *145* (5), 381-388.
[182] Vollmer, W.; Born, P. In *Microbial Glycobiology*; Elsevier, **2010**; pp 15–28.
[183] Delcour, A. H. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2009**, *1794* (5), 808-816.
[154] Wimley, W. C. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (10), 905-917.

bactériennes (**Figure 14**).[184] Ces mécanismes ont également été étudiés de manière exhaustive avec des membranes phospholipidiques artificielles.[185] Le premier de ces mécanismes, appelé « barrel-stave mechanism», suppose la formation de canaux ou de pores dans la membrane par l'insertion perpendiculaire des PAM, provoquant une lyse bactérienne (**Figure 14.A**).[186,141] Les peptides de magainines, par exemple, se replient lors de l'interaction avec la membrane lipidique anionique et leur structure secondaire est stabilisée par deux à quatre ponts disulfures permettant la création de pores dans la membrane bactérienne qui provoquent la lyse de la cellule.[146] Un autre mécanisme, appelé « toroidal pore mechanism », consiste en une réorganisation membranaire en réponse à l'insertion et à l'interaction des PAM avec les têtes polaires des phospholipides qui composent la membrane bactérienne (**Figure 14.B**).[187,188] Par rapport au « barrel-stave mechanism», les arrangements hydrophobes et hydrophiles des lipides sont maintenus, alors que dans les pores toroïdaux les arrangements hydrophobes et hydrophiles de la bicouche sont perturbés.[189] Il est important de noter que la capacité de former des pores toroïdaux chez les bactéries est particulièrement liée à la présence de phosphatidyléthanolamine, une espèce lipidique qui confère de manière significative un potentiel de courbure.[155,190] La magainine 2 et la mélittine sont des exemples de PAM qui agissent selon ce mécanisme.[191,192]

[184] Sara, P.; Adam, M. *Biophys. Rep.* **2021**, *7* (3), 173-184.
[185] Reddy, K. V. R. *et al*., *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24* (6), 536-547.
[186] Bessin, Y. *et al*., *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2004**, *1667* (2), 148-156.
[141] Kumar, P. *et al*., *Biomolecules* **2018**, *8* (1), 4.
[146] Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238-250.
[187] Ludtke, S. J. *et al*., *Biochemistry* **1996**, *35* (43), 13723-13728.
[188] Sengupta, D. *et al*., *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (10), 2308-2317.
[189] Yang, L. *et al*., *Biophys. J.* **2001**, *81* (3), 1475-1485.
[155] Huang, H. W. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8347-8352.
[190] Lee, E. Y. *et al*., *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160153.
[191] Matsuzaki, K. *et al*., *Biochemistry* **1998**, *37* (34), 11856-11863.
[192] Matsuzaki, K. *et al*., *Biophys. J.* **1997**, *73* (2), 831-838.

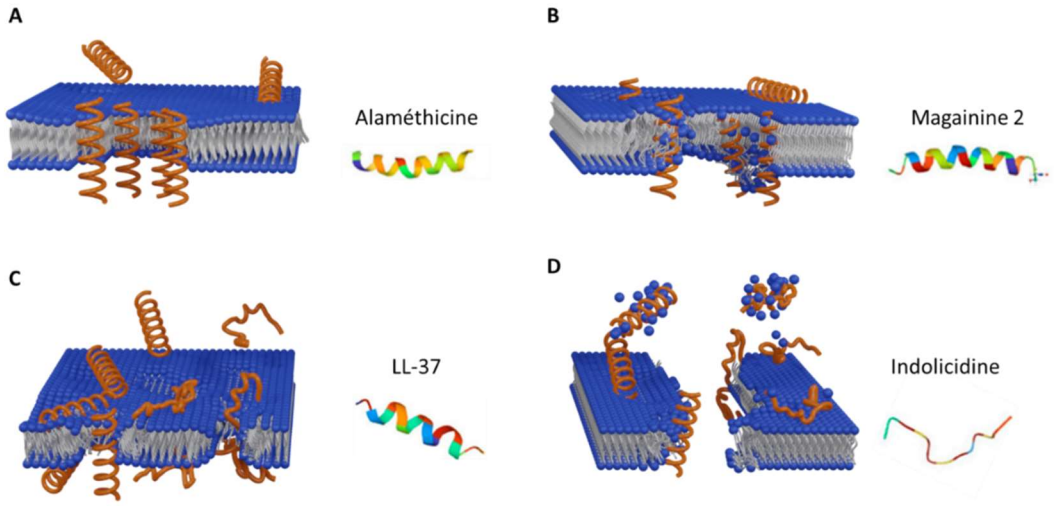


Figure 14 : *Les PAM interagissent avec les membranes et induisent leur déstabilisation selon différents mécanismes : A) « Barel-stave pore model » ; B) « Toroidal pore model » ; C) « Carpet model » ; D) « Detergent model »*

Alors que les premiers mécanismes décrits sont plus susceptibles de se produire avec des PAM structurés,[152] le troisième mécanisme possible, appelé « carpet model », ne nécessite pas d'interaction spécifique dépendante de la structure secondaire ; il ne nécessite pas non plus que le peptide s'insère dans la membrane pour former des canaux transmembranaires ou des structures peptidiques spécifiques (**Figure 14.C**).[141] Dans ce mécanisme, les PAM adhèrent à la surface de la membrane par des forces électrostatiques. À certains seuils de concentrations, ils couvrent la surface de la membrane conduisant à la perte de l'intégrité de la membrane.[186] Des exemples de PAM qui agissent selon ce mécanisme sont l'indolicidine étendue ou le LL-37.[177] Enfin, les PAM peuvent aussi agir comme des molécules de type tensioactif (« detergent model ») en raison de leur caractère fortement chargé qui perturbe la membrane bactérienne et forme des micelles (**Figure 14.D**). Cet événement peut avoir lieu en cas de concentrations plus élevées en PAM dans le cas du « carpet model ». Des exemples de PAM dont le mécanisme d'action repose sur le modèle tensioactif sont les cathélicidines 1 et 2.[193]

[152] Lee, T.-H. *et al.*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16* (1), 25-39.
[141] Kumar, P. *et al.*, *Biomolecules* **2018**, *8* (1), 4.
[186] Bessin, Y. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2004**, *1667* (2), 148-156.
[177] Engelberg, Y.; Landau, M. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 3894.
[193] Banaschewski, B. J. H. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (6), 3075-3083

Bien que tous ces modèles aient été largement étudiés, ils ne prennent pas suffisamment en compte l'importance de la balance du caractère hydrophobe/cationique, une caractéristique critique des PAM. Dans ce contexte, la corrélation entre ce rapport et la composition de la membrane lipidique a été plus récemment démontrée à travers un phénomène présenté comme une courbure en forme de selle appelée la courbure négative gaussienne ou « Negative Gaussian Curvature » (NGC).[194] Décrit plus récemment, ce dernier modèle a fait l'objet de diverses études expérimentales et théoriques.[195] À l'origine, le NGC a été étudié de manière approfondie en surveillant l'interaction créée entre les *θ*-défensines-1 ou les *θ*-défensines-7 et les vésicules lipidiques par la technique de diffusion des rayons X aux petits angles.[194] Les vésicules ont changé radicalement de forme lorsqu'elles ont interagi avec les PAM, affichant la formation d'une phase cubique Pn3m « double diamant ». Ce comportement de phase spécifique génère une courbure positive dans une direction et une courbe négative dans la direction perpendiculaire, produisant une courbure en forme de selle. Le mécanisme de perturbation de la membrane peut être expliqué plus en détail par l'enveloppe électrostatique de la membrane par les PAM. De l'intérieur des pores qui se forment lors de l'interaction avec les PAM, il a été possible d'observer plusieurs manifestations telles que des bulles, des bourgeons et des projections en forme de tige.[196] Pour générer efficacement des NGC, le caractère sélectif d'un rapport cationique/hydrophobe donné a été démontré en 2018 par la comparaison du dérivé de la défensine-3 humaine CHRG01 (séquence de 14 acides aminés) avec le HBD-3 (séquence de 45 acides aminés), un peptide de charge similaire mais à plus forte hydrophobie.[196] Cette étude a confirmé qu'une plus forte hydrophobie diminuait la fuite membranaire en raison d'une augmentation de la courbe gaussienne positive.

[194] Schmidt, N. W. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (17), 6720-6727.
[195] Schmidt, N. W.; Wong, G. C. L. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2013**, *17* (4), 151-163.
[196] Arora, A. *et al*., *J. Biosci.* **2018**, *43* (4), 707-715.

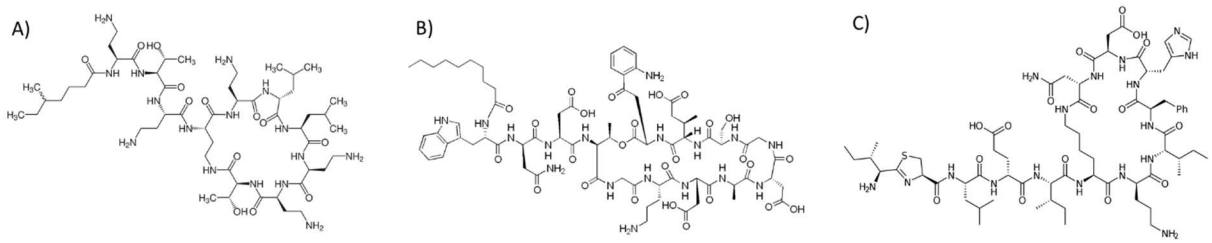


Figure 15 : *Exemples de peptides antimicrobiens commercialisés en France comme antibiotique : A) Colistine (ou polymyxine E), B) Daptomycine et C) Bacitracine*

D'un point de vue thérapeutique, les PAM montrent un très bon potentiel pour renforcer l'arsenal antibiotique (**Figure 15**), principalement pour deux raisons.[197,198,199] Premièrement, comme la membrane cellulaire bactérienne est une des cibles préférentielles de ces peptides, il est difficile pour la plupart des bactéries de s'adapter et de développer une résistance. En effet, devenir résistant aux PAM impliquerait que les bactéries changent significativement la composition de leur membrane et dans de nombreux cas, ces changements sont incompatibles avec la préservation de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane. Deuxièmement, par rapport aux antibiotiques synthétiques, les PAM sont des molécules biodégradables qui ne persistent pas dans l'environnement après leur élimination de l'organisme. Cela permet d'éviter un temps de contact long à de faible concentration avec les bactéries de notre environnement, ce qui limite d'autant le risque d'émergence de bactéries résistantes.[200]

3.4. Les limitations des peptides antimicrobiens

Les PAM présentent plusieurs faiblesses qui doivent encore être corrigées afin d'étendre leur utilisation comme antibiotiques. Tout d'abord, comme tout peptide, la plupart des PAM sont sensibles aux endo- et/ou exopeptidases (et protéases) et sont rapidement hydrolysés dans le tube digestif. Les PAM sont donc des antibiotiques qui ne sont généralement pas administrés par voie orale, ce qui constitue la principale limitation à leur

[197] Datta, S.; Roy, A. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, *27* (1), 555-577.
[198] Roque-Borda, C. A. *et al*., *Pharmaceutics* **2021**, *13* (6), 773.
[199] Ryu, M. *et al*., *J. Microbiol.* **2021**, *59* (2), 113-123.
[200] Magana, M. *et al*., *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20* (9), e216–e230.

développement pharmaceutique.[146] Ensuite, il est à noter que certains PAM actuellement utilisés en clinique comme antibiotiques administrés par voie intraveineuse (IV), comme la colistine (également appelée polymyxine E), sont hautement néphrotoxiques, ce qui limite drastiquement leur utilisation.[201] Cette toxicité est liée à un manque de sélectivité conduisant à des interactions entre la colistine et la membrane des cellules tubulaires proximales rénales. De telles interactions ont été récemment caractérisées, ouvrant la voie à la conception de nouveaux dérivés de la colistine qui pourraient présenter un profil plus sûr.[202] Enfin, les PAM commerciaux sont des biomolécules qui sont exclusivement obtenues à partir de micro-organismes génétiquement modifiés, un mode de production assez complexe et coûteux.[203] Par exemple, *E. coli* modifié peut produire certains PAM, mais le coût moyen de production atteint plus de 40 000 $ par kg de PAM dans le meilleur des cas.[204] On pourrait imaginer synthétiser les PAM par une approche de synthèse peptidique sur support solide (SPPS).[205] Cependant, parmi d'autres inconvénients, cette approche synthétique nécessite de nombreuses étapes de réactions itératives qui conduisent à des rendements médiocres, affectant les capacités de synthèse à l'échelle industrielle et restreignant la longueur des PAM que l'on pourrait synthétiser.[206] Dans ce sens, il faut noter les efforts faits pour préparer de la magainine synthétique ayant une activité à large spectre[207] ou des analogues synthétiques de la gramicidine S ayant une activité contre les bactéries Gram positif.[208] Plusieurs peptides antimicrobiens ont été développés grâce à la SPPS,[209] en tenant compte du fait qu'un gramme produit par cette technique peut coûter en moyenne environ 10 000 $.[210] Ainsi, de nouvelles voies de synthèse pour produire des PAM sont attendues.

---

[146] Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238-250.
[201] Ordooei Javan, A. *et al*., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71* (7), 801-810.
[202] Jiang, X. *et al*., *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (8), 2110-2119.
[203] Sun, B. *et al*., *AMB Express* **2018**, *8* (1).
[204] Gaglione, R. *et al*., *New Biotechnol.* **2019**, *51*, 39-48.
[205] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
[206] Andersson, L. *et al*., *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2000**, *55* (3), 227-250.
[207] Zasloff, M. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85* (3), 910-913.
[208] Imazu, S. *et al*., *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32* (4), 298-306.
[209] Lobo-Ruiz, A.; Tulla-Puche, J. *Synthetic Approaches of Naturally and Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics*; Elsevier Ltd, **2018**, 23-49
[210] Zhou, C. *et al*., *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 60-67.

4. Les analogues polymériques de peptides antimicrobiens

Les polymères synthétiques sont des candidats très intéressants pour apporter des réponses aux limitations posées par la production et l'utilisation des PAM. Dans ce contexte, la chimie des polymères est un énorme avantage qui garantit l'accès à de grandes quantités de produit. De plus, le développement croissant des polymères biodégradables rend de plus en plus accessible la production de matériaux peu rémanents dans l'environnement.[211] Comme la plupart des PAM, les polymères sont des macromolécules mais, contrairement aux PAM, ils sont constitués d'unités monomères dont la séquence n'est pas contrôlée et peuvent être polydispersés. Malgré ces différences fondamentales, les polymères synthétiques ont été largement étudiés depuis plusieurs décennies pour s'attaquer aux bactéries en tant que polymères antiseptiques.[212,213,214]

De tels polymères antimicrobiens, également connus sous le nom de polymères biocides, possèdent généralement une structure de polycations amphiphiles expliquant l'inhibition de la croissance des bactéries.[215,216] Par rapport aux PAM, ils pourraient offrir de nombreux avantages comme notamment une production plus efficace et moins coûteuse, une stabilité dans l'utilisation et le stockage à long terme et une activité à large spectre contre certains micro-organismes pathogènes.[219] Les polymères antibactériens présentent une toxicité au moins comparable à celle des PAM et leurs utilisations restent aujourd'hui limitées aux sciences des matériaux. Les domaines qui peuvent bénéficier de l'utilisation des polymères antimicrobiens sont le secteur textile, la conception de systèmes de filtration de

[211] Chin, W. *et al*., *Macromolecules* **2013**, *46* (22), 8797-8807.
[212] Cheng, Y. *et al*., *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42* (7), 1032-1038.
[213] Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (2), 281-339.
[214] Kenawy, E.-R. *et al*., *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1359-1384.
[215] Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C. *Polymers* **2012**, *4* (1), 46-71.
[216] Chen, A. *et al*., *Polym. Rev.* **2017**, *57* (2), 276-310.

l'eau, l'emballage alimentaire et les industries biomédicales et pharmaceutiques, y compris en tant que revêtement antibactérien des dispositifs médicaux.[217,218,219,220]

Suivant les caractéristiques chimiques clés des PAM, les polymères antibactériens incorporent au moins deux éléments essentiels dans leurs structures chimiques : une partie cationique et une partie hydrophobe. L'activité biologique est influencée par le type, la quantité, la localisation et la distribution de ces deux composantes. Les groupements cationiques sont les éléments constitutifs essentiels qui permettent aux polymères antimicrobiens de tuer les bactéries : ils comprennent principalement les groupements ammoniums,[221] les sulfoniums[222] ou les phosphoniums.[223] Il existe deux façons d'introduire de l'hydrophobicité sur ces groupements, soit en synthétisant des homopolymères cationiques fonctionnalisés par des groupements hydrophobes, soit en contrôlant la topologie de copolymères *via* un mélange d'unités monomères cationiques et hydrophobes (**Figure 16**).[224]

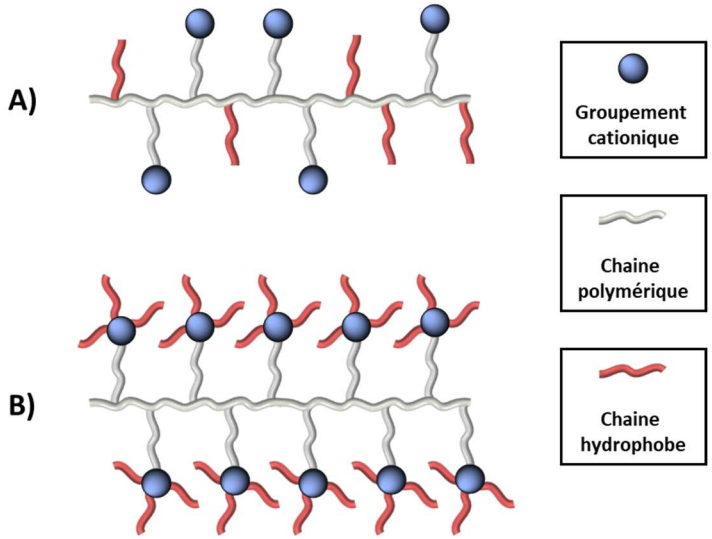


Figure 16 : *Représentation d'analogues synthétiques de PAM obtenus par : A) synthèse de copolymères et B) synthèse d'homopolymères*

[217] Bucheńska, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *61* (3), 567-576.
[218] Tyagi, M.; Singh, H. *J. Appl. Polymer Sci.*, **2000**, *76* (7), 1109-1116.
[219] Goldberg, S. *et al.*, *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (10), 5650-5654.
[220] Konradi, R. *et al.*, *Langmuir* **2008**, *24* (3), 613-616.
[221] Mizerska, U. *et al.*, *Eur. Polym. J.* **2009**, *45* (3), 779-787.
[222] Kanazawa, A. *et al., J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1993**, *31* (11), 2873-2876.
[223] Kanazawa, A. *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *54* (9), 1305-1310.
[224] Ergene, C. *et al.*, *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407-2427.

Bien que la synthèse d'homopolymères soit la manière la plus simple et la plus efficace de produire des candidats polymères antimicrobiens, il est encore difficile de moduler leurs activités, leurs toxicités ou d'induire une sélectivité antimicrobienne. Plus proches des PAM dans lesquels les unités cationiques et hydrophobes sont portées par des unités monomères différentes, les copolymères synthétiques visent à résoudre ces limitations. L'émergence de la polymérisation radicalaire et des réactions de polymérisation contrôlée a grandement fait progresser la préparation de tels copolymères et de nombreuses approches sont maintenant étudiées pour mieux reproduire les propriétés de perturbation membranaire des PAM, tant au niveau de l'efficacité que de la sélectivité.[225]

4.1. Relations structure-activité

Afin de déstabiliser la membrane bactérienne le plus efficacement possible, il est important de contrôler avec précision le caractère hydrophobe/cationique lors de la conception chimique des analogues de PAM.[224] Alors que ce contrôle est souvent approximatif lors de l'utilisation d'homopolymères, la topologie est un moyen simple de contrôler la façon dont deux monomères différents se répartissent sur le polymère. Des distributions topologiques différentes généreront des polymères avec des rapports hydrophobes/cationiques différents qui présenteront potentiellement des activités antimicrobiennes différentes.[226,227] De nombreuses méthodes de polymérisation sont disponibles et permettent maintenant de contrôler cette topologie.[228] Les mélanges de polymères contenant des monomères cationiques et hydrophobes se sont avérés particulièrement critiques avec le mécanisme impliquant une NGC, mécanisme qui explique actuellement la capacité de déstabilisation membranaire de plus de 1 000 AMP cationiques.[190] En effet, les progrès réalisés au cours des dernières décennies dans les réactions de copolymérisation permettent d'obtenir des ratios

[225] Lienkamp, K. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9836-9843.
[224] Ergene, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407-2427.
[226] Nimmagadda, A. *et al*., *Biomacromolecules* **2017**, *18* (1), 87-95.
[227] Park, E. S. *et al*., *Eur. Polym. J.* **2004**, *40* (12), 2819-2822.
[228] Mowery, B. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (50), 15474-15476.
[190] Lee, E. Y. *et al*., *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160153.

hydrophobes/cationiques parfaitement contrôlés.[229,230] De plus, la grande variété de monomères permet d'obtenir un large panel de structures polymériques (**Figure 17**).[231] Par exemple, l'utilisation du processus de polymérisation radicalaire a permis d'obtenir des copolymères de méthacrylate et de méthacrylate d'aminoéthyle qui ont été capables, à des rapports hydrophobes/cationiques précis, de promouvoir une NGC spécifique déjà observés avec les PAM.[232] Le rapport hydrophobe/cationique, également appelé équilibre amphiphile, influence à la fois l'activité et la sélectivité antibactériennes.[216] Par exemple, Chin et al. ont synthétisé, par polymérisation par ouverture de cycle (ROP, pour ring-opening polymerization), un ensemble de polycarbonates cationiques avec des groupements ammonium quaternisés. Ces polymères ont montré une activité et une sélectivité antibactériennes qui pouvaient être modulées en fonction de la nature chimique des groupements alkyles substituant de l'atome d'azote.[211]

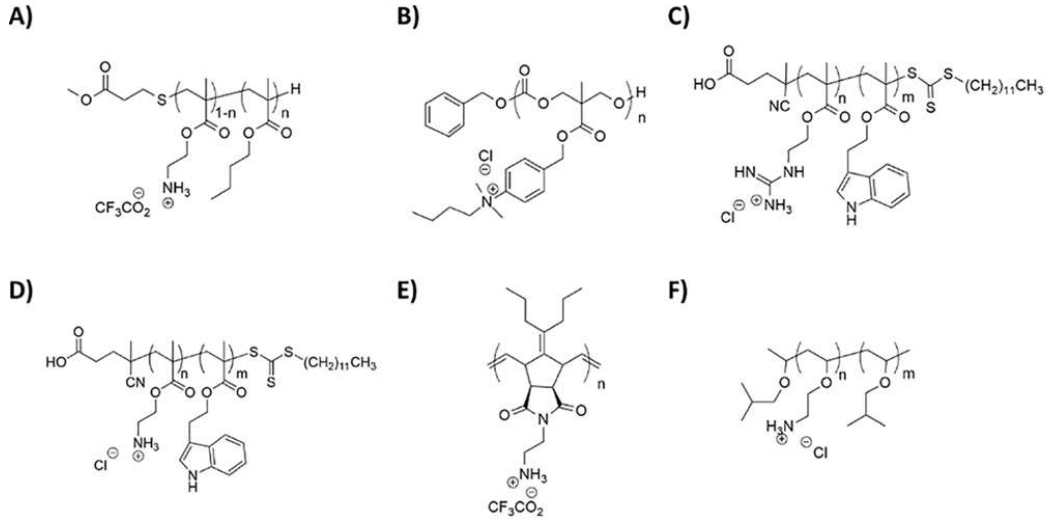


Figure 17 : *Exemples de polymères antimicrobiens : A) Polyméthacrylate d'aminoéthyle et de butyle ; B) Polycarbonate d'ammonium quaternaire ; C et D) Polyméthacrylate portant des groupements analogues d'acides aminés (arginine, lysine, tryptophane) ; E) Polynorbornene et F) Polyvinylethers*

[229] Zamfir, M.; Lutz, J.-F. *Nat. Commun.* **2012**, *3* (1), 1138.
[230] Kuroki, A. *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (46), 40117-40126.
[231] Hong, S. *et al.*, *PLOS ONE* **2017**, *12* (1), e0169262.
[232] Hu, K. *et al.*, *Macromolecules* **2013**, *46* (5), 1908-1915.
[216] Chen, A. *et al.*, *Polym. Rev.* **2017**, *57* (2), 276-310.
[211] Chin, W. *et al.*, *Macromolecules* **2013**, *46* (22), 8797-8807.

4.1.1. Les groupements cationiques

Comme évoqué précédemment, le groupement cationique est l'un des éléments clés qui conditionne l'activité antibactérienne. Les groupements cationiques à base d'ammonium sont ceux que l'on trouve le plus dans les polymères antimicrobiens.[224] L'ammonium quaternaire a une charge positive permanente, tandis que les groupements ammoniums primaires, secondaires et tertiaires sont dépendants du pH, ce qui signifie que l'état de protonation des polymères dépend du pKa de la fonction amine constitutive et du pH du milieu dans lequel ils devront exercer leur activité antibactérienne. Kuroda et al. ont prouvé que la caractéristique de dépendance au pH est importante pour obtenir des polymères antimicrobiens moins toxiques avec une série de polyméthacrylates amphiphiles.[233] De plus, ils ont étudié une série de polymères avec des groupements ammoniums primaire, tertiaire et quaternaire et ils ont montré que la fonction amine primaire avait une sélectivité plus grande vis-à-vis de *E. coli* que contre les globules rouges.[234] En plus des fonctions ammoniums, les sels de pyridinium ou de guanidinium sont également des groupements cationiques couramment utilisés dans les polymères antimicrobiens en raison de leur haute solubilité dans l'eau et de leurs propriétés moins toxiques.[224] Dans ce cas, la charge est délocalisée à travers les liaisons π ou les systèmes aromatiques conjugués et joue un rôle clé pour l'adsorption des polymères sur la membrane bactérienne. Zhang *et al*. ont ainsi synthétisé une série de stéarate de polyhexaméthylène guanidine qui a démontré un spectre d'action large contre les bactéries Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*P. aeruginosa*).[235]

De façon générale, la quaternisation des amines est une caractéristique chimique importante qui améliore grandement la performance antimicrobienne des polymères antimicrobiens.[236] Cette optimisation est basée sur la simple introduction d'un groupement

[224] Ergene, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407-2427.
[233] Palermo, E. F. *et al*., *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 3098-3107.
[234] Palermo, E. F.; Kuroda, K. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1416-1428.
[235] Zhang, Y. *et al*., *Polymer* **1999**, *40* (22), 6189-6198.
[236] Konai, M. M. *et al*., *Biomacromolecules* **2018**, *19* (6), 1888-1917.

hydrophobe sur chaque chaîne latérale cationique des macromolécules. Par exemple, cette caractéristique peut être facilement modulée par la nature et la longueur des chaînes latérales alkyles qui sont liées à l'atome d'azote dans les polymères quaternisés.[239,237] Des études sur des séries de bromure de poly(4-vinyl-*N*-alkylpyridinium) avec différentes chaînes alkyles linéaires, allant du propyle à l'hexadécyle, ont montré une meilleure activité sur *S. aureus* avec des petites chaines alkyles.[238] Une autre étude a évalué l'activité du méthacrylate de diméthylaminoéthyle quaternisé avec du bromure de benzyle, de butyle, de dodécyle ou d'hexadécyle et a déterminé que les chaînes benzyle et butyle conféraient les meilleures activités.[239]

On retrouve aussi des polymères cationiques antimicrobiens portant des groupements sulfonium ou phosphonium. [223,227,] Par exemple, Endo *et al.* ont préparé des polymères contenant des atomes de soufre et de phosphore possédant une charge positive. Le premier était un tétrafluoroborate de poly(*p*-vinylbenzyl-tétraméthylènesulfonium) et a démontré une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* que contre *E. coli*. Le second polymère était le poly(tributyl(4-vinylbenzyl)phosphonium) qui a montré une activité contre *S. aureus*.[223]

4.1.2. Les groupements hydrophobes

Un autre paramètre important est la nature chimique de la chaîne hydrophobe qui joue un rôle crucial lors de l'interaction avec la membrane bactérienne. Cela a été démontré par Lienkamp et al. à travers l'activité contre *E. coli* des polymères oxanorbornènes.[240] Les polymères étaient actifs lorsque les chaînes latérales étaient des groupements propyle ou butyle mais inactifs avec des groupements méthyle ou éthyle. Dans une autre étude, l'activité ainsi que la sélectivité de polycarbonates quaternisés ont été étudiées en fonction de la

[237] Cheng, J. *et al*., *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4* (14), 2128-2136.
[238] Tiller, J. C. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (11), 5981-5985.
[239] Lu, G. *et al*., *React. Funct. Polym.* **2007**, *67* (4), 355-366.
[223] Kanazawa, A. *et al*., *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *54* (9), 1305-1310.
[227] Kanazawa, A. *et al., J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1993**, *31* (11), 2873-2876.
[240] Ilker, M. F. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (48), 15870-15875.

longueur de la chaine alkyle sur l'ion ammonium (variant de 1 à 8 carbones).[211] L'activité biocide a diminué lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmentait, vraisemblablement en raison d'une diminution de la solubilité dans l'eau, avec une activité optimale pour une longueur de chaine de quatre atomes de carbones. De même, l'effet de la structure entre les groupements hexyle, cyclohexyle et benzyle a été étudié et la meilleure activité correspondait au groupement hexyle. Grâce à la modification de dérivés du polynorbornène, l'influence de la longueur de la chaîne alkyle ainsi que l'équilibre amphiphile ont également été démontrés par Ilker et ses collaborateurs.[245]

4.1.3. Les espaceurs et les groupements satellites

Il existe d'autres paramètres qui peuvent avoir un rôle important dans l'activité antibactérienne. Les espaceurs, c'est-à-dire la chaine entre le squelette polymérique et la charge, ont une fonction importante puisqu'ils peuvent modifier l'hydrophobicité du polymère.[241] Les extrémités de chaine peuvent aider le groupement cationique à perturber la membrane par co-insertion.[242] Le contrôle de la microstructure, c'est-à-dire la distribution des charges et des groupements cationiques sur le polymère, peut aussi moduler l'activité des polymères et plus particulièrement la sélectivité vis-à-vis de l'hémolyse.[243] D'autres propriétés comme le poids moléculaire du polymère ainsi que l'effet des contre-ions sont aussi des éléments qui peuvent influencer l'activité.[223,244] Ces paramètres influencent tout particulièrement la solubilité aqueuse des polymères, entrainant des variations d'activités (**Figure 18**).[216]

Malgré de nombreux efforts de rationalisation pour mieux comprendre et optimiser leur activité antimicrobienne, les polymères synthétiques, beaucoup plus simples que les PAM, ne

[211] Chin, W. *et al*., *Macromolecules* **2013**, *46* (22), 8797-8807.
[241] Palermo, E. F. *et al*., *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1632-1641.
[242] Waschinski, C. J. *et al*., *Biomacromolecules* **2008**, *9* (7), 1764-1771
[243] Oda, Y. *et al*., *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3581-3591
[223] Kanazawa, A. *et al*., *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *54* (9), 1305-1310
[244] Kuroda, K.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (12), 4128-4129.
[216] Chen, A. *et al*., *Polym. Rev.* **2017**, *57* (2), 276-310

permettent pas de reproduire finement les propriétés biologiques de ces derniers telles que la sélectivité. Bien que de nombreux squelettes polymériques incluant les polyméthacrylates, les polycarbonates, le polynorbornène, le polypyridinium et le polyarylamide aient montré une forte activité antimicrobienne, la plupart de ces macromolécules ne sont pas adaptées au développement de traitements topiques ou encore moins systémiques.[224] En effet, elles nécessitent des temps de contact de l'ordre de plusieurs heures pour présenter une action antibactérienne et n'ont donc pas de réel potentiel thérapeutique. Elles entrent dans la catégorie des agents désinfectants qui peuvent être utiles pour les dispositifs médicaux et elles sont généralement utilisées comme additifs dans les revêtements, dans la composition des détergents, de certains filtres... Pour obtenir de meilleurs candidats thérapeutiques, il est donc essentiel de mieux rationaliser et optimiser les propriétés chimiques de ces polymères.

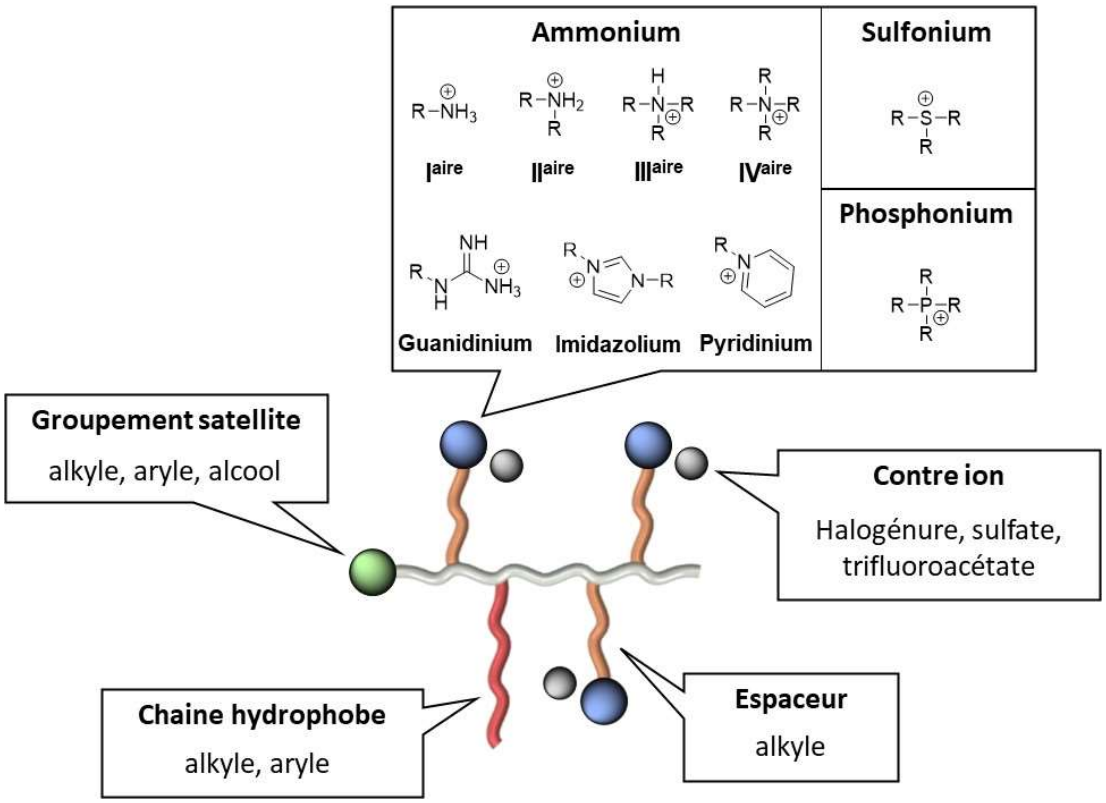


Figure 18 : *Conception d'analogues polymériques de PAM : éléments essentiels de modulation de leur activité antimicrobienne*

[224] Ergene, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407-2427.

4.2. Analogues polymériques de peptides antimicrobiens contre *C. difficile*

Dans le contexte de l'ICD, il existe très peu d'études sur la préparation et l'évaluation d'analogues polymériques de peptides antimicrobiens contre *C. difficile*. L'une des seules études sur ce sujet est l'œuvre de Liu et de ses collaborateurs qui ont synthétisé des polymères poly-*β*-peptidiques possédant une activité sur les cellules végétatives de *C. difficile* comparable à un PAM : LL-37.[245] De plus, Ils ont aussi mis en évidence que ces polymères réduisaient la germination des spores de *C. difficile* (**Figure 19**). Plus récemment, Jones et al. ont synthétisé des homopolymères cationiques capables d'inhiber à la fois, la croissance des cellules végétatives mais aussi des spores de *C. difficile*.[246]

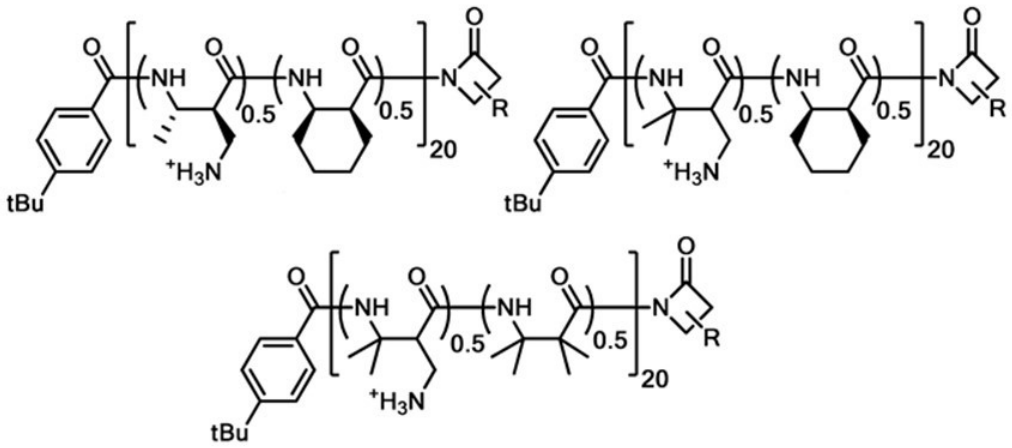


Figure 19 : *Exemples de polymères poly-β-peptidique actifs sur C. difficile*

5. Analogues peptidiques de PAM

Les PAM sont généralement constitués de 10 à 80 acides aminés et la seule méthodologie de synthèse permettant de reproduire avec précision leur séquence primaire est la synthèse peptidique sur support solide (SPPS, pour solid phase peptide synthesis).[247] Bien que cette technique offre un contrôle précis de la composition en acides aminés, elle est relativement longue et coûteuse à mettre en place. Par ailleurs, un procédé plus économique et efficace pour préparer des polypeptides synthétiques repose sur une réaction de

[245] Liu, R. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14498-14504.
[246] Jones, J. B. et *al*., *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (5), 1236-1247.
[247] Bonduelle, C. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 1517-1529

polymérisation en une étape : la polymérisation par ouverture de cycle (ROP, pour ring opening polymerization) (**Figure 20**).

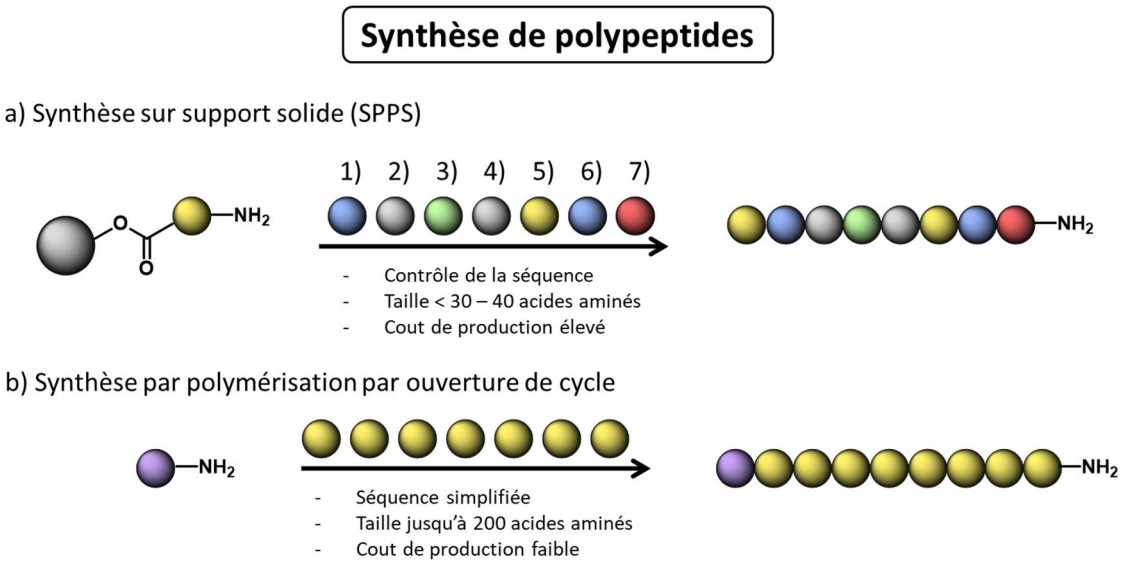


Figure 20 : *Voies de synthèses pour préparer des peptides synthétiques*

Les polymères polypeptidiques sont des macromolécules simples par rapport aux protéines naturelles. En effet, ils sont constitués de plusieurs acides aminés qui sont répétés de nombreuses fois mais peuvent néanmoins adopter des structurations secondaires telles que des hélices *α* ou des feuillets *β*, une propriété rare en chimie des polymères.[247] Ce procédé de polymérisation contrôlée fait intervenir des réactifs, appelés *N*-carboxyanhydrides (NCA) et permet de préparer des polymères d'acides aminés à la fois avec de bons rendements et en grandes quantités.[248,249] De plus, par rapport aux protéines naturelles, les polymères polypeptidiques peuvent facilement subir des transitions de structure secondaire qui peuvent être facilement mises en œuvre en adaptant les chaînes latérales des acides aminés.[248,250] De ce fait, pour se rapprocher encore plus des PAM et concevoir des molécules plus sélectives avec une potentielle activité antibactérienne, les polymères polypeptidiques sont certainement l'un des meilleurs supports à considérer.[251]

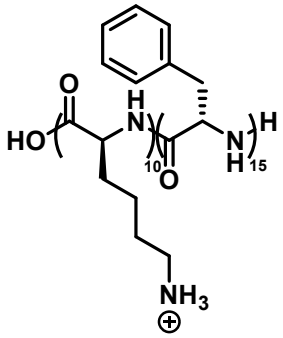
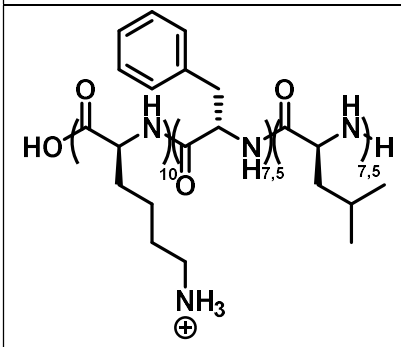
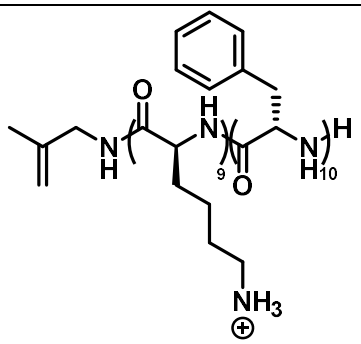
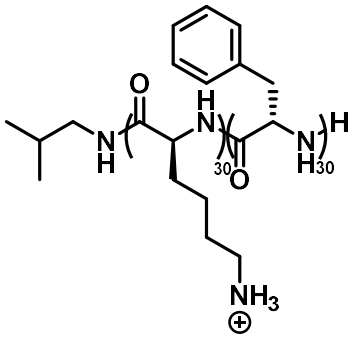
[247] Bonduelle, C. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 1517-1529
[248] Huang, J. *et al*., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7373.
[249] Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3668-3672
[250] Deming, T. J. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 786-808.
[251] Hwang, J.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (1), 17-21.

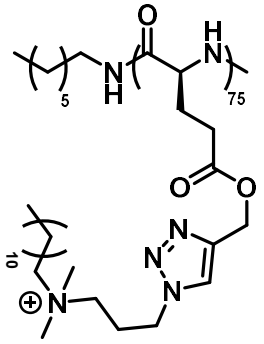
Très tôt, les copolymères polypeptidiques ont été utilisés pour induire la déstabilisation des membranes.[252,253] Les premières études fondamentales sur ce sujet ont montré que les copolymères polypeptidiques cationiques étaient capables de se lier aux membranes phospholipidiques malgré de grandes distributions dans la taille de ces polymères et une absence totale de contrôle de la séquence primaire. Plus tard, la polymérisation contrôlée a été une avancée décisive pour mieux étudier les paramètres macromoléculaires impliqués dans cette déstabilisation membranaire (composition en acides aminés, poids moléculaire, etc.).[254,255]

Les premières études de relations structure-activité antibactérienne des polymères polypeptidiques ont porté sur la composition en acides aminés, montrant que les séquences mélangeant des charges positives avec des résidus hydrophobes étaient particulièrement actives dans les perturbations membranaires.[249,260] Une étude complète, publié par Zhou *et al.*, a présenté des polymères polypeptidiques composés de L-Lysine, L-Phénylalanine, et L-Leucine ayant un large spectre anti-infectieux (**Tableau 5**). Ces copolymères ont montré des activités contre *C. albicans, E. coli, P. aeruginosa, S. marcescens* et *S. aureus* plus élevées que celles obtenues par trois PAM couramment utilisés comme contrôles positifs antibactériens : LL-37, indolicidine, et magainine I.[210] En plus de la composition en acides aminés, la nature chimique des groupements cationiques (amine primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire) et des groupements hydrophobes (L-Leucine, L-Phénylalanine) sont également des facteurs déterminants dans l'optimisation de l'activité antibactérienne.[256,257]

Tableau 5 *: Exemples de polymères polypeptidiques ayant une activité antimicrobienne*

[252] Katchalski, E. *et al*., *Nature* **1955**, *176* (4472), 118-119.
[253] Katchalski, E. *et al*., Chapter 10 - Polyamino Acids as Protein Models; NEURATH Structure, and Function (Second Edition), H. B. T.-T. P. C., Ed.; Academic Press, **1964**; 405–602.
[254] Deming, T. J. *Nature* **1997**, *390* (6658), 386-389.
[255] Wyrsta, M. D. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12919–12920.
[249] Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3668-3672
[210] Zhou, C. *et al*., *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 60-67
[256] Engler, A. C. *et al*., *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1666-1674.
[257] Zhen, J. B. *et al*., *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4142–4152.

Structure	Microstructure	Activité contre	CMI en µg/mL	Réf.
	Aléatoire	*E. coli* (Gram -) *P. aeruginosa* (Gram -) *S. marcescens* (Gram -) *S. aureus* (Gram +)	31 31 250 31	210
	Aléatoire	*E. coli* (Gram -) *P. aeruginosa* (Gram -) *S. marcescens* (Gram -) *S. aureus* (Gram +)	31 31 250 31	210
	Aléatoire	*K. pneumoniae* (Gram -) *P. aeruginosa* (Gram -) *E. coli* (Gram -) *E. faecalis* (Gram +) *S. aureus* (Gram +)	64 64 128 64 64	264
	Bloc	*E. coli* (Gram -) *P. aeruginosa* (Gram -) *S. marcescens* (Gram -) *S. aureus* (Gram +)	8 8 16 2	265

	Aléatoire	*E. coli* (Gram -) *S. aureus* (Gram +)	1250 - 2500 39,1 – 78,1	263

La microstructure et le rapport hydrophobe/cationique sont aussi des éléments clés pour moduler l'activité et la sélectivité des polymères polypeptidiques. Su *et al*. ont ainsi comparé l'efficacité de copolypeptides de lysine et de phénylalanine qui présentaient des microstructures blocs ou aléatoires et des rapports hydrophobe/cationique variant de 33 à 66 %.[258] Tous les copolymères étudiés ont présenté une activité contre *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* et *S. marcescens.* Cette activité était plus élevée avec des copolymères présentant une microstructure « bloc » et lorsque l'hydrophobie générale du polymère était augmentée. Ils peuvent également tirer parti de leurs caractéristiques uniques : des études ont montré que les structures secondaires des polymères polypeptidiques ont un impact significatif sur l'activité antimicrobienne. Cheng et ses collègues ont montré que les PAM hélicoïdaux peuvent être imités par des polyglutamates fonctionnalisés par des motifs benzimidazole. Ces polypeptides adoptent une structure hélicoïdale amphiphile possédant une forte activité antibactérienne contre *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, B. toyonensis* et *H. pylori.*[259] Quelques années plus tard, cette même équipe a synthétisé un copolymère composé d'acide L-glutamique et de *γ*-6-*N*-(méthyl-dihexyl-ammonium)hexyl-L-glutamate capable de se structurer en hélice *α* à un pH acide (**Figure 21**). Ce copolymère a fourni une activité sélective contre *H. pylori* au niveau de l'estomac après une administration orale.[260]

[258] Su, X. *et al*., *Biopolymers* **2017**, *107* (11), e23041.
[259] Xiong, M. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (43), 13155–13160.
[260] Chen, J. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (48), 12675–12680

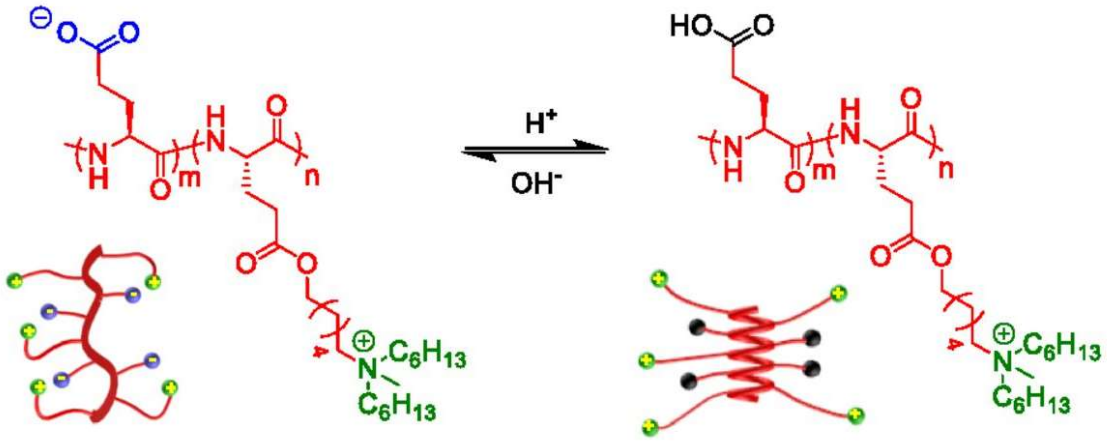


Figure 21 : *Copolymère peptidique antibactérien capable de se structurer en hélice α en fonction du pH*

5.1. Les limitations des analogues peptidiques

La grande majorité des polypeptides possédant des propriétés antibactériennes développés à ce jour présente des inconvénients pouvant limiter leur utilisation comme traitement antibiotique. Le premier inconvénient est le manque de sélectivité. En effet, la plupart ont une activité sur les bactéries Gram positif et Gram négatif. Dans de rare cas, ils peuvent avoir une activité sur un seul de ces deux groupes. En plus d'un manque de sélectivité antibactérienne, les polymères peptidiques souffrent aussi d'un manque de sélectivité vis-à-vis des cellules humaines. Enfin, le fait que les squelettes peptidiques soient classés parmi les polymères biodégradables, entraine souvent une très grande sensibilité à l'hydrolyse enzymatique qui peut également engendrer un manque d'efficacité *in vivo* ainsi qu'une incompatibilité avec une administration par voie orale. En effet, ils peuvent être rapidement dégradés par les protéases et les peptidases que l'on trouve tout le long du tube digestif, comme, par exemple, la trypsine ou la pepsine.[258] A ce stade, ces limitations sont des inconvénients potentiels et constituent les futurs défis pour les polypeptides. Pour résoudre ces problèmes, il faut noter que des efforts importants ont été faits, tant sur les procédés de polymérisation par ouverture de cycle que sur le choix des monomères.

[258] Su, X. *et al*., *Biopolymers* **2017**, *107* (11), e23041.

5.2. Perspectives

La possibilité de mimer les structures secondaires des PAM *via* des réaction de polymérisation est un axe de recherche important et de nombreux travaux sont actuellement menés sur la conception de nouvelles molécules qui pourraient faire évoluer les perspectives en matière de polymères antibactériens.[261,262,263] Alors que la polymérisation des NCA a longtemps été confinée à une chimie exigeante, des avancées récentes ont rendu cette chimie plus simple, apportant un impact significatif dans le domaine des polypeptides antimicrobiens.[264,265] Par exemple, des réactions de polymérisation catalysées, ont permis d'obtenir des polymères en quelques minutes, facilitant la conception de bibliothèques de polypeptides antimicrobiens.[266]

[261] Nguyen, M. *et al*., *Biomacromolecules* **2018**, *19* (10), 4068-4074.
[262] Leigh, T.; Fernandez-Trillo, P. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 291-310
[263] Gong, C. *et al*., *Adv. Healthc. Mater.* **2021**
[264] Grazon, C. *et al*., *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (2).
[265] Song, Z. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *166* (22), 10658-10663.
[266] Wu, Y. *et al*., *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 5297.

Chapitre 2 : Préparation de *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés

1. Synthèse de N-carboxyanhydrides (NCA) : état de l'art

Les *N*-carboxyanhydrides (NCA) d'acide *α*-aminés, aussi appelés anhydrides de Leuchs ou 2,5-dioxo-1,3-oxazolidines, sont des composés cycliques dérivés d'acides aminés principalement utilisés pour la synthèse de polypeptides par polymérisation par ouverture de cycle (ROP).[267] Depuis leur découverte au début du XXème siècle par H. Leuchs, plusieurs méthodologies de synthèse ont émergé, facilitant leur préparation et leur utilisation.

1.1. Synthèse des NCA à partir des acides aminés à fonction amine primaire

1.1.1. La méthode de Leuchs

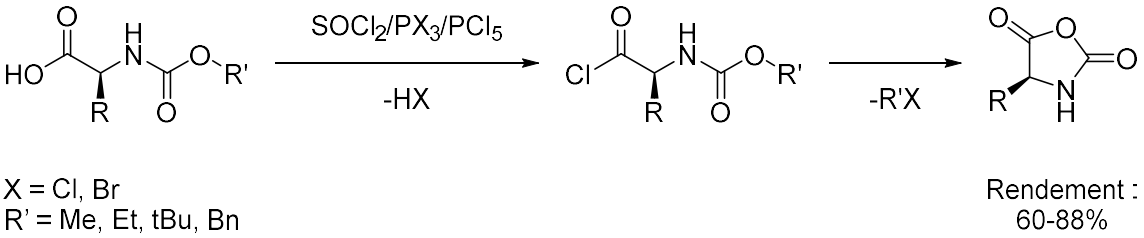


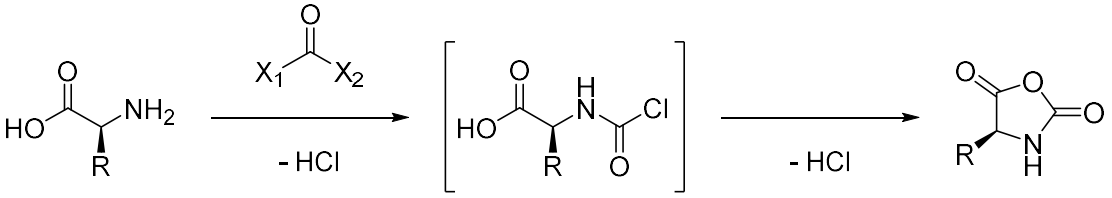
Figure 22 : *Synthèse de NCA selon la méthode de Leuchs*

L'une des méthodes couramment utilisées pour synthétiser des NCA est la méthode de Leuchs. Entre 1906 et 1908, H. Leuchs décrit pour la première fois la synthèse d'un NCA obtenu par hasard lors de la purification par distillation du produit de la réaction entre le chlorure de thionyle ($SOCl_2$) et un *N*-méthoxycarbonyle ou un *N*-éthoxycarbonyle de glycine.[268,269,270] Dès lors, d'autres agents d'halogénation tels que PCl_3, PBr_3, PCl_5 et le dichlorométhyl méthyl éther ont été utilisés pour former des NCA à partir d'acides aminés protégés sur la fonction amine par des groupements du type *t*-butyloxycarbonyle (*t*-Boc), fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) ou carboxybenzyle (Cbz) (**Figure 22**).[271] Grace à cette

[267] Kricheldorf, H. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (35), 5752-5784.
[268] Leuchs, H. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39* (1), 857-861.
[269] Leuchs, H.; Manasse, W. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40* (3), 3235-3249.
[270] Leuchs, H.; Geiger, W. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41* (2), 1721-1726.
[271] Kricheldorf, H. R. *α-Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles*, Universität Hamburg, Hamburg, Germany, **1987**, 214

méthodologie, Ben-Ishai *et al*. ont préparé des NCA en faisant réagir des acides aminés *N*-substitués par des groupements carboxybenzyle ou carboxyéthyle avec du PBr_3 pour obtenir des NCA de phénylalanine (rendement de 82-84%), d'alanine (60-68%), de valine (85-88%) et de lysine (85%).[272] Les sous-produits générés lors de la synthèse de NCA *via* la méthode de Leuchs incluent notamment du HCl, du HBr, des halogénures d'alkyle ainsi que tout excès de l'agent d'halogénation (PCl_3, $SOCl_2$, PBr_3, PCl_5, etc…) et des sous-produits de l'agent d'halogénation utilisé (H_3PO_4 ou $POCl_3$ notamment).

1.1.2. La méthode de Fuchs-Farthing



Phosgène : $X_1 = X_2 = Cl$
Diphosgène : $X_1 = Cl$; $X_2 = OCCl_3$
Triphosgène : $X_1 = X_2 = OCCl_3$

Rendement : 59-84%

Figure 23 : *Synthèse de NCA selon la méthode de Fuchs-Farthing*

La méthode la plus simple et la plus souvent utilisée de nos jours est la méthode de Fuchs-Farthing. Elle fut initialement développée par F. Fuchs en 1922 avant d'être adaptée par C. Farthing au début des années 1950.[273,274] Cette méthode consiste à faire réagir directement un acide aminé (à fonction amine non protégée) avec le phosgène, évitant ainsi la préparation d'un intermédiaire carbamate nécessaire avec la méthode de Leuchs (**Figure 23**). Cependant, cette méthodologie est plus dangereuse du fait de l'utilisation du phosgène qui est un gaz létal pour l'homme (CL_{50} = 500 ppm après 1 min de contact).[275] La première optimisation de cette méthode a été d'utiliser du phosgène dilué à 20% dans le benzène afin de substituer la manipulation d'un gaz par celle d'une solution, sans pour autant résoudre le

[272] Ben-Ishai, D.; Katchalski, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (14), 3688–3689.
[273] Fuchs, F. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1922**, *55* (9), 2943-2943.
[274] Farthing, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 3213–3217.
[275] INRS, Phosgène (FT 72), https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_72, consulté le 10/10/2021.

problème de toxicité. Par la suite, l'utilisation des dérivés du phosgène comme le diphosgène, un liquide, ou le triphosgène, un solide, a été proposée comme alternatives plus sûres.[276,277] Des NCA ont été synthétisés en mélangeant des acides aminés avec du diphosgène dans du THF anhydre à 60°C, permettant d'obtenir les NCA de glycine (70% de rendement), d'alanine (59%) de valine (70%) et de *γ*-méthyl glutamate (84%). Des NCA ont été synthétisés en mélangeant des acides aminés avec du triphosgène dans du THF anhydre à 50°C, permettant d'obtenir les NCA d'alanine (59% de rendement), de valine (83%), de leucine (67%) et de phénylalanine (83%). Malgré tout, cette méthodologie de synthèse reste plus dangereuse que celle proposée par Leuchs car les dérivés du phosgène se décomposent en phosgène lors de la formation du NCA, obligeant un traitement minutieux du milieu réactionnel à la fin de la réaction.

1.1.3. Les méthodes alternatives

Des alternatives aux méthodes de synthèses traditionnelles ont été rapportées dans la littérature ces 20 dernières années. Ces alternatives reposent principalement sur l'utilisation de nouveaux agents d'halogénation dans le cas de la méthode de Leuchs ou l'utilisation de réactifs moins toxiques que le phosgène et ses dérivés dans le cas de la méthode de Fuchs-Farthing. Parmi celles proposées pour remplacer le phosgène, Fujita *et al*. ont proposé l'utilisation de carbonate de 2,4-dinitrophényle (**Figure 24-A**).[278] Ils ont préparé des NCA de glutamate (98% de rendement), d'isoleucine (96%) et de tyrosine (97%). Une autre alternative a été proposée par Koga *et al.* en remplaçant le phosgène par le carbonate de diphényle (**Figure 24-B**). [279] Ils ont ainsi préparé des NCA de phénylalanine, de méthionine et de glutamate avec des rendements inférieurs à 10% pour des temps de réaction supérieur à 40 h. Cependant, aucune de ces alternatives n'a remplacé les méthodes de Fuchs-Farthing ou de Leuchs pour produire des NCA, du fait de réactions plus lentes, de rendements plus faibles

[276] Katakai, R.; Iizuka, Y. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (5), 715-716.
[277] Wilder, R.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (9), 2755-2756.
[278] Fujita, Y. *et al*., *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (22), 5365–5370.
[279] Koga, K. *et al*., *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (19), 4351-4355.

et/ou de réactifs plus difficiles (et plus chers) à se procurer. Aujourd'hui, la méthode de Fuchs-Farthing utilisant du diphosgène reste la voie de synthèse de référence au niveau industriel.

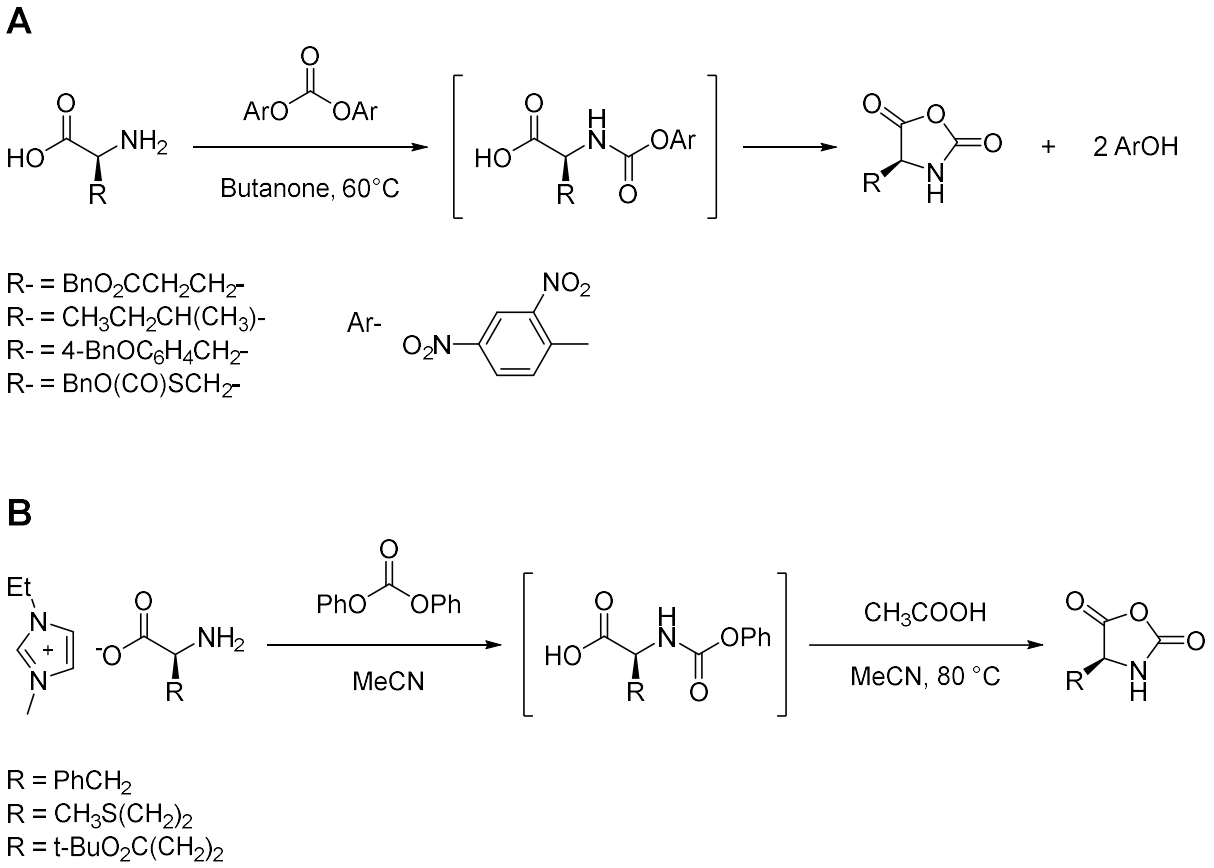
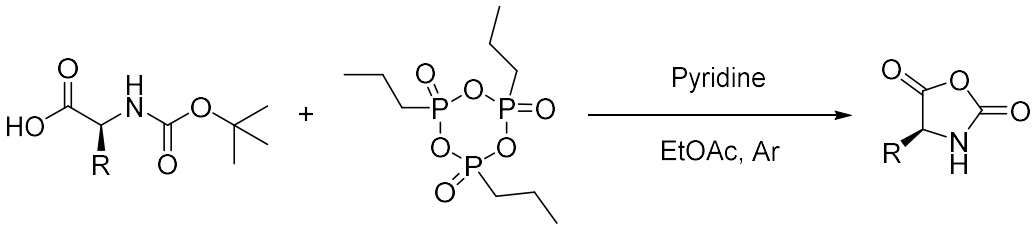


Figure 24 : *Méthodes alternatives de synthèse de NCA basées sur la méthode de Fuchs-Farthing sans utilisation de phosgène*

Récemment, un nouveau procédé de synthèse de NCA a été publié par Laconde *et al.* utilisant l'anhydride propylphosphonique (T3P) comme alternative aux réactifs d'halogénations couramment utilisés dans la méthode de Leuchs.[280] Ce procédé simple, qui n'utilise ni phosgène ni dérivés halogénés, permet d'obtenir des NCA avec des puretés élevées et de très bons rendements en 2 h de réaction à température ambiante (**Tableau 6**). Cette méthodologie a été appliquée à une grande variété d'acides aminés et le procédé est compatible avec de nombreux groupements protecteurs couramment utilisés dans la synthèse peptidique.

[280] Laconde, G. *et al.*, *Org. Lett.* **2021**, *23* (16), 6412-6416.

Tableau 6 : *Synthèse alternative de NCA basée sur la méthode de Leuchs mais n'utilisant pas de réactif halogéné*



NCA	Rendement (en %)	NCA	Rendement (en %)
(L)Trp(Boc)-NCA	80	(L)Tyr(Otbu)-NCA	90
(L)Arg(Pbf)-NCA	85	(L)Phe-NCA	85
(L)Val-NCA	78	(L)Asp(Obzl)-NCA	85
(D)Asp(Obzl)-NCA	89	(L)Thr(Obzl)-NCA	80
(L)Gln(Xan)-NCA	78	(L)Asn(Xan)-NCA	90
(L)Ala-NCA	75	(L)Ser(OBzl)-NCA	78
(L)Glu(OBzl)-NCA	78	(L)Cys(Trt)-NCA	80
(L)Lys(Boc)-NCA	85	(L)Lys(Fmoc)-NCA	88
(L)Tic-NCA	76	(L)Leu-NCA	86

1.2. Application aux NCA *N*-alkylés (NNCA) : données de la littérature

1.2.1. NCA *N*-alkylés dérivés de la glycine

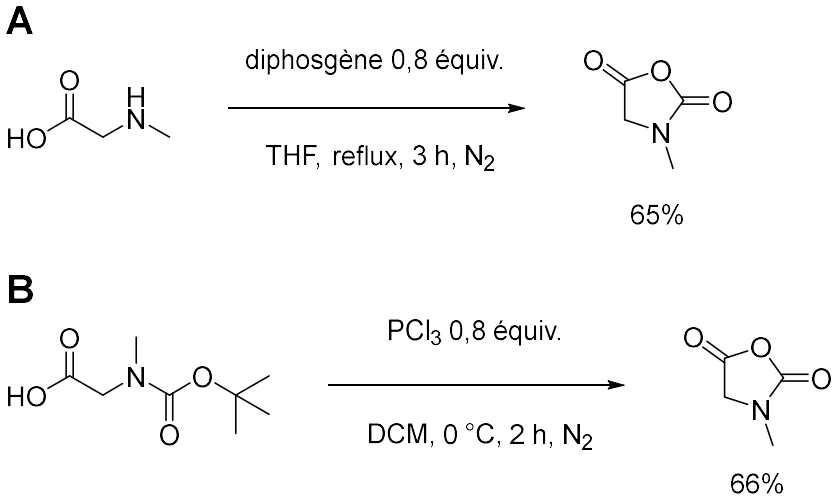


Figure 25 : *Synthèse de la Sar-NCA : A) selon la méthode de Fuchs-Farthing en utilisant du diphosgène et B) selon la méthode de Leuchs utilisant du PCl_3*

Les voies d'accès aux NCA sont transposables à la préparation de NCA *N*-alkylés (NNCA). Les premiers exemples de synthèse de NNCA rapportés dans la littérature portent tous sur des dérivés de la glycine, l'acide aminé le plus simple, ne possédant ni chaine latérale ni atome de carbone chiral.[281] On retrouve dans la littérature des NNCA obtenus *via* la méthode

[281] Fetsch, C. *et al*., *Macromolecules* **2011**, *44* (17), 6746-6758.

de Leuchs et la méthode de Fuchs-Farthing.[271] Le NNCA le plus commun est le *N*-méthylglycine-*N*-carboxyanhydride (Sar-NCA) obtenu à partir d'un acide aminé naturel issu de la biomasse : la sarcosine (ou *N*-méthylglycine) (**Figure 25**).

Du fait de l'absence de centre asymétrique dans la structure de la glycine, il est possible (et souvent plus facile) de former des NNCA dérivés de la glycine sans utiliser la glycine comme substrat. En effet, la réaction entre la benzylamine et le bromoacétate de benzyle, suivie de la déprotection de l'ester benzylique ainsi formé, permet d'obtenir la *N*-benzylglycine (**Figure 26-A**).[282] De même, la réaction entre l'acide glyoxylique et la benzylamine permet de synthétiser la *N*-benzylglycine (**Figure 26-B**).[283] En remplaçant la benzylamine par une autre amine (isobutylamine, isopropylamine, etc…), il est ainsi possible d'obtenir un large panel de NNCA fonctionnalisés sur l'atome d'azote.

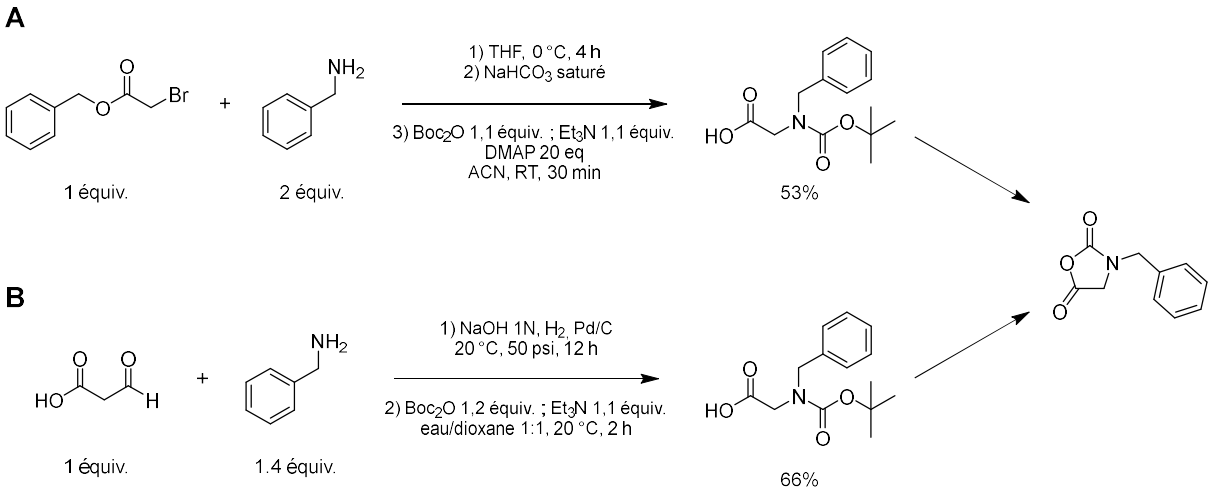


Figure 26 : *Voies de synthèse pour obtenir la N-Boc-N-benzyl-glycine en n'utilisant pas la glycine comme substrat : A) par réaction entre le bromoacétate de benzyle et la benzylamine et B) par réaction entre l'acide glyoxylique et la benzylamine*

1.2.2. NCA *N*-alkylés dérivés des autres acides aminés

Les NNCA dérivés d'autres acides aminés ont été beaucoup moins étudiés que ceux dérivés de la glycine. Akssira et al. ont décrit la synthèse de NCA d'alanine, de valine et de

[271] Kricheldorf, H. R. *α-Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles*, Universität Hamburg, Hamburg, Germany, **1987**, 214
[282] Bossler, H. G. *et al*., *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77* (4), 1124-1165.
[283] Mouna, A. M. *et al*., *Synth. Commun.* **1994**, *24* (17), 2429-2435.

phénylalanine *N*-méthylée en faisant réagir les intermédiaires *N*-Boc-*N*-méthylés avec du PCl_3 (**Figure 27-A**).[284,285] Fu et ses collaborateurs ont préparé des NNCA en faisant réagir les intermédiaires *N*-Boc-*N*-4-méthylbenzyl-alanine et *N*-Boc-*N*-4-méthylbenzyl-leucine avec du PCl_3 (**Figure 27-B**).[286] Actuellement, la grande majorité des NNCA décrits dans la littérature provient d'acides aminés ne possédant pas de chaine latérale fonctionnalisée. Le seul NNCA obtenu à partir d'un acide aminé naturel possédant une chaine latérale fonctionnalisée a été décrit par Muhl et ses collaborateurs. Ils ont décrit la préparation du *N*-Me-L-Met-NCA en faisant réagir la *N*-Me-L-Met avec du diphosgène dans du THF anhydre sous N_2 pendant 45 minutes (**Figure 27-C**).

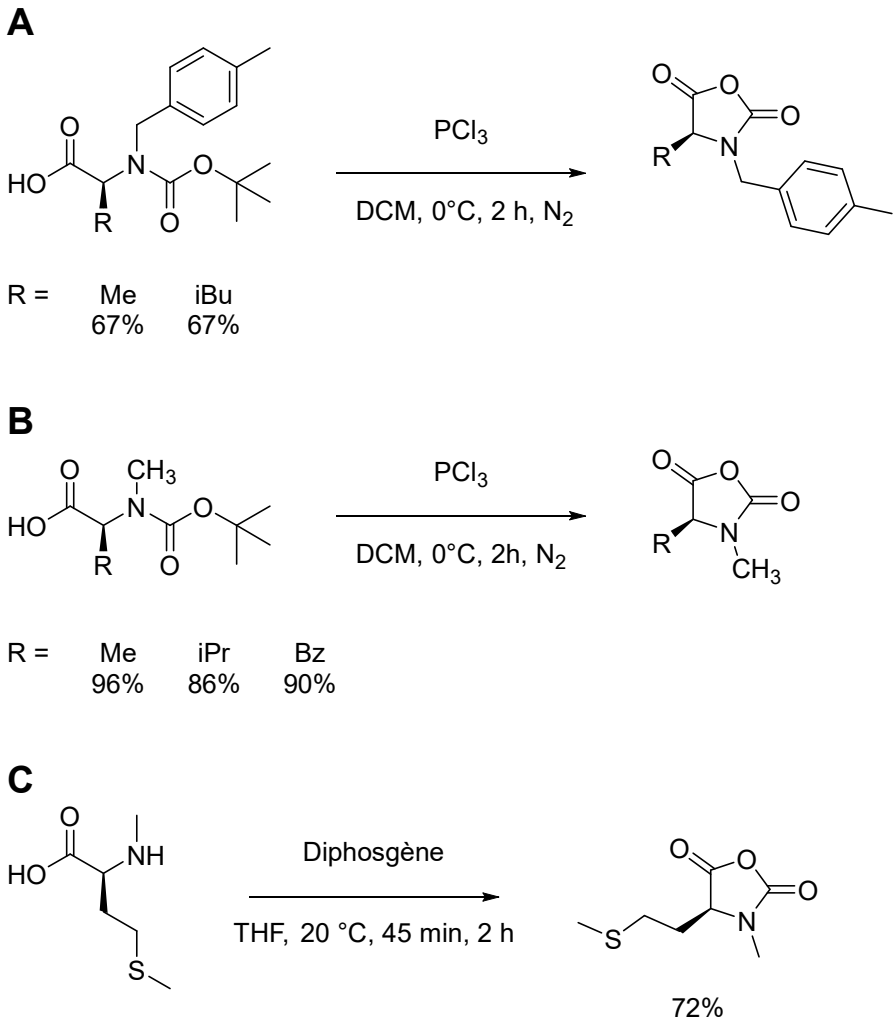


Figure 27 : *Exemples de synthèse de NNCA obtenus à partir d'acides aminés naturels*

[284] Akssira, M. *et al*., *Tetrahedron*, **1994**, *50* (30), 9051-9060
[285] Akssira, M. *et al*., *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47
[286] Fu, X. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (37), 4617-4624.

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur la synthèse de NCA *N*-méthylés à partir d'acides aminés naturels hydrophobes et cationiques (**Figure 28**). L'utilisation d'acides aminés naturels, qui sont des composés naturels, est un enjeu majeur pour la chimie moderne. En effet, la chimie bio-sourcée est une chimie dans laquelle les ressources fossiles sont partiellement ou complétement remplacées par des ressources issues de la biomasse. Dans le contexte actuel, cela permet de restreindre l'empreinte environnementale de la chimie organique. Le premier objectif de ce chapitre de thèse est de synthétiser des dérivés d'acides aminés dits « hydrophobes » (c'est-à-dire possédant une chaine latérale de type alkyle ou alkylaryle) *N*-carbamoylés et *N*-méthylés puis de tenter d'appliquer notre méthodologie de synthèse à des acides aminés dits « cationiques », c'est-à-dire possédant une chaine latérale fonctionnalisée pouvant porter une charge positive au pH physiologique. Le deuxième objectif de ce chapitre de thèse est la cyclisation de ces dérivés en NNCA *via* la méthode de Leuchs afin d'éviter l'utilisation de phosgène et de ses dérivés.

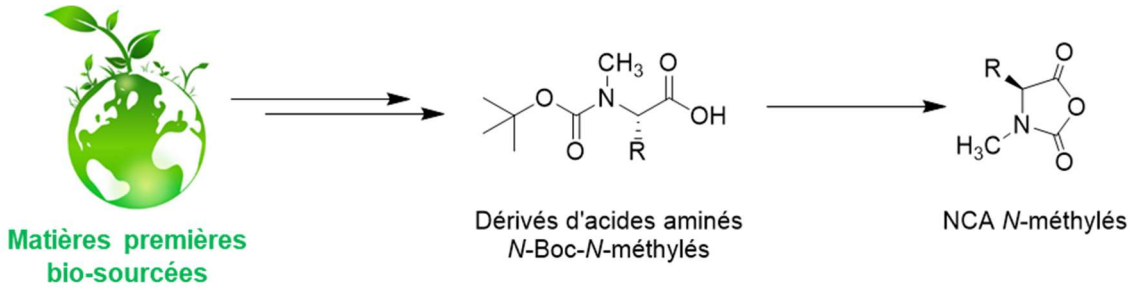


Figure 28 : *Objectif du chapitre 2 : synthèse de N-carboxyanhydrides N-méthylés via la méthode de Leuchs à partir d'acides aminés bio-sourcés possédant une chaine latérale « hydrophobe » ou « cationique »*

2. Synthèse des précurseurs de NNCA : acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés

2.1. Dérivés d'acides aminés « hydrophobes »

Pour synthétiser des précurseurs *N*-Boc-*N*-méthylés d'acides aminés hydrophobes, deux principales méthodologies sont rapportées dans la littérature.[287] Dans les deux cas, la réaction se fait en deux étapes en partant d'un acide aminé naturel. La première méthode

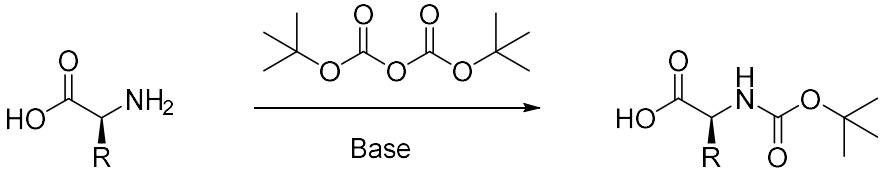
[287] Aurelio, L. *et al*., *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 5823–5846.

consiste à protéger la fonction amine de l'acide aminé par le groupement protecteur *t*-Boc sous forme de carbamate puis à réaliser la *N*-méthylation.[288] La seconde méthodologie consiste, à l'inverse, à débuter la séquence réactionnelle en méthylant la fonction amine de l'acide aminé avant de l'engager dans une réaction de carbamoylation avec Boc_2O.[289]

2.1.1. Séquence carbamoylation/*N*-méthylation

La protection de la fonction amine des acides aminés par le groupe protecteur *t*-Boc est une réaction très courante dans la chimie peptidique. Elle consiste à faire réagir un acide aminé avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) en présence d'une base (**Tableau 7**).[290] Les conditions de réaction sont flexibles : la réaction peut se faire dans l'eau, dans un mélange eau/THF ou eau/dioxane ou dans un solvant organique tel que l'acétonitrile, le dioxane ou le méthanol. Les bases couramment utilisées sont le bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$), le carbonate de potassium (K_2CO_3), l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou la triéthylamine (Et_3N). La protection de la fonction amine d'un acide aminé par un groupement Boc est une réaction rapide avec une conversion de 100%, donnant des rendements souvent supérieurs à 80%.[291,292,293]

Tableau 7 : *Synthèse d'acides aminés N-Boc en utilisant du Boc_2O*

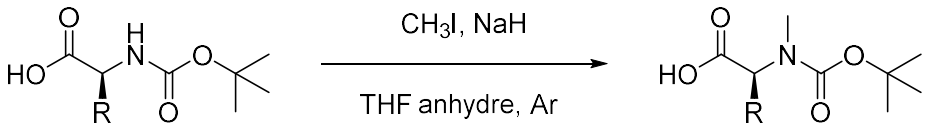


Acide aminé hydrophobe	Base	Rendement (en %)	Ref
Alanine	Na_2CO_3	95%	291
Valine	Et_3N	95%	292
Leucine	Et_3N	99%	292
Isoleucine	K_2CO_3	96%	292
Phénylalanine	NaOH	99%	293

[288] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 916-921.
[289] da Silva, R. A. *et al*., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (43), 7680-7682.
[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910.
[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308.
[292] Pozdnev, V. F. *et al*., *Chem. Nat. Compd.* **1979**, *15* (4), 471–476.
[293] Shen, Z.-L. *et al*., *Chem. Commun.* **2012**, *48* (47), 5856

Une fois l'intermédiaire carbamate obtenu, la seconde étape consiste à déprotoner l'atome d'azote de la fonction carbamate avec, le plus souvent, l'hydrure de sodium (NaH) puis à faire réagir l'anion formé avec le iodométhane (CH_3I) dans un solvant anhydre sous argon (**Tableau 8**).

Tableau 8 : *N-méthylation d'acides aminés N-Boc en utilisant le iodométhane en présence d'hydrure de sodium*



Acide aminé *N*-Boc-*N*-méthylé	Rendement (en %)	Réf
Alanine	83	[290]
Valine	80	[290]
Leucine	83*	[290]
Isoleucine	90*	[290]
Phénylalanine	90*	[290]

* Produit isolé sous forme de sel de dicyclohexylamine

2.1.2. Séquence *N*-méthylation/carbamoylation

Contrairement à la première méthodologie, la séquence réactionnelle qui consiste à méthyler la fonction amine d'un acide aminé avant de l'engager dans une réaction de carbamoylation avec Boc_2O a été beaucoup moins étudiée. En effet, pour introduire un seul groupement alkyle sur la fonction amine d'un acide aminé, la réaction d'amination réductrice est une méthode intéressante. Pour la synthèse d'acides aminés *N*-méthylés, le composé carbonylé utilisé est le formaldéhyde.[289] Cependant, la réaction de mono-méthylation de la fonction amine ne peut pas être contrôlée ce qui conduit à la formation des composés mono-, di- et tri-méthylés qui sont souvent difficile à séparer.[294] Ces réactions de polyalkylations expliquent que cette voie de synthèse soit peu utilisée. Généralement, on utilise comme réducteur de l'hydrogène (H_2) en présence d'un catalyseur (Pd/C) ou une source d'hydrure (le tetrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) ou le cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$). Pour résoudre ce problème, Merryman et ses collaborateurs ont proposé une amination réductrice

[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910
[289] da Silva, R. A. *et al*., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (43), 7680-7682.
[294] Ohfune, Y. *et al*., *Chem. Lett.* (Jpn), **1984**, *13* (3), 441-444.

entre l'acide aminé et le 2-nitrobenzaldéhyde.[295] Du fait de l'encombrement stérique du motif phényle, seul le composé mono-alkylé est alors généré. On procède ensuite à une seconde amination réductrice avec le formaldéhyde. Il reste alors à former la molécule mono-méthylée en clivant le groupement 2-nitrobenzyle par rayonnement ultraviolet (**Figure 29**). Cette réaction n'a jamais été adaptée pour obtenir des intermédiaires *N*-méthylés à grande échelle. Une fois l'intermédiaire *N*-méthylé obtenu, la réaction de protection par un groupement Boc est identique à celle décrite précédemment.

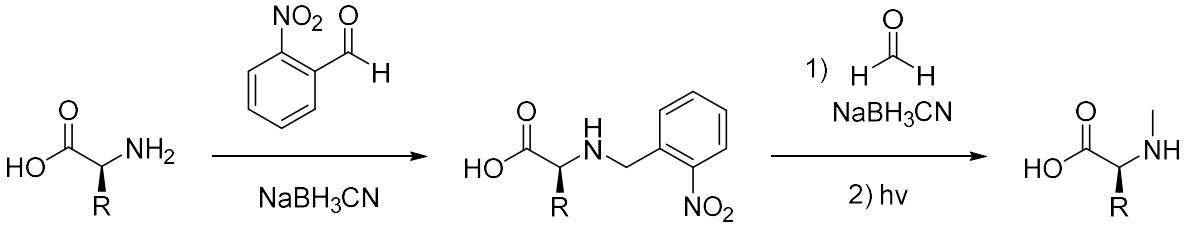
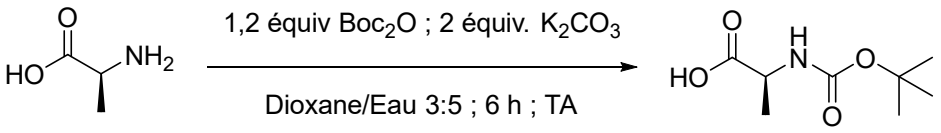


Figure 29 : *Synthèse d'acides aminés mono-méthylés sur la fonction amine par une réaction d'amination réductrice avec le formaldéhyde*

2.1.3. Choix de la meilleure stratégie et optimisation

Pour préparer les précurseurs *N*-Boc-*N*-méthylés, nous avons donc décidé de suivre la première voie de synthèse qui consiste à protéger la fonction amine sous forme de carbamate *tertio*butylique puis à réaliser la *N*-méthylation de la fonction carbamate. Cette voie de synthèse ne comporte en effet que 2 étapes avec un rendement global de 80% et des conversions de 100% ce qui simplifie grandement les étapes de purification. Nous avons choisi de travailler avec 3 acides aminés hydrophobes : la L-Alanine (L-Ala, A), la L-Leucine (L-Leu, L) et la L-Phénylalanine (L-Phe, F). Dans un premier temps, toutes les réactions ont été mises au point avec la L-Ala avant d'être appliquées à la L-Leu et la L-Phe. L'intermédiaire *N*-Boc-L-Ala **1** a été obtenu en faisant réagir la L-Ala avec 1,2 équivalents de Boc_2O et 2 équivalents de K_2CO_3 dans un mélange dioxane/eau 3 : 5, à température ambiante pendant 12 h (**Figure 30**). La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant la ninhydrine comme révélateur jusqu'à conversion complète.

[295] Merryman, C.; Green, R. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (4), 575-582.



1

89%

Figure 30 : *Synthèse de la N-Boc-L-Ala **1***

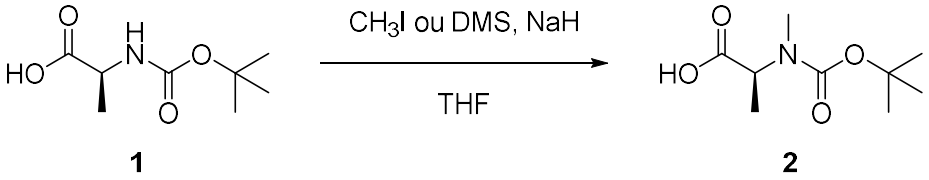
Une fois le composé **1** obtenu, nous avons commencé par mettre en place la réaction de méthylation en faisant réagir **1** sous argon avec 10 équivalents de CH_3I et 10 équivalents de NaH dans du THF anhydre sous argon pendant 12 h. Cette réaction a permis d'obtenir le composé *N*-Boc-*N*-Me-L-Ala **2** avec un rendement de 50% après une recristallisation dans un mélange Et_2O/hexane 1 : 2 (**Tableau 9**). Afin d'optimiser la réaction, nous avons décidé de comparer le iodométhane à un autre agent méthylant, le sulfate de diméthyle (DMS).[296] En effet, le DMS, bien qu'aussi toxique que le CH_3I (car faisant également parti de la famille des agents alkylants) est aujourd'hui préféré au iodométhane à l'échelle industrielle du fait de son faible cout et de sa grande réactivité. De plus, le DMS est un liquide huileux odorant qui possède une température d'ébullition plus élevée que celle du iodométhane (188 °C contre 42,5 °C) qui est un liquide incolore et inodore, ce qui limite fortement le risque d'inhalation et donc d'intoxication.

Nous avons donc commencé par faire réagir le composé **1** avec le DMS dans les mêmes conditions que celles décrites pour le iodométhane, c'est-à-dire 10 équivalents de DMS et 10 équivalents de NaH dans du THF anhydre sous argon. Malgré une conversion totale plus rapide, le rendement final était plus faible (< 30%) et nous avons noté l'apparition d'un produit secondaire qui n'a pas été caractérisé. Nous avons donc décidé de diminuer les quantités de DMS et de NaH mises en jeu. Au final, 1,5 équivalents de DMS et 3 équivalents de NaH ont été utilisés pour obtenir le composé **2** en moins de 4 h avec un rendement de 65% après recristallisation dans un mélange Et_2O/hexane 1 : 2 (**Tableau 9**). En parallèle, nous nous sommes penchés sur la nécessité ou non de travailler dans des conditions anhydres et sous

[296] Prashad, M. *et al*., *Org. Lett.* **2003**, *5* (2), 125-128.

argon. L'utilisation de THF non anhydre comme solvant n'a eu aucune influence sur la synthèse du composé **2**. De même, la présence d'argon n'a eu aucune influence sur le temps de la réaction ainsi que sur le rendement de la réaction. C'est pourquoi nous avons décidé de ne travailler ni en condition anhydre, ni sous atmosphère inerte.

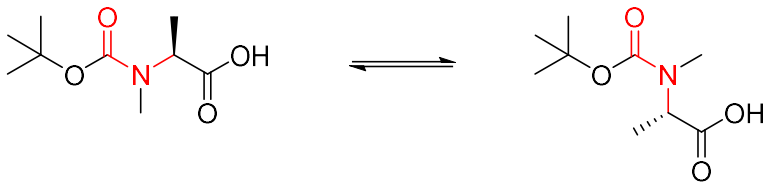
Tableau 9 : *N-méthylation de la N-Boc-L-Ala en utilisant le iodométhane ou le sulfate de diméthyle en présence d'hydrure de sodium*



1 **2**

Agent méthylant	NaH (équiv.)	Temps (h)	Conversion (%)	Rendement (%)
CH_3I (10 équiv.)	10	12	100	50%
DMS (1,5 équiv.)	3	4	100	65%

2.1.3.1. Les rotamères



anti **syn**

Figure 31 : *Représentation des conformations syn et anti de la N-Boc-N-Me-L-Ala* ***2***

Les carbamates sont des fonctions chimiques qui adoptent des conformations syn et anti selon un phénomène appelé effet rotamérique. Pour la fonction carbamate, cet effet est dû à un effet mésomère entre le doublet non liant de l'atome d'azote et le groupement carbonyle de la fonction carbamate (**Figure 31**).[297,298] Au cours de notre travail, nous avons observé ce phénomène sur les spectres RMN pour tous les dérivés *N*-Boc-*N*-méthylés. La **Figure 32** montre le spectre de RMN du proton du composé **2** à 25°C où l'on distingue un dédoublement de certains signaux dû à la présence des 2 rotamères. Dans le but de prouver qu'il s'agit bien de rotamères, une analyse de RMN du proton de ce même composé **2** a été

[297] Moraczewski, A. L. *et al.*, *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (21), 7258-7262.
[298] van Est-Stammer, R.; Engberts, J. B. F. N. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **2010**, *90* (12), 1307–1319.

faite à 70°C : elle montre une disparition du dédoublement de tous les signaux, ce qui valide la présence de 2 rotamères. (**Figure 32**).

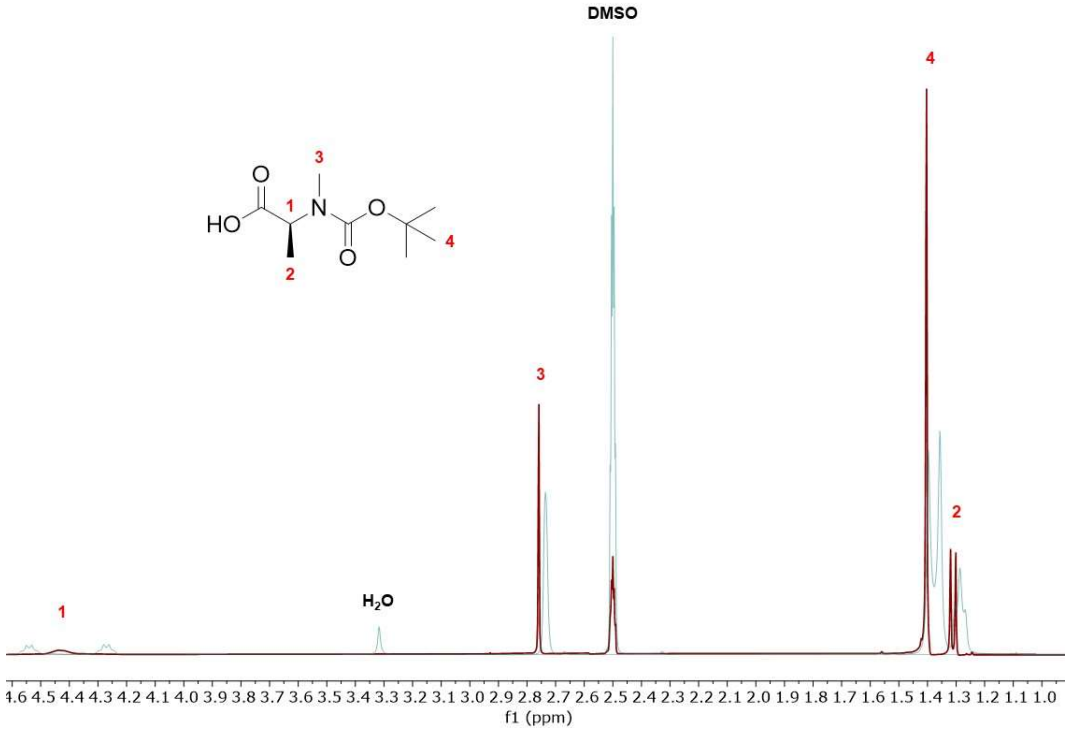


Figure 32 : *Spectres RMN ^{1}H de la N-Boc-N-Me-L-Ala dans le DMSO à 25°C (en bleu) et à 70°C (en rouge)*

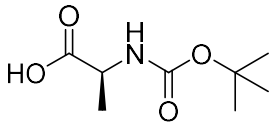
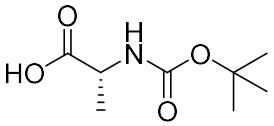
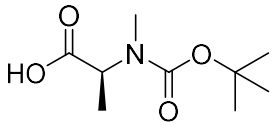
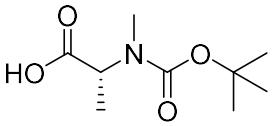
2.1.3.2. Le contrôle de la non racémisation

Un des objectifs de cette thèse est de travailler avec des acides aminés naturels chiraux, afin que l'on retrouve cette caractéristique stéréochimique dans les polymères cibles. Il est donc essentiel de parfaitement contrôler l'ensemble des réactions mises en place afin d'éviter toute racémisation. Pour nous assurer du caractère non racémisant de notre voie de synthèse, nous avons contrôlé le pouvoir rotatoire des composés **1** et **2** afin de les comparer aux valeurs de la littérature.[290,291] En parallèle, nous avons également appliqué la même voie de synthèse à l'énantiomère D de l'Alanine. En utilisant les procédures décrites dans la partie 2.3.1, nous avons synthétisé les composés *N*-Boc-D-Ala **3** et *N*-Boc-*N*-Me-D-Ala **4**. Les pouvoirs rotatoires des molécules **3** et **4** ont été obtenus en préparant des solutions de concentrations connues et analysé à l'aide d'un polarimètre dans les mêmes conditions que

[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910
[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308

pour les composés **1** et **2**. Dans les mêmes conditions expérimentales (concentration, température, etc.), les résultats montrent que la synthèse des dérivés d'acides aminés *N*-Boc et *N*-Boc-*N*-méthylés n'est pas racémisante (**Tableau 10**). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de diffraction des rayons X sur le composé **2** (**Figure 33**).

Tableau 10 : *Comparaison des pouvoirs rotatoires entre les intermédiaires N-Boc-Ala et N-Boc-N-Me-Ala en série L et D*

Structure	**Pouvoir rotatoire** $[\propto]_{25}^{D}$	**Structure**	**Pouvoir rotatoire** $[\propto]_{25}^{D}$
 **1**	- 25° C : 2,0 g/100mL Solvant = AcOH (Lit : - 26°)[291]	 **3**	+ 24° C : 2,0 g/100mL Solvant = AcOH
 **2**	- 30° C : 0,5 g/100mL Solvant = EtOH (Lit : - 30,4°)[290]	 **4**	+ 29° C : 0,5 g/100mL Solvant = EtOH

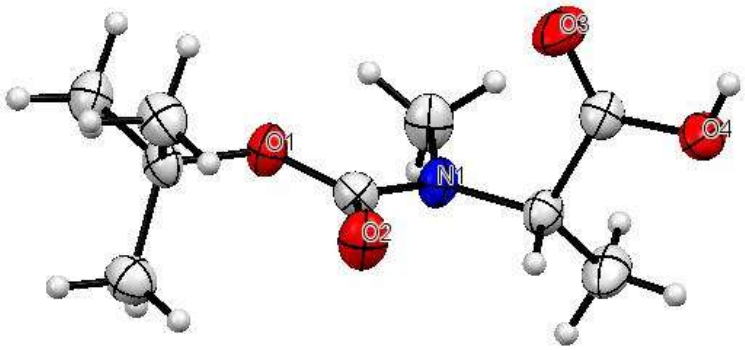


Figure 33 : *Structure de la N-Boc-N-Me-L-Ala **2** obtenue par diffraction des rayons X*

La méthodologie de synthèse a donc été validée et appliquée à la L-leucine et à la L-phénylalanine afin d'obtenir les acides aminés *N*-Boc-L-Leu **5,** N-Boc-*N*-Me-L-Leu **6,** *N*-Boc-L-Phe **7** et *N*-Boc-*N*-Me-L-Phe **8** (**Figure 34**).

[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308
[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910

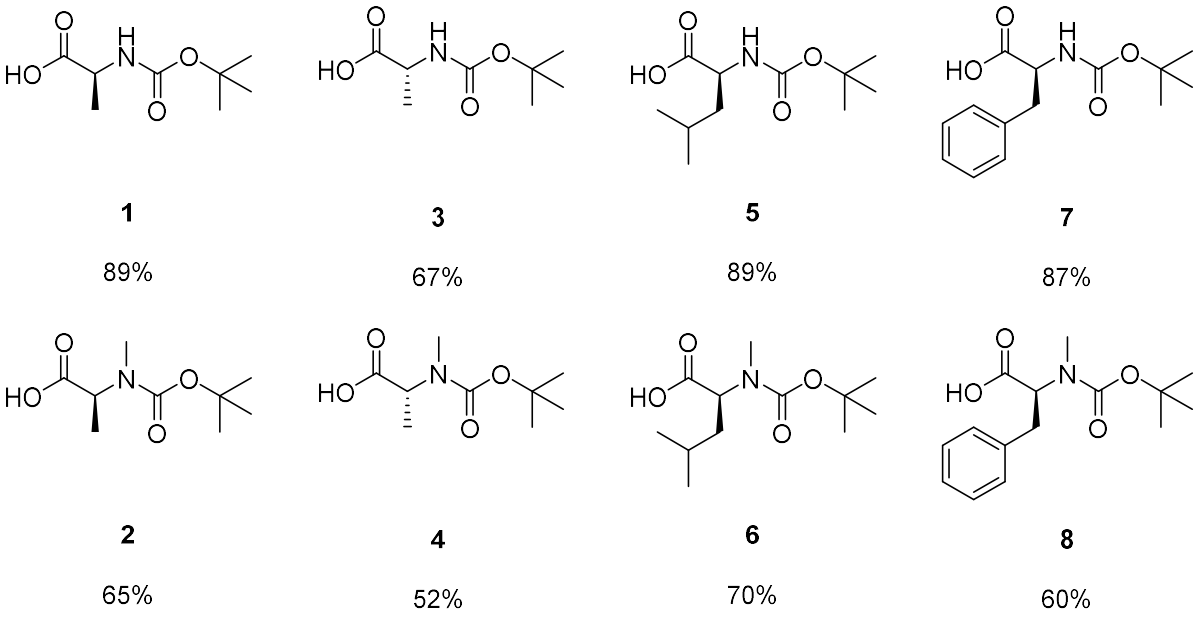


Figure 34 : *Série d'acides aminés N-Boc-N-méthylés hydrophobes synthétisée*

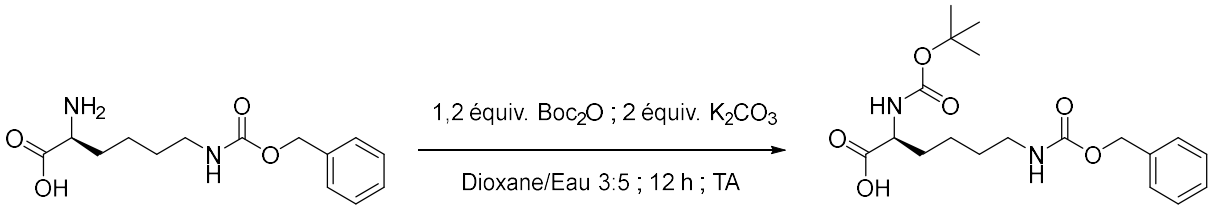
En résumé, nous avons optimisé une méthodologie de synthèse non racémisante qui permet de produire des acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés à partir d'acides aminés naturels avec des de bons rendements (~90% pour l'étape de carbamoylation et 60-70% pour l'étape de *N*-méthylation). Notre méthodologie est rapide, simple, efficace et elle ne nécessite aucune purification par colonne chromatographique.

2.2. Dérivés d'acides aminés « cationiques »

Dans le but de concevoir des copolymères antibactériens amphiphiles, nous avons choisi d'inclure dans la composition des polymères cibles un acide aminé possédant une chaine latérale fonctionnalisée pouvant porter une charge cationique au pH physiologique. Parmi les acides aminés naturels basiques présents dans la structure des PAM, on retrouve fréquemment la lysine et ses dérivés (ornithine et acide 2,4-diaminobutyrique) qui possèdent une fonction amine, l'arginine qui possède une fonction guanidine et quelque fois l'histidine qui possède un groupement imidazole. Dans ce travail de thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur la lysine et ses dérivés.

2.2.1. Application du protocole précédent à la L-Lysine

Afin de préparer le précurseur N_α-Boc-N_α-Me-L-Lysine, nous avons utilisé la procédure optimisée qui a été décrite précédemment dans la partie 2.1.3, en utilisant comme produit de départ la N_ε-Cbz-L-Lys commerciale. La N_α-Boc-N_ε-Cbz-L-Lys **9** a été obtenue en faisant réagir la N_ε-Cbz-L-Lys avec 1,2 équivalents de Boc_2O et 2 équivalents de K_2CO_3 dans un mélange dioxane/eau 3 : 5 à température ambiante pendant 12 h (**Figure 35**).



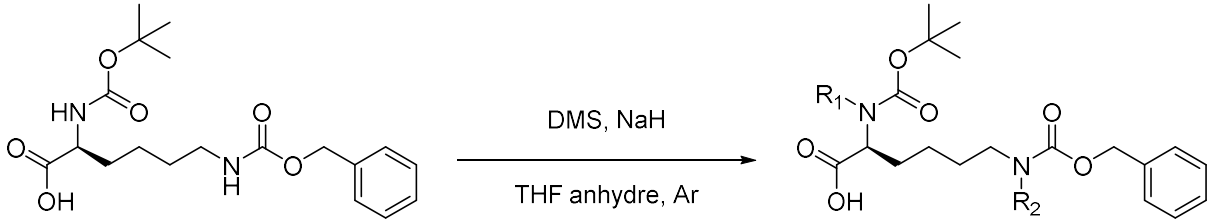
9

87%

Figure 35 : *Synthèse de la N_α-Boc-N_ε-Cbz-L-Lys **9***

La synthèse du dérivé N_α-Boc-N_α-Me-N_ε-Cbz-L-Lys n'ayant jamais été décrite, nous avons commencé par mettre en place la réaction de *N*-méthylation décrite dans la partie 2.1.3 en faisant réagir le composé **9** avec 1,5 équivalents de DMS et 3 équivalents de NaH dans du THF pendant 4 heures. Malheureusement, cette réaction a généré un mélange de composés qui n'ont pas pu être séparés sur colonne de silice. En effet, le composé **9** comporte deux fonctions carbamates qui peuvent être *N*-méthylées dans les conditions décrites précédemment. Dans un premier temps, nous avons tenté d'optimiser les conditions de réaction avec pour objectif d'obtenir très majoritairement le composé *N*-méthylé sur le groupement carbamate *tertio*butylique. Les essais réalisés sont présentés dans le **Tableau 11**. Les réactions ont été suivies par CCM en utilisant la ninhydrine comme révélateur.

Tableau 11 : *Essais de N-méthylation de **9***



9

Essai	Agent méthylant	NaH (Nbre équiv.)	Temps (h)	Température (°C)	Produits observés par CCM*		
					$R_1 = R_2 = H$	$R_1 = H$ et $R_2 = CH_3$ ou $R_1 = CH_3$ et $R_2 = H$	$R_1 = R_2 = CH_3$
1	DMS (1,5 équiv.)	3	4	20	Oui	Oui	Oui
2	DMS (2 équiv.)	3	4	20	Non	Oui	Oui
3	DMS (1 équiv.)	3	4	20	Oui	Oui	Oui
4	DMS (1 équiv.)	3	4	0	Oui	Oui	Non
5	DMS (0,5 équiv.)	3	4	20	Oui	Oui	Non
6	DMS (3 équiv.)	6	6	20	Non	Non	Oui

* Les composés mono *N*-méthylés n'ont pas pu être différenciés par CCM

Les différents essais ne nous ont pas permis d'obtenir le composé *N*-méthylé uniquement sur la fonction carbamate tertiobutylique. Selon les conditions, nous avons observé la présence de 1 à 4 produits de réaction correspondants au substrat, aux produits *N*-méthylés sur une des deux fonctions carbamates et au produit bis-*N*-méthylé sur les deux fonctions carbamates. De plus, les composés présentant des propriétés physico-chimiques assez voisines, nous n'avons pas réussi à les isoler par chromatographie. C'est pourquoi, nous avons décidé de synthétiser le composé *bis N*-méthylé qui demeure une molécule potentiellement intéressante pour la préparation de futurs copolymères amphiphiles cationiques. Ainsi, le composé N_α-Boc-N_α-Me-N_ε-Cbz-N_ε-Me-L-Lys **10** a été obtenu en faisant réagir le composé **9** avec 3 équivalents de DMS et 6 équivalents de NaH dans le THF pendant 6 h à température ambiante (**Figure 36**). Le composé **10** a ainsi été obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 75%.

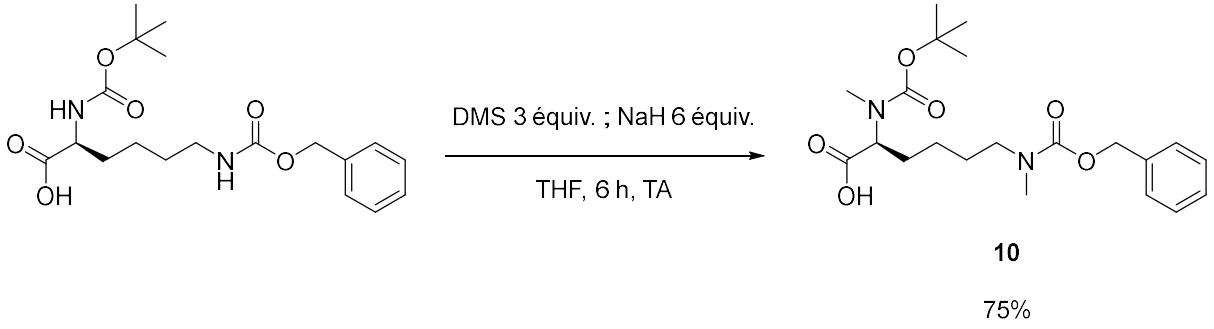


Figure 36 : *Synthèse de la N_α-Boc-N_α-Me-N_ε-Cbz-N_ε-Me-L-Lys **10***

En résumé, nous avons appliqué notre méthodologie de synthèse afin de préparer un intermédiaire *N*-Boc-*N*-méthylé possédant une chaine latérale qui, après déprotection du groupement Cbz, peut être cationique au pH physiologique. Nous avons dû adapter notre méthodologie car nous n'avons pas été en mesure d'obtenir une *N*-méthylation sélective et

nous avons décidé de synthétiser le composé *bis N*-méthylé de Lysine qui est une molécule originale et un « intermédiaire cationique » qui demeure potentiellement intéressant en vue de préparer des polymères amphiphiles cationiques.

2.2.2. Stratégie alternative à partir de la L-Glutamine

La méthodologie de synthèse présentée dans le paragraphe 2.2.1 transposée à la lysine n'a permis d'isoler que le composé bis *N*-méthylée sur les deux fonctions carbamates. Dans le but de synthétiser un acide aminé *N*-Boc-*N*-méthylé qui, après déprotection, possèdera une fonction amine primaire, DeGrado et ses collaborateurs ont synthétisé la *N*-Boc-*N*-Me-L-Ornithine, un analogue de la lysine possédant une chaine latérale carbonée plus courte, à partir de la *N*-Boc-L-Glutamine (**Figure 37**).[299]

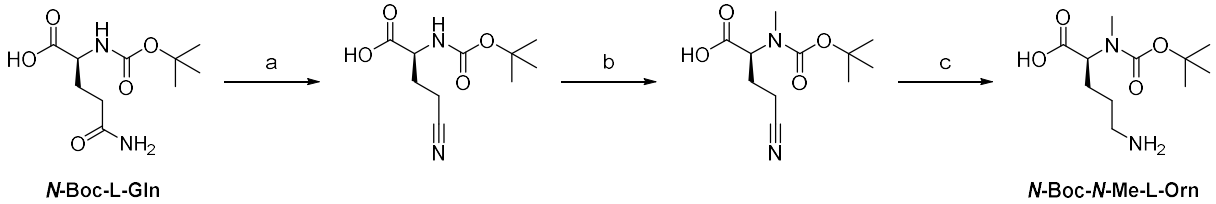
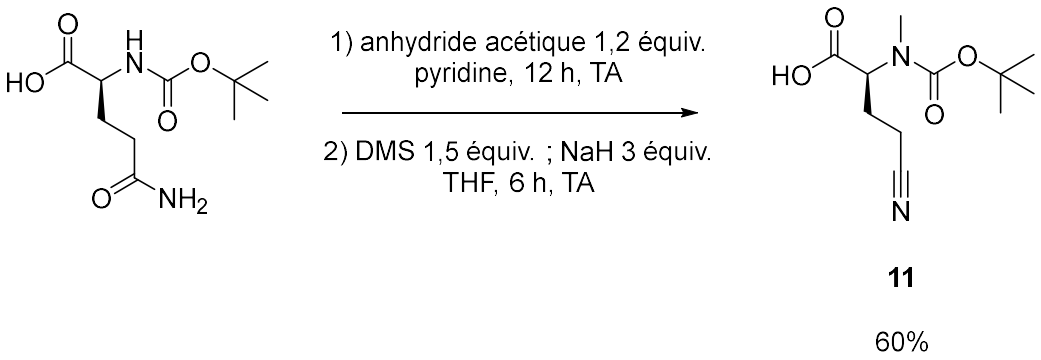


Figure 37 : *Synthèse de la N_α-Boc-N_α-Me-L-Orn à partir de la N-Boc-L-Gln : (a) anhydride acétique, pyridine, 90% ; (b) CH_3I, NaH, THF, 83% ; (c) H_2/PtO_2, i-PrOH, 95%*

Nous avons décidé d'appliquer cette stratégie afin de produire un nouveau composé cationique en adaptant le protocole décrit dans la **Figure 37**. Nous avons commencé par déshydrater la fonction amide de la *N*-Boc-L-Glutamine en nitrile avec 1,2 équivalent d'anhydride acétique dans la pyridine pendant 12 h. Après avoir éliminé la pyridine sous pression réduite et sans purification supplémentaire, nous avons solubilisé le milieu réactionnel dans du THF en présence de 1,5 équivalent de DMS et 3 équivalents de NaH pendant 6 h à température ambiante. Cette séquence réactionnelle a permis de synthétiser l'acide N_α-Boc-2-aminométhyl-4-cyanobutyrique **11** avec un rendement global de 60% (**Figure 38**).

[299] Xue, C-H ; DeGrado. F., *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 55 - 58

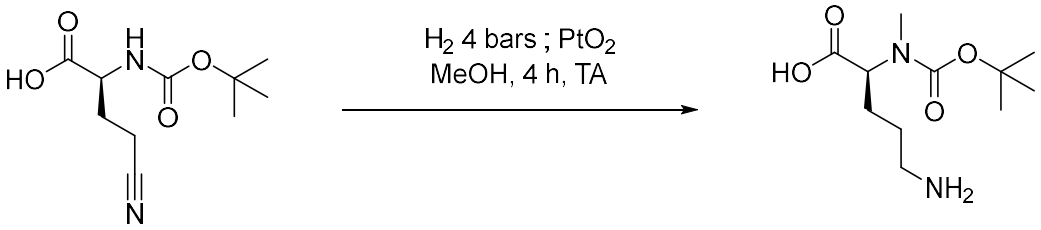


11

60%

Figure 38 : *Synthèse de la N_α-Boc-2-aminométhyl-4-cyanobutyrique **11** à partir de la N-Boc-L-Gln*

Enfin, l'hydrogénation catalytique du composé **11** dans le méthanol en présence de dioxyde de platine (PtO_2) et sous pression de H_2 (4 bars) a permis d'obtenir la *N*-Boc-*N*-Me-L-Ornithine **12** (**Figure 39**).



11 **12**

95%

Figure 39 : *Synthèse de la N_α-Boc-N_α-Me-L-Orn **12** par hydrogénation catalytique du composé **11***

Nous avons ainsi réalisé la synthèse d'un dérivé d'ornithine *N*-Boc-*N*-méthylé à fonction amine primaire préservée sur sa chaine latérale via trois étapes de synthèse à partir de la Boc-Glutamine avec un rendement global de 57%. Avant que ce composé puisse être cyclisé en NNCA, une dernière étape de synthèse consistant à protéger la fonction amine sur sa chaine latérale est indispensable et reste à faire.

3. Synthèse des *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés (NNCA)

A partir des dérivés *N*-Boc-*N*-méthylés, des NNCA ont été préparés en une étape par la méthode de Leuchs. Pour parvenir à une procédure de cyclisation optimale, deux réactifs électrophiles ont été évalués ($SOCl_2$ et PCl_3) et deux techniques de purification ont été utilisées (cristallisation et filtration sur célite).

Le mécanisme de cyclisation des acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés en NNCA par la méthode de Leuchs n'a pas été étudié mais nous avons émis l'hypothèse d'un mécanisme présenté dans la **Figure 40** avec comme réactif électrophile $SOCl_2$. La réaction pourrait se décomposer en : 1) l'halogénation de la fonction acide carboxylique par $SOCl_2$, conduisant à un intermédiaire chlorure d'acyle et à la libération de SO_2 puis 2) la cyclisation en NNCA par une attaque nucléophile intramoléculaire induite par la déprotection acide du groupement tertiobutylique par HCl.

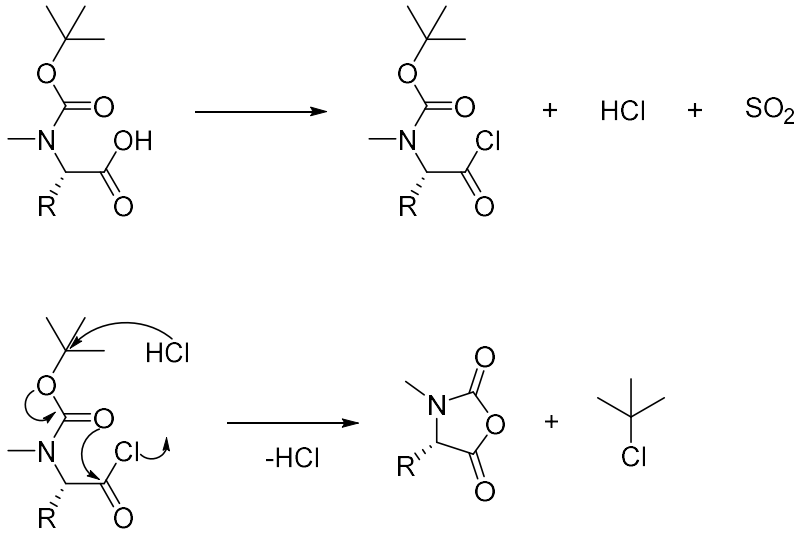


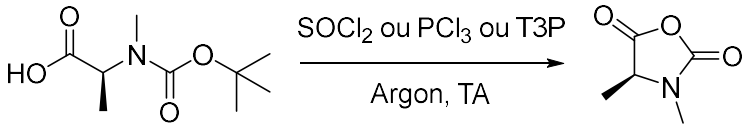
Figure 40 : *Mécanisme proposé pour la formation de NNCA par la méthode de Leuchs avec $SOCl_2$*

3.1. Optimisation de la synthèse de NNCA

Comme indiqué précédemment (partie 1.2.2), le PCl_3 est le réactif le plus fréquemment utilisé pour obtenir des NNCA à partir d'acides aminés *N*-méthylés dont le groupement amine est protégée par une fonction carbamate. Récemment, un nouveau réactif, l'anhydride propylphosphonique (T3P), a été proposé comme alternatif au PCl_3. Ainsi, les réactions entre la *N*-Boc-*N*-Me-L-Ala **2** et le trichlorure de phosphore (PCl_3), le chlorure de thionyle ($SOCl_2$) ou l'anhydride propylphosphonique (T3P), conduisant au *N*-Me-L-Ala-NCA **13,** ont été comparées (**Tableau 12**). La formation du NNCA a été contrôlée par IR en suivant l'apparition et l'augmentation des bandes d'élongations des groupements NC=O et OC=O à ~1850 et ~1780 cm^{-1} du NCA jusqu'à ce qu'aucun changement ne soit observé (**Figure 41**). Nous avons constaté que le PCl_3 est le réactif qui permet à la fois d'obtenir le meilleur rendement et la

durée de réaction la plus courte. Après 1 h de réaction, nous avons obtenu le composé **13** avec un rendement de 89%.

Tableau 12 : *Essais de synthèse de la N-Me-L-Ala-NCA **13***



2 **13**

Essai	Nbre équiv. *N*-Boc-*N*-Me-Ala	Réactif (Nbre équiv.)	Solvant	Temps (h)	Rendement (%)
1	1	$SOCl_2$ (1,2)	THF anhydre	2	77
2	1	PCl_3 (1,2)	DCM anhydre	1	89
3	1	TP3 (1,2)	EtOAc	2	69

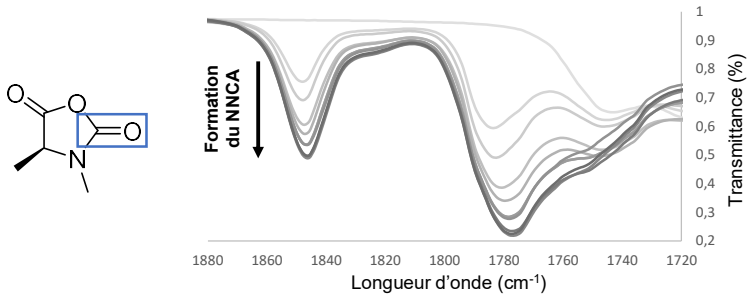


Figure 41 : *Suivi de la formation du N-Me-L-Ala-NCA via l'apparition et l'augmentation de la bande d'élongation à 1850 cm^{-1} correspondant à la liaison NC=O du carboxyanhydride (en bleu)*

Ensuite, nous avons concentré nos efforts sur la purification du *N*-Me-Ala-NCA **13**. En effet, les NNCA préparés *via* la méthode de Leuchs génèrent des contaminants tels que du HCl, des halogénures d'alkyle ainsi que tout excès et sous-produits de l'agent d'halogénation utilisé. Par exemple, au cours de la synthèse du NCA, le HCl peut ouvrir les cycles conduisant à la formation de dérivés de chlorure d'acyle (**Figure 42**). [249,300,301] C'est pourquoi, pour être utilisés dans une synthèse contrôlée de polypeptide, les NNCA doivent être débarrassés de tous ces contaminants électrophiles qui peuvent inhiber ou ralentir le futur processus de polymérisation dans lequel ils vont être engagés.[302]

[249] Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3668–3672.
[300] Brenner, M.; Photaki, I. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39* (6), 1525–1528.
[301] Katchalski, E.; Sela, M. *Adv. Protein Chem.* **1958**, *13* (C), 243–492.
[302] Dorman, L. C.; Shiang, W. R.; Meyers, P. A. *Synth. Commun.* **1992**, *22* (22), 3257–3262.

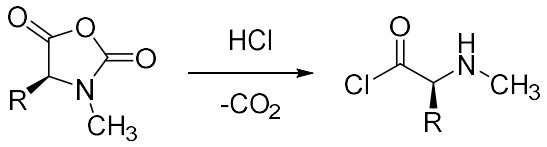


Figure 42 : *Possible réaction d'ouverture du cycle d'un NNCA par HCl conduisant à la formation de chlorure d'acyle*

Traditionnellement, les NCA sont purifiés par des cristallisations répétées dans des solvants anhydres.[276] La recristallisation est utile pour la purification de nombreux NCA qui sont généralement des solides, mais plusieurs recristallisations sont souvent nécessaires pour éliminer toutes traces d'impuretés. En effet, certaines impuretés tels que les halogénures d'alkyles entravent la cristallisation des NCA et une étape de purification préliminaire doit être réalisée avant que le NCA puisse cristalliser. Ces recristallisations multiples sont souvent lentes et fastidieuses et une expertise est essentielle pour déterminer les conditions de solvant optimales pour obtenir les meilleurs résultats. En fonction de la nature du NCA, il est possible de faire entre 2 et 6 recristallisations, ce qui peut mener à de faibles rendements. Il est aussi possible de purifier des NCA par sublimation, mais cette procédure est limitée à quelques NCA et associée à de faibles rendements.[303,304] En outre, certains NCA ne peuvent être isolés que sous la forme d'huile et par conséquent, ne peuvent pas être purifiés par recristallisation. Ces dernières années, des nouvelles méthodes de purification de NCA ne nécessitant pas de recristallisation ont été proposées. Kramer et collaborateurs ont décrit la purification de NCA en utilisant la chromatographie flash sur colonne.[249] Ils ont montré que cette technique permettait d'éliminer rapidement toutes les impuretés sur une large sélection de NCA différents. Semple *et al*. ont par ailleurs décrit une méthode de filtration sur célite qui a démontré son efficacité dans l'élimination des contaminants chlorés.[305]

Nous avons décidé de transposer le protocole de purification par filtration sur célite pour le composé **13** en effectuant quelques modifications. A la place d'une filtration, nous

[276] Kricheldorf, H. R. *α-Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles*, Universität Hamburg, Hamburg, Germany, **1987**, 214
[303] Waley, S. G.; Watson, J. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1949**, *199* (1059), 499–517.
[304] Ballard, D. G. H.; Bamford, C. H. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1954**, *223* (1155), 495–520.
[249] Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3668–3672.
[305] Semple, J. E. *et al*., *Synth. Commun.* **2017**, *47* (1), 53–61.

avons effectué une agitation d'une solution de **13** dans du DCM anhydre sous atmosphère inerte sur de la célite préalablement séché sous pression réduite à 150 °C pendant 2 h (~ 2 g de célite pour 1 g de NNCA). Après une agitation de 5 min, la solution a été canulée dans un second Schlenk avant d'être évaporée sous pression réduite. Nous avons décidé de comparer cette méthode de purification à la recristallisation du composé **13** dans un mélange DCM/pentane (1 : 5). Nous avons utilisé la RMN du phosphore pour contrôler la présence ou non de résidus phosphorés (PCl_3, H_3PO_4). Comme le montre la **Figure 43**, l'utilisation de célite est plus efficace que 3 recristallisations pour éliminer les contaminants phosphorés mais a aussi permis d'isoler le composé **13** avec des rendements plus élevés (95% contre 89%). De plus, cette méthode est tout particulièrement adaptée aux NNCA obtenus sous la forme d'huile pour lesquels des recristallisations sont impossibles.

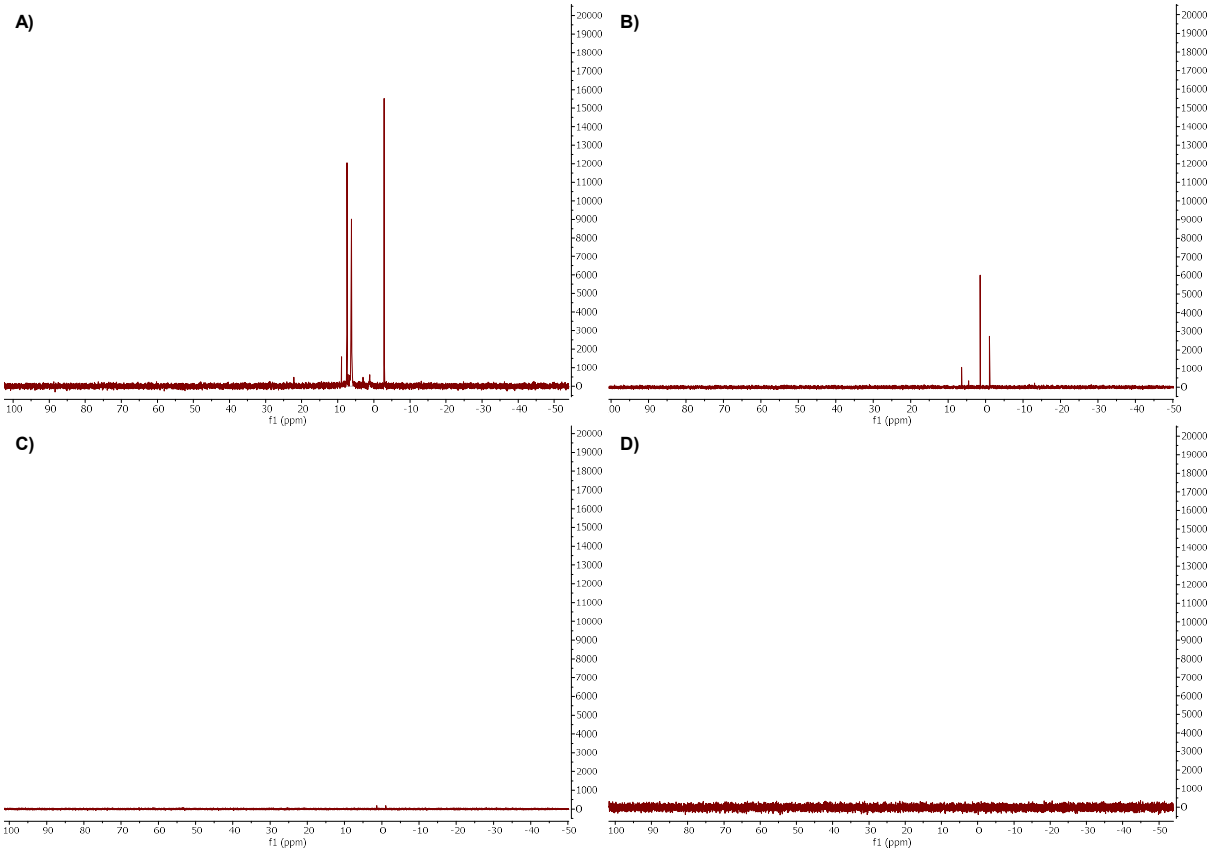


Figure 43 : *Analyse RMN ^{31}P du composé **13** : A) après 1 recristallisation ; B) après 2 recristallisations ; C) après 3 recristallisation et D) après une filtration sur célite*

3.2. Synthèse d'une bibliothèque de NNCA

Pour préparer les *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés à partir des acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés préparés dans la partie 2, nous avons donc décidé d'utiliser le PCl_3 comme agent de cyclisation et nous avons purifié les différents NNCA en suivant la méthode décrite dans la partie 3.1. Cette méthodologie a permis de préparer avec succès les composés **13 – 17** avec des rendements allant de 80 à 95% (**Figure 44**).

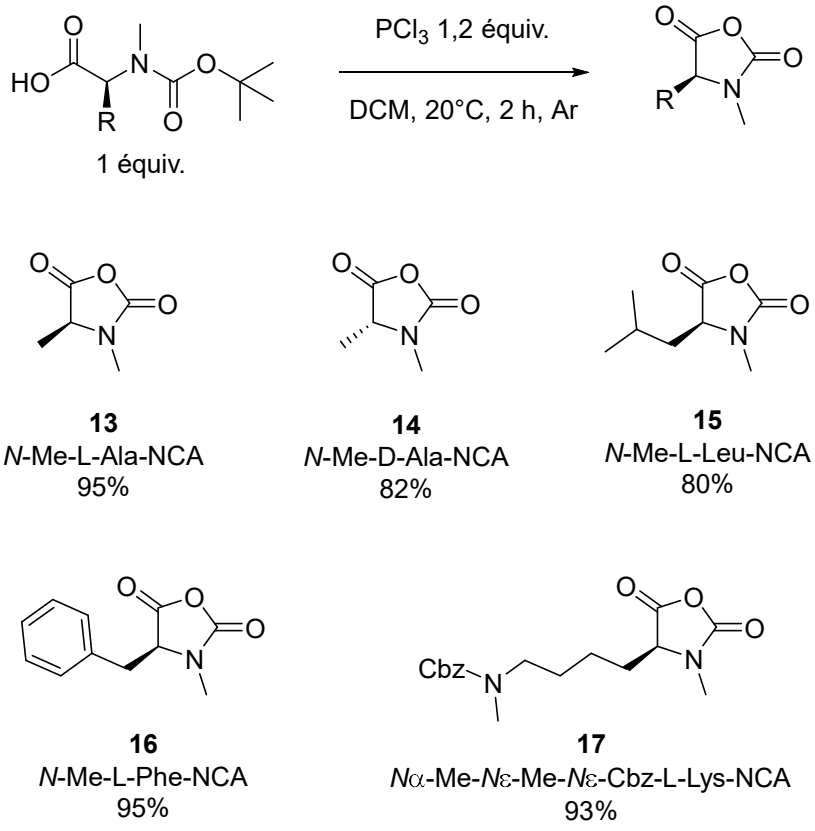


Figure 44 : *Synthèse d'une série de NNCA possédant une chaine latérale « hydrophobe » ou « cationique » via la méthode de Leuchs.*

En résumé, nous avons préparé une petite bibliothèque de NNCA à partir d'acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés synthétisés dans les parties 2.1 et 2.2. Dans l'optique de produire des NNCA les plus purs possible, nous avons optimisé l'étape de purification à l'aide d'une agitation en présence de célite suivi par une filtration sous argon. Cette méthode simple, efficace et compatible avec des NNCA sous forme solide ou d'huile a permis de produire des NCA *N*-méthylés avec des rendements compris entre 80 et 95%. En utilisant cette méthode, nous avons synthétisé pour la première fois un NCA *bis N*-méthylé de lysine protégée sur sa chaine latérale par un groupement Cbz. Les NNCA étant des molécules sensibles, ils sont

conservés sous argon à -20 °C jusqu'à leur utilisation comme monomère pour la polymérisation par ouverture de cycle.

4. Conclusion

En conclusion, nous avons préparé une série de NCA *N*-méthylés hydrophobes et, pour la première fois, un NCA *bis N*-méthylé de lysine protégé sur la chaine latérale par un groupement Cbz en utilisant une méthodologie en 3 étapes de synthèse : 1) la carbamoylation de la fonction amine des acides aminés en carbamate tertiobutylique ; 2) la *N*-méthylation de la fonction carbamate tertiobutylique en utilisant le sulfate de diméthyle et l'hydrure de sodium pour obtenir les composés *N*-Boc-*N*-méthylés et 3) la cyclisation des composés *N*-Boc-*N*-méthylés en utilisant la méthode de Leuchs avec du trichlorure de phosphore. Cette méthodologie non racémisante nous a permis de produire rapidement des monomères à partir de matières premières bio-sourcés en seulement 3 étapes de synthèse avec des bons rendements (~90% pour l'étape de carbamoylation, 60-70% pour l'étape de *N*-méthylation et 80-95% pour l'étape de cyclisation en NNCA). Nous avons optimisé la purification des NNCA en utilisant de la célite préalablement séchée sous pression réduite à 150 °C pendant 2 h, ce qui nous a permis d'obtenir des composés avec d'excellentes puretés, débarrassés de toutes impuretés souvent retrouvées dans les synthèses de NCA classiques et qui affectent leur polymérisation. Dans le chapitre 3, nous allons étudier la polymérisation de cette petite bibliothèque de NNCA « hydrophobes » et « cationiques » dans le but de produire des homopolymères puis des copolymères amphiphiles avec une potentielle activité contre *Clostridioides difficile*.

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériels

Tous les produits chimiques et les solvants utilisés dans ce travail ont été achetés chez Sigma Aldrich, Fluorochem, Acros, TCI et ont été utilisés sans aucune purification

supplémentaire. Le tétrahydrofurane a été obtenu à partir d'un purificateur de solvant au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse), conservés sous atmosphère d'argon. L'eau MiliQ a été obtenue à partir d'un système de purification d'eau MEDICA-RFII 7/15 (LCC, Toulouse).

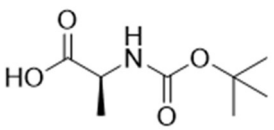
5.2. Equipements

Les spectres IR ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre FTIR (Spectromètre IR Frontier, Perkin Elmer), et les échantillons ont été mesurés avec un analyseur ATR (GladiATR, Pike Technologies) de Fisher technologies effectuant 32 scans au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse, France). Les données brutes ont été obtenues avec le logiciel Perkin Elmer spectrum 10 et les données ont été traitées avec le logiciel Originlab 2016.

Les spectres de RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P ont été enregistrés à l'aide des spectromètres Brucker Avance 300, Brucker Avance 400 et Brucker Avance III 400 au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse, France). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel MestReNova 14.1.2. Les déplacements chimiques des signaux sont donnés en ppm. Les spectres obtenus ont été calibrés en utilisant les signaux résiduels des solvants (Dimethylformamide (DMF) 8,03 ppm ; $CHCl_3$ 7,26 ppm et H_2O 4,79 ppm). Les signaux ont été classés comme suit : singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m) et large (br).

5.3. Préparation des intermédiaires *N*-Boc-*N*-méthylés

N-Boc-L-Alanine (**1**).[291]



1

[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308

Dans un ballon, la L-Alanine (1,00 g ; 11,2 mmol ; 1 équiv.) et le carbonate de potassium (3,10 g ; 22,4 mmol ; 2 équiv.) ont été solubilisés dans 40 mL d'une solution de dioxane/eau (62,5% et 37,5%) et agités pendant 30 minutes. Ensuite, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,95 g ; 13,5 mmol ; 1,2 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agitée à température ambiante. La réaction est suivie par CCM en éluant avec un mélange DCM/MeOH (9 : 1) et en révélant avec une solution de ninhydrine. Après 12 h, le milieu réactionnel est concentré de moitié sous pression réduite avant d'être acidifié avec une solution de HCl 1M jusqu'à pH = 2-3. La solution a été extraite avec Et_2O (3x 50 mL) puis les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl (2x 50 mL). La phase organique est finalement séchée avec du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) puis évaporée sous pression réduite. Le produit **1** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 89% (10,0 mmol ; 1,9 g).

Formule brute : $C_8H_{15}NO_4$

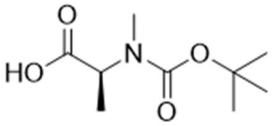
Masse molaire : 189,20 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 81 °C (Lit 79-81 °C)[291]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,22 (d ; *J* = 7,3 Hz ; 3H ; CH_3) ; 1,38 (s ; 9H, tBu) ; 3,92 (m ; 1H ; CH) ; 7,10 (d ; *J* = 7,6 Hz ; 1H ; NHBoc) ; 12,38 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 17,50 (CH_3) ; 28,68 (tBu) ; 49,26 (CH) ; 78,38 (tBu) ; 155,71 (COON) ; 175,11 (COOH). En accord avec la littérature[291] ; $[\alpha]_D^{25}$ = - 25° (c : 2 g/100 mL dans l'acide acétique)[291]

N-Boc-*N*-Me-L-Alanine (**2**).[290]



2

[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308
[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910

Dans un ballon, **1** (1,00 g ; 5,3 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 20 mL de THF à 0 °C et a été agité pendant 30 min. Ensuite, l'hydrure de sodium à 60% (0,64 g ; 15,9 mmol, 3 équiv.) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (0,75 mL ; 8 mmol ; 1,5 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 4 h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM en éluant avec un mélange DCM/MeOH (9 : 1) et en révélant avec une solution de ninhydrine. Une fois la réaction terminée, 50 mL d'eau a été ajouté à 0 °C et le mélange a été lavé avec l'éther diéthylique (3x100 mL). La phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl 1M jusqu'à pH = 2-3. La solution a été extraite avec Et_2O (3x 100 mL) puis les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl (2x 100 mL). La phase organique est finalement séchée avec du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) puis évaporée sous pression réduite. Le produit **2** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 65% (3,45 mmol ; 0,7 g).

Formule brute : $C_9H_{17}NO_4$

Masse molaire : 203,24 g/mol

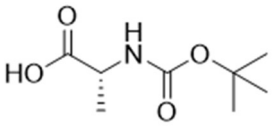
Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 89 °C (Lit 90-91 °C)[290]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,30 (t ; *J* = 7,5 Hz ; 3H ; CH_3) ; 1,37 & 1,41 (s ; 9H, *cis* & *trans* tBu) ; 2,74 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,28 & 4,55 (q, *J* = 7,2 Hz ; 1H ; *cis* & *trans* CH) ; 12,57 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 15,07 & 15,63 (*cis* & *trans* CH_3) ; 28,41 & 28,50 (*cis* & *trans* tBu) ; 31,00 & 31,89 (*cis* & *trans* NCH_3) ; 53,63 & 55,25 (*cis* & *trans* CH) ; 79,44 (tBu) ; 155,09 & 155,48 (*cis* & *trans* COON) ; 173,86 (COOH). En accord avec la littérature[306] $[\alpha]_D^{25}$ = - 30° (c : 0,5 g/100 mL dans l'éthanol).

[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910
[306] Niello, M. *et al*., *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107615.

N-Boc-D-Alanine (**3**).[41]



3

Dans un ballon, la D-Alanine (1,00 g ; 11,2 mmol ; 1 équiv.) et le carbonate de potassium (3,10 g ; 22,4 mmol ; 2 équiv.) ont été solubilisés dans 40 mL d'une solution de dioxane/eau (62,5% et 37,5%) et agités pendant 30 minutes. Ensuite, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,95 g ; 13,5 mmol ; 1,2 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agitée à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **1** décris précédemment. Le produit **3** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 67% (7,5 mmol ; 1,42 g).

Formule brute : $C_8H_{15}NO_4$

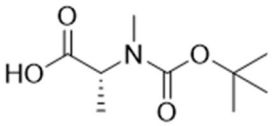
Masse molaire : 189,20 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 83 °C (Lit 79-82 °C)[306]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,22 (d ; *J* = 7,3 Hz ; 3H ; CH_3) ; 1,38 (s ; 9H, tBu) ; 3,92 (m ; 1H ; CH) ; 7,10 (d ; *J* = 7,6 Hz ; 1H ; NHBoc) ; 12,38 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 17,50 (CH_3) ; 28,68 (tBu) ; 49,26 (CH) ; 78,38 (tBu) ; 155,71 (COON) ; 175,11 (COOH). En accord avec la littérature[306] $[\alpha]_D^{25}$ = + 24° (c : 2 g/100 mL dans l'acide acétique)

N-Boc-*N*-Me-D-Alanine (**4**).[306]



4

[306] Niello, M. *et al*., *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107615.

Dans un ballon, **3** (2,00 g ; 10,6 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 40 mL de THF à 0 °C et a été agité pendant 30 min. Ensuite, l'hydrure de sodium à 60% (1,28 g ; 31,8 mmol, 3 équiv.) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (1,50 mL ; 16 mmol ; 1,5 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 4 h à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **2** décris précédemment. Le produit **4** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 52% (5,5 mmol ; 1,12 g).

Formule brute : $C_9H_{17}NO_4$

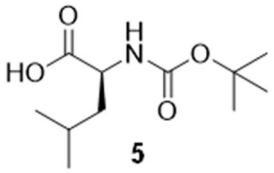
Masse molaire : 203,24 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 86 °C (Lit 87-89 °C)[306]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,27 – 1,31 (m ; 3H ; *cis* & *trans* CH_3) ; 1,36 & 1,40 (s ; 9H, *cis* & *trans* tBu) ; 2,74 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,27 & 4,54 (q, *J* = 7,2 Hz ; 1H ; *cis* & *trans* CH) ; 12,56 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 15,07 & 15,64 (*cis* & *trans* CH_3) ; 28,41 & 28,48 (*cis* & *trans* tBu) ; 31,01 & 31,90 (*cis* & *trans* NCH_3) ; 53,63 & 55,26 (*cis* & *trans* CH) ; 79,45 (tBu) ; 131,38 (COON) ; 173,87 (COOH). En accord avec la littérature[307] $[\alpha]_D^{25}$ = + 29° (c : 0,5 g/100 mL dans l'éthanol).

N-Boc-L-Leucine (**5**).[307]



5

Dans un ballon, la L-Leucine (1,00 g ; 7,6 mmol ; 1 équiv.) et le carbonate de potassium (2,1 g ; 15,2 mmol ; 2 équiv.) ont été solubilisés dans 40 mL d'une solution de dioxane/eau (62,5% et 37,5%) et agités pendant 30 minutes. Ensuite, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1,99 g ; 9,1

[306] Niello, M. *et al*., *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107615.
[307] Anderson, G. W.; McGregor, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (23), 6180–6183

mmol ; 1,2 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agitée à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **1** décris précédemment. Le produit **5** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 89% (6,8 mmol ; 1,57 g).

Formule brute : $C_{11}H_{21}NO_4$

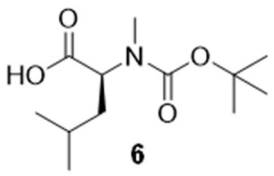
Masse molaire : 231,29 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 69 °C (Lit 67-72°C)[307]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0,84 – 0,88 (m ; 6H ; 2 CH_3) ; 1,38 (s ; 9H, tBu) ; 1,40 – 1,55 (m, 2H, CH_2) ; 1,58 – 1,68 (m ; 1H ; CH) ; 3,87 - 3,93 (m ; 1H ; $C_\alpha H$) ; 7,04 (d ; *J* = 8,2 Hz ; 1H ; NHBoc) ; 12,38 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 21,67 (2 CH_3) ; 23,34 (CH) ; 24,80 (CH_2) ; 28,67 (tBu) ; 52,22 ($C_\alpha H$) ; 78,36 (tBu) ; 155,06 (COON) ; 175,12 (COOH). $[\alpha]_D^{25}$ = -24° (c : 2 g/100 mL dans l'acide acétique)[307]

<u>*N*-Boc-*N*-Me-L-Leucine (**6**).</u>[290]



6

Dans un ballon, **5** (1,00 g ; 4,3 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 20 mL de THF à 0 °C et a été agité pendant 30 min. Ensuite, l'hydrure de sodium à 60% (0,52 g ; 12,9 mmol, 3 équiv.) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (0,62 mL ; 6,45 mmol ; 1,5 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 4 h à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **2** décris précédemment. Le produit **6** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 70% (3 mmol ; 0,74 g).

Formule brute : $C_{12}H_{23}NO_4$

[307] Anderson, G. W.; McGregor, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (23), 6180–6183.
[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910

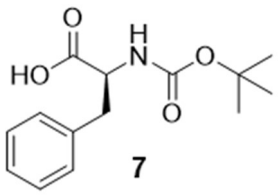
Masse molaire : 245,32 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 54 °C (Lit 56-57 °C)[290]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 0,81 – 0,97 (m ; 6H ; 2 CH_3) ; 1,37 – 1,40 (s ; 9H, *cis* & *trans* tBu) ; 1,46 – 1,60 (m, 2H, CH_2) ; 1,63 – 1,77 (m ; 1H ; CH) ; 2,69 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,35 – 4,45 & 4,57 – 4,66 (m ; 1H ; *cis* & *trans* $C_\alpha H$) ; 12,64 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 21,45 (2 CH_3) ; 23,52 – 23,58 (*cis* & *trans* CH) ; 24,87 – 25,07 (CH_2) ; 28,41 – 28,46 (*cis* & *trans* tBu) ; 30,66 – 31,06 (*cis* & *trans* NCH_3) ; 55,81 – 57,20 (*cis* & *trans* $C_\alpha H$) ; 79,48 (tBu) ; 155,33 – 155,95 (*cis* & *trans* COON) ; 173,62 – 173,78 (*cis* & *trans* COOH). $[\alpha]_D^{25}$ = -27° (c : 0,5 g/100 mL dans l'éthanol)[290]

N-Boc-L-Phénylalanine (**7**).[291]



7

Dans un ballon, la L-Phénylalanine (1,00 g ; 6,1 mmol ; 1 équiv.) et le carbonate de potassium (1,7 g ; 12,2 mmol ; 2 équiv.) ont été solubilisés dans 40 mL d'une solution de dioxane/eau (62,5% et 37,5%) et agités pendant 30 minutes. Ensuite, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1,60 g ; 7,3 mmol ; 1,2 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agitée à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **1** décris précédemment. Le produit **7** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 87% (5,3 mmol ; 1,4 g).

Formule brute : $C_{14}H_{19}NO_4$

Masse molaire : 265,31 g/mol

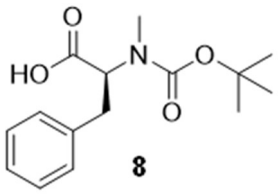
Apparence : Poudre blanche

[290] Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906-910
[291] Cakici, M. *et al*., *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308

Point de fusion : 80 °C (Lit 79-80 °C)[307]

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,32 (s ; 9H, tBu) ; 2,74 – 3,11 (m, 2H, CH_2) ; 4,05 – 4,15 (m ; 1H ; CH) ; 7,09 (d ; *J* = 8,4 Hz ; 1H ; NHBoc) ; 7,15 – 7,43 (m ; 5H ; CH Ar) ; 12,61 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 28,61 (tBu) ; 36,90 (CH_2) ; 55,60 (CH) ; 78,49 (tBu) ; 126,76 ; 128,58 ; 129,55 & 138,51 (C Ar) ; 155,90 (COON) ; 174,07 (COOH). En accord avec la littérature[296] $[\alpha]_D^{25}$ = 25° (c : 1 g/100 mL dans l'éthanol)[296]

N-Boc-*N*-Me-L-Phénylalanine (**8**).[295]



8

Dans un ballon, **7** (1,00 g ; 3,8 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 20 mL de THF à 0 °C et a été agité pendant 30 min. Ensuite, l'hydrure de sodium à 60% (0,46 g ; 11,4 mmol, 3 équiv.) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (0,54 mL ; 5,7 mmol ; 1,5 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 4 h à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **2** décris précédemment. Le produit **8** a été isolé comme une huile avec un rendement de 60% (2,3 mmol ; 0,64 g).

Formule brute : $C_{15}H_{21}NO_4$

Masse molaire : 279,33 g/mol

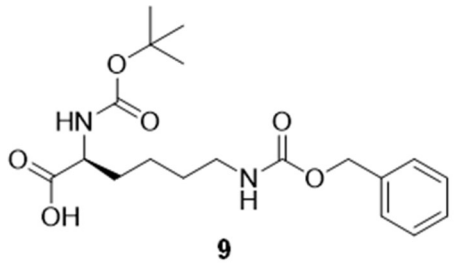
Apparence : Huile incolore

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,25 – 1,32 (s ; 9H, *cis* & *trans* tBu) ; 2,59 – 2,62 (s, 3H, *cis* & *trans* NCH_3) ; 2,89 – 3,24 (m, 2H, CH_2) ; 4,55 – 4,66 & 4,70 – 4,84 (m ; 1H ; *cis* & *trans* CH) ; 7,10 – 7,38 (m ; 5H ; CH Ar) ; 12,77 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 28,20 & 28,39 (*cis* & *trans* tBu) ; 32,28 – 32,51 (*cis* & *trans* CH_2) ; 34,53 & 35,19

[307] Anderson, G. W.; McGregor, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (23), 6180–6183.

(*cis* & *trans* NCH_3) ; 59,64 & 61,20 (*cis* & *trans* CH) ; 79,32 & 79,38 (*cis* & *trans* tBu) ; 126,67 (2 C Ar) ; 128,57 & 128,66 (*cis* & *trans* C Ar) ; 129,25 & 129,45 (*cis* & *trans* C Ar) ; 138,42 & 138,70 (*cis* & *trans* C Ar) ; 155,49 & 155,78 (*cis* & *trans* COON) ; 172,72 & 172,82 (*cis* & *trans* COOH). $[\alpha]_D^{25}$ = -3° (c : 2 g/100 mL dans l'éthanol).

<u>N_α-Boc-N_ε-Cbz-L-Lys (**9**).</u>



9

Dans un ballon, la N_ε-Cbz-L-Lys (1,00 g ; 2,63 mmol ; 1 équiv.) et le carbonate de potassium (0,73 g ; 5,26 mmol ; 2 équiv.) ont été solubilisés dans 40 mL d'une solution de dioxane/eau (62,5% et 37,5%) et agités pendant 30 minutes. Ensuite, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (0,69 g ; 3,16 mmol ; 1,2 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agitée à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **1** décris précédemment. Le produit **9** a été isolé comme une huile incolore avec un rendement de 87% (2,32 mmol ; 0,95 g).

Formule brute : $C_{19}H_{28}N_2O_6$

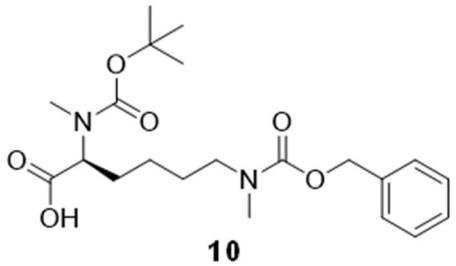
Masse molaire : 380,44 g/mol

Apparence : Huile incolore

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 1,28 – 1,38 (s ; 9H, tBu et m ; 4H ; 2 CH_2) ; 1,55 – 1,63 (m, 2H, CH_2) ; 2,94 – 3,01 (m, 2H, CH_2) ; 3,78 – 3,86 (m ; 1H ; CH) ; 5,01 (s, 2H, CH_2) ; 7,00 (d ; *J* = 7,9 Hz ; 1H ; NHBoc) ; 7,23 (t ; *J* = 5,7 Hz ; 1H ; NHCbz) ; 7,29 – 7,40 (m ; 5H ; 5 CH Ar) ; 12,40 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 23,37 (CH_2) ; 28,43 (CH_2) ; 28,67 (tBu) ; 29,46 (CH_2) ; 30,89 (CH_2) ; 53,94 (CH) ; 65,57 (CH_2) ; 78,39 (tBu) ; 128,18

(2 C Ar) ; 128,81 (2 C Ar) ; 137,75 (C Ar) ; 156,06 (COON) ; 156,54 (COON) ; 174,69 (COOH). $[\alpha]_D^{25}$ = -7 ° (c : 2 g/100 mL dans l'acide acétique).

<u>N_α-Boc-N_α-Me-N_ε-Cbz-N_ε-Me-L-Lys (**10**).</u>



10

Dans un ballon, **9** (1,00 g ; 2,6 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 20 mL de THF à 0 °C et a été agité pendant 30 min. Ensuite, l'hydrure de sodium à 60% (0,63 g ; 15,6 mmol, 6 équiv.) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (0,62 mL ; 6,5 mmol ; 3 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 6 h à température ambiante. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **2** décris précédemment. Le produit **10** a été isolé comme une huile incolore avec un rendement de 75% (1,95 mmol ; 0,8 g).

Formule brute : $C_{21}H_{32}N_2O_6$

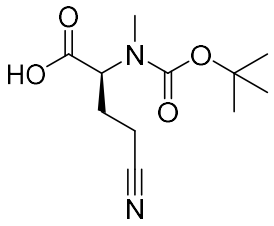
Masse molaire : 408,49 g/mol

Apparence : Huile incolore

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 1,15 – 1,25 (m, 2H, *cis* & *trans* CH_2) ; 1,37 & 1,42 (s ; 9H, *cis* & *trans* tBu) ; 1,47 – 1,58 (m, 2H, *cis* & *trans* CH_2) ; 1,60 – 1,89 (m, 4H, 2 CH_2) ; 2,70 (s, 3H, NCH_3) ; 2,83 (s, 3H, NCH_3) ; 3,20 – 3,26 (m, 2H, CH_2) ; 4,26 – 4,30 & 4,53 – 4,58 (m ; 1H ; *cis* & *trans* CH) ; 5,06 (s ; 2H ; CH_2) ; 7,26 – 7,38 (m ; 5H ; 5 CH Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 23,23 & 23,33 (*cis* & *trans* CH_2) ; 26,81 & 27,23 (*cis* & *trans* CH_2) ; 28,36 & 28,39 (*cis* & *trans* tBu) ; 28,18 & 28,83 (*cis* & *trans* CH_2) ; 31,43 (CH_2) ; 33,78 & 34,43 (*cis* & *trans* NCH_3) ; 48,20 & 48,44 (*cis* & *trans* NCH_3) ; 57,51 & 59,20 (*cis* & *trans* CH) ; 66,47 (CH_2) ; 79,35 & 79,42 (*cis* & *trans* tBu) ; 127,82 (C Ar) ; 128,11 (C Ar) ; 128,76 (2 C Ar) ; 137,57 (C

Ar) ; 155,81 (COON) ; 155,39 & 155,98 (*cis* & *trans* COON) ; 173,33 & 172,40 (*cis* & *trans* COOH).

Acide N_α-Boc-2-aminométhyl-4-cyanobutyrique (**11**).[299]



11

Dans un ballon, la N-Boc-L-Glutamine (7,4 g ; 30 mmol ; 1 équiv.) et l'anhydride acétique (3,4 mL ; 36 mmol ; 1,2 équiv.) ont été solubilisés dans 100 mL de pyridine et ont été agités pendant 12 h à température ambiante. Ensuite, le mélange réactionnel a été concentré sous pression réduite le brut avant d'être repris dans 100 mL d'Et_2O. La phase organique est lavée avec une solution à 5% d'acide citrique (3x 100 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (3x 100 mL). La phase organique est finalement séchée avec du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) puis évaporée sous pression réduite. Sans autres purifications, le brut est repris dans 100 mL de THF et l'hydrure de sodium à 60% (3,6 g ; 90 mmol, 3 équiv. par rapport à la Boc-L-Gln) a été ajouté en 3 fois et le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0 °C. Enfin, le sulfate de diméthyle (4,2 mL ; 45 mmol ; 1,5 équiv.) a été ajouté et la réaction a été agité pendant 30 min à 0 °C puis 6 h à température ambiante. La réaction est suivie par CCM en éluant avec un mélange DCM/MeOH (9 : 1) et en révélant avec une solution de ninhydrine. Une fois la réaction terminée, 100 mL d'eau a été ajouté à 0 °C et le mélange a été lavé avec l'éther diéthylique (3x 200 mL). La phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl 1M jusqu'à pH = 2-3. La solution a été extraite avec Et_2O (3x 200 mL) puis les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl (2x 100 mL). La phase organique est finalement séchée avec du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) puis évaporée sous pression réduite. Le produit **11** a été isolé et recristallisé dans un mélange

[299] Xue, C-H ; DeGrado. F., *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 55 - 58

EtOAc/éther de pétrole (1 : 1) comme une poudre blanche avec un rendement global de 60% (18,2 mmol ; 4,4 g).

Formule brute : $C_{11}H_{18}N_2O_4$

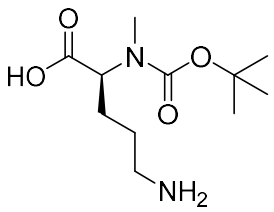
Masse molaire : 242,27 g/mol

Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 117 °C (Lit 116-118 °C)[299]

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,45 (s ; 9H, tBu) ; 1,99 – 2,62 (m, 4H, 2 CH_2) ; 2,86 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,37 – 4,47 & 4,58 – 4,70 (m ; 1H ; *cis* & *trans* CH) ; 10,68 (s ; 1H ; COOH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 14,35 & 14,39 (*cis* & *trans* CH_2) ; 24,80 & 25,36 (*cis* & *trans* CH_2) ; 28,23 (tBu) ; 32,82 (NCH_3) ; 58,25 & 58,64 (*cis* & *trans* CH) ; 81,33 & 81,36 (*cis* & *trans* tBu) ; 118,56 & 118,78 (*cis* & *trans* CN) ; 155,35 & 156,40 (*cis* & *trans* COON) ; 175,09 (COOH). En accord avec la littérature[299] $[\alpha]_D^{25}$ = -50° (c : 0,5 g/100 mL dans le méthanol).

<u>N_α-Boc-N_α-Me-L-Ornithine (12).</u>[299]



12

Le composé 11 (1,0 g ; 4,1 mmol ; 1 équiv.) et le dioxyde de platine (100 mg) ont été solubilisés dans 20 mL de MeOH. Le milieu réactionnel a été hydrogéné à 4 bars de H_2 pendant 2 h à température ambiante. Après 2 h de réaction, le milieu réactionnel a été filtré sur célite, concentré sous pression réduite et précipité plusieurs fois dans l'Et_2O pour donner une poudre blanche avec 95% de rendement (3,9 mmol ; 0,96 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) :

[299] Xue, C-H ; DeGrado. F., *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 55 - 58

Formule brute : $C_{11}H_{22}N_2O_4$

Masse molaire : 246,16 g/mol

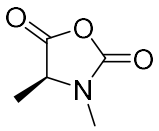
Apparence : Poudre blanche

Point de fusion : 144 °C (Lit 147-149 °C)[299]

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 1,37 (s ; 9H, tBu) ; 1,49 – 1,63 (m, 2H, CH_2) ; 1,66 – 1,98 (m, 2H, CH_2) ; 2,71 (s ; 3H ; NCH_3) ; 2,88 – 3,09 (m, 2H, CH_2) ; 4,11 – 4,22 & 4,30 – 4,43 (m ; 1H ; *cis* & *trans* CH) **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 24,11 & 24,28 (*cis* & *trans* CH_2) ; 25,84 & 26,38 (*cis* & *trans* CH_2) ; 27,71 (tBu) ; 30,30 & 31,44 (*cis* & *trans* CH_2) ; 39,11 (NCH_3) ; 59,71 & 61,54 (*cis* & *trans* CH) ; 81,63 & 81,84 (*cis* & *trans* tBu) ; 157,82 (COON) ; 178,06 (COOH). En accord avec la littérature[299] $[\alpha]_D^{25}$ = -29° (c : 0,5 g/100 mL dans le méthanol).

5.4. Préparation des *N*-carboxyanhydrides *N*-méthylés (NNCA)

<u>*N*-Me-L-Alanine-NCA (**13**).[285]</u>



13

Dans un Schlenk préalablement séché sous pression réduite pendant 1 h, **2** (1,00 g ; 4,92 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 10 mL de DCM anhydre et du trichlorure de phosphore (0,52 mL ; 5,9 mmol ; 1,2 équiv.) et la réaction a été agitée à température ambiante sous argon. Après 2 h de réaction, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite avant d'être repris dans 10 mL de DCM anhydre. La solution est transférée dans un nouveau Schlenk contenant de la célite préalablement séché sous pression réduite à 150 °C pendant 3 h. Après une légère agitation pendant 10 min, la solution est filtrée dans un nouveau Schlenk, évaporée

[299] Xue, C-H ; DeGrado. F., *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 55 - 58
[285] Akssira, M. *et al*., *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47

sous pression réduite et isolée comme une poudre blanche avec un rendement de 95% (4,7 mmol ; 0,6 g).

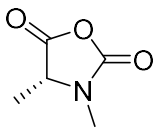
Formule brute : $C_5H_7NO_3$

Masse molaire : 129,11 g/mol

Apparence : Poudre blanche

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1,54 (d ; J = 7,0 Hz ; 3H ; CH_3) ; 2,99 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,17 (q ; J = 7,0 Hz ; 1H ; CH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 15,24 (CH_3) ; 28,41 (NCH_3) ; 57,03 (CH) ; 151,75 (COON) ; 169,37 (COO). En accord avec la littérature[285]

N-Me-D-Alanine-NCA (**14**).



14

Dans un Schlenk préalablement séché sous pression réduite pendant 1 h, **4** (1,00 g ; 4,92 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 10 mL de DCM anhydre et du trichlorure de phosphore (0,52 mL ; 5,9 mmol ; 1,2 équiv.) et la réaction a été agitée à température ambiante sous argon. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **13** décris précédemment. Le produit **14** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 82% (4,03 mmol ; 0,52 g).

Formule brute : $C_5H_7NO_3$

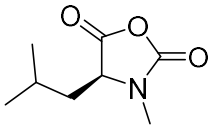
Masse molaire : 129,11 g/mol

Apparence : Poudre blanche

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1,55 (d ; J = 8,0 Hz ; 3H ; CH_3) ; 3,01 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,18 (q ; J = 8,0 Hz ; 1H ; CH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 15,12 (CH_3) ; 27,99 (NCH_3) ; 56,23 (CH) ; 152,12 (COON) ; 169,21 (COO).

[285] Akssira, M. *et al*., *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47

N-Me-L-Leucine-NCA (**15**).



15

Dans un Schlenk préalablement séché sous pression réduite pendant 1 h, **6** (1,00 g ; 4,1 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 10 mL de DCM anhydre et du trichlorure de phosphore (0,43 mL ; 4,9 mmol ; 1,2 équiv.) et la réaction a été agitée à température ambiante sous argon. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **13** décris précédemment. Le produit **15** a été isolé comme une huile incolore avec un rendement de 80% (3,3 mmol ; 0,56 g).

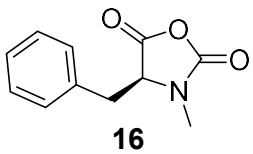
Formule brute : $C_8H_{13}NO_3$

Masse molaire : 171,20 g/mol

Apparence : Huile incolore

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 0,87 – 0,95 (m ; 6H ; 2 CH_3) ; 1,67 – 1,77 (m ; 2H ; CH_2) ; 1,78 – 1,91 (m ; 1H ; CH) ; 2,92 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,10 (t ; J = 5,9 Hz ; 1H ; CH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 22,12 (CH_3) ; 23,00 (CH3) ; 24,17 (CH_2) ; 28,75 (NCH_3) ; 37,94 (CH) ; 59,67 (CH) ; 152,01 (COON) ; 169,02 (COO).

N-Me-L-Phénylalanine-NCA (**16**).[285]



16

Dans un Schlenk préalablement séché sous pression réduite pendant 1 h, **8** (1,00 g ; 3,68 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 10 mL de DCM anhydre et du trichlorure de phosphore (0,38 mL ; 4,3 mmol ; 1,2 équiv.) et la réaction a été agitée à température ambiante sous argon.

[285] Akssira, M. *et al*., *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47

Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **13** décris précédemment. Le produit **16** a été isolé comme une poudre blanche avec un rendement de 95% (3,41 mmol ; 0,7 g).

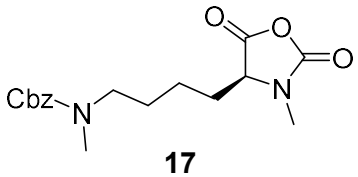
Formule brute : $C_{11}H_{11}NO_3$

Masse molaire : 205,21 g/mol

Apparence : Poudre blanche

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 2,93 (s ; 3H ; NCH_3) ; 3,16 – 3,29 (m ; 2H ; CH_2) ; 4,38 – 4,45 (m ; 1H ; CH) ; 7,03 – 7,50 (m ; 5H ; 5 CH Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 29,25 (NCH_3) ; 35,35 (CH_2) ; 62,48 (CH) ; 128,06 (C Ar) ; 129,13 (2 C Ar) ; 129,18 (2 C Ar) ; 133,17 (C Ar) ; 151,81 (COON) ; 168,03 (COO). En accord avec la littérature[285]

<u>N_α-Me-N_ε-Cbz-N_ε-Me-L-Lysine-NCA (**17**).</u>



17

Dans un Schlenk préalablement séché sous pression réduite pendant 1 h, **10** (1,00 g ; 2,45 mmol ; 1 équiv.) a été solubilisé dans 10 mL de DCM anhydre et du trichlorure de phosphore (0,26 mL ; 2,94 mmol ; 1,2 équiv.) et la réaction a été agitée à température ambiante sous argon. Ensuite le protocole est identique à la synthèse du composé **13** décris précédemment. Le produit **17** a été isolé comme une huile incolore avec un rendement de 93% (2,27 mmol ; 0,76 g).

Formule brute : $C_{17}H_{22}N_2O_5$

Masse molaire : 334,37 g/mol

Apparence : Huile incolore

[285] Akssira, M. *et al*., *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1,55 (d ; J = 8,0 Hz ; 3H ; CH_3) ; 3,01 (s ; 3H ; NCH_3) ; 4,18 (q ; J = 8,0 Hz ; 1H ; CH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 20,72 (CH_2) ; 26,83 & 27,45 (*cis* & *trans* CH_2) ; 27,86 (NCH_3) ; 28,65 (NCH_3) ; 34,88 & 34,55 (*cis* & *trans* CH_2) ; 48,14 (CH_2) ; 61,27 (CH) ; 66,51 (CH2) ; 127,84 (C Ar) ; 128,17 (C Ar) ; 128,82 (2 C Ar) ; 137,59 (C Ar) ; 152,36 (COO) ; 155,86 (COONCbz) ; 169,21 (COON).

Chapitre 3 : Synthèse de polypeptides *N*-méthylés par polymérisation par ouverture de cycle et étude de l'activité biologique sur *Clostridioides difficile*

De nombreux peptides ont démontré une activité contre les bactéries pathogènes et sont considérés comme des candidats prometteurs pour le traitement de nombreuses infections.[146,200] Cependant, leur préparation est souvent complexe, impliquant soit une réaction de biosynthèse, soit une synthèse par couplages itératifs (multi-étapes). Ces deux approches présentent des limitations majeures telles que la consommation importante de réactifs, des temps de réaction élevés, des problèmes d'isolement et/ou de purification et des difficultés à produire de grandes quantités.[204,308] Dans ce contexte, la chimie des polymères est une méthodologie de synthèse alternative qui pourrait résoudre certains de ces inconvénients.[224] La chimie des polymères est un moyen simple pour concevoir des structures possédant des chaines latérales cationiques et hydrophobes, un paramètre clé dans la structure des peptides antimicrobiens (PAMs).[224,309] Parmi les polymères possibles, les polypeptides (ou polymères peptidique) sont l'un des meilleurs modèles à développer car ils sont construits avec des acides aminés, tout comme les PAMs. Les polypeptides sont généralement obtenus par une réaction de polymérisation en chaine : la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) de monomères *N*-carboxyanhydrides (NCA) dérivés d'acides aminés. La ROP est une réaction de polymérisation qui peut être contrôlée, qui fait intervenir des réactifs simples et qui permet la préparation de polymères avec de bons rendements et en grandes quantités.[310] Cependant, les PAMs et les polymères peptidiques partagent une limitation commune : leur sensibilité aux peptidases. Ces enzymes ont une action catalytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques, entrainant une perte de leur activité anti-infectieuse.[311]

[146] Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238–250.
[200] Magana, M *et al*.,. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20* (9), e216–e230.
[204] Gaglione, R. *et al*., *New Biotechnol.* **2019**, *51*, 39–48.
[308] Boman, H. G. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *13* (1), 61–92.
[224] Ergene, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407–2427.
[309] Yang, Y. *et al*., *Polym. J.* **2018**, *50* (1), 33–44.
[310] Rasines Mazo, A. *et al*., *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (14), 4737–4834.
[311] Moncla, B. J. *et al*., *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2011**, *02* (06), 404–408.

Cette limitation est un frein majeur pour le développement de polypeptides antimicrobiens comme médicaments administrables par voie orale.

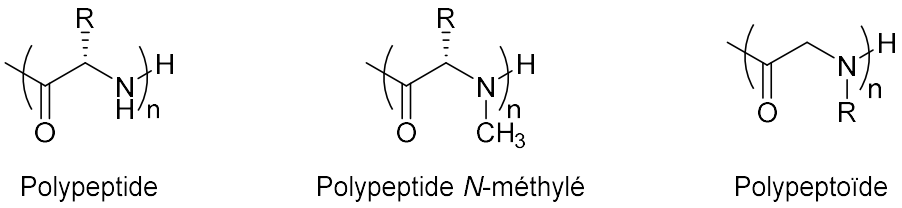


Figure 45 : *Les différentes classes de polymères dérivés d'acides aminé*

En utilisant la chimie des polymères, ce projet de recherche s'est intéressé à une classe de polypeptides modifiés (pseudo-polypeptides) possédant une liaison peptidique *N*-méthylée (**Figure 45**). La *N*-méthylation de la liaison peptidique empêche la formation de liaisons hydrogènes intra ou intermoléculaire en plus d'introduire un effet stérique et conformationnel qui réduit fortement la protéolyse de ces macromolécules par rapport aux polypeptides classiques.[312] L'objectif de ce projet a été d'étudier le potentiel antibactérien de ces pseudo-polypeptides *N*-méthylés. Ces derniers ont déjà été préparés par synthèse peptidique en phase solide (SPPS)[313,314,315] , souvent avec difficulté. Ce travail de recherche est pionnier quant à leur développement *via* la chimie des polymères. L'apport d'une méthodologie clef, la copolymérisation, a déjà permis de développer des structures macromoléculaires, analogues simplifiés de PAM, construites avec des acides aminés dans lesquels aucun contrôle de séquence n'est nécessaire pour aboutir à une activité antibactérienne.[316]

L'utilisation d'une réaction de copolymérisation offre plusieurs avantages : premièrement, elle permet une optimisation combinatoire simple (par rapport à la synthèse en phase solide), en associant en une seule étape des acides aminés « cationiques » et « hydrophobes ». Deuxièmement, elle introduit de nouveaux pharmacophores macromoléculaires qui sont généralement peu étudiés : des paramètres tels que la taille

[312] Zuckermann, R. N. *Biopolymers* **2011**, *96* (5), 545–555.
[313] Chatterjee, J. *et al*., *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1331–1342.
[314] Chatterjee, J. *et al*., *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (3), 432–444.
[315] Szloszár, A. *et al*., *J. Flow Chem.* **2018**, *8* (1), 21–27.
[316] Salas-Ambrosio, P. *et al*., *Biomacromolecules* **2021**, *22* (1), 57–75.

(degré de polymérisation) ou la topologie (linéaire, branché, etc.) de ces macromolécules. Dans ce chapitre 3, l'objectif a été d'étudier la synthèse de copolymères en réalisant la ROP de NCA *N*-méthylés afin de tenter d'obtenir une chimiothèque de copolymères amphiphiles à potentiel anti-*C. difficile* afin d'essayer de mettre en évidence des éléments de relation structure-activité sur un pharmacophore macromoléculaire (**Figure 46**).

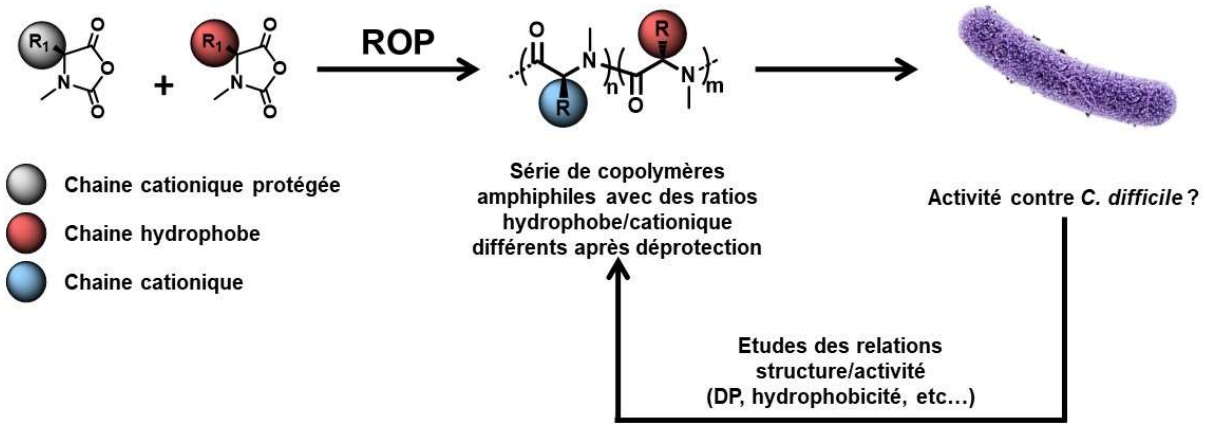


Figure 46 : *Stratégie pour la préparation de copolymères amphiphiles ciblant C. difficile*

1. Synthèses de polypeptides par ROP à partir de NCA *N*-méthylés

En dehors de nombreuses études utilisant la sarcosine (le dérivé *N*-méthylé de la glycine)[317,318] , il existe très peu de publications traitant de la synthèse de polymères peptidiques composés d'acides *α*-aminés *N*-méthylés. En dehors de la polysarcosine, la première mention d'un polypeptide *N*-méthylé apparait dans les travaux de Goodman et Fried dédiés à l'étude structurale de la poly(*N*-Me-*L*-Ala).[319] A l'aide de calculs expérimentaux permettant d'estimer l'énergie conformationnelle, d'analyses par dichroïsme circulaire et par résonnance magnétique nucléaire (RMN), ils ont montré que ce pseudo-polypeptide adopte une structuration en hélice droite où toutes les liaisons peptidiques sont en configuration géométrique *trans*.[320] Plus tard, Cosani et ses collègues ont tenté en vain d'obtenir par ROP la poly(*N*-Bn-L-Ala) et la poly(*N*-Me-*L*-Phe) à partir de ces mêmes NCA *N*-alkylés.[321] Pour

[317] Birke, A. *et al*., *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *81*, 163–208.
[318] Hu, Y. *et al*., *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (7), 2232–2238.
[319] Goodman, M.; Fried, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (5), 1264–1267.
[320] Mark, J. E.; Goodman, M. *Biopolymers* **1967**, *5* (9), 809–814.
[321] Cosani, A. *et al*., *Macromolecules*, **1978**, *11* (5), 1041–1045.

pallier ce problème, ils ont proposé des méthodes de méthylation post-polymérisation. Ils ont ainsi pu préparer la poly(*N*-Me-*γ*-Me-L-Glu) et la poly(*N*-Me-*γ*-Et-L-Glu) en méthylant la liaison peptidique de la poly(*γ*-Me-L-Glu) et de la poly(*γ*-Et-L-Glu).[322] Récemment, Muhl *et al.* ont décrit la synthèse de la poly(*N*-Me-DL-Ala), de la poly(*N*-Me-L-Leu), de la poly(*N*-Me-L-Met) et de la poly(*N*-Me-DL-Met) (**Figure 47**).[323] Enfin, la poly(L-Pro) (PLP) fait office de cas particulier car elle est obtenue à partir de la proline, le seul acide aminé possédant une fonction amine secondaire.[324]

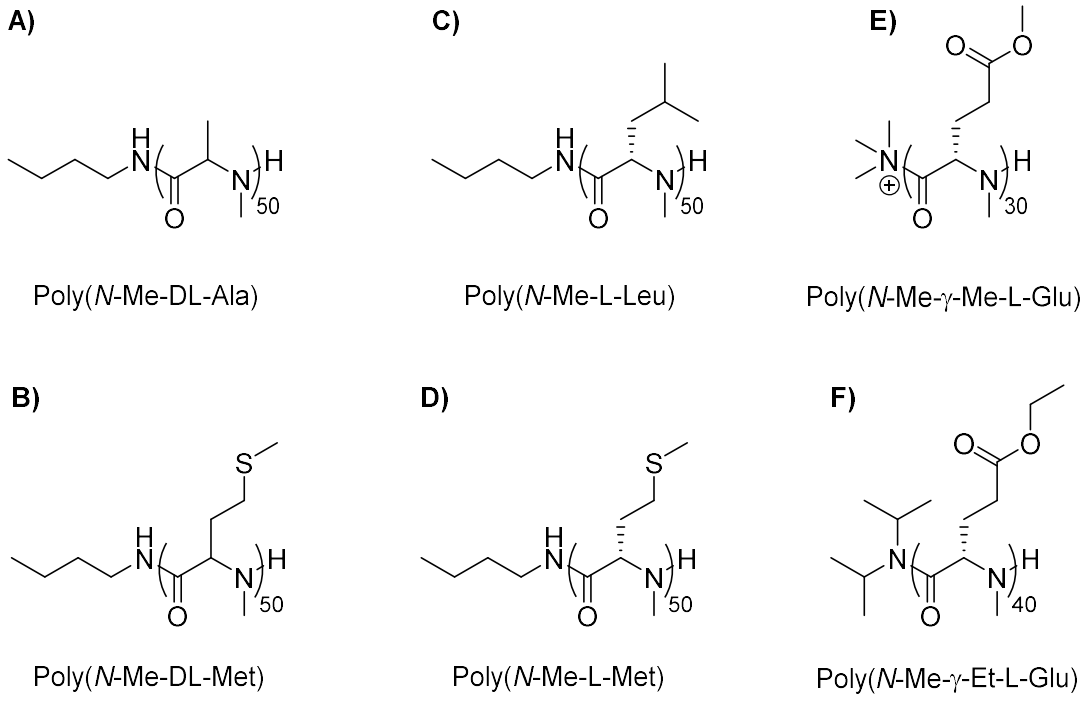


Figure 47 : *Exemples de polypeptides N-alkylés synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) à partir de NCA N-alkylés ou par méthylation post-polymérisation : A) Poly(N-Me-DL-Ala) ; B) Poly(N-Me-DL-Met) ; C) Poly(N-Me-L-Leu) ; D) Poly(N-Me-L-Met) ; E) Poly(N-Me-γ-Me-L-Glu) et F) Poly(N-Me-γ-Et-L-Glu)*

Les polypeptides *N*-alkylés, au même titre que les polypeptoïdes, peuvent donc être synthétisés par ROP à partir de NCA *N*-alkylés (NNCA) en utilisant un nucléophile comme amorceur. Contrairement aux NCAs non alkylés, l'absence de proton sur l'atome d'azote n'autorise normalement que le mécanisme nucléophile pendant l'ouverture de cycle. Le mécanisme de réaction de la ROP commence par l'étape d'amorçage qui correspond à

[322] Cosani, A. *et al*., *Macromolecules*, **1979**, *12* (5), 875–877.
[323] Muhl, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2020**, *11* (43), 6919–6927.
[324] Steinberg, I. Z. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (20), 5263–5279.

l'attaque nucléophile de l'amorceur sur le NCA (**Figure 48**). Parmi les nucléophiles utilisés pour amorcer des réactions de ROP, les amines primaires sont les plus couramment utilisées. Après ouverture de cycle, il se forme un intermédiaire acide carbamique instable qui libère une molécule de CO_2, régénérant une nouvelle extrémité amine nucléophile. Cette amine sera le point de départ des étapes suivantes que l'on regroupe sous le terme de propagation. La propagation fait référence à la répétition d'attaques nucléophiles, d'ouvertures de cycles et de libération de CO_2 jusqu'à une consommation complète du NCA. En général, la ROP de NNCA peut être considérée comme un processus de polymérisation contrôlé, cela signifie que l'ajout de NCA augmentera stœchiométriquement la longueur de la chaine polymérique. Il s'agit d'un comportement clé qui permet de concevoir non seulement des copolymères aléatoires mais aussi des copolymères dits blocs. Plus précisément, une polymérisation contrôlée signifie qu'il existe une corrélation entre la masse molaire du polymère final et le rapport entre la concentration de NCA (M) et la concentration de l'amorceur (I), nommé degré de polymérisation théorique (M/I ou DP).

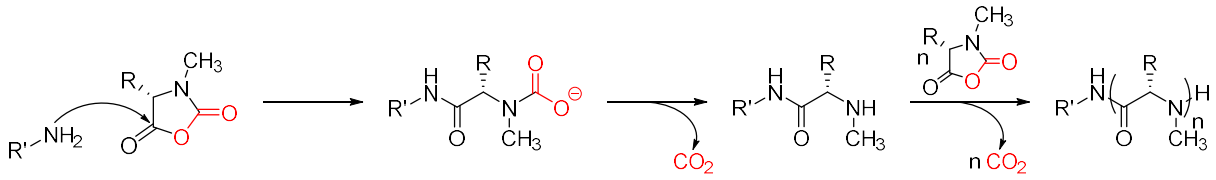


Figure 48 : *Mécanisme de la réaction de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) appliqué à un NNCA*

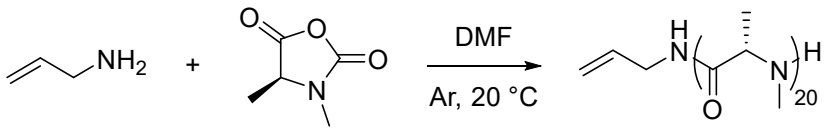
1.1. Cinétique de la ROP de NCA d'acides aminés *N*-méthylés

Contrairement à la ROP de NCA non alkylés ou de NNCA dérivés de la glycine, la synthèse de polypeptides *N*-méthylés par ROP représente un défi majeur : avec les NCA non alkylés, la cinétique de polymérisation est fortement liée à la nature chimique de l'acide aminé utilisé,[325] alors que pour des NNCA dérivés de la glycine, elle est intimement liée à la nature du groupement présent sur l'atome d'azote.[326] Les NCA d'acides aminés *N*-méthylés combinent ces deux éléments structuraux, ce qui pourrait fortement impacter les conditions de

[325] Szwarc, M. *Adv. Polymer Sci.* **1965**, *4*, 1–65.
[326] Bai, T.; Ling, J. *Biopolymers* **2019**, *110* (4), e23261.

polymérisation. L'étude des cinétiques de polymérisation est donc un élément essentiel pour commencer ce travail et pour optimiser les étapes de préparation. Notre premier objectif a donc été d'évaluer la synthèse d'homopolymères préparés à partir des NCA *N*-méthylés décrits dans le chapitre 2. Dans un premier temps, nous avons synthétisé la poly(*N*-Me-L-Ala), en étudiant la cinétique d'ouverture du cycle, puis nous l'avons comparé à la poly(*N*-Me-L-Phe) et à la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] afin d'évaluer l'influence de la chaine latérale de l'acide aminé sur la cinétique de la réaction de polymérisation.

1.1.1. Cinétique de formation du poly(*N*-Me-L-Ala)



1 équiv. 20 équiv.

Figure 49 : *Synthèse de la poly(N-Me-L-Ala) en utilisant l'allylamine comme amorceur dans le DMF*

De même que pour les réactions de polymérisations effectuées avec les NCA non méthylés, la cinétique de conversion des NCA *N*-méthylés peut être suivie à l'aide de la spectroscopie infrarouge (FTIR) en en se basant sur la disparition des bandes d'élongations des liaisons NC=O et OC=O à ~1850 et ~1780 cm^{-1} de la fonction carboxyanhydride. Après une purification minutieuse, nous avons étudié la cinétique de polymérisation du NCA-*N*-méthylé d'alanine (*N*-Me-L-Ala-NCA) amorcée par l'allylamine. Par défaut, l'allylamine a été utilisée dans nos études car elle permet des caractérisations structurales par RMN des polymères plus faciles car les signaux des protons allyliques présentent des déplacements chimiques très spécifiques, facilitant leur utilisation pour déterminer le degré de polymérisation par comparaison des intégrations de ces signaux avec ceux présents sur le motif polymérisé. De plus, il est possible de faire une fonctionnalisation post-polymérisation sur la fonction alcène de l'allylamine avec un fluorophore pour d'éventuelles futures explorations biologiques. Pour cela, le monomère *N*-Me-L-Ala-NCA a été solubilisé dans du DMF anhydre sous argon à une concentration de 0,4 M et l'allylamine a été utilisée à un M/I = 20, correspondant à la taille des copolymères antibactériens ciblés (**Figure 49**). La ROP a été suivie par FTIR et la

cinétique de réaction déterminée en évaluant la disparition de la bande d'élongation de la liaison NC=O à 1846 cm^{-1} (**Figure 50-A**), une bande spécifique du *N*-Me-L-Ala-NCA. La conversion totale du NNCA a été observée après 48 h. Le polymère a été isolé sous la forme d'un solide blanc par précipitation dans un mélange éther diéthylique/pentane 2 : 1 suivi d'une précipitation dans le pentane.

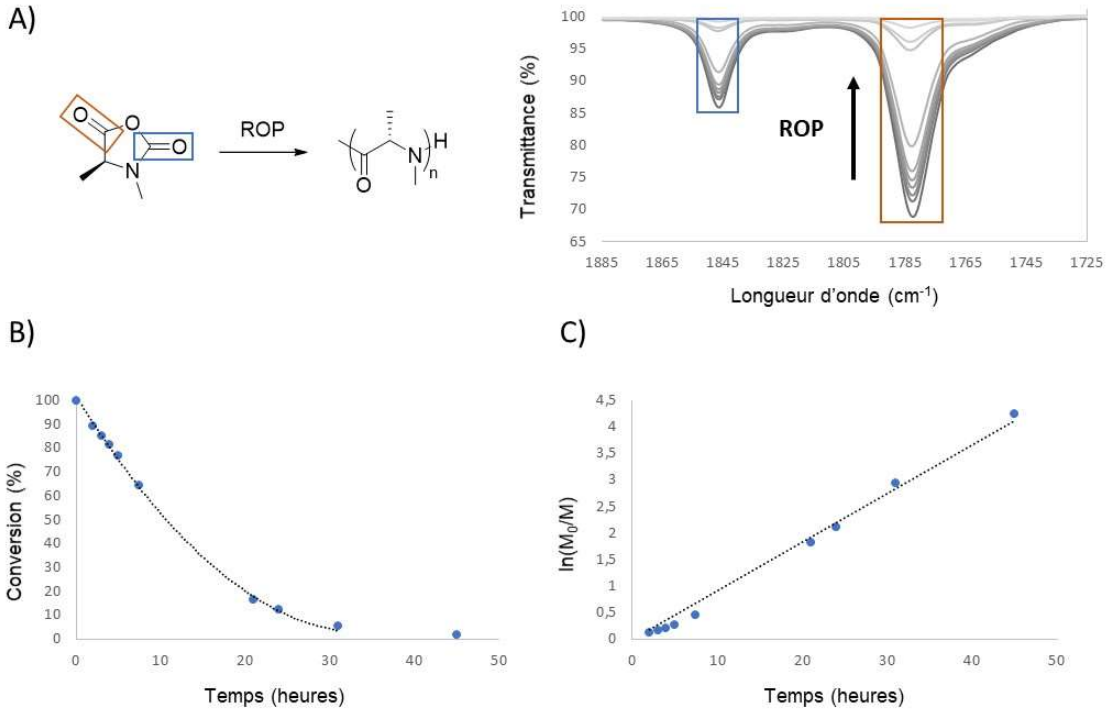


Figure 50 : *Suivi cinétique de la polymérisation du N-Me-L-Ala-NCA (ROP dans le DMF à 0,4 M et M/I = 20). A) Disparition au cours du temps de la bande d'élongation à 1846 cm^{-1}, B) Conversion du N-Me-L-Ala-NCA au cours du temps et C) détermination de la vitesse de réaction par régression linéaire en utilisant une réaction de premier ordre*

Pour étudier la cinétique, nous avons tracé la droite d'équation $\ln(M_0/M)$. Elle traduit une réaction de premier ordre en fonction du temps, où M_0 est l'intensité initiale du pic à 1846 cm^{-1} et M l'intensité du pic à un certain temps, ce qui signifie que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de *N*-Me-L-Ala-NCA. La pente ainsi obtenue permet d'estimer la constante cinétique de la réaction. La vitesse de la cinétique pour le *N*-Me-L-Ala-NCA est ainsi calculée et donne $k_{obs.} = 9{,}2 \times 10^{-2}\ h^{-1}$ (**Figure 50-B et Figure 50-C**).

Afin de vérifier la bonne formation de la poly(*N*-Me-L-Ala), nous avons associé à cette étude cinétique des analyses structurales du polymère. Nous avons d'abord effectué des analyses RMN ^1H en solubilisant le polymère dans le $CDCl_3$: le spectre est présenté en **Figure**

51. L'analyse RMN de la poly(*N*-Me-L-Ala) montre la présence de signaux larges à 1,1 – 1,6 ppm correspondant au CH_3 de la chaine latérale, à 2,7 – 3,2 ppm correspondant au *N*-méthyl et à 5,2 – 5,6 ppm correspondant au CH (protons e, f et d de la **Figure 51**). Les signaux larges sont caractéristiques des conformations cis/trans que peut prendre la chaine peptidique.[327]

La RMN ^{1}H est une technique permettant de calculer le degré de polymérisation (que nous appellerons DP_{RMN}). Pour ce calcul, nous avons corrélé les valeurs d'intensité des pics des protons appartenant à l'amorceur (proton b et c sur la **Figure 51**) et ceux du polymère (protons d, f et e sur la **Figure 51**). Nous avons trouvé un DP_{RMN} calculé légèrement inférieur à la valeur normalement attendue (~16 au lieu de 20).

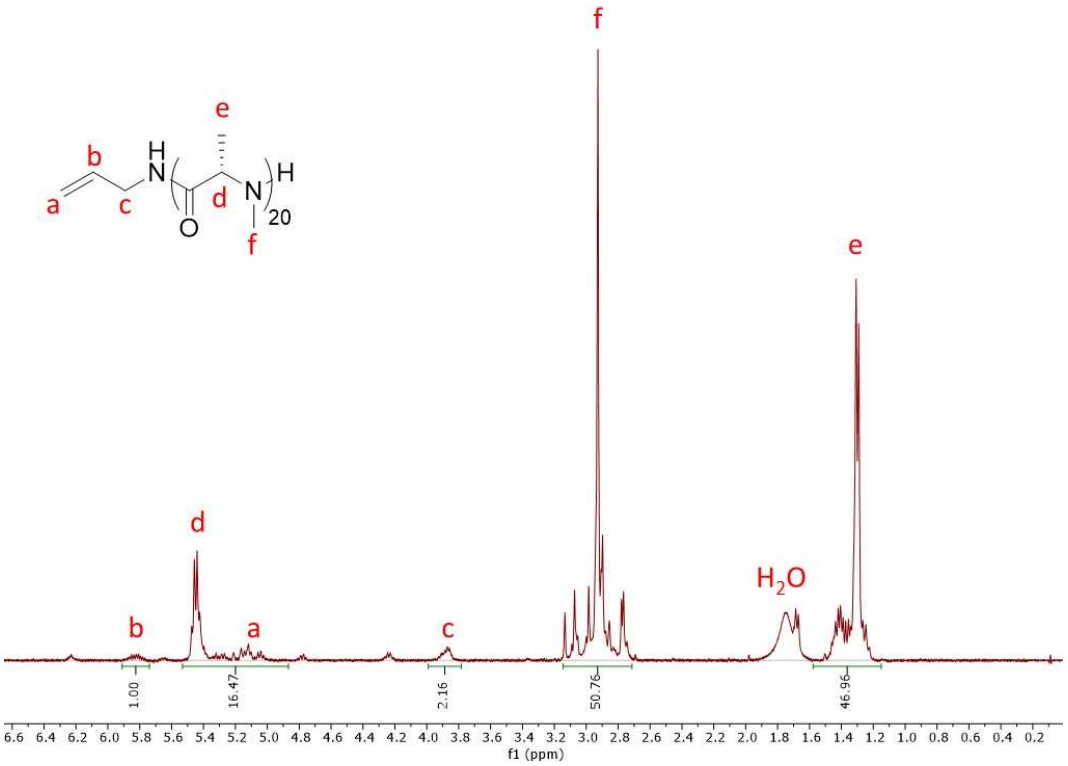


Figure 51 : *Spectre RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ de la poly(N-Me-L-Ala) de M/I = 20 formé lors d'une ROP amorcée par l'allylamine dans le DMF. Les pics larges sont caractéristiques des conformations cis et trans que peut prendre la chaine peptidique.*

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode complémentaire à la RMN ^{1}H pour déterminer la taille des polymères. La SEC est une méthode de chromatographie en phase liquide qui permet de séparer des macromolécules en fonction de leur volume

[327] Sui, Q. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 12042–12048.

hydrodynamique. Il s'agit d'une méthode d'analyse commune pour faire l'étude de polymères. Cette technique consiste à faire passer le polymère en solution dans une colonne remplie de bille poreuse. Selon leurs tailles, les polymères peuvent être plus ou moins retenus dans les billes poreuses et donc ressortir après un temps plus ou moins long. La masse molaire moyenne en nombre (Mn) de la poly(*N*-Me-L-Ala) a été déterminée par SEC dans l'hexafluoropropan-2-ol (HFIP). Nous avons trouvé une valeur de Mn supérieure à la valeur théorique et à celle obtenue par RMN (**Tableau 13**). Cette valeur pourrait s'expliquer par la structuration secondaire du polymère qui augmenterait son rayon hydrodynamique et par conséquent la valeur de Mn. Pour répondre à cette hypothèse, il serait intéressant de préparer une gamme de poly(*N*-Me-L-Ala) avec des Mn parfaitement définies.

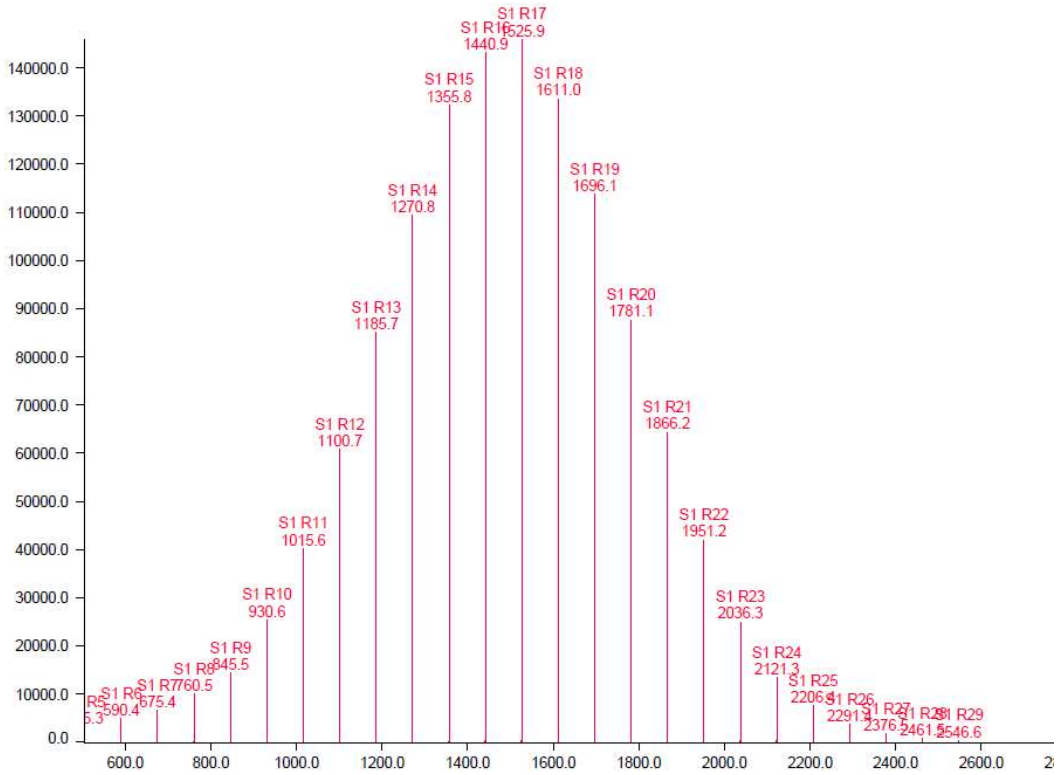
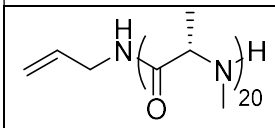


Figure 52 : *Spectre de masse de la poly(N-Me-L-Ala) formée lors d'une ROP amorcée par l'allylamine obtenu par MALDI-TOF avec S = amorceur (allylamine) et R = monomère (N-Me-Ala)*

Finalement, nous avons effectué une analyse par spectrométrie de masse en utilisant la technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplé à un analyseur à temps de vol (TOF). La poly(*N*-Me-L-Ala) a été mélangée à une certaine proportion à une matrice : l'acide *α*-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) en présence d'iodure de sodium (NaI)

(Polymère/Matrice/NaI 1:3:1). Cette analyse a révélé une population de poly(*N*-Me-L-Ala) : un Δ ≈ 85 g/mol correspondant à l'unité monomère *N*-Me-L-Ala (R sur la **Figure 52**) sépare chaque pic de masse. De plus, l'extrémité de chaine nous confirme la présence de l'allylamine (S sur la **Figure 52**) qui a donc bien amorcée la polymérisation (**Figure 52**). L'ensemble des résultats obtenus par RMN, SEC et spectrométrie de masse pour la poly(*N*-Me-L-Ala) sont repris dans le **tableau 13**. Les analyses de RMN ^{1}H et de MALDI-TOF semblent confirmer la présence d'un polymère amorcé par l'allylamine avec un DP calculé proche du DP théorique (~17 au lieu de 20) alors que l'analyse par SEC semble montrer la présence d'un polymère dont la valeur de Mn est très supérieure à celle théorique (3087 au lieu de 1781).

Tableau 13 : *Comparaison des degrés de polymérisation (ou Mn) de la poly(N-Me-L-Ala) obtenus par RMN, SEC et MALDI-TOF*

	DP théorique	DP_{RMN}	Mn théorique (en g/mol)	Mn_{sec} (en g/mol)	$Mn_{MALDI-TOF}$ (en g/mol)
	20	16	1780	3087	1526

En résumé, nous avons étudié la cinétique de polymérisation d'un NCA *N*-méthylé : le *N*-Me-L-Ala-NCA, en suivant la disparition des bandes d'élongations des liaisons NC=O et OC=O du carboxyanhydride à 1780 et 1850 cm^{-1} par FTIR. Nous avons préparé un homopolymère, la poly(*N*-Me-Ala), à un M/I = 20, le paramètre initial que nous voulons cibler pour construire nos premières séries de copolymères antibactériens. Nous avons aussi effectué une étude structurale complète permettant de caractériser la taille et la nature des extrémités de chaine du polymère visé (M/I, amorceur, polydispersité).

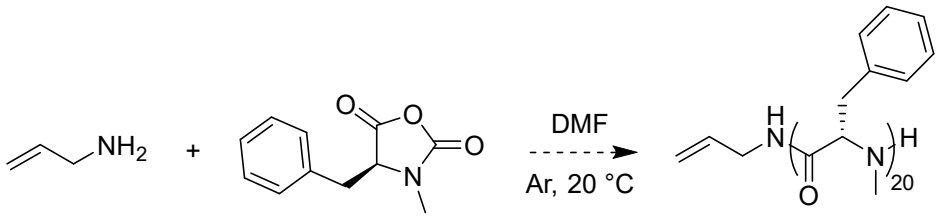
1.1.2. Cinétique de formation d'autres pseudo-polypeptides *N*-méthylés

Avec les NCA, la nature de la chaine latérale d'un acide aminé peut fortement impacter la cinétique de la polymérisation. La chaine latérale peut influencer la polymérisation par des effets d'encombrements stériques, par l'introduction de réactions secondaires avec des chaines latérales fonctionnalisées (esters, carbamates, etc.) ou par des effets de structuration

secondaire qui peut accélérer ou ralentir l'étape de propagation. Dans le but de mieux comprendre l'influence de cette chaine latérale sur la cinétique de polymérisation dans le cas des NCA *N*-méthylés, nous avons décidé d'étudier la cinétique de la ROP avec deux NCA *N*-méthylés possédant une chaine latérale plus encombrante *via* l'étude de la cinétique de formation de poly(*N*-Me-L-Phénylalanine) et de poly(N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lysine.

1.1.2.1. Poly(*N*-Me-L-Phénylalanine)

Dans cette nouvelle étude, nous avons comparé la cinétique de polymérisation par ouverture de cycle du *N*-Me-L-Phe-NCA à celle du *N*-Me-L-Ala-NCA. Le *N*-Me-L-Phe-NCA a été solubilisé dans du DMF anhydre sous argon à une concentration de 0,4 M et l'allylamine a été utilisée comme amorceur à un M/I = 20 (**Figure 53**). La cinétique de la ROP a été déterminée en suivant la disparition de la bande d'élongation de la liaison NC=O à ~1850 cm^{-1} par FTIR. Après 2 jours de polymérisation, l'analyse FTIR indique une conversion de 15% et nous avons arrêté la réaction de ROP au bout de 7 jours sans avoir pu observer une conversion complète ni isoler le polymère final (~50% de conversion).



1 équiv. 20 équiv.

Figure 53 : Essai de s*ynthèse de la poly(N-Me-L-Phe) en utilisant l'allylamine comme amorceur dans le DMF sans catalyseur*

Nous avons comparé les cinétiques de formation de la poly(*N*-Me-L-Ala) et de la poly(*N*-Me-L-Phe) sur une période de 48 h (**Figure 54**). En utilisant la droite d'équation M/M_0, nous avons déterminé une vitesse k = 1,9x10^{-3} mol.L^{-1}.h^{-1} soit une polymérisation 50 fois plus lente que celle de la poly(*N*-Me-L-Ala). Nous émettons deux hypothèses permettant d'expliquer cette différence de réactivité : 1) l'encombrement stérique généré par la chaine latérale du groupe benzyle est plus important et 2) la structuration secondaire de cette nouvelle chaine peptidique freine la polymérisation. Les analyses structurales permettant de répondre

à ces hypothèses n'ayant pas été réalisées, nous n'avons pas pu confirmer si nous avons réussi à amorcer la ROP du *N*-Me-L-Phe-NCA avec l'allylamine.

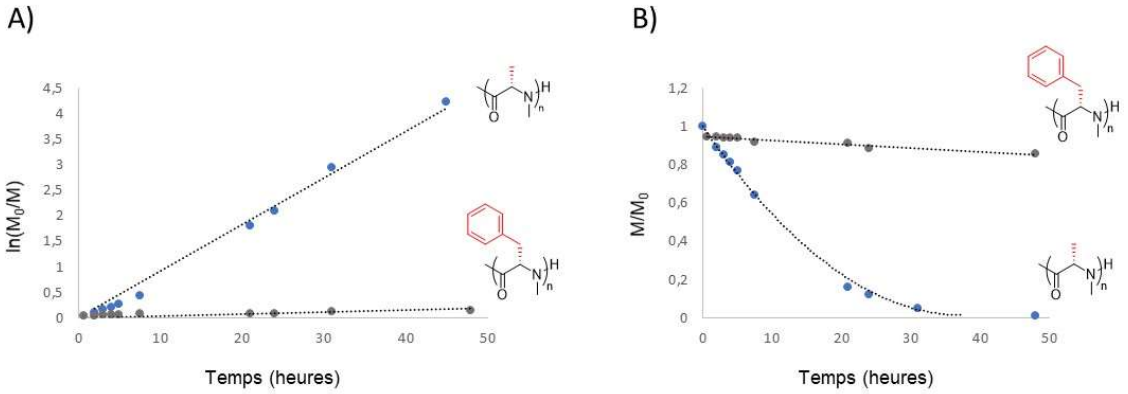


Figure 54 : *Influence de la chaine latérale sur la cinétique de la ROP : comparaison entre le N-Me-L-Ala-NCA et le N-Me-L-Phe NCA. A) détermination de la vitesse de en utilisant une réaction de premier ordre et B) détermination de la vitesse de réaction en utilisant une réaction d'ordre zéro*

1.1.2.2. Poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys]

Nous avons ensuite étudié la cinétique de la ROP du N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA. Tout comme pour le *N*-Me-L-Phe-NCA (partie 1.1.2.1), Il est essentiel de noter qu'il s'agit de la première polymérisation en utilisant ce monomère qui n'est pas encore décrit dans la littérature.

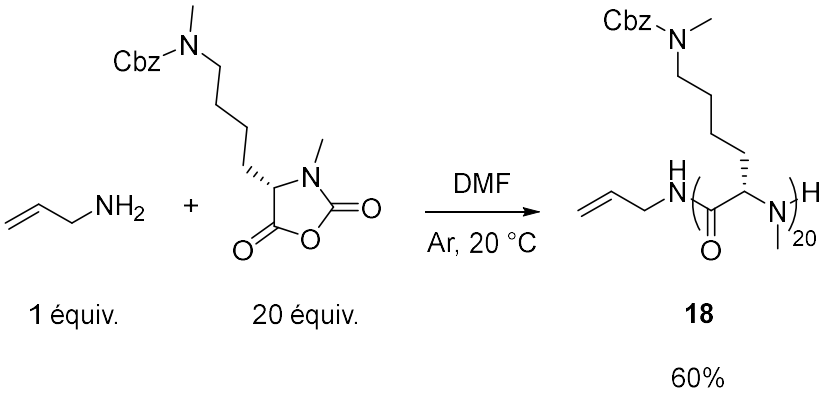


Figure 55 : *Synthèse de poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys]* **18** *en utilisant l'allylamine comme amorceur dans le DMF*

Le N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA a été solubilisé dans du DMF anhydre sous argon à une concentration de 0,4 M et l'allylamine a été utilisée comme amorceur à un M/I = 20 (**Figure 55**). La cinétique de la ROP a été déterminée en suivant la disparition par FTIR de la bande d'élongation de la liaison NC=O du NNCA à ~1850 cm^{-1} et la conversion a été totale

après 10 jours. Contrairement à la formation de poly(*N*-Me-L-Ala), la conversion menant à la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] **18** nous indique que la ROP semble suivre une réaction d'ordre zéro (**Figure 56**). Nous avons tracé la droite d'équation M/M_0 en fonction du temps. La constante de vitesse (k) de la cinétique d'ouverture du cycle du N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA est égale à $2{,}6 \times 10^{-3}$ $mol.L^{-1}.h^{-1}$ soit une réaction 35 fois plus lente que pour le *N*-Me-L-Ala-NCA mais du même ordre de grandeur que pour le *N*-Me-L-Phe-NCA (**Figure 56**). Dans le cas de la réaction de polymérisation par ouverture de cycle, une réaction d'ordre zéro soulève différentes hypothèses : 1) l'étape limitante serait la perte de la molécule de CO_2 lors de l'étape de propagation ; 2) la ROP impliquerait une réaction hétérogène (réactivité à la surface), c'est-à-dire que le polymère précipiterait au cours de la ROP et 3) le NNCA ne polymériserait pas mais s'hydrolyserait au cours du temps.

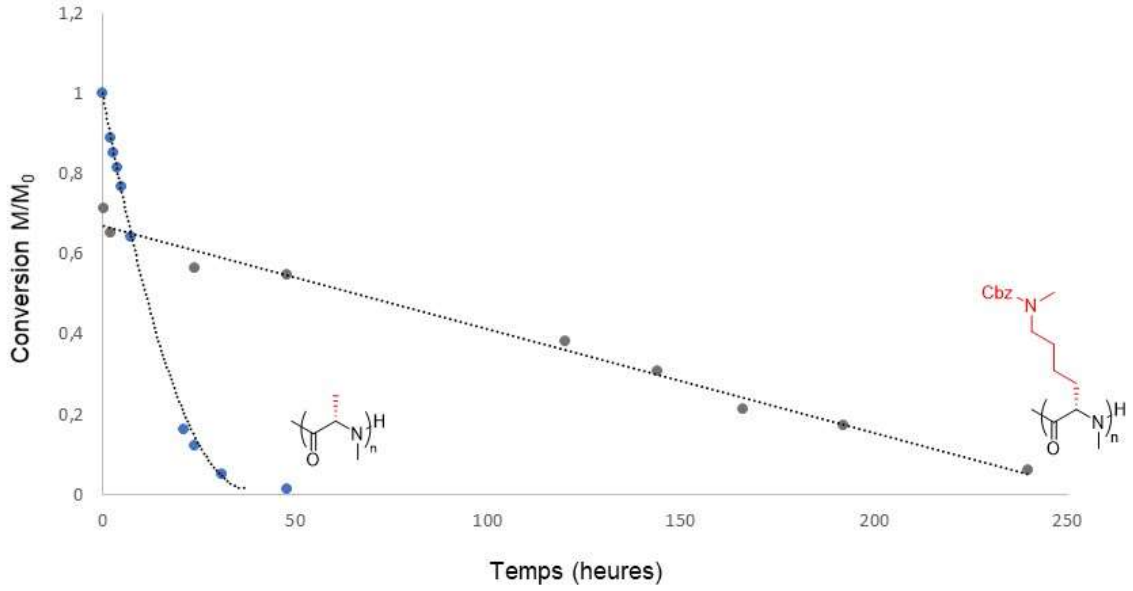


Figure 56 : *Influence de la chaine latérale sur la cinétique de la ROP : comparaison entre le N-Me-L-Ala-NCA et le N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA.*

Dans le but d'affiner nos hypothèses, nous avons effectué une analyse RMN ^1H dans le $CDCl_3$ du polymère **18** ainsi formé. Le polymère **18** a été isolé sous la forme d'une poudre blanche par précipitation dans un mélange éther diéthylique/pentane 2 : 1 suivi d'une précipitation dans le pentane comme un solide avec un rendement de 60%. Le DP_{RMN} a été calculé en corrélant le signal de l'allylamine à 5,8 ppm (signal b et c sur la **Figure 57**) avec le signal à 3,3 ppm correspondant à un CH_2 de la chaine latérale de la lysine (signal i sur la

Figure 57). Le DP_{RMN} calculé est égal à 20, ce qui est en parfait accord avec la valeur théorique visée (M/I théorique = 20).

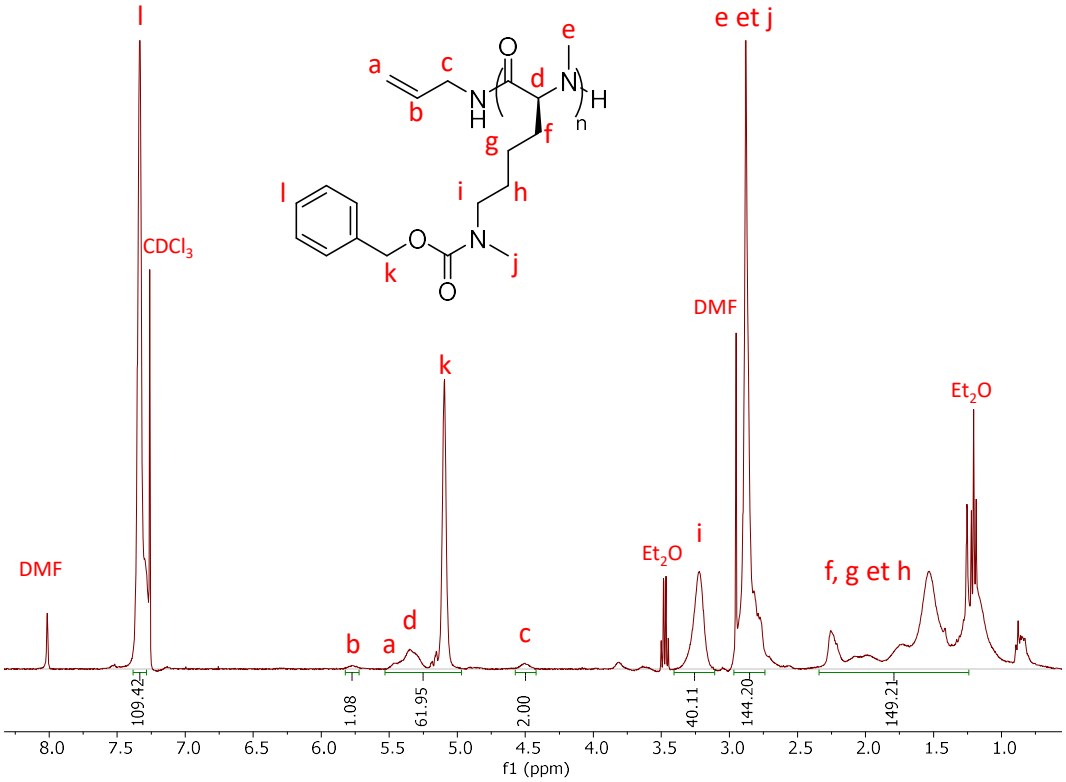


Figure 57 : *Spectre ^{1}H-RMN de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] **18** dans $CDCl_3$*

Ces analyses montrent clairement que nous obtenons un polymère amorcé par l'allylamine avec une valeur de M/I calculée proche du M/I théorique (~ 19 – 20 au lieu de 20) dans des conditions homogènes. En effet, une polymérisation dans des conditions hétérogènes impliquerait un DP calculé plus petit du fait de la précipitation du polymère au cours de la réaction. Ces observations renforcent donc l'hypothèse de l'importance cinétique de l'élimination du CO_2 lors de l'étape de propagation

1.1.3. Influence d'une base sur la cinétique de formation de la poly(*N*-Me-L-Phe)

A quelques exceptions près, la polymérisation des NCA *N*-alkylés est un processus lent en comparaison à la polymérisation des NCA classiques.[326,328] Nous venons d'observer

[326] Bai, T.; Ling, J. *Biopolymers* **2019**, *110* (4), e23261.
[328] Chan, B. A. *et al.*, *Biopolymers* **2018**, *109* (1).

des différences significatives quant aux cinétiques de la polymérisation par ouverture de cycle des NCA *N*-méthylés en montrant l'influence de l'encombrement stérique de la chaine latérale (section 1.1.2). Ces différences peuvent être un inconvénient lors de réactions de copolymérisation puisque nous voulons le plus possible que les monomères s'incorporent de manière aléatoire dans la structure du polymère. Plusieurs conditions sont connues pour modifier les cinétiques lors de la ROP des NCAs, telles que le changement de solvant, la température ou l'utilisation du vide.[329] Dans la littérature, il existe aussi beaucoup de catalyseurs qui permettent d'améliorer la ROP des NCA.[315] Inspirés par ces travaux et pour tenter de minimiser les différences de réactivité de nos NCA *N*-méthylés, nous avons décidé d'utiliser une base comme organocatalyseur de la polymérisation. L'impact d'une base améliore généralement la ROP des NCA, comme le montre l'utilisation de la triéthylamine (Et_3N)[330,331] , de carbène (NHC)[332] ou le bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS).[266] Dans le cas des NCA non *N*-alkylés, la base joue le rôle d'activateur lors d'étape d'amorçage en déprotonant le NCA alors que pour les NCA *N*-alkylés, elle peut jouer directement le rôle d'amorceur[333,334,337]ou elle peut faciliter l'attaque nucléophile lors de l'étape de propagation en déprotonant l'amine formée.[323,335]

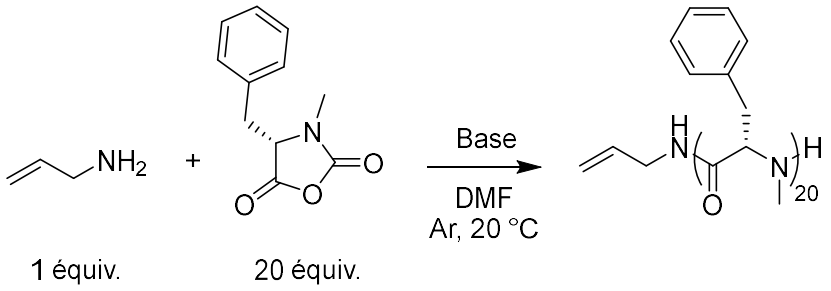


Figure 58 : *Synthèse de la poly(N-Me-L-Phe) en utilisant l'allylamine comme amorceur dans le DMF à 0,4 M en catalyse basique.*

[329] Habraken, G. J. M. *et al*., *Polym. Chem.* **2011**, *2* (6), 1322
[315] Rasines Mazo, A. *et al*., *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (14), 4737–4834
[330] Vacogne, C. D.; Schlaad, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (86), 15645–15648.
[331] Vacogne, C. D.; Schlaad, H. *Polymer* **2017**, *124*, 203–209.
[332] Guo, L.; Zhang, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (50), 18072–18074.
[266] Wu, Y. *et al*., *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 5297.
[333] Guo, L. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (22), 9163–9171
[334] Salas-Ambrosio, P. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (10), 3697–3702.
[323] Muhl, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2020**, *11* (43), 6919–6927.
[335] Chan, B. A. *et al*., *Macromolecules* **2016**, *49* (6), 2002–2012.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de différentes bases sur la cinétique de la ROP du *N*-Me-L-Phe-NCA. Le monomère *N*-Me-L-Phe-NCA a été solubilisé dans du DMF anhydre sous argon à une concentration de 0,4 M et l'allylamine a été utilisée comme amorceur à un M/I = 20. Le catalyseur (C) a été ajouté à un M/C = 20 (**Figure 58**). La cinétique de la ROP a été mesurée en suivant la disparition par FTIR de la bande d'élongation de la liaison NC=O à 1850 cm^{-1}.

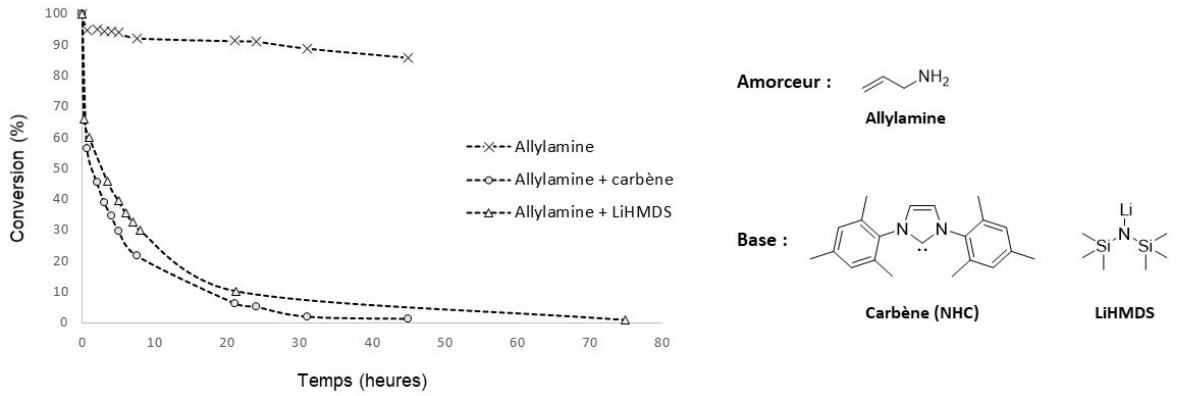


Figure 59 : *Cinétique de formation de la poly(N-Me-L-Phe) initiée par l'allylamine avec un M/I = 20 dans le DMF à 0,4 M en présence de différentes bases.*

Les résultats obtenus avec 2 catalyseurs basiques, présentés dans la **Figure 59**, ont montré une disparition plus rapide du *N*-Me-L-Phe-NCA en présence de ces bases. L'utilisation d'un carbène *N*-hétérocyclique (NHC) a permis d'obtenir une conversion de 100% en 48 h et l'utilisation de LiHMDS a permis d'obtenir une conversion de 100% en 72 h. Les cinétiques ainsi obtenues étaient comparables à celle obtenue avec la poly(*N*-me-L-Ala). Cependant, faute de temps, nous n'avons pu faire que des études cinétiques et non structurales de ces polymérisations. En l'absence de ces caractérisations, ne nous sommes pas en capacité de confirmer la formation d'un polymère. En résumé, nous avons montré qu'il était possible de polymériser des NCA *N*-méthylés d'acides aminés possédant des chaines latérales de nature et de taille différente. La chaine latérale est un paramètre important qui influence le comportement cinétique des NCA *N*-méthylés par des effets d'encombrements stériques ou de structuration secondaire. Nous n'avons pas été en capacité de discriminer lequel de ces effets est responsable des variations de cinétique par manque de temps et de caractérisations expérimentales. Enfin, les premières expériences de catalyse sur la

phénylalanine *N*-méthylée nous ont permis d'obtenir des cinétiques de consommation du NCA beaucoup plus rapides que dans les conditions non catalysées, ce qui laisse espérer la possibilité d'engager des NNCA encombrés dans des réactions de ROP pour former des copolymères.

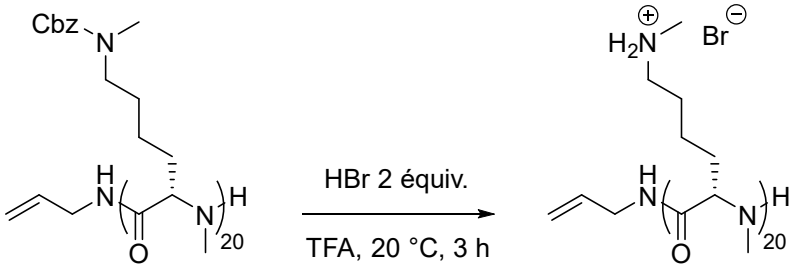
1.2. Préparation de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys]

Pour la première fois, un polymère de lysine bis *N*-méthylée protégée (paragraphe 1.1.2.2) a été synthétisé, ouvrant la voie à la préparation de copolymères cationiques à base de lysine bis *N*-méthylée. Pour obtenir ces derniers, il a fallu optimiser une deuxième étape de synthèse importante : l'hydrolyse du groupement carbamate permettant d'obtenir la fonction amine. Dans le cas des poly(Lysine)s, la déprotection des groupes *N*-Cbz s'effectue à partir de la poly[N_ε-Cbz-L-Lys] en la faisant réagir avec de l'acide bromhydrique (HBr) à température ambiante dans de l'acide trifluoroacétique (TFA).[210] Inspiré par cette procédure, nous avons d'abord préparé la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] à partir du N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA. La synthèse de ce polymère est décrite dans le paragraphe 1.1.2.2.

Afin d'obtenir un polymère cationique, nous avons ainsi déprotégé les groupements Cbz de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] : le polymère **18** a été solubilisé dans du TFA et 2 équivalents de HBr (par rapport à la N_α-Me-N_ε-Me-Lys) ont été ajoutés, puis le milieu réactionnel a été agité pendant 3 h à température ambiante (**Figure 60**). Le polymère **19** ainsi obtenu a été purifié par précipitation dans l'éther diéthylique avant d'être dialysé et lyophilisé avec un rendement de 71%. Le polymère **19** a été analysé par RMN ^{1}H dans D_2O. Comme pour le polymère avant déprotection, le DP_{RMN} a été calculé en corrélant le signal de l'allylamine à 5,9 ppm (signal b sur la **Figure 61**) avec les signaux à 1,4 ppm, 1,75 ppm et 2,0 ppm correspondant à trois CH_2 de la chaine latérale de la lysine (signal f, g et h sur la **Figure 61**). Nous avons ainsi vérifié que l'étape de déprotection n'avait pas modifié le DP_{RMN} du

[210] Zhou, C. *et al*., *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 60–67.

polymère (DP_{RMN} = 20 avant et après déprotection) et nous avons contrôlé que les pics correspondants au groupe protecteur Cbz aient disparu (**Figure 61**).



18 **19**

71%

Figure 60 : *Déprotection de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys]* **18** *en poly[N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys]* **19** *en utilisant HBr dans du TFA pendant 3 h à température ambiante.*

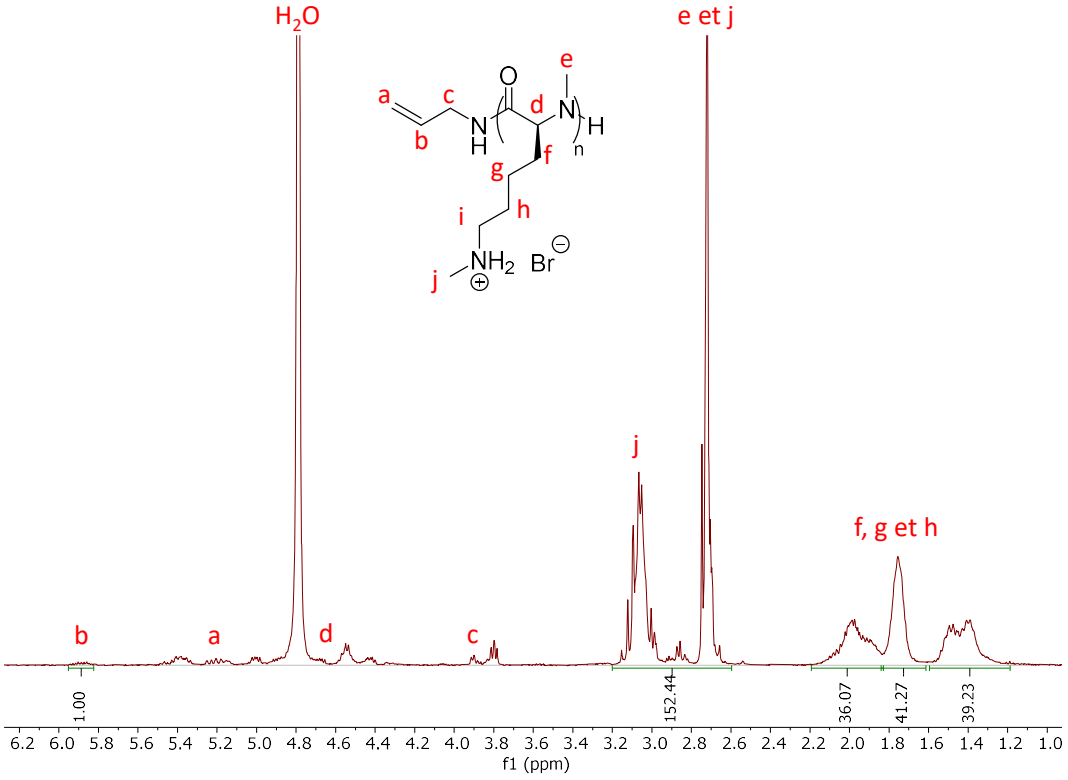


Figure 61 : *Spectres ^{1}H-RMN de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys]* ***19*** *dans D_2O*

2. Essais de synthèse de copolypeptides *N*-méthylés avec un rapport hydrophobe/cationique contrôlé

En chimie médicinale, le criblage de chimiothèques est un outil efficace pour diriger la conception d'agents anti-infectieux *via* l'étude des relations structure-activité (RSA).[336] L'utilisation de la chimie des polymères ouvre ce concept à de nouveaux pharmacophores macromoléculaires qui restent à étudier pour les analogues polymériques simplifiés de PAMs : taille, dispersité, topologie, composition des unités monomères, nature de l'amorceur, etc.[316] Plus précisément, la conception macromoléculaire de copolymères nécessite de définir des paramètres clés, comme déjà décrite dans le chapitre 1. Comme exemple représentatif d'une approche relations structure/activité, Gellman *et al.* ont optimisé la conception de copolymères de nylon-3 contre diverses bactéries[233,337,338,339], y compris *C. difficile*.[245] Ils ont rapporté qu'il était ainsi possible de moduler les activités en fonction de la longueur du polymère, de l'amorceur, du rapport hydrophobe/cationique mais aussi en fonction de la nature chimique du groupement hydrophobe.

Le premier exemple d'une approche RSA impliquant des copolymères de polypeptides a été publié en 2001 par Deming *et al*. pour concevoir des déstabilisateurs de membranes phospholipidiques.[255] Dans cette étude, T. Deming et ses collaborateurs ont effectué un criblage de plus de 60 copolymères différents synthétisés à partir de seulement deux NCA. En faisant varier des paramètres structuraux tels que la longueur, la nature du NCA ou l'hydrophobicité, ils ont déterminé qu'un contenu hydrophobe élevé (>30%) augmente généralement l'interaction avec les membranes de liposomes modèles en solution. Cette première étude a montré qu'une optimisation précise de la composition du copolymère

[336] Guha, R. On Exploring Structure–Activity Relationships. In *In Silico Models for Drug Discovery*; Kortagere, S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2013**; *993*, pp 81–94.
[316] Salas-Ambrosio, P. *et al*., *Biomacromolecules* **2021**, *22* (1), 57–75.
[233] Mowery, B. P. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (50), 15474–15476.
[337] Mowery, B. P. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (28), 9735–9745.
[338] Chakraborty, S. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14530–14535.
[339] Liu, L. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (8), 3219–3230.
[245] Liu, R. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14498–14504.
[255] Wyrsta, M. D. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12919–12920.

aboutissait à des interactions sélectives et que cette composition du copolymère variait avec la composition de la membrane. L'approche RSA des polymères polypeptidiques proposée par T. Deming a depuis été vérifiée en pratique avec des bactéries. Par exemple, Wu et ses collaborateurs ont préparé une petite bibliothèque de copolymères à partir de 2 NCA : le N_{ε}-Boc-DL-Lys, la partie cationique, et le *γ*-benzyl-L-Glu-NCA (BLG-NCA), la partie hydrophobe. En faisant varier l'hydrophobicité du copolymère de 10 à 60%, ils ont observé des activités sur un grand nombre de bactéries incluant *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* multirésistante et *S. aureus* multirésistante.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier la préparation de plusieurs copolymères linéaires à base d'acides aminés *N*-méthylés en faisant varier l'hydrophobicité globale des copolymères en modulant le rapport hydrophobe/cationique et la nature de la chaine latérale des acides aminés hydrophobes (**Figure 62**).

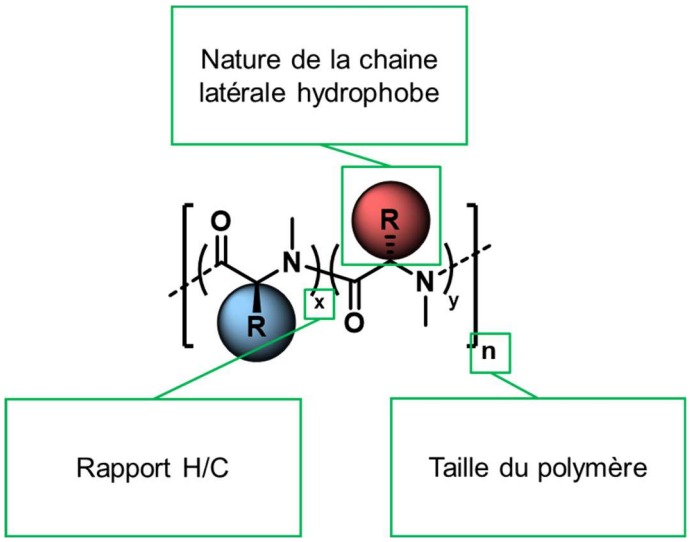


Figure 62 : *Les différentes modulations structurales envisagées pour les copolymères cibles*

2.1. Préparation de copolymères cationiques avec des rapports hydrophobes/cationiques variables

Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, les études de RSA menées en utilisant la chimie des polymères ont montré que la variation du caractère dual hydrophobe/cationique est un facteur déterminant pour obtenir des polymères anti-infectieux. En utilisant la

polymérisation par ouverture de cycle, ce paramètre peut être facilement ajusté par copolymérisation de 2 monomères différents.[210] Avec cette polymérisation, des copolymères polypeptidiques peuvent être obtenus avec une dispersion étroite,[340] cependant, cela n'a jamais été appliqué à la synthèse de copolypeptides *N*-méthylés à base de lysine et d'acide aminé hydrophobe (leucine, phénylalanine, etc…). Pour atteindre cet objectif, nous avons commencé par préparer une série de copolymères composée de Lysine *bis N*-méthylée et d'Alanine *N*-méthylée : poly[(N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys)-(*N*-Me-L-Ala)] dans un processus en 2 étapes. Dans la première étape, nous avons effectué la ROP en mélangeant les NCA *N*-méthylés de lysine et d'alanine, en utilisant l'allylamine comme amorceur à un M/I = 20. Dans le but de concevoir des copolymères possédant des balances hydrophobes/cationiques différentes, nous avons fait varier la stœchiométrie entre le monomère « cationique » et le monomère « hydrophobe » afin d'obtenir des compositions en monomère hydrophobe allant de 10% à 50%. Dans la deuxième étape, nous avons déprotégé les groupements Cbz des Lysines *bis N*-méthylées afin d'obtenir des copolymères cationiques (**Figure 63**).

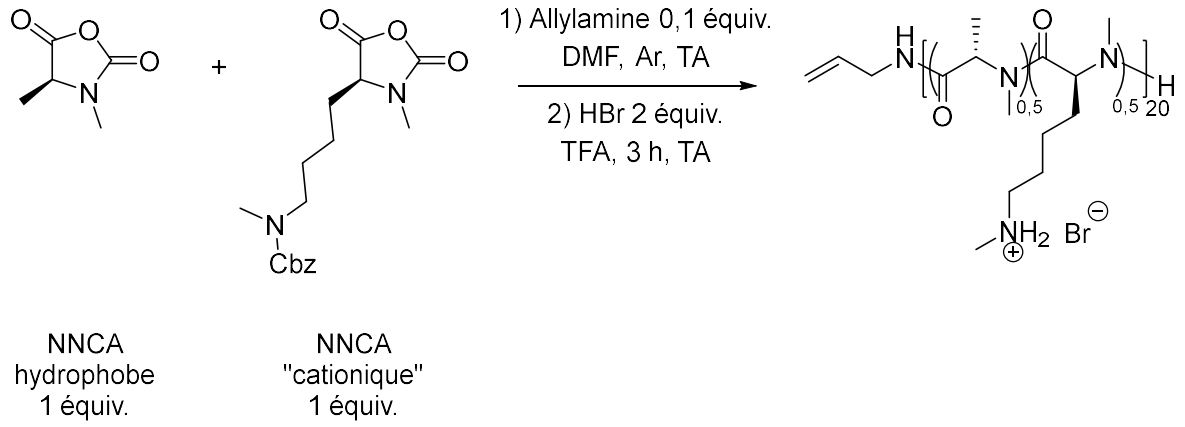


Figure 63 : *Synthèse d'un copolymère poly[(N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys)-(N-Me-L-Ala)] en deux étapes.*

L'avancement des copolymérisations a été suivi par FTIR jusqu'à disparition complète des signaux des NNCA. Il est important de noter une très nette augmentation des temps de réaction de la copolymérisation (allant jusqu'à 30 jours en fonction du rapport Ala/Lys) par rapport à ce qui était attendu à la suite des études cinétiques de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-

[210] Zhou, C. *et al*., *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 60–67.
[340] Fetsch, C.; Luxenhofer, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (19), 1708–1713.

L-Lys] et de la poly(*N*-Me-L-Ala). Cette observation semble toutefois être en adéquation avec les observations faites lors de l'étude cinétique de la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys]. En effet, lors de l'étude cinétique de la ROP du N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys-NCA, nous avions observé une réaction d'ordre zéro qui semblait s'expliquer par une étape d'élimination du CO_2 limitante lors de la ROP. Dans l'optique de résoudre cette problématique, il pourrait s'avérer approprié d'effectuer les copolymérisations sous flux d'Argon pour faciliter l'élimination du CO_2. Dans notre cas, nous avons décidé d'ajouter une base non nucléophile encombrée, la *N*,*N*-Diisopropyléthylamine (DIPEA), après 7 jours de réaction dans le but de faciliter la polymérisation comme cela l'a déjà été montrée pour des NNCA.[323] Pour les réactions de polymérisation suivantes, la DIPEA a été ajoutée 48 h après l'ajout de l'allylamine. Les copolymères ont été isolés par précipitation dans un mélange éther diéthylique/pentane 2 : 1 suivi d'une précipitation dans le pentane pour donner des solides visqueux orange avec des rendements allant de 40 à 70% (**Tableau 14**). Les copolymères ont été analysés par ^{1}H-RMN dans $CDCl_3$ (**Figure 64**).

Tableau 14 *: Série de copolymères cationiques N-méthylés basée sur l'Alanine et la Lysine obtenue par ROP : détermination du DP et du rapport H/C par RMN après déprotection.*

NCA *N*-méthylé hydrophobe	H/C théorique (%)	DP théorique	H/C RMN* (%)	DP_{RMN}*	Rendement (%)	
					Avant déprotection	Après déprotection
Alanine	10	20	14	21	40%	82%
Alanine	20	20	24	21	45%	78%
Alanine	30	20	27	26	47%	81%
Alanine	40	20	41	22	61%	84%
Alanine	50	20	50	20	70%	85%
* Le H/C RMN et le DP_{RMN} ont été calculés sur les copolymères déprotégés						

Pour tous les copolymères, nous avons calculé le DP_{RMN} en utilisant le signal du proton allylique à 5,8 ppm (signal b sur la **Figure 64**) et les signaux du CH de la chaine peptidique à 5,3 ppm (signaux d et g sur la **Figure 64**). Pour déterminer le rapport Lys/Ala, nous avons utilisé le signal à 3,2 ppm (signal n sur la **Figure 64**) correspondant à un CH_2 de la chaine latérale de la lysine et les signaux à 5,3 ppm (signaux d et g sur la **Figure 64**) correspondant aux CH de la chaine peptidique. En général, les DP_{RMN} calculés ainsi que les rapports

[323] Muhl, C. *et al.*, *Polym. Chem.* **2020**, *11* (43), 6919–6927.

hydrophobes/cationiques concordaient avec les valeurs théoriques visées (M/I théorique = 20 et rapport de 10 à 50%) (**Tableau 14**).

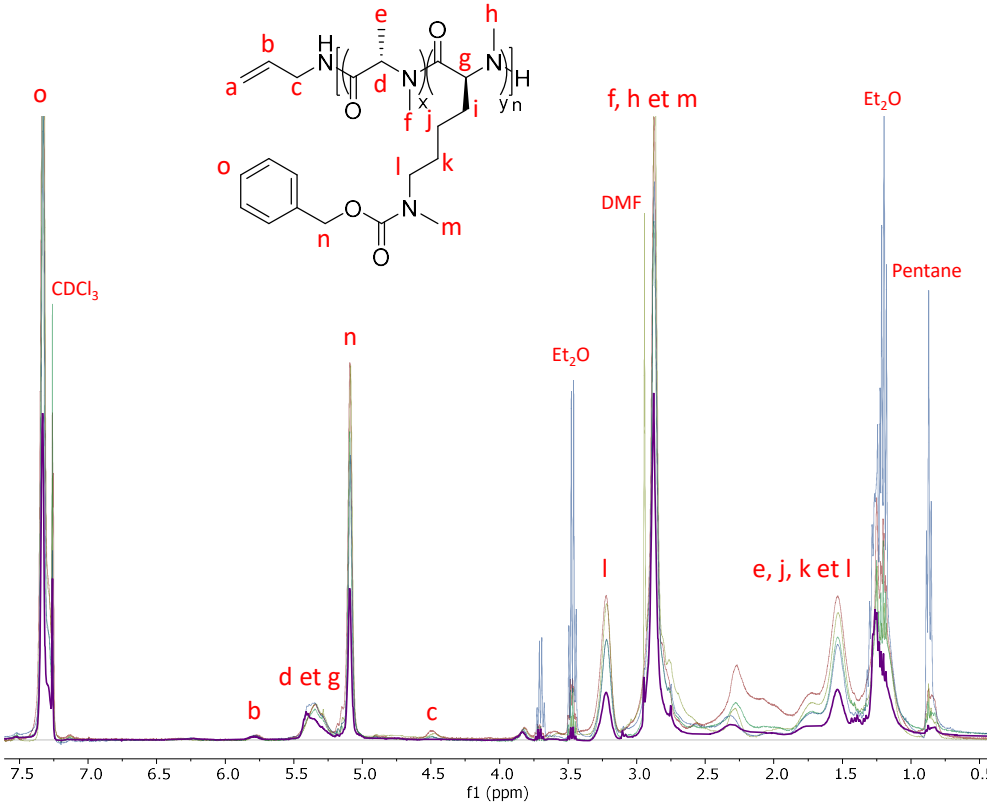


Figure 64 : *Spectres ^{1}H-RMN des poly[(N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys)-(N-Me-L-Ala)]* ***20 – 25*** *dans le $CDCl_3$ avec une quantité d'Alanine variant de 10 à 50%.*

Nous avons ensuite effectué la déprotection de ces copolymères en utilisant la procédure décrite dans la partie 1.2. Tous les copolymères ont été déprotégés dans du TFA en ajoutant 2 équivalents de HBr par rapport à la lysine. Après 3 heures de déprotection, les copolymères ont été précipités dans l'éther diéthylique avant d'être dialysés et lyophilisés. Nous avons obtenu des copolymères cationiques et hydrosolubles avec des rendements d'environ 80%. Nous avons vérifié par RMN que l'étape de déprotection n'avait pas modifié la taille du polymère en comparant le DP_{RMN} et les rapports hydrophobes/cationiques calculés avant et après déprotection (**Figure 65**). Nous avons aussi vérifié que les pics correspondant au groupe protecteur Cbz avaient totalement disparu. Les analyses RMN dans D_2O montrent que l'étape de déprotection n'a pas dégradé les copolymères. En effet, les DP_{RMN} calculés avant et après déprotection sont identiques. De même, aucun pic appartenant au groupement protecteur Cbz n'a été observé.

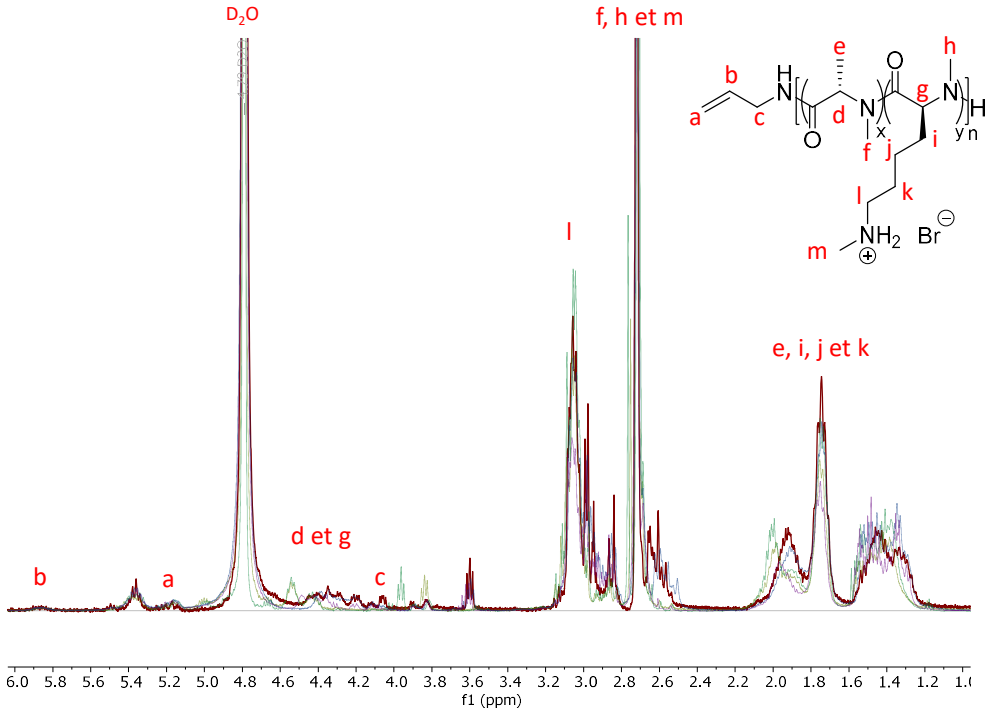


Figure 65 : *Spectres RMN ^{1}H des poly[(N_α-Me-N_ε-Me-L-Lys)-(N-Me-L-Ala)]* ***26 – 30*** *dans D_2O avec une quantité d'Alanine variant de 10 à 50%.*

En résumé, nous avons réussi à préparer, *via* une réaction de copolymérisation par ouverture de cycle, une première série de copolypeptides à base d'Alanine *N*-méthylée et de Lysine bis N-méthylées solubles dans l'eau, avec un degré de polymérisation et un rapport hydrophobe/cationique contrôlés. Afin d'améliorer la réactivité des NNCA, nous avons utilisé une base non nucléophile encombrée, la DIPEA, qui n'a eu aucune influence dans la structure des copolymères tout en permettant de les obtenir plus rapidement.

2.2. Essai de préparation de copolymères cationiques avec une hydrophobie accrue

Comme évoqué dans les études de T. Deming et de Y. Wu, l'approche RSA permet d'identifier et de concevoir de nouvelles macromolécules actives aux propriétés améliorées.[224] Parmi les paramètres modulables, l'hydrophobicité est un élément clé qui joue un rôle majeur dans la déstabilisation de la membrane bactérienne, entrainant la fuite du milieu intracellulaire et la mort de la bactérie. Pour promouvoir cette déstabilisation, certaines études indiquent que

[224] Ergene, C. *et al.*, *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407–2427.

la nature chimique de la chaine latérale hydrophobe influence la bioactivité.[316] Avec des polypeptides obtenus par copolymérisation, le choix du monomère hydrophobe pourrait donc être crucial, comme démontré lors du criblage de copolymères composés de L-lysine mélangée à un autre acide aminé hydrophobe (L-Ala, L-Leu, L-Ile, L-Phe et L-Val).[255] Dans cette section, nous avons essayé de développer de nouveaux copolymères en mélangeant des unités N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lysine avec 3 types d'unités *N*-méthylés hydrophobes. Notre objectif a été de préparer puis de de cribler une bibliothèque de copolypeptides *N*-méthylés avec des rapports hydrophobes/cationiques allant de 0 à 50% et des degrés de polymérisation de 20 et de 30. Toutes les réactions de copolymérisation ont été amorcées avec l'allylamine (**Figure 66**).

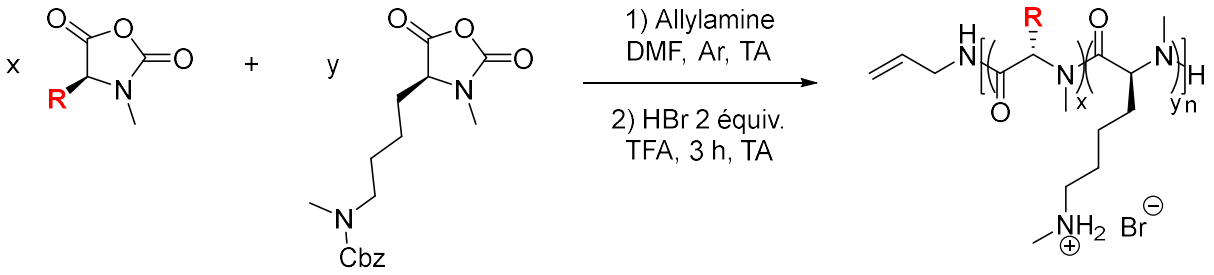


Figure 66 : Schéma de s*ynthèse de copolymères faisant varier la nature chimique de la chaine latérale hydrophobe.*

Toutes les copolymérisations par ouverture de cycle ont été réalisées en suivant la même procédure que celle décrite dans la partie 2.1 et tous les copolymères ont été déprotégés en suivant la procédure décrite dans la partie 1.2 pour donner des copolymères cationiques (**Tableau 15 et Tableau 16**). L'ensemble des procédures et caractérisations des composés sont données dans la partie expérimentale.

[316] Salas-Ambrosio, P. *et al.*, *Biomacromolecules* **2021**, *22* (1), 57–75.
[255] Wyrsta, M. D. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12919–12920.

Tableau 15 *: Série de copolymères cationiques N-méthylés avec un DP visé de 20 obtenue par ROP : détermination du DP et du rapport H/C par RMN après déprotection.*

NCA *N*-méthylé hydrophobe	H/C théorique (%)	DP théorique	H/C RMN* (%)	DP_{RMN}*	Rendement (%)	
					Avant déprotection	Après déprotection
Leucine	10	20	10	20	35	67
Leucine	20	20	12	17	42	78
Leucine	30	20	15	28	68	82
Leucine	40	20	25	20	74	89
Leucine	50	20	36	22	75	86
Phénylalanine	10	20	6	16	51	82
Phénylalanine	20	20	12	17	63	81
Phénylalanine	30	20	20	25	85	91
Phénylalanine	40	20	23	13	76	89
Phénylalanine	50	20	36	16	83	92
* Le H/C RMN et le DP_{RMN} ont été calculés sur les copolymères déprotégés						

Tableau 16 *: Série de copolymères cationiques N-méthylés avec un DP visé de 30 obtenue par ROP : détermination du DP et du rapport H/C par RMN après déprotection.*

NCA *N*-méthylé hydrophobe	H/C théorique (%)	DP théorique	H/C RMN* (%)	DP_{RMN}*	Rendement (%)	
					Avant déprotection	Après déprotection
Alanine	20	30	26	19	33	67
Alanine	30	30	34	26	37	70
Alanine	40	30	43	28	41	68
Alanine	50	30	42	24	56	63
Leucine	10	30	7	14	54	74
Leucine	20	30	13	16	78	75
Leucine	30	30	20	15	39	66
Leucine	40	30	28	18	64	63
Leucine	50	30	32	19	66	71
Phénylalanine	10	30	11	9	68	51
Phénylalanine	20	30	20	10	65	78
Phénylalanine	30	30	27	11	58	67
Phénylalanine	40	30	33	12	78	91
Phénylalanine	50	30	40	13	77	93
* Le H/C RMN et le DP_{RMN} ont été calculés sur les copolymères déprotégés						

En utilisant le **Tableau 15**, nous observons que les séries de copolymères à base de leucine et de phénylalanine avec un degré de polymérisation ciblé de 20 possèdent des rapports hydrophobes/cationiques calculés très éloignés des valeurs théoriques ciblées : entre 10 et 36% pour les copolymères à base de leucine et entre 6 et 36% pour les copolymères à base de phénylalanine. Par ailleurs, les DP_{RMN} calculés sont globalement proches de la valeur visée pour les copolymères à base de leucine alors que pour la série de copolymères à base de phénylalanine, ils sont légèrement plus petits. En utilisant le **Tableau 16**, nous observons que, comme pour les séries de DP 20, les séries de copolymères à base d'alanine, de leucine et de phénylalanine possèdent un DP_{RMN} ainsi que des rapports hydrophobes/cationiques calculés très éloignés des valeurs théoriques ciblées. Par exemple, les copolymères de phénylalanine et de lysine *N*-méthylés attendus à des DP de 30 présentent des DP_{RMN} calculés aux alentours de 10.

Parmi les possibles hypothèses qui pourraient expliquer ces résultats, l'une d'entre elles serait que, comme observé avec les études cinétiques de polymérisation du *N*-Me-L-Phe et du N_{α}-Me-N_{ε}-Me-N_{ε}-Cbz-L-Lys-NCA, l'encombrement stérique généré par la chaine latérale des NNCA empêche la polymérisation de se poursuivre, entrainant des rapports hydrophobes/cationiques plus faibles. Une seconde hypothèse serait que les copolymérisations étant très lentes, une hydrolyse des NNCA concomitantes a eu lieu pendant la copolymérisation. Cette hydrolyse pourrait expliquer les DP_{RMN} ainsi que les rapports hydrophobes/cationiques très inférieurs aux valeurs théoriques ciblées.

En conclusion, nous avons appliqué le protocole de copolymérisation décrit dans le paragraphe 2.1 afin de synthétiser des copolymères avec des rapports hydrophobes/cationiques allant de 10 à 50% et des degrés de polymérisation de 20 et de 30. Dans l'ensemble, les analyses par RMN des polymères ainsi préparés ont montré que les paramètres structuraux calculés étaient assez éloignés de ceux initialement ciblés. Plus précisément, dans le cas des copolymères à base de leucine et de phénylalanine, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des teneurs en hydrophobe supérieures à 40%. Nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer ces observations : 1) l'encombrement stérique généré par la chaine latérale bloquant la polymérisation comme observée lors des études cinétiques et 2) une hydrolyse des NNCA au cours de la polymérisation. Pour tenter de résoudre ces problèmes, l'utilisation d'un catalyseur pourrait s'avérer être une piste intéressante. Dans notre étude, nous avons utilisé la DIPEA comme catalyseur afin d'améliorer la cinétique de la polymérisation mais les temps de réaction sont restés relativement longs (supérieurs à 30 jours en fonction de la nature du groupement hydrophobe et du rapport hydrophobe/cationique). De nouvelles copolymérisations utilisant les catalyseurs décrits dans la section 1.1.3 (LiHMDS, NHC) pourraient être une alternative afin de concevoir des copolymères avec des paramètres structuraux contrôlés (DP, teneur hydrophobe) et des temps de polymérisation plus courts.

3. Etude de l'activité antimicrobienne des copolymères sur *C. difficile*

Les évaluations biologiques ont été effectuées par nos soins au sein du laboratoire de pathogénèse des bactéries anaérobies (LPBA) de l'Institut Pasteur de Paris, sous la supervision du Dr Bruno Dupuy. Nous avons effectué un criblage rapide sur *C. difficile* en plaque 96 puits : dans chaque puits, environ 10^5 unités formant colonies par mL (UFC/mL) de *C. difficile* dans le milieu de culture Brain-Heart Infusion (BHI) ont été incubées avec des concentrations croissantes de copolymères pendant 24 h à 37°C sous atmosphère composée de 90% de N_2, 5% de CO_2 et 5% de H_2. Ce criblage a permis d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la plus petite concentration permettant d'inhiber la croissance de la bactérie. La CMI a été déterminée visuellement pour chaque polymère. En parallèle, du milieu BHI non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif pour vérifier l'absence de contamination du milieu de croissance et du milieu BHI inoculé avec uniquement *C. difficile* a été utilisé comme contrôle positif. Malheureusement, les résultats expérimentaux ont montré que nous ne pouvions pas observer de valeurs de CMI inférieures à 500 µg/mL pour tous les polymères testés.

Dans l'optique de préparer de nouveaux agents thérapeutiques, et tout particulièrement dans le cas des agents anti-infectieux, l'évaluation de la cytotoxicité est un élément essentiel à déterminer. Il est en effet important de s'assurer que les nouvelles molécules proposées soient réellement actives *via* un mécanisme sélectif vis-à-vis d'une cible et non des « poisons » pour l'organisme.[224,341] Traditionnellement, le test le plus largement utilisé pour déterminer la cytotoxicité des PAM et des analogues de PAM est l'activité hémolytique car il s'agit d'un test simple, rapide et économique. Aujourd'hui, ces évaluations ont tendance à être faites sur des lignées cellulaires de mammifères. Ici, nous avons évalué l'activité cytotoxique des copolymères sur une lignée de cellule Caco-2, des cellules épithéliales intestinales utilisées

[224] Ergene, C. *et al*., *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407–2427.
[341] Greco, I. *et al*., *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 13206.

comme modèle de la barrière intestinale.[342] A partir d'une courbe dose-réponse, nous avons déterminé la concentration cytotoxique médiane (CC_{50}). Ces évaluations ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Pharmadev de Toulouse par le Dr Sandra Bourgeade-Delmas. Nous avons constaté que tous les composés qui ont été testés sur *C. difficile* présentaient aussi une valeur de CC_{50} supérieure à 250 µg/mL sur la lignée cellulaire Caco-2, signifiant que ces polymères, ne sont peu cytotoxiques vis-à-vis de la lignée cellulaire Caco-2.

En conclusion, nous avons testé une petite bibliothèque de copolypeptides amphiphiles *N*-méthylés sur une bactérie d'intérêt : *C. difficile* mais aucune activité antimicrobienne n'a pu être observée dans cette série. La principale explication qui semble justifier l'absence d'activité est la faible hydrophobie des composés que ne dépassait pas 40% alors que la plupart des analogues de PAM qui ont été décrits sont actifs à des teneurs hydrophobes de 50%.

3.1. Etude de l'activité antimicrobienne d'une série de copolypeptoïdes

Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, les polypeptoïdes sont une classe de dérivés polypeptidiques dérivés de la glycine dont les atomes d'azotes des liaisons peptidiques sont substitués, ce qui leur confèrent une résistance accrue à la protéolyse par rapport aux polypeptides classiques (**Figure 67**).[343] De plus, la grande diversité chimique que peuvent prendre les substituants sur l'atome d'azote de la liaison peptidique permet d'accéder à une variété de propriétés physicochimiques et biologiques.

[342] Lea, T. Caco-2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 103–111
[343] Miller, S. M. *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (22), 2657–2662.

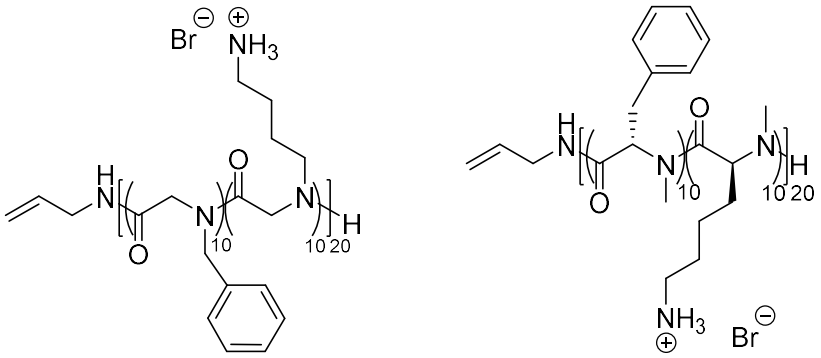
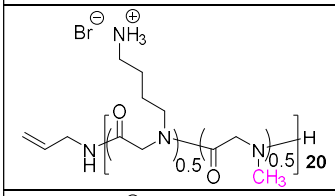
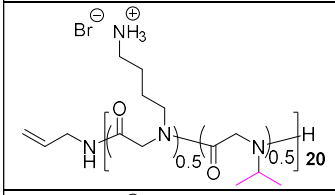
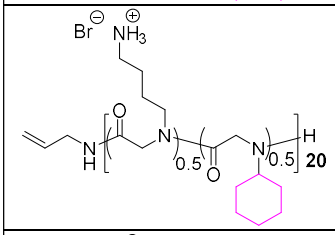
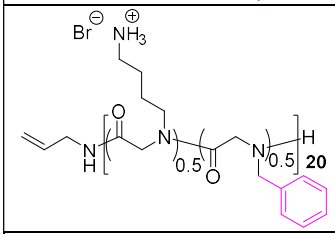


Figure 67 : *Différences structurales entre un copolypeptoïde (à gauche) et un copolypeptide N-méthylés (à droite)*

Dans cette section, nous avons décidé d'étudier les relations structures/activités de copolypeptoïdes synthétisés par le Dr Pedro Salas dans le cadre de son travail de thèse au sein du laboratoire de chimie des polymères organiques (LCPO) de Bordeaux. Les évaluations biologiques ont été effectuées par nos soins au sein du laboratoire de pathogénèse des bactéries anaérobies (LPBA) de l'Institut Pasteur de Paris en suivant le même mode opératoire que celui décrit dans la section 3.

Nous avons commencé par étudier l'influence du bloc hydrophobe sur l'activité des copolypeptoïdes. Pour cela, nous avons étudié 4 copolypeptoïdes possédant tous un DP de 20 et un ratio H/C de 50% mais constitués de 4 blocs hydrophobes différents, correspondant à divers groupements alkyles substituant l'atome d'azote : méthyle, isopropyle, cyclohexyle et benzyle (**Tableau 17**).

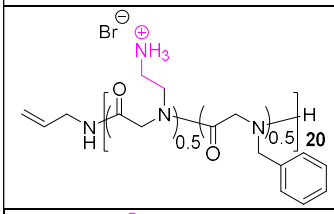
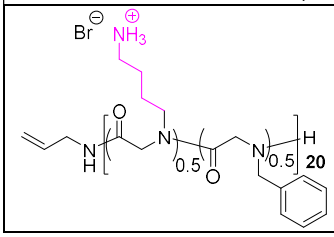
Tableau 17 *: Etude de l'influence du monomère hydrophobe sur l'activité anti-C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	500	n.m*	n.c**
	> 500	n.m*	n.c**
	> 500	n.m*	n.c**
	15,6	143	9,2
* non mesuré ; ** non calculé			

Les résultats présentés dans le **Tableau 17** montrent que la nature du groupement hydrophobe est un paramètre important pour inhiber la croissance de *C. difficile*. En effet, pour les groupements moins hydrophobes (méthyle, isopropyle et cyclohexyle) nous n'avons pas observé d'activité contre *C. difficile* à une concentration de 500 µg/mL alors que pour le copolymère comportant des groupements benzyle, nous avons observé une activité à une concentration de 15,6 µg/mL.

Nous avons étudié l'influence du bloc cationique sur l'activité des copolypeptoïdes. Pour cela, nous avons étudié 2 copolypeptoïdes possédant tous un DP de 20 et un ratio H/C de 50% mais constitués de 2 monomères cationiques différents possédant tous les deux une fonction amine primaire : 2-aminoéthyle et 4-aminobutyle (**Tableau 18**).

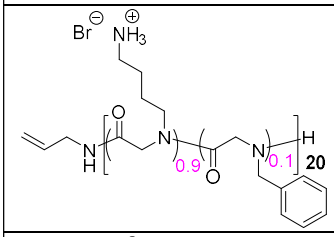
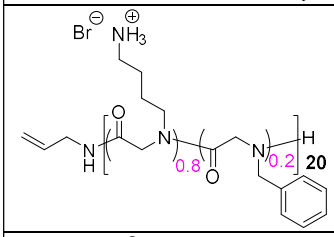
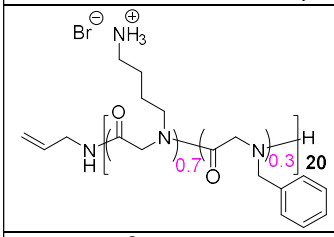
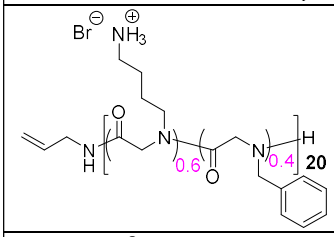
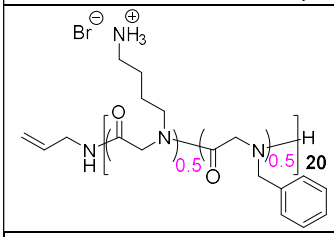
Tableau 18 *: Etude de l'influence de la chaine carbonée du monomère cationique sur l'activité anti-C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	62,5	> 250	> 4
	15,6	143	9,2

A partir de cette brève étude, nous avons montré que le copolymère à base de 4-aminobutyle présente une meilleure activité contre *C. difficile* que le copolymère à base de 2-aminoéthyle mais il serait intéressant de faire des études complémentaires pour connaitre la véritable influence du bloc cationique sur l'activité des copolypeptoïdes vis-à-vis de *C. difficile*.

Nous avons ensuite étudié l'influence du ratio H/C sur l'activité des copolypeptoïdes. Pour cela, nous avons conservé le motif benzyle avec lequel nous avons obtenu la meilleure activité et nous avons étudié une série de copolypeptoïdes de possédant tous un DP de 20 et un ratio H/C variant de 10 à 50% (**Tableau 19**).

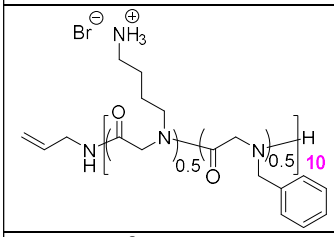
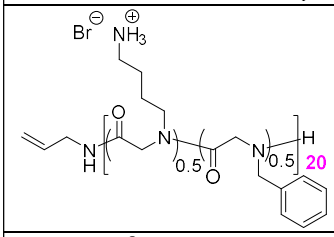
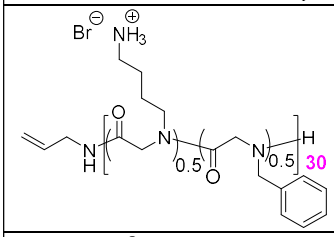
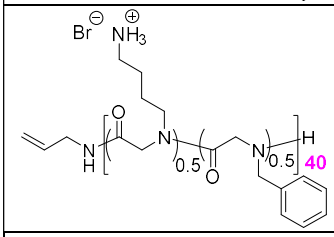
Tableau 19 *: Etude de l'influence rapport hydrophobe/cationique sur l'activité anti-C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	> 500	n.m*	n.c**
	> 500	n.m*	n.c**
	250	n.m*	n.c**
	500	n.m*	n.c**
	15,6	143	9,2
* non mesuré ; ** non calculé			

Les résultats présentés dans le **Tableau 19** montrent que le rapport hydrophobe/cationique est aussi un élément clé pour inhiber la croissance de *C. difficile*. En effet, nous n'avons pas observé d'activité contre *C. difficile* avec des rapports H/C inférieurs à 50%.

Nous avons ensuite étudié l'influence du degré de polymérisation sur l'activité des copolypeptoïdes. Pour cela, nous avons étudié une série de copolypeptoïdes avec un DP de 10, 20, 30 et 40 (**Tableau 20**).

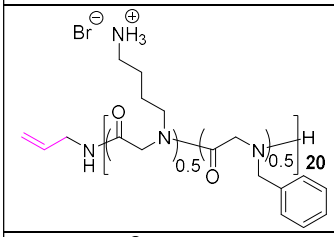
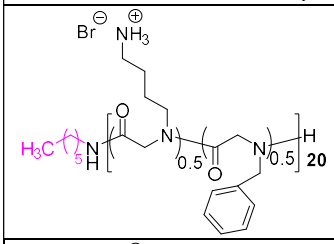
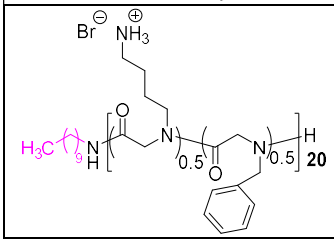
Tableau 20 *: Etude de l'influence du degré de polymérisation sur l'activité anti-C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	> 100	n.m*	n.c**
	15,6	143	9,2
	15,6	211	13,5
	7,8	93	11,9
* non mesuré ; ** non calculé			

Les résultats présentés dans le **Tableau 20** montrent que l'activité anti-*C. difficile* augmentait avec un DP plus élevé, passant d'une valeur supérieure à 100 µg/mL pour un DP = 10 à une valeur de 15,6 µg/mL pour un DP = 20 et 30 et à une valeur de 7,8 µg/mL pour un DP = 40. En parallèle, des études de cytotoxicité des copolymères sur la lignée cellulaire Caco-2 ont montré que le copolymère avec un DP = 30 possède le meilleur indice de sélectivité (IS). Ces résultats suggèrent qu'un minimum de 20 unités est nécessaire pour tuer *C. difficile.*

Une dernière étude a porté sur l'influence de l'amorceur sur l'activité des copolypeptoïdes. Pour cela, nous avons comparé l'influence de 3 amorceurs différents : l'allylamine, l'hexylamine et la décylamine (**Tableau 21**).

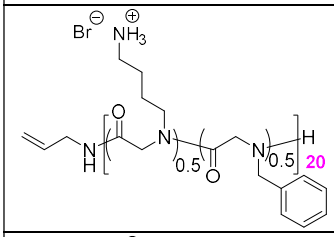
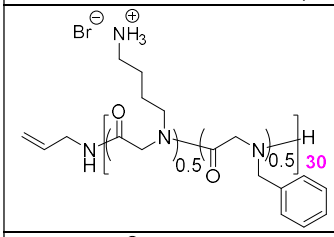
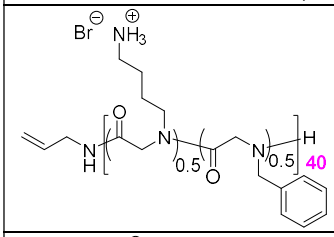
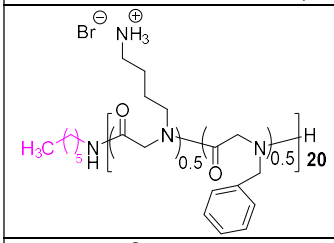
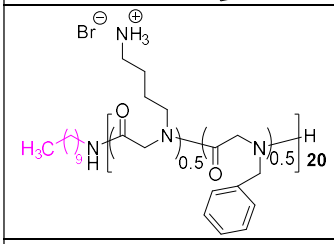
Tableau 21 *: Etude de l'influence de l'amorceur sur l'activité anti-C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	15,6	143	9,2
	3,9	81	20,8
	3,9	91	23,3

Les résultats présentés dans le **Tableau 21** montrent que l'activité anti-*C. difficile* augmente avec un amorceur plus hydrophobe, passant d'une valeur de 15,6 µg/mL pour l'allylamine à une valeur de 3,9 µg/mL pour l'hexylamine et la décylamine. En parallèle, les études de cytotoxicité des copolymères sur la lignée cellulaire Caco-2 ont montré que les copolymères amorcés avec l'hexylamine et la décylamine sont beaucoup plus cytotoxiques que le copolymère amorcé avec l'allylamine.

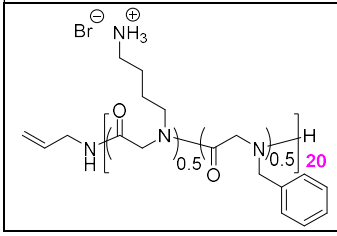
A ce stade, nous avons identifié cinq composés macromoléculaires actifs sur *C. difficile* et possédant un indice de sélectivité supérieur à 9 par rapport aux cellules Caco-2. Ces composés sont tous constitués d'un bloc hydrophobe de type benzyle et d'un bloc cationique de type 4-aminobutyle avec un contenu hydrophobe de 50%. Les structures de ces composés sont reprises dans le **Tableau 22** et nous les avons comparés à trois molécules actives sur *C. difficile* : le métronidazole, la vancomycine et la fidaxomicine ainsi qu'à un peptide antimicrobien, le LL37.

Tableau 22 *: Meilleures molécules contre C. difficile*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	15,6	143	9,2
	15,6	211	13,5
	7,8	93	11,9
	3,9	81	20,8
	3,9	91	23,3
Métronidazole	0,8	> 250	n.c**
Vancomycine	0,8	> 250	n.c**
Fidaxomicine	0,05	141	2820
LL-37	12,5	213	17
** non calculé			

Tout d'abord, nous avons étudié l'activité de ces composés vis-à-vis de spores de *C. difficile* en présence de taurocholate, une molécule jouant un rôle majeur dans la germination des spores de *C. difficile* (**Tableau 23**). Il est important de noter que pour la suite des études biologiques, nous avons décidé de travailler uniquement avec le copolypeptoïde amorcé par l'allylamine et possédant un DP de 20.

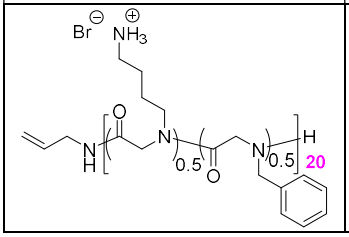
Tableau 23 *: Etude de l'activité d'un copolypeptoïde vis-à-vis de spores de C. difficile en présence d'un germinant*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CMI sur les spores de *C. difficile* (en µg/mL)
	15,6	12,5

Le **tableau 23** montre que le polymère est actif sur les spores de *C. difficile* en présence de taurocholate dans la même gamme de concentration que sur la forme végétative. Cependant, cette étude ne permet pas de savoir précisément si le polymère est actif directement sur la spore, sur la spore en germination ou sur la nouvelle cellule végétative qui s'est formée.

Ensuite, nous avons étudié la résistance du copolypeptoïde à la protéolyse en déterminant sa CMI après un traitement par la trypsine, une peptidase qui participe à la digestion des protéines (**Tableau 24**).

Tableau 24 *: Etude de l'activité d'un copolypeptoïde après un traitement par la trypsine*

Structure	CMI sur *C. difficile* sans traitement par la trypsine (en µg/mL)	CMI sur *C. difficile* après traitement par la trypsine (en µg/mL)
	15,6	15,6

Le **tableau 24** montre que le polymère reste actif contre *C. difficile* après un traitement par la trypsine ce qui apporte une première preuve sur la capacité de ces macromolécules à résister aux peptidases et donc à leur possible administration par voie orale.

En conclusion, nous avons montré qu'il était possible d'utiliser une approche RSA afin de préparer des copolypeptoïdes actifs contre *C. difficile*. En faisant un premier criblage des copolymères en modulant la nature du monomère hydrophobe, le monomère cationique et en

faisant varier la teneur en monomère hydrophobe, nous avons identifié un copolymère composé de motif benzyle et 4-aminobutyle avec un pourcentage d'hydrophobe de 50% possédant une bonne activité anti-C. *difficile* et une cytotoxicité limitée (CMI = 15,6 µg/mL ; CC_{50} = 143 µg/mL ; IS = 9,3). En affinant notre approche RSA *via* l'étude de nouveaux paramètres structurels clés tels que le degré de polymérisation et la nature de l'amorceur, nous avons observé qu'en augmentant la taille du polymère, on obtenait des composés avec des MIC plus faibles, passant de 15,6 µg/mL pour un DP de 20 à 7,8 µg/mL pour un DP de 40. De même, l'utilisation d'un amorceur plus hydrophobe entraine aussi une diminution de la CMI, passant de 15,6 µg/mL en utilisant l'allylamine à 3,9 µg/mL en utilisant l'hexylamine et la décylamine. Enfin, nous avons démontré que l'activité de ces composés contre *C. difficile* reste inchangée après l'action d'une peptidase, la trypsine.

3.2. Etude de l'activité antimicrobienne d'un copolypeptoïde macrocyclique

Les polymères cycliques sont des macromolécules uniques qui ont des propriétés physiques différentes de leurs homologues linéaires. En solution, les polymères cycliques possèdent une topologie en forme d'anneau impliquant un volume hydrodynamique plus faible et il a été démontré que la cyclisation concentre la distribution spatiale des chaines latérales, apportant des propriétés biologiques uniques.[344] Dans ce paragraphe, nous avons évalué l'activité anti-*C. difficile* d'un copolypeptoïde macrocyclique obtenu *via* une nouvelle voie simple de synthèse en utilisant la polymérisation par expansion de cycle (REP) amorcée par le LiHMDS dans le DMF (**Figure 68**) et en se basant sur les études RSA menées sur les composés linéaires (**Tableau 25**).

[344] Haque, F. M.; Grayson, S. M. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (5), 433–444.

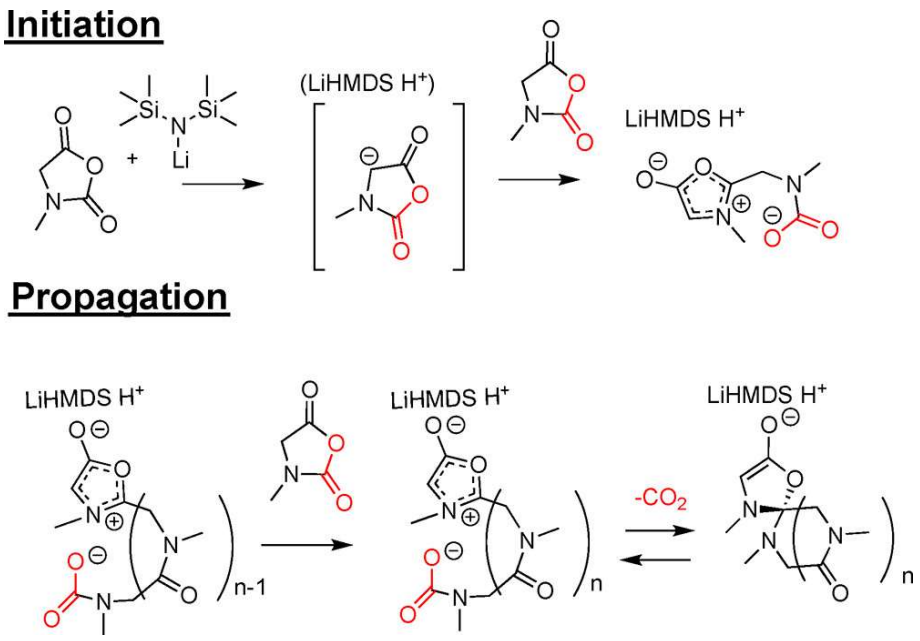
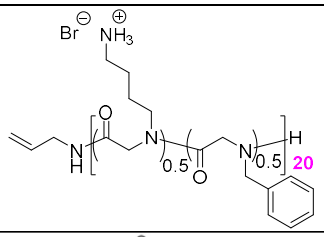
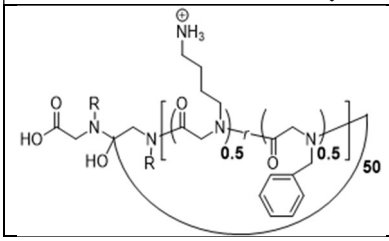


Figure 68 *: Mécanisme proposé pour la polymérisation par expansion de cycle de NNCA amorcée par le LiHMDS*[334]

Tableau 25 *: Comparaison entre un copolypeptoïde linéaire et un copolypeptoïde cyclique*

Structure	CMI sur *C. difficile* (en µg/mL)	CC_{50} sur Caco-2 (en µg/mL)	Indice de sélectivité (IS)
	15,6	143	9,2
	12,5	208	16,6

En utilisant le **Tableau 25**, nous observons que, non seulement le copolymère cyclique possède une meilleure activité anti-*C. difficile* que son analogue linéaire (CMI = 12,5 µg/mL) mais il est également moins cytotoxique pour les cellules Caco-2 (CC_{50} = 208 µg/mL ; IS = 17).

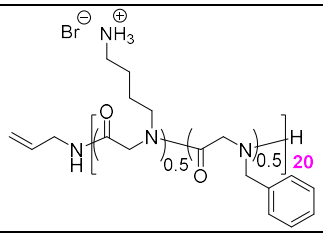
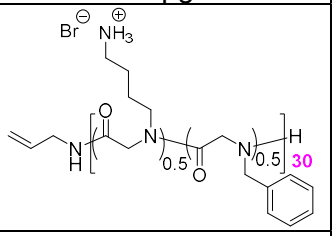
3.3. Etude de l'activité antimicrobienne sur diverses bactéries Gram positif et Gram négatif

[334] Salas-Ambrosio, P. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (10), 3697–3702

Les peptides antimicrobiens possèdent des structures ainsi que des profils d'activités biologiques très différents pourtant, leurs mécanismes d'actions sont souvent similaires et reposent le plus souvent sur la déstabilisation membranaire. Ces variations d'activités s'expliquent par les diversités dans la composition ainsi que dans l'architecture de l'enveloppe cellulaire. Dans le cas des bactéries Gram positif, les PAM interagissent avec la membrane cytoplasmique après avoir traversé la paroi cellulaire composée majoritairement par des acides téichoïques, des acides lipotéichoïques et du peptidoglycane. En fonction de la composition de l'enveloppe cellulaire ou de la composition et de la structuration d'un PAM, il est possible d'observer de très nettes différences dans les activités biologiques.

C'est en suivant cette idée que nous avons décidé de tester 2 copolypeptoïdes identifiés dans le paragraphe 3.1 sur une série de bactéries Gram positif et négatif. Ces tests ont été réalisés par le laboratoire Fonderephar à Toulouse et les résultats sont compilés dans le **Tableau 26**

Tableau 26 *: Etude de l'activité de deux copolypeptoïdes sur une série de bactéries Gram positif et négatif*

Bactérie	Gram	CMI sur différentes bactéries en µg/mL	
			
C. difficile	**+**	**15,6**	**15,6**
S. aureus	+	62,5	62,5
*S. aureus**	+	62,5	62,5
E. faecalis	+	125	125
L. monocytogenes	+	31,3	15,6
S. pneumoniae	+	250	250
B. fragilis	-	62,5	15,6
H. pylori	-	125	125
E. coli	-	62,5	62,5
P. aeruginosa	-	62,5	62,5
A. baumanii	-	31,3 – 62,5	31,3
* souches résistantes à la méthycilline			

Nous observons que les copolypeptoïdes présentent des CMI supérieures à 62,5 µg/mL pour la plupart des bactéries Gram positif et négatif testées, à l'exception de *L.*

monocytogenes (31,3 µg/mL pour le DP de 20 et 15,6 µg/mL pour le DP de 30), *B. fragilis* (15,6 µg/mL pour le DP de 30) et *A. baumanii* (15,6 µg/mL pour le DP de 30).

4. Conclusion

En conclusion, nous avons commencé par étudier la cinétique de réaction de polymérisation par ouverture de cycle en préparant des homopolymères : la poly(*N*-Me-Ala), la poly(*N*-Me-Phe) et la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] à partir des NCA *N*-méthylés synthétisés et présentés dans le chapitre 2. Cette première étude a montré que la que les cinétiques étaient fortement corrélées à la nature de la chaine latérale du NCA : les polymérisations étaient beaucoup plus lentes quand la chaine latérale est encombrée. En effet, nous avons obtenu des vitesses de réaction 35 fois plus lente pour la poly[N_α-Me-N_ε-Me-N_ε-Cbz-L-Lys] par rapport à la poly(*N*-Me-Ala) et nous n'avons pas été en mesure de synthétiser la poly(*N*-Me-Phe). Cependant des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'influence de plusieurs paramètres qui n'ont pas été parfaitement définis : 1) des études cinétiques de NCA d'acides aminés « classiques » pour évaluer l'influence de la *N*-méthylation sur la polymérisation et 2) l'étude de la structuration secondaire en comparant des acides aminés *N*-méthylés de la série L, de la série D ou racémisés.

Ensuite, en utilisant les résultats obtenus lors des études cinétiques, nous avons décidé de préparer des séries de copolypeptides amphiphiles à partir de lysine bis *N*-méthylées comme monomère « cationique » et d'alanine, de leucine ou de phénylalanine N-méthylés comme monomère « hydrophobe » avec un degré de polymérisation de 20 et 30 et une composition en monomère hydrophobe variant de 10 à 50%. Malheureusement, mis à part pour les copolymères à base d'alanine *N*-méthylés de DP 20, nous n'avons pas réussi à obtenir les composés visés. Nous pensons que, comme observés lors des études cinétiques, l'encombrement stérique et/ou la structuration secondaire provenant de la chaine latérale des NNCA influencent grandement la réaction de copolymérisation. Pour résoudre ce problème, l'utilisation d'un catalyseur tel que le LiHMDS ou un carbène pourrait s'avérer être une

alternative intéressante. En effet, la brève étude que nous avons menée sur la synthèse de la poly(*N*-Me-Phe) en présence d'une base non nucléophile a montré qu'il était possible de grandement améliorer la cinétique de formation de ce polymère. Cependant, des essais complémentaires sont obligatoires pour confirmer ces observations.

Enfin, en utilisant une approche relations structure/activité, nous avons étudié l'activité d'une série de copolypeptoïdes contre une bactérie d'intérêt : *Clostridioides difficile.* En modulant certains paramètres structurels tels que la nature du monomère cationique, la nature du monomère hydrophobe, l'hydrophobicité, le degré de polymérisation et la nature de l'amorceur, nous avons identifié plusieurs éléments clés permettant d'obtenir des composés actifs contre *C. difficile.* En général, l'ensemble des composés actifs sur *C. difficile* possédait tous un groupement benzyle (analogue de la phénylalanine) comme bloc hydrophobe et un groupement 4-aminobutyle (analogue de la lysine) comme bloc cationique avec une teneur en benzyle de 50% et un DP compris entre 20 et 40. Des copolypeptoïdes macrocycliques ont été préparés en suivant une toute nouvelle méthodologie et, en se basant sur les études RSA menées sur les composés linéaires, un composé cyclique possédant une activité anti-*C. difficile* a été identifié. De plus, nous avons évalué la résistance de ces composés à la protéolyse en montrant que la CMI reste inchangée malgré un traitement par la trypsine, une peptidase présente dans le tube digestif, ouvrant ainsi la voie à une possible administration par voie orale de ces composés.

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériels

Tous les produits chimiques et les solvants utilisés dans ce travail ont été achetés chez Sigma Aldrich, Fluorochem, Acros, TCI et ont été utilisés sans aucune purification supplémentaire. Le tétrahydrofurane a été obtenu à partir d'un purificateur de solvant au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse), conservé sous atmosphère d'argon.

L'eau MiliQ a été obtenue à partir d'un système de purification d'eau MEDICA-RFII 7/15 (LCC, Toulouse).

5.2. Equipements

Les spectres IR ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre FTIR (Spectromètre IR Frontier, Perkin Elmer), et les échantillons ont été mesurés avec un analyseur ATR (GladiATR, Pike Technologies) de Fisher technologies effectuant 32 scans au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse, France). Les données brutes ont été obtenues avec le logiciel Perkin Elmer spectrum 10 et les données ont été traitées avec le logiciel Originlab 2016.

Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide des spectromètres Brucker Avance 300, Brucker Avance 400 et Brucker Avance III 400 au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, Toulouse, France). Les analyses ont été faites à 298 K et les données ont été analysées à l'aide du logiciel MestReNova 14.1.2. Les déplacements chimiques des signaux sont donnés en ppm. Les spectres obtenus ont été calibrés en utilisant les signaux résiduels des solvants (Dimethylformamide (DMF) 8,03 ppm ; $CHCl_3$ 7,26 ppm et H_2O 4,79 ppm). Les signaux ont été classés comme suit : singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m) et large (br).

Les masses molaires des polymères ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en utilisant le diméthylformamide (DMF + bromure de lithium (LiBr) 1 g/L) ou L'hexafluoropropan-2-ol (HFIP) comme éluant au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO, Bordeaux, France). Les mesures ont été effectuées sur un système Ultimate 3000 de Thermoscientific équipé d'un détecteur à barettes de diode (DAD). Le système comprenait également un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (MALS) et un détecteur d'indice de réfraction différentiel (dRI) de Wyatt technology. Les polymères ont été séparés sur deux colonnes de gel Shodex Asahipack GF310 et GF510 (300 x 7.5 mm) (limites d'exclusion de 500 Da à 300 000 Da) à un débit de 0.5 mL/min. La température des colonnes a été maintenue à 50°C. Les chromatogrammes ont été enregistrés avec les logiciels

Chromeleon 7.2 et Astra 7.1.0 et analysés avec le logiciel Originlab 2016. Les dn/dc ont été déterminés expérimentalement.

Les analyses de masse MALDI-TOF ont été effectuées à l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT, Toulouse, France) sur APPAREIL en utilisant l'acide *α*-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) comme matrice et l'iodure de sodium (NaI) comme sel à des ratios qui varient en fonction du polymère.

5.3. Etude cinétique par spectrométrie IR

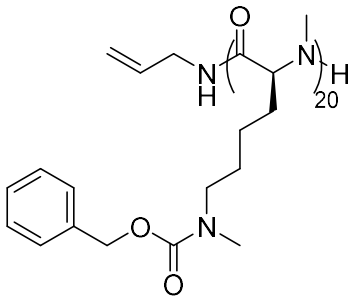
Le composé à analyser a été solubilisé dans un Schlenk sous argon dans le DMF anhydre à une concentration de 0,4 M. Ensuite, 0,05 équivalent d'allylamine a été ajouté à l'aide d'une seringue purgée sous argon. La solution a été agitée à température ambiante sous argon. A certains moments, environ 50 µL de la solution ont été prélevés avec une seringue purgée à l'argon. L'échantillon a été déposé sur l'analyseur ATR du spectromètre IR et il a été analysé dans la gamme de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}. En utilisant la hauteur de la bande d'élongation du groupement C=O à environ 1850 cm^{-1}, la conversion du monomère a pu être suivie au cours du temps, puisque l'intensité de la bande est dépendante de la concentration en NCA. La valeur initiale de la bande à t_0 a été corrigée en utilisant le DMF comme blanc. Les échantillons ont été prélevés et analysés jusqu'à ce qu'aucun changement de hauteur ne soit observé. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel OriginLab 2016.

5.4. Préparation d'homopolymères

Synthèse de la poly[*N*-méthyl-L-lysine(me, Cbz)] : 18. Le *N*-méthyl-L-lysine(me, Cbz) NCA (*N*-me-L-lys(me, Cbz) NCA, 0,406 g ; $1{,}21.10^{-3}$ mol, 20 équiv.) a été solubilisé dans un Schlenk sous argon dans 3,0 mL de DMF anhydre. Ensuite, 4,5 µL d'allylamine ($6{,}61.10^{-5}$ mol ; 1 équiv.) ont été ajoutées à l'aide d'une seringue purgée sous argon suivi par 12 µL de DIPEA ($6{,}63.10^{-5}$ mol ; 1 équiv.). La solution a été agitée à température ambiante sous argon jusqu'à la disparition du NCA. Le polymère a été isolé par précipitation dans un mélange éther

diéthylique/pentane 1 :2 suivi d'une seconde précipitation dans le pentane avec d'être centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes avant d'être séché sous vide (0,214 g, 60%).

18



Masse molaire : 5857 g/mol

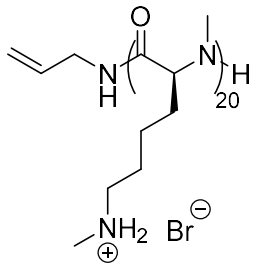
DP_{RMN} = 19

MW_{RMN} = (DP_{RMN} *290 + 57) = 5567 g/mol

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 96H, CH_{Ar}) ; 5,79 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,12 (br, 58H, CH + CH_2) ; 3,25 (s, 38H, CH_2) ; 2,92 (br, 2 NCH_3,136H) ; 2,43 – 1,04 (m, 3 CH_2, 133H).

Déprotection de la poly[*N*-méthyl-L-lysine(me, Cbz)] en poly[*N*-méthyl-L-lysine(me)] : 19. Dans un Schlenk, 51 mg de P[*N*meK(me, Cbz)]$_{20}$ (1,8.10^{-4} mol ; 1 équiv.) a été dissout dans 1 mL d'acide trifluoroacétique. Ensuite, 41 µL d'une solution aqueuse de HBr 33% (3,6.10^{-4} mol ; 2 équiv.) a été ajoutée et la réaction a été agitée à température ambiante pendant 3 heures. Ensuite, le polymère a été précipité dans l'éther diéthylique, centrifugé à 4000 rpm et le surnageant a été éliminé. Le solide a été repris dans 1 mL d'eau et le pH a été ajusté à pH = 7 avec une solution saturée de $NaHCO_3$. La solution a été dialysée contre de l'eau MiliQ avant d'être lyophilisée. Rendement = 86% (35,5 mg).

19



Masse molaire : 4740 g/mol

DP_{RMN} = 19

MW_{RMN} = (DP_{RMN} *237 + 57) = 4560 g/mol

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 5,80 (br, 1H, CH allylamine) ; 2,99 (br, 39H, CH_2) ; 2,64 (br, 112H, 2 $NCH_3)H_3$,) ; 1,88 (br, 36H, CH_2) ; 1,67 (br, 40H, CH_2) ; 1,36 (br, 38H, CH_2). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

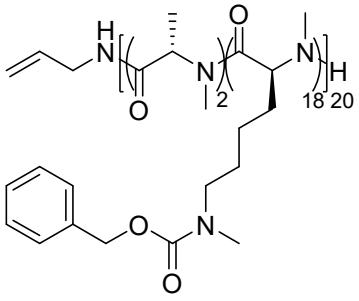
5.5. Préparation de copolymères

5.5.1. Copolymères avec des rapports hydrophobes/cationiques variables

Des séries de copolymères ont été préparées en utilisant des NCA *N*-méthylés hydrophobes et le NCA N-méthylé de lysine. Comme exemple, la synthèse de la poly[(*N*-me-L-ala)-(*N*-me-L-lysine(me, Cbz))] **20** par ROP est décrite à un M/I = 20 et un rapport hydrophobe/cationique de 10%. Le *N*-méthyl-L-lysine(Me, Cbz) NCA (*N*-me-L-lys(Me, Cbz) NCA, 0,446 g, 1,33.10^{-3} mol, 18 équiv.) et le *N*-méthyl-L-alanine NCA (*N*-me-L-ala NCA, 0,02 g, 1,5.10^{-4} mol, 2 équiv.) ont été solubilisés dans un Schlenk sous argon dans 3,3 mL de DMF anhydre. Ensuite, 5,6 µL d'allylamine (7,4.10^{-5} mol, 1 équiv.) ont été ajoutées à l'aide d'une seringue purgée sous argon et 14,4 µL de DIPEA (7,4.10^{-5} mol, 1 équiv.) ont été ajoutées à l'aide d'une seringue purgée sous argon. La solution a été agitée à température ambiante sous argon jusqu'à la disparition du NCA. Le polymère a été récupéré par précipitation dans un mélange éther diéthylique/pentane 2 : 1 suivi d'une seconde précipitation dans le pentane

avec d'être centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes avant d'être séché sous vide et isolé sous forme d'un solide visqueux avec un rendement de 40% (0,161 g).

20



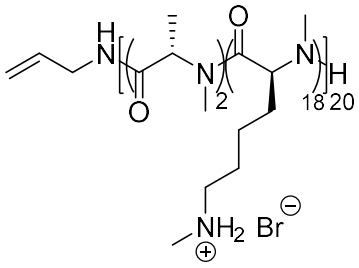
DP_{RMN} : 19

% hydrophobe calculé : 11%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 85H, CH_{Ar}) ; 5,80 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,12 (br, 53H, CH (19H) + CH_2 (34 H)) ; 3,25 (br, 34H, CH_2) ; 2,90 (br, 110H, 3 NCH_3) ; 2,49 – 1,04 (m, 133H, 3 CH_2 + CH_3).

La déprotection des copolymères a été réalisée de manière similaire à la méthode de déprotection de **19**. Un exemple de déprotection du copolymère est donné comme suivant : dans un tube, 41 mg de **20** ($1,4.10^{-4}$ mol ; 1 équiv.) est dissout dans 1 mL de TFA. A la solution de polymère, 32 µL de HBr 33% ($2,8.10^{-4}$ mol ; 2 équiv.) ont été ajoutés et la solution a été ajoutée pendant 3 heures à température ambiante. Ensuite, le polymère a été précipité dans l'éther diéthylique, centrifugé à 4000 rpm et le surnageant a été éliminé. Le solide a été repris dans 1 mL d'eau et le pH a été ajusté à pH = 7 avec une solution saturée de $NaHCO_3$. La solution a été dialysée contre de l'eau MiliQ avant d'être lyophilisée. Après la lyophilisation, le copolymère a été récupéré comme un solide jaunâtre avec un rendement de 82% (27,1 mg).

25



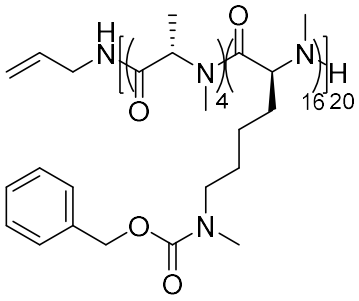
DP_{RMN} : 21

% hydrophobe calculé : 14%

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 5,78 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,13 – 2,39 (m, 152H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 1,99 – 1,14 (m, 118H, 3 CH_2 et 1 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

En utilisant le protocole décrit précédemment, une série de copolymères (M/I = 20) a été synthétisée, présentant un pourcentage d'hydrophobie variant de 20 à 50%.

21

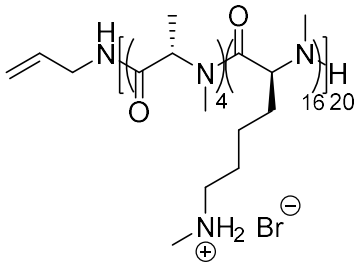


Rendement = 45% et DP_{RMN} : 19

% hydrophobe calculé : 16%

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 85H, CH_{Ar}) ; 5,80 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,12 (br, 53H, CH (19H) + CH_2 (34 H)) ; 3,25 (br, 34H, CH_2) ; 2,90 (br, 110H, 3 NCH_3) ; 2,49 – 1,04 (m, 133H, 3 CH_2 + CH_3).

26

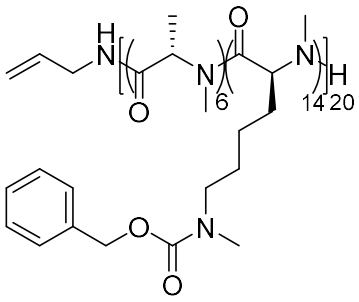


Rendement = 78% et DP_{RMN} : 21

% hydrophobe calculé : 24%

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 5,77 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,15 – 2,51 (m, 143H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 2,11 – 1,15 (m, 112H, 3 CH_2 et 1 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

22

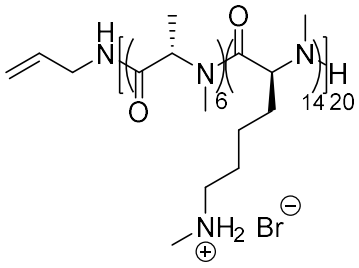


Rendement = 47% et DP_{RMN} : 24

% hydrophobe calculé : 33%

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 80H, CH_{Ar}) ; 5,81 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,12 (br, 56H, CH (24H) + CH_2 (32 H)) ; 3,25 (br, 32H, CH_2) ; 2,90 (br, 122H, 3 NCH_3) ; 2,44 – 1,08 (m, 206H, 3 CH_2 + CH_3).

27

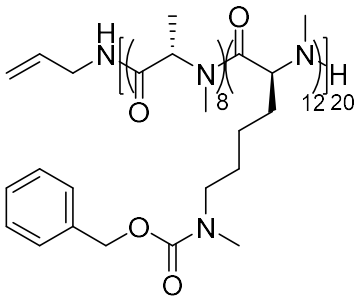


Rendement = 81% et DP_{RMN} : 26

% hydrophobe calculé : 27%

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 5,77 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,18 – 2,44 (m, 174H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 2,07 – 1,14 (m, 135H, 3 CH_2 et 1 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

23

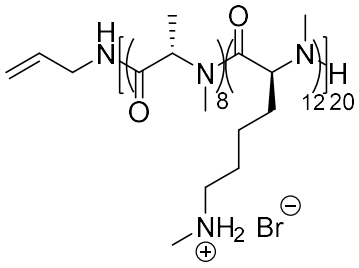


Rendement = 61% et DP_{RMN} : 20

% hydrophobe calculé : 40%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 67H, CH_{Ar}) ; 5,81 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,11 (br, 44H, CH (20H) + CH_2 (24 H)) ; 3,24 (br, 24H, CH_2) ; 2,90 (br, 102H, 3 NCH_3) ; 1,96 – 1,02 (m, 175H, 3 CH_2 + CH_3).

28

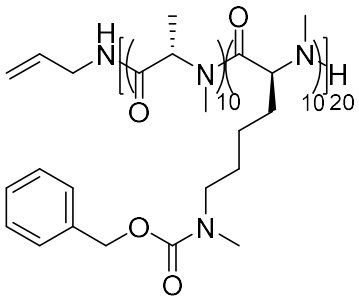


Rendement = 84% et DP_{RMN} : 22

% hydrophobe calculé : 41%

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 5,78 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,13 – 2,35 (m, 132H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 1,98 – 1,09 (m, 105H, 3 CH_2 et 1 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

24

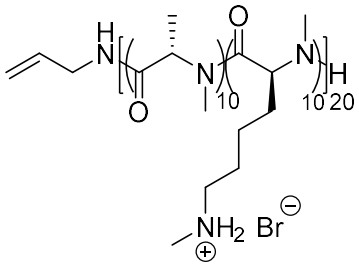


Rendement = 70% et DP_{RMN} : 18

% hydrophobe calculé : 55%

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 42H, CH_{Ar}) ; 5,80 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,28 (br, 34H, CH (18H) + CH_2 (16 H)) ; 3,25 (br, 16H, CH_2) ; 2,90 (br, 78H, 3 NCH_3) ; 2,43 – 1,09 (m, 114H, 3 CH_2 + CH_3).

29



Rendement = 85% et DP_{RMN} : 20

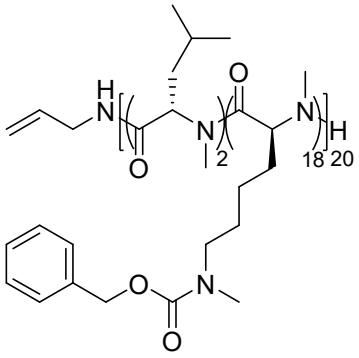
% hydrophobe calculé : 50%

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 5,77 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,17 – 2,47 (m, 122H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 2,10 – 1,04 (m, 91H, 3 CH_2 et 1 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

5.5.2. Copolymère avec des chaines hydrophobes variables

En utilisant le protocole décrit dans la partie 4.5.1, nous avons synthétisé les composés suivants :

30

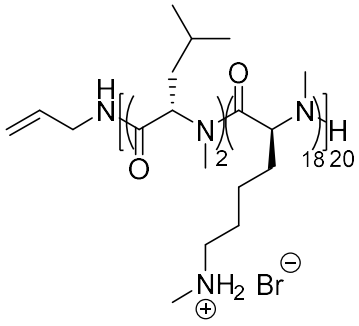


Rendement = 35% et DP_{RMN} : 20

% hydrophobe calculé : 10%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (br 90H, CH_{Ar}) ; 5,79 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,46 – 4,99 (m, 56H, CH (20H) + CH_2 (36 H)) ; 3,25 (br, 36H, CH_2) ; 2,90 (br, 112H, 3 NCH_3) ; 2,63 – 1,08 (m, 113H, 4 CH_2 + CH) ; 0,93 (br, 12H, 2 CH_3).

31

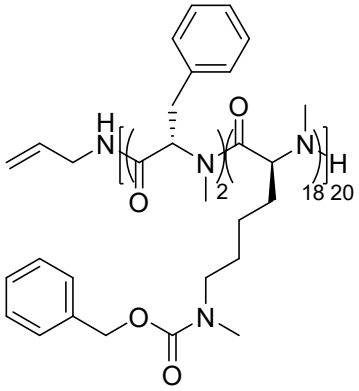


Rendement = 67% et DP_{RMN} : 20

% hydrophobe calculé : 10%

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 5,78 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,13 – 2,49 (m, 147H, 3 NCH_3 et CH_2) ; 2,00 – 1,12 (m, 112H, 4 CH_2 et 1 CH) ; 1,03 – 0,75 (m, 12H, 2 CH_3). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

32

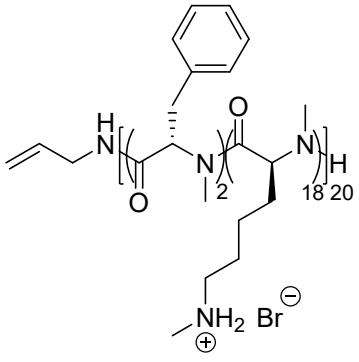


Rendement = 51% et DP_{RMN} : 16

% hydrophobe calculé : 6%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,33 (br 80H, CH_{Ar}) ; 5,78 (br, 1H, CH allylamine) ; 5,46 – 4,85 (m, 46H, CH (16H) + CH_2 (30 H)) ; 3,23 (br, 33H, 2 CH_2) ; 2,90 (br, 92H, 3 NCH_3) ; 2,07 – 1,00 (m, 99H, 3 CH_2).

33



Rendement = 82% et DP_{RMN} : 16

% hydrophobe calculé : 6%

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 7,29 (br, 5H, CH_{Ar}) ; 5,79 (br, 1H, CH allylamine) ; 3,22 – 2,46 (m, 124H, 3 NCH_3 + 2 CH_2) ; 1,89 (br, 30H, CH_2) ; 1,66 (br, 30H, CH_2) ; 1,37 (br, 30H, CH_2). Le signal du CH de la chaine peptidique se trouve sous le signal résiduel de H_2O et il n'a pas pu être interprété.

5.5.3. Copolymères avec des chaines hydrophobes et des M/I variables

En utilisant le protocole décrit dans la partie 4.5.1, nous avons synthétisé les composés suivants (**Tableau 27**). Les rendements sont donnés avant et après déprotection et les M/I et les rapports hydrophobes/cationiques sont donnés après déprotection. Les composés n'étant pas ceux initialement visés, nous ne leur avons pas attribué de numéro.

Tableau 27 *: Série de copolymère cationique N-méthylé obtenue par ROP : détermination du DP et du rapport H/C par RMN après déprotection*

NCA *N*-méthylé hydrophobe	H/C théorique (en %)	DP théorique	H/C RMN (en %)	DP_{RMN}	Rendement (%)	
					Avant déprotection	Après déprotection
Leucine	20	20	12	17	42%	78%
Leucine	30	20	15	28	68%	82%
Leucine	40	20	25	20	74%	89%
Leucine	50	20	36	22	75%	86%
Phénylalanine	20	20	12	17	63%	81%
Phénylalanine	30	20	20	25	85%	91%
Phénylalanine	40	20	23	13	76%	89%
Phénylalanine	50	20	36	16	83%	92%
Alanine	20	30	26	19	33	67
Alanine	30	30	34	26	37	70

Alanine	40	30	43	28	41	68
Alanine	50	30	42	24	56	63
Leucine	10	30	7	14	54	74
Leucine	20	30	13	16	78	75
Leucine	30	30	20	15	39	66
Leucine	40	30	28	18	64	63
Leucine	50	30	32	19	66	71
Phénylalanine	10	30	11	9	68	51
Phénylalanine	20	30	20	10	65	78
Phénylalanine	30	30	27	11	58	67
Phénylalanine	40	30	33	12	78	91
Phénylalanine	50	30	40	13	77	93

5.6. Etude de l'activité antimicrobienne

Les études sur l'activité antimicrobienne sur *C. difficile* ont été effectuées en collaboration avec laboratoire de pathogénèse des bactéries anaérobies (LPBA) de l'Institut Pasteur de Paris sous la direction du Dr Bruno Dupuy. La procédure est décrite comme suivant :

La souche 630Δerm de *Clostridioides difficile* utilisée dans cette étude a été décrite par H. Hussain et al. en 2005.[345] *C. difficile* a été cultivée dans une chambre anaérobie avec une atmosphère de 5% H_2, 5% CO_2 et 90% N_2. Les cellules ont été cultivées sur un milieu de culture Brain-Heart Infusion (BHI) à 37 °C. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des polymères testés et des contrôles (métronidazole (Sigma- Aldrich), vancomycine (Sigma-Aldrich), fidaxomicine (Carbosynth) et LL-37 (sb-peptide)) a été déterminée par la méthode de microdilution.[346] Une série de double dilution des polymères testés et des médicaments témoins a été préparée dans de l'eau hautement purifiée pour obtenir une gamme de concentrations finales allant de 5000 à 39 µg/mL et 20 µL de chaque concentration ont été ajoutés à une plaque à 96 puits. Ensuite, une solution fraiche de *C. difficile* de concentration 10^7-10^8 UFC/mL a été diluée dans du BHI pour obtenir une concentration de 10^5 UFC/mL et chaque puits a été inoculé avec 180 µL de cette solution en anaérobiose avec 180 µL et incubé à 37°C pendant 24 heures.

[345] Hussain, H. A. *et al*., *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54* (2), 137–141.
[346] European Committee for Antimicrobial Suscpetibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9* (8), ix–xv.

La CMI rapportée est la concentration minimale de médicament qui a totalement supprimé la croissance des bactéries après 24 h à 37 °C, par détermination visuelle. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Du milieu BHI non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif pour vérifier l'absence de contamination du milieu de croissance. Du milieu BHI inoculé avec uniquement *C. difficile* a été utilisé comme contrôle positif.

5.7. Etude de l'activité antimicrobienne après un traitement par la trypsine

Une solution du polymère à tester a été préparée dans un tampon carbonate 50 mM pH = 7,8 à 1 mg/mL avec 0,3 mg/mL de trypsine (Sigma-Aldrich). Après 1h à 37°C, une série de double dilution a été préparée dans un tampon carbonate 50 mM pH = 7,8 pour obtenir une gamme de concentration finale de 1000 à 8 µg/mL et 20 µL de chaque concentration ont été ajoutés à une plaque à 96 puits. Ensuite, une solution fraiche de *C. difficile* de concentration 10^7-10^8 UFC/mL a été diluée dans du BHI pour obtenir une concentration de 10^5 UFC/mL et chaque puits a été inoculé avec 180 µL de cette solution en anaérobiose avec 180 µL et incubé à 37°C pendant 24 heures.

La CMI rapportée est la concentration minimale de médicament qui a totalement supprimé la croissance des bactéries après 24 h à 37 °C, par détermination visuelle. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Du milieu BHI non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif pour vérifier l'absence de contamination du milieu de croissance. Du milieu BHI inoculé avec uniquement *C. difficile* a été utilisé comme contrôle positif.

5.8. Cytotoxicité

Les études de cytotoxicité ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le Développement (Pharmadev, Toulouse, France) par l'ingénieure d'étude Sandra Bourgeade-Delmas. La procédure est décrite comme suivant :

L'évaluation de la cytotoxicité des copolymères par le test MTT sur la lignée cellulaire Caco-2 (lignée cellulaire épithéliale humaine) a été réalisée selon la procédure de Mosmann

avec de légères modifications.[347] Les cellules (10^5 cellules/mL) dans 100 µL du milieu complet [DMEM High Glucose complété par 10% de sérum de veau fœtal (FCS), 2 mM L-glutamine, des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine) et 1X NEAA] ont été placées dans chaque puits de plaques 96 puits et incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 et 95% d'air. Après une incubation de 24 h, différentes concentrations de peptides et des contrôles appropriés ont ensuite été ajoutés (100 µL) et les plaques ont été incubées pendant 72 h à 37 °C. Chaque puits a ensuite été examiné au microscope pour détecter la formation éventuelle de précipités avant l'élimination du milieu. Une solution de MTT (0,5 mg/mL dans du DMEM complet à haute teneur en glucose, 100 µl) a ensuite été ajoutée à chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 2 h à 37 °C. La solution de MTT a ensuite été retirée et du DMSO (100 µL) a été ajouté pour dissoudre les cristaux de formazan résultants. Les plaques ont été agitées vigoureusement (300 rpm) pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre pour microplaques (Eon Bio Tek). De l'eau a été utilisée comme blanc et la doxorubicine (Sigma Aldrich) comme contrôle positif. Les CC_{50} ont été calculées par analyse de régression non linéaire traitée sur des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs CC_{50} représentent la valeur moyenne calculée à partir de trois expériences indépendantes.

[347] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.

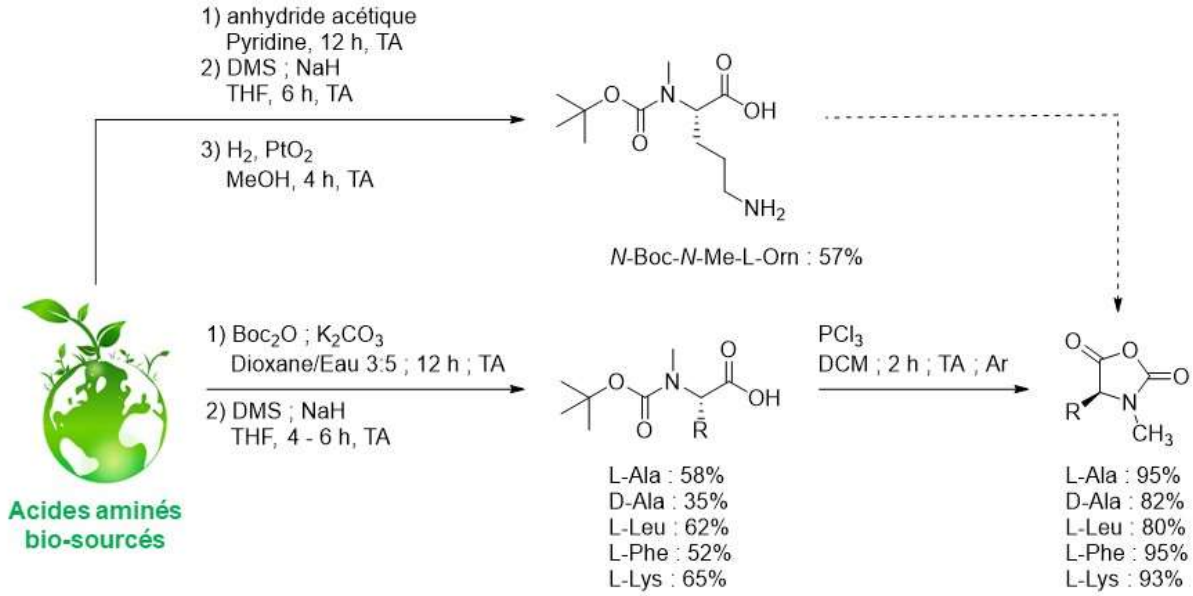
Conclusion

Clostridioides difficile (*C. difficile*) est un bacille Gram positif anaérobie strict qui sporule et se développe souvent dans la flore intestinale de patients dont le microbiote est déstabilisé par une antibiothérapie à spectre large. L'infection à *C. difficile* (ICD), principale conséquence de la colonisation du tube digestif par une souche toxinogène de *C. difficile,* est aujourd'hui responsable de la quasi-totalité des colites pseudomembraneuses ainsi que de 10 et 25% des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques. Depuis 2011, on estime à près de 500,000 infections et environ 30 000 décès chaque année associés à *C. difficile* aux Etats-Unis, engendrant des coûts de soins de santé estimés à près de 3 milliards de dollars. Parmi les nouvelles stratégies pour lutter contre ce pathogène, l'utilisation d'analogues polymériques de peptides antimicrobiens (PAM), des biomolécules constituées d'acides aminés qui sont notamment produites par certains micro-organismes pour cibler virus, bactéries, fungi et parasites, semblent être une alternative prometteuse pour produire de nouveaux candidats médicaments.

L'objectif de cette thèse a été de développer de nouveaux polymères peptidiques *N*-méthylés à potentiel anti *C. difficile*. En mimant la structure amphiphile des PAM, nous avons préparé des copolypeptides cationiques dont le squelette peptidique est *N*-méthylée pour afin de leur conférer une bonne résistance vis-à-vis des protéases du tube digestif avec la possibilité de déstabiliser la membrane de *C. difficile*. Ces nouveaux polymères ont été préparés *via* une réaction de polymérisation par ouverture de cycle de monomères du type *N*-carboxyanhydrides.

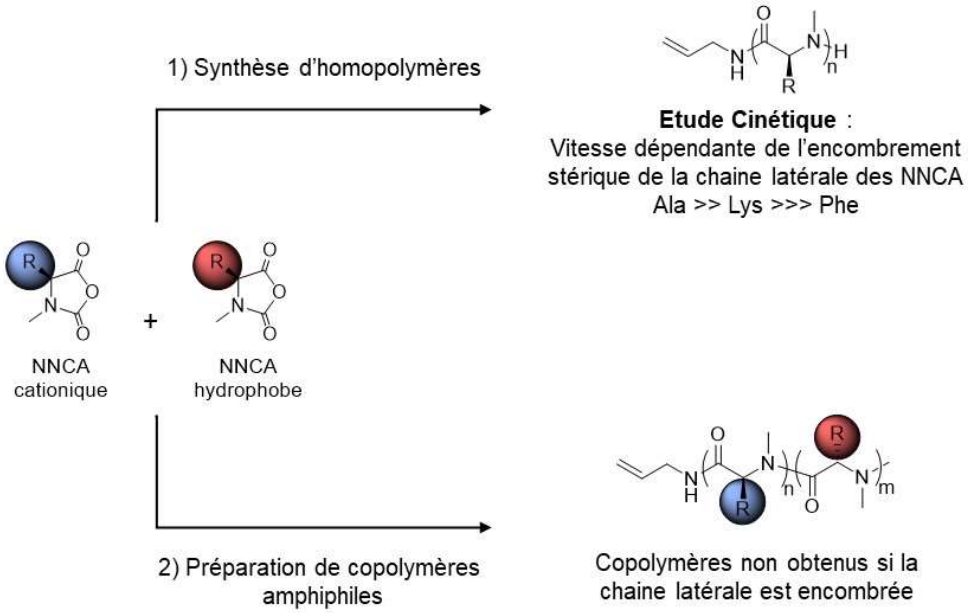
Dans le chapitre 2, nous avons préparé avec succès des monomères *N*-méthylés-*N*-carboxyanhydrides (NNCA) à partir d'acides aminés bio-sourcés possédant une chaine latérale hydrophobe (L-Alanine, D-Alanine, L-Leucine et L-Phénylalanine) ou une chaine latérale « cationique » (L-Lysine) à pH physiologique, à l'échelle du gramme, avec des rendements et des puretés élevés et ne nécessitant aucune étape de purification par

chromatographie. La méthodologie de synthèse, non racémisante, a été divisée en deux temps : 1) la synthèse d'acides aminés *N*-Boc-*N*-méthylés en 2 étapes puis 2) la cyclisation en NNCA par la méthode de Leuchs en utilisant le trichlorure de phosphore. Notre méthodologie de synthèse, transposée à la lysine, n'a permis d'isoler que le produit *N*-diméthylé sur les deux fonctions carbamates. Afin de préparer un acide aminé *N*-méthylé présentant une chaine latérale à fonction amine primaire préservée, nous avons mis en place une méthode alternative en 5 étapes à partir de la *N*-Boc-L-Glutamine dont les deux dernières étapes restent à achever pour accéder à la molécule ciblée en série ornithine.



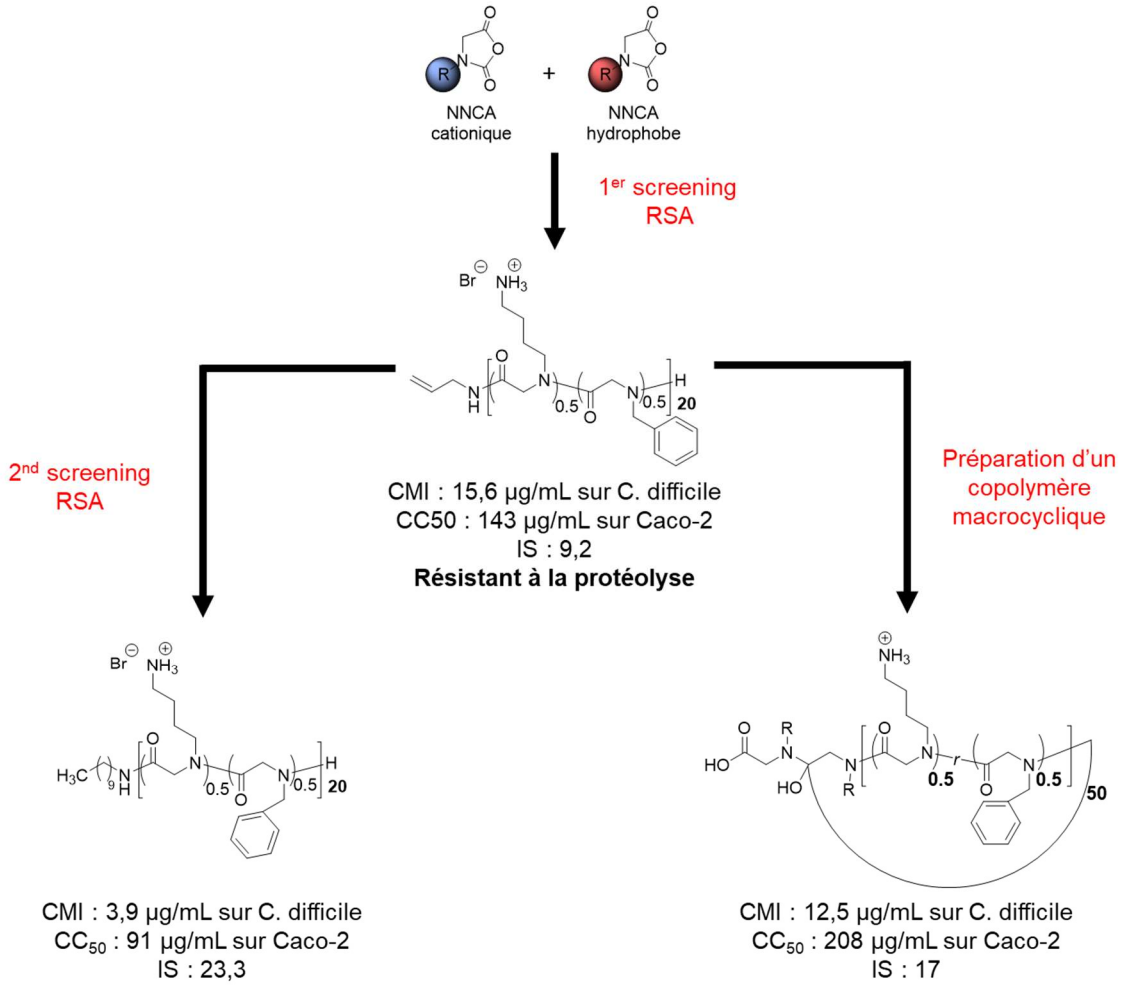
Dans le chapitre 3, nous avons réalisé une étude complète de la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) des NNCA synthétisés dans le chapitre 2 en préparant tout d'abord des homopolymères *N*-méthylés d'alanine et de lysine. Ces études, reposant principalement sur l'étude de la cinétique, ont montré qu'une chaine latérale encombrée entraine un net ralentissement avec une réaction 35 fois plus lente pour la lysine bis *N*-méthylées par rapport à l'alanine *N*-méthylés. Ensuite, des réactions de copolymérisation en mélangeant un NNCA « hydrophobe » et le NNCA dérivé de lysine, suivies par la déprotection des fonctions carboxybenzyles nous ont permis de préparer des composés solubles dans l'eau en faisant varier différents paramètres (nature de l'acide aminé hydrophobe, contenu hydrophobe, degré de polymérisation). Cependant, les différentes analyses structurales (^{1}H RMN,

chromatographie par exclusion stérique) effectuées sur l'ensemble des copolymères ont montré que, mise à part pour une série de copolymères à base d'alanine, les composés visés n'ont pas été obtenus. Ces analyses ont en effet montré que les copolymères synthétisés à base de NNCA dont la chaine latérale est encombrée présentaient des paramètres différents de ceux initialement ciblés. Néanmoins, les copolymères amphiphiles dont la formation a été validée par RMN ont tout de même été testés sur *C. difficile* et aucun d'entre eux n'a présenté d'activité à des concentrations inférieures à 250 µg/mL, probablement du fait d'une trop faible lipophilie.



En parallèle, nous avons étudié l'activité d'une bibliothèque de copolypeptoïdes contre *Clostridioides difficile*. A l'aide d'un premier screening basé sur une approche RSA en faisant varier le rapport hydrophobe/cationique et la nature des monomères hydrophobes et cationiques, nous avons identifié une nouvelle molécule amphiphile de DP 20 composée à 50% de fonction benzyle (NPhe) et à 50% de fonction 4-aminobutyle (NLys) présentant une bonne activité contre *C. difficile*. En reprenant ce copolymère, nous avons effectué une seconde étude RSA reposant sur l'étude de nouveaux paramètres structurels tels que le degré de polymérisation et la nature de l'amorceur et nous avons constaté que des valeurs de CMI optimales ont été atteintes pour des copolymères avec un DP compris entre 20 et 40 et

amorcés avec l'hexylamine et la décylamine. Les mêmes paramètres structurels ont été utilisées pour optimiser l'activité anti-*C. difficile* de copolypeptoïdes macrocycliques obtenus à partir d'une nouvelle méthodologie et nous avons obtenu un copolymère cyclique aussi actif sur *C. difficile* qu'un copolymère linéaire. Enfin, nous avons évalué la résistance de ces composés à la protéolyse en montrant que la CMI des composés linéaires et cycliques reste inchangé après un traitement par la trypsine, ouvrant ainsi la voie à une possible administration par voie orale de ces composés.



Perspectives

La polymérisation par ouverture de cycle (ROP) est une voie de synthèse simple et rapide permettant de préparer une grande variété de macromolécules possédant des propriétés antibactériennes contre divers pathogènes d'intérêts tels que *C. difficile*. Même si nous avons réalisé une première étude sur l'utilisation de nouveaux monomères de types *N*-carboxyanhydres-*N*-méthylés (NNCA) à partir d'acides aminés naturels, la polymérisation de ces derniers reste très peu étudiée. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes chimiques influençant la ROP des NNCA, de nouvelles études pourraient être mises en œuvre : 1) l'utilisation de nouvelles conditions expérimentales (solvant, température, catalyseur, etc.) pour permettre de surpasser certaines contraintes chimiques tels que l'encombrement stérique, la solubilité ou encore la structuration secondaire ; 2) l'utilisation de NNCA possédant une chiralité différente afin d'évaluer la structuration secondaire.

Les évaluations biologiques menées sur une bibliothèque de copolypeptoïdes ont montré qu'il était possible d'obtenir des composés actifs que ce soit sur la forme végétative mais aussi sur les spores de *C. difficile* en présence d'un germinant et présentant une cytotoxicité parfois faible vis-à-vis des cellules épithéliales intestinales Caco-2 et une résistance à la protéolyse. Cependant, il serait intéressant d'effectuer de nouvelles études sur les spores de *C. difficile* afin d'évaluer si les composés sont actifs directement sur la spore, sur la nouvelle cellule végétative qui s'est formée à partir de la spore ou pendant la germination de la spore. De même, évaluer l'activité de ces composés pendant la sporulation de *C. difficile* pourraient être une nouvelle voie d'étude intéressante à explorer. En complément, des études avec d'autres peptidases et des évaluations du passage dans le sang ainsi que des études *in vivo* pourraient apporter de nouvelles preuves sur l'administration orale des polymères et sur leur cytotoxicité mais aussi dans le but d'évaluer leur comportement dans un milieu vivant. Les brèves évaluations biologiques qui ont été menées sur un panel de bactéries Gram positif et négatif

ont montré qu'il était possible d'obtenir des composés sélectifs mais il serait intéressant d'affiner ces résultats sur les bactéries qui constituent le microbiote intestinal.

Bibliographie

(1) WHO. *Antibiotic Resistance*; **2019**. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance. Consulté le 15/09/21

(2) Fair, R. J.; Tor, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* **2014**, *6*, PMC.S14459. https://doi.org/10.4137/PMC.S14459.

(3) World Health Organization. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2021*; World Health Organization: Geneva, **2021**. https://apps.who.int/iris/handle/10665/341666. Consulté le 15/09/21

(4) WHO. *Antimicrobial Resistance*; **2018**. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. Consulté le 15/09/21

(5) *ECDC. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA—AER for 2019; ECDC: Stockholm, Sweden, **2020**. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019*. Consulté le 15/09/21

(6) de Kraker, M. E. A.; Stewardson, A. J.; Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year Due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Med.* **2016**, *13* (11), e1002184. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184.

(7) Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleesschauwer, B.; Cecchini, M.; Ouakrim, D. A.; Oliveira, T. C.; Struelens, M. J.; Suetens, C.; Monnet, D. L.; Strauss, R.; Mertens, K.; Struyf, T.; Catry, B.; Latour, K.; Ivanov, I. N.; Dobreva, E. G.; Tambic Andraševic, A.; Soprek, S.; Budimir, A.; Paphitou, N.; Žemlicková, H.; Schytte Olsen, S.; Wolff Sönksen, U.; Märtin, P.; Ivanova, M.; Lyytikäinen, O.; Jalava, J.; Coignard, B.; Eckmanns, T.; Abu Sin, M.; Haller, S.; Daikos, G. L.; Gikas, A.; Tsiodras, S.; Kontopidou, F.; Tóth, Á.; Hajdu, Á.; Guólaugsson, Ó.; Kristinsson, K. G.; Murchan, S.; Burns, K.; Pezzotti, P.; Gagliotti, C.; Dumpis, U.; Liuimiene, A.; Perrin, M.; Borg, M. A.; de Greeff, S. C.; Monen, J. C.; Koek, M. B.; Elstrøm, P.; Zabicka, D.; Deptula, A.; Hryniewicz, W.; Caniça, M.; Nogueira, P. J.; Fernandes, P. A.; Manageiro, V.; Popescu, G. A.; Serban, R. I.; Schréterová, E.; Litvová, S.; Štefkovicová, M.; Kolman, J.; Klavs, I.; Korošec, A.; Aracil, B.; Asensio, A.; Pérez-Vázquez, M.; Billström, H.; Larsson, S.; Reilly, J. S.; Johnson, A.; Hopkins, S. Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19* (1), 56–66. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4.

(8) Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *Volume 12*, 3903–3910. https://doi.org/10.2147/IDR.S234610.

(9) Reigadas Ramírez, E.; Bouza, E. S. Economic Burden of Clostridium Difficile Infection in European Countries. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; Vol. 1050, pp 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_1.

(10) Stewart, S.; Robertson, C.; Pan, J.; Kennedy, S.; Dancer, S.; Haahr, L.; Manoukian, S.; Mason, H.; Kavanagh, K.; Cook, B.; Reilly, J. Epidemiology of Healthcare-Associated Infection Reported from a Hospital-Wide Incidence Study: Considerations for Infection

Prevention and Control Planning. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *114*, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.03.031.

(11) Stewart, S.; Robertson, C.; Kennedy, S.; Kavanagh, K.; Haahr, L.; Manoukian, S.; Mason, H.; Dancer, S.; Cook, B.; Reilly, J. Personalized Infection Prevention and Control: Identifying Patients at Risk of Healthcare-Associated Infection. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *114*, 32–42. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.03.032.

(12) Haque, M.; Sartelli, M.; McKimm, J.; Abu Bakar, M. B. Health Care-Associated Infections – an Overview. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *Volume 11*, 2321–2333. https://doi.org/10.2147/IDR.S177247.

(13) Folliero, V.; Franci, G.; Dell'Annunziata, F.; Giugliano, R.; Foglia, F.; Sperlongano, R.; De Filippis, A.; Finamore, E.; Galdiero, M. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 1–11. https://doi.org/10.1155/2021/9033278.

(14) Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (2), 95–108. https://doi.org/10.1038/nrmicro821.

(15) Gebreyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhatu, D. B. Challenges of Intervention, Treatment, and Antibiotic Resistance of Biofilm-Forming Microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5* (8), e02192. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02192.

(16) Li, J.; Zhang, K.; Ruan, L.; Chin, S. F.; Wickramasinghe, N.; Liu, H.; Ravikumar, V.; Ren, J.; Duan, H.; Yang, L.; Chan-Park, M. B. Block Copolymer Nanoparticles Remove Biofilms of Drug-Resistant Gram-Positive Bacteria by Nanoscale Bacterial Debridement. *Nano Lett.* **2018**, *18* (7), 4180–4187. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b01000.

(17) Frost, L. R.; Cheng, J. K. J.; Unnikrishnan, M. Clostridioides Difficile Biofilms: A Mechanism of Persistence in the Gut? *PLOS Pathog.* **2021**, *17* (3), e1009348. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009348.

(18) WHO. *Lack of New Antibiotics Threatens Global Efforts to Contain Drug-Resistant Infections*; **2020**. https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections. Consulté le 15/09/21

(19) World Health Organization. *2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis*; World Health Organization: Geneva, **2021**.

(20) Miethke, M.; Pieroni, M.; Weber, T.; Brönstrup, M.; Hammann, P.; Halby, L.; Arimondo, P. B.; Glaser, P.; Aigle, B.; Bode, H. B.; Moreira, R.; Li, Y.; Luzhetskyy, A.; Medema, M. H.; Pernodet, J.-L.; Stadler, M.; Tormo, J. R.; Genilloud, O.; Truman, A. W.; Weissman, K. J.; Takano, E.; Sabatini, S.; Stegmann, E.; Brötz-Oesterhelt, H.; Wohlleben, W.; Seemann, M.; Empting, M.; Hirsch, A. K. H.; Loretz, B.; Lehr, C.-M.; Titz, A.; Herrmann, J.; Jaeger, T.; Alt, S.; Hesterkamp, T.; Winterhalter, M.; Schiefer, A.; Pfarr, K.; Hoerauf, A.; Graz, H.; Graz, M.; Lindvall, M.; Ramurthy, S.; Karlén, A.; van Dongen, M.; Petkovic, H.; Keller, A.; Peyrane, F.; Donadio, S.; Fraisse, L.; Piddock, L. J. V.; Gilbert, I. H.; Moser, H. E.; Müller, R. Towards the Sustainable Discovery and Development of New Antibiotics. *Nat. Rev. Chem.* **2021**. https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1.

(21) WHO. *Biggest Threats and Data*; **2020**. https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html. Consulté le 15/09/21

(22) Cattoir, V.; Felden, B. Future Antibacterial Strategies: From Basic Concepts to Clinical Challenges. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220* (3), 350–360. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz134.

(23) Kauss, T.; Arpin, C.; Bientz, L.; Vinh Nguyen, P.; Vialet, B.; Benizri, S.; Barthélémy, P. Lipid Oligonucleotides as a New Strategy for Tackling the Antibiotic Resistance. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1054. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58047-x.

(24) Claudel, M.; Schwarte, J. V.; Fromm, K. M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry* **2020**, *2* (4), 849–899. https://doi.org/10.3390/chemistry2040056.

(25) Hall, I.; O'toole, E. Intestinal Flora in Newborn Infants with a Description of a New Pathogenic Anaerobe, Bacillus Difficilis. *Am. J. Diseseases Child.* **1935**, *49*, 390.

(26) Tedesco, F. J. Clindamycin-Associated Colitis. *Ann. Intern. Med.* **1974**, *81* (4), 429. https://doi.org/10.7326/0003-4819-81-4-429.

(27) Bartlett, J. G.; Onderdonk, A. B.; Cisneros, R. L.; Kasper, D. L. Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of Clostridium in Hamsters. *J. Infect. Dis.* **1977**, *136* (5), 701–705. https://doi.org/10.1093/infdis/136.5.701.

(28) Buyse, S.; Azoulay, E.; Barbut, F.; Schlemmer, B. Infection à Clostridium difficile : physiopathologie, diagnostic et traitement. *Réanimation* **2005**, *14* (4), 255–263. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.04.003.

(29) Vaishnavi, C. Clinical Spectrum & Pathogenesis of Clostridium Difficile Associated Diseases. *INDIAN J MED RES* **2010**, 13.

(30) Eckert, C.; Barbut, F. Infections à *Clostridium difficile*. *médecine/sciences* **2010**, *26* (2), 153–158. https://doi.org/10.1051/medsci/2010262153.

(31) Smits, W. K.; Lyras, D.; Lacy, D. B.; Wilcox, M. H.; Kuijper, E. J. Clostridium Difficile Infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2* (1), 16020. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20.

(32) Archibald, L. K.; Banerjee, S. N.; Jarvis, W. R. Secular Trends in Hospital-Acquired *Clostridium Difficile* Disease in the United States, 1987–2001. *J. Infect. Dis.* **2004**, *189* (9), 1585–1589. https://doi.org/10.1086/383045.

(33) Kuijper, E. J.; Coignard, B.; Tüll, P.; Poxton, I.; Brazier, J.; Duerden, B.; Delmée, M.; Mastrantonio, P.; Gastmeier, P.; Barbut, F.; Rupnik, M.; Suetens, C.; Collignon, A.; McDonald, C.; Gerding, D. N.; Tjallie van der Kooi, I.; van den Hof, S.; Notermans, D. W.; Pearson, A.; Nagy, E.; Colville, A.; Wilcox, M.; Borriello, P.; Pituch, H.; Minton, N. Emergence of Clostridium Difficile-Associated Disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 2–18. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x.

(34) Couturier, J.; Davies, K.; Gateau, C.; Barbut, F. Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, **2018**; Vol. 1050, pp 45–58. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_4.

(35) O'Connor, J. R.; Johnson, S.; Gerding, D. N. Clostridium Difficile Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain. *Gastroenterology* **2009**, *136* (6), 1913–1924. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.073.

(36) Balsells, E.; Shi, T.; Leese, C.; Lyell, I.; Burrows, J.; Wiuff, C.; Campbell, H.; Kyaw, M. H.; Nair, H. Global Burden of Clostridium Difficile Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Glob. Health* **2019**, *9* (1). https://doi.org/10.7189/jogh.09.010407.

(37) Fu, Y.; Luo, Y.; Grinspan, A. M. Epidemiology of Community-Acquired and Recurrent *Clostridioides Difficile* Infection. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2021**, *14*, 175628482110162. https://doi.org/10.1177/17562848211016248.

(38) Lessa, F. C.; Mu, Y.; Bamberg, W. M.; Beldavs, Z. G.; Dumyati, G. K.; Dunn, J. R.; Farley, M. M.; Holzbauer, S. M.; Meek, J. I.; Phipps, E. C.; Wilson, L. E.; Winston, L. G.; Cohen, J. A.; Limbago, B. M.; Fridkin, S. K.; Gerding, D. N.; McDonald, L. C. Burden of \textlessi\textgreaterClostridium Difficile\textless/I\textgreater Infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372* (9), 825–834. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408913.

(39) Wiuff, C.; Banks, A.-L.; Fitzpatrick, F.; Cottom, L. The Need for European Surveillance of CDI. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp 13–25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_2.

(40) Guh, A. Y.; Mu, Y.; Winston, L. G.; Johnston, H.; Olson, D.; Farley, M. M.; Wilson, L. E.; Holzbauer, S. M.; Phipps, E. C.; Dumyati, G. K.; Beldavs, Z. G.; Kainer, M. A.; Karlsson, M.; Gerding, D. N.; McDonald, L. C. Trends in U.S. Burden of *Clostridioides Difficile* Infection and Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (14), 1320–1330. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910215.

(41) Colomb-Cotinat, M.; Assouvie, L.; Durand, J.; Daniau, C.; Leon, L.; Maugat, S.; Soing-Altrach, S.; Gateau, C.; Couturier, J.; Arnaud, I.; Astagneau, P.; Berger-Carbonne, A.; Barbut, F. Epidemiology of Clostridioides Difficile Infections, France, 2010 to 2017. *Eurosurveillance* **2019**, *24* (35). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638.

(42) Setlow, P.; Johnson, E. A. Spores and Their Significance. In *Food Microbiology*; Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., Hill, C., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2019; pp 23–63. https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2.

(43) Paredes-Sabja, D.; Shen, A.; Sorg, J. A. Clostridium Difficile Spore Biology: Sporulation, Germination, and Spore Structural Proteins. *Trends Microbiol.* **2014**, *22* (7), 406–416. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003.

(44) Zhu, D.; Sorg, J. A.; Sun, X. Clostridioides Difficile Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for C. Difficile Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 29. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029.

(45) Kochan, T. J.; Foley, M. H.; Shoshiev, M. S.; Somers, M. J.; Carlson, P. E.; Hanna, P. C. Updates to Clostridium Difficile Spore Germination. *J. Bacteriol.* **2018**, *200* (16), 1–12. https://doi.org/10.1128/JB.00218-18.

(46) Kochan, T. J.; Somers, M. J.; Kaiser, A. M.; Shoshiev, M. S.; Hagan, A. K.; Hastie, J. L.; Giordano, N. P.; Smith, A. D.; Schubert, A. M.; Carlson, P. E.; Hanna, P. C. Intestinal Calcium and Bile Salts Facilitate Germination of Clostridium Difficile Spores. *PLOS Pathog.* **2017**, *13* (7), e1006443. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006443.

(47) Sorg, J. A.; Sonenshein, A. L. Bile Salts and Glycine as Cogerminants for *Clostridium Difficile* Spores. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (7), 2505–2512. https://doi.org/10.1128/JB.01765-07.

(48) Paredes-Sabja, D.; Setlow, P.; Sarker, M. R. Germination of Spores of Bacillales and Clostridiales Species: Mechanisms and Proteins Involved. *Trends Microbiol.* **2011**, *19* (2), 85–94. https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.004.

(49) Gerding, D. N.; Muto, C. A.; Owens, Jr., R. C. Measures to Control and Prevent Clostridium Difficile Infection. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46* (s1), S43–S49. https://doi.org/10.1086/521861.

(50) Eze, P.; Balsells, E.; Kyaw, M. H.; Nair, H. Risk Factors for Clostridium Difficile Infections – an Overview of the Evidence Base and Challenges in Data Synthesis. *J. Glob. Health* **2017**, *7* (1), 010417. https://doi.org/10.7189/jogh.07.010417.

(51) Davies, K.; Lawrence, J.; Berry, C.; Davis, G.; Yu, H.; Cai, B.; Gonzalez, E.; Prantner, I.; Kurcz, A.; Macovei, I.; Pituch, H.; Nováková, E.; Nyč, O.; Gärtner, B.; Berger, F. K.; Oleastro, M.; Cornely, O. A.; Vehreschild, M. J. G. T.; Pedneault, L.; Wilcox, M. Risk Factors for Primary Clostridium Difficile Infection; Results From the Observational Study of Risk Factors for Clostridium Difficile Infection in Hospitalized Patients With Infective Diarrhea (ORCHID). *Front. Public Health* **2020**, *8*, 293. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00293.

(52) Schäffler, H.; Breitrück, A. Clostridium Difficile – From Colonization to Infection. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 646. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00646.

(53) Leffler, D. A.; Lamont, J. T. \textlessi\textgreaterClostridium Difficile\textless/I\textgreater Infection. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372* (16), 1539–1548. https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772.

(54) Miller, M.; Gravel, D.; Mulvey, M.; Taylor, G.; Boyd, D.; Simor, A.; Gardam, M.; McGeer, A.; Hutchinson, J.; Moore, D.; Kelly, S. Health Care–Associated *Clostridium Difficile* Infection in Canada: Patient Age and Infecting Strain Type Are Highly Predictive of Severe Outcome and Mortality. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50* (2), 194–201. https://doi.org/10.1086/649213.

(55) Lessa, F. C.; Gould, C. V.; McDonald, L. C. Current Status of Clostridium Difficile Infection Epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55* (suppl 2), S65–S70. https://doi.org/10.1093/cid/cis319.

(56) Pepin, J. Mortality Attributable to Nosocomial Clostridium Difficile-Associated Disease during an Epidemic Caused by a Hypervirulent Strain in Quebec. *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, *173* (9), 1037–1042. https://doi.org/10.1503/cmaj.050978.

(57) Janoir, C. Virulence Factors of Clostridium Difficile and Their Role during Infection. *Anaerobe* **2016**, *37*, 13–24. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009.

(58) Lyerly, D. M.; Krivan, H. C.; Wilkins, T. D. Clostridium Difficile: Its Disease and Toxins. *CLIN MICROBIOL REV* **1988**, *1*, 18.

(59) Chandrasekaran, R.; Lacy, D. B. The Role of Toxins in Clostridium Difficile Infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41* (6), 723–750. https://doi.org/10.1093/femsre/fux048.

(60) Chen, S.; Sun, C.; Wang, H.; Wang, J. The Role of Rho GTPases in Toxicity of Clostridium Difficile Toxins. *Toxins* **2015**, *7* (12), 5254–5267. https://doi.org/10.3390/toxins7124874.

(61) Kuehne, S. A.; Cartman, S. T.; Heap, J. T.; Kelly, M. L.; Cockayne, A.; Minton, N. P. The Role of Toxin A and Toxin B in Clostridium Difficile Infection. *Nature* **2010**, *467* (7316), 711–713. https://doi.org/10.1038/nature09397.

(62) Lyras, D.; O'Connor, J. R.; Howarth, P. M.; Sambol, S. P.; Carter, G. P.; Phumoonna, T.; Poon, R.; Adams, V.; Vedantam, G.; Johnson, S.; Gerding, D. N.; Rood, J. I. Toxin B Is Essential for Virulence of Clostridium Difficile. *Nature* **2009**, *458* (7242), 1176–1179. https://doi.org/10.1038/nature07822.

(63) Kuehne, S. A.; Collery, M. M.; Kelly, M. L.; Cartman, S. T.; Cockayne, A.; Minton, N. P. Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in Virulence of an Epidemic Clostridium Difficile Strain. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209* (1), 83–86. https://doi.org/10.1093/infdis/jit426.

(64) Lanis, J. M.; Heinlen, L. D.; James, J. A.; Ballard, J. D. Clostridium Difficile 027/BI/NAP1 Encodes a Hypertoxic and Antigenically Variable Form of TcdB. *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (8), e1003523. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003523.

(65) Mani, N.; Dupuy, B. Regulation of Toxin Synthesis in Clostridium Difficile by an Alternative RNA Polymerase Sigma Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (10), 5844–5849. https://doi.org/10.1073/pnas.101126598.

(66) Matamouros, S.; England, P.; Dupuy, B. Clostridium Difficile Toxin Expression Is Inhibited by the Novel Regulator TcdC: TcdC Inhibits C. Difficile Toxin Expression. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64* (5), 1274–1288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05739.x.

(67) Govind, R.; Dupuy, B. Secretion of Clostridium Difficile Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (6), e1002727. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727.

(68) Abt, M. C.; McKenney, P. T.; Pamer, E. G. Clostridium Difficile Colitis: Pathogenesis and Host Defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (10), 609–620. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108.

(69) Gerding, D. N.; Johnson, S.; Rupnik, M.; Aktories, K. *Clostridium Difficile* Binary Toxin CDT: Mechanism, Epidemiology, and Potential Clinical Importance. *Gut Microbes* **2014**, *5* (1), 15–27. https://doi.org/10.4161/gmic.26854.

(70) Vuotto, C.; Donelli, G.; Buckley, A.; Chilton, C. Clostridium Difficile Biofilm. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp 97–115. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_7.

(71) Tijerina-Rodríguez, L.; Villarreal-Treviño, L.; Morfín-Otero, R.; Camacho-Ortíz, A.; Garza-González, E. Virulence Factors of *Clostridioides* (*Clostridium*) *Difficile* Linked to Recurrent Infections. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2019**, *2019*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2019/7127850.

(72) McDonald, L. C.; Gerding, D. N.; Johnson, S.; Bakken, J. S.; Carroll, K. C.; Coffin, S. E.; Dubberke, E. R.; Garey, K. W.; Gould, C. V.; Kelly, C.; Loo, V.; Shaklee Sammons, J.; Sandora, T. J.; Wilcox, M. H. Clinical Practice Guidelines for Clostridium Difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America

(IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66* (7), e1–e48. https://doi.org/10.1093/cid/cix1085.

(73) Johnson, S.; Lavergne, V.; Skinner, A. M.; Gonzales-Luna, A. J.; Garey, K. W.; Kelly, C. P.; Wilcox, M. H. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides Difficile* Infection in Adults. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, ciab549. https://doi.org/10.1093/cid/ciab549.

(74) Gateau, C.; Couturier, J.; Coia, J.; Barbut, F. How to: Diagnose Infection Caused by Clostridium Difficile. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24* (5), 463–468. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005.

(75) Crobach, M. J. T.; Baktash, A.; Duszenko, N.; Kuijper, E. J. Diagnostic Guidance for C. Difficile Infections. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp 27–44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_3.

(76) Planche, T.; Wilcox, M. Reference Assays for Clostridium Difficile Infection: One or Two Gold Standards? *J. Clin. Pathol.* **2011**, *64* (1), 1–5. https://doi.org/10.1136/jcp.2010.080135.

(77) Guery, B.; Galperine, T.; Barbut, F. *Clostridioides Difficile* : Diagnosis and Treatments. *BMJ* **2019**, l4609. https://doi.org/10.1136/bmj.l4609.

(78) Lee, H. S.; Plechot, K.; Gohil, S.; Le, J. Clostridium Difficile: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10* (2), 687–697. https://doi.org/10.1007/s40121-021-00417-7.

(79) Crobach, M. J. T.; Planche, T.; Eckert, C.; Barbut, F.; Terveer, E. M.; Dekkers, O. M.; Wilcox, M. H.; Kuijper, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Diagnostic Guidance Document for Clostridium Difficile Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, S63–S81. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010.

(80) Khurana, S.; Kahl, A.; Yu, K.; DuPont, A. W. Recent Advances in the Treatment of Clostridioides Difficile Infection: The Ever-Changing Guidelines. *Fac. Rev.* **2020**, *9*. https://doi.org/10.12703/b/9-13.

(81) Rao, K.; Malani, P. N. Diagnosis and Treatment of *Clostridioides* (*Clostridium*) *Difficile* Infection in Adults in 2020. *JAMA* **2020**, *323* (14), 1403. https://doi.org/10.1001/jama.2019.3849.

(82) Fitzpatrick, F.; Skally, M.; Brady, M.; Burns, K.; Rooney, C.; Wilcox, M. H. European Practice for CDI Treatment. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp 117–135. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_8.

(83) Igarashi, Y.; Tashiro, S.; Enoki, Y.; Taguchi, K.; Matsumoto, K.; Ohge, H.; Suzuki, H.; Nakamura, A.; Mori, N.; Morinaga, Y.; Yamagishi, Y.; Yoshizawa, S.; Yanagihara, K.; Mikamo, H.; Kunishima, H. Oral Vancomycin versus Metronidazole for the Treatment of Clostridioides Difficile Infection: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Infect. Chemother.* **2018**, *24* (11), 907–914. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.08.003.

(84) Jarmo, O.; Veli-Jukka, A.; Eero, M. Treatment of *Clostridioides (Clostridium) Difficile* Infection. *Ann. Med.* **2020**, *52* (1–2), 12–20. https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1701703.

(85) Planche, T.; Cusinato, M. Clostridioides (Clostridium) Difficile. *Medicine (Baltimore)* **2021**, S1357303921002000. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.07.008.

(86) Annales de l'Institut Pasteur : journal de microbiologie / publiées sous le patronage de M. Pasteur par E. Duclaux. 117.

(87) Cherry, R. D.; Portnoy, D.; Jabbari, M.; Daly, D. S.; Kinnear, D. G.; Goresky, C. A. Metronidazole: An Alternate Therapy for Antibiotic-Associated Colitis. *Gastroenterology* **1982**, *82* (5), 849–851. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80244-8.

(88) Freeman, C. D.; Klutman, N. E.; Lamp, K. C. Metronidazole. *Drugs* **1997**, *54* (5), 679–708. https://doi.org/10.2165/00003495-199754050-00003.

(89) Ceruelos, A. H.; Romero-Quezada, L. C.; Ruvalcaba, J. C.; Contreras, L. L. Therapeutic Uses of Metronidazole and Its Side Effects: An Update. 5.

(90) Griffith, R. S. Introduction to Vancomycin. *Rev. Infect. Dis.,* **1981**, *3*, 200 - 204

(91) Rubinstein, E.; Keynan, Y. Vancomycin Revisited - 60 Years Later. *Front. Public Health* **2014**, *2*. https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00217.

(92) Silva, J.; Batts, D. H.; Fekety, R.; Plouffe, J. F. Treatment of Clostridium Difficile Colitis and Diarrhea with Vancomycin. *Am. J. Med.* **1981**, *71*, 815 - 822.

(93) Aslam, S.; Hamill, R. J.; Musher, D. M. Treatment of Clostridium Difficile-Associated Disease: Old Therapies and New Strategies. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5* (9), 549–557. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70215-2.

(94) Venugopal, A. A.; Johnson, S. Fidaxomicin: A Novel Macrocyclic Antibiotic Approved for Treatment of Clostridium Difficile Infection. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (4), 568–574. https://doi.org/10.1093/cid/cir830.

(95) Artsimovitch, I.; Seddon, J.; Sears, P. Fidaxomicin Is an Inhibitor of the Initiation of Bacterial RNA Synthesis. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55* (suppl_2), S127–S131. https://doi.org/10.1093/cid/cis358.

(96) Okumura, H.; Fukushima, A.; Taieb, V.; Shoji, S.; English, M. Fidaxomicin Compared with Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of Clostridioides (Clostridium) Difficile Infection: A Network Meta-Analysis. *J. Infect. Chemother.* **2020**, *26* (1), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.07.005.

(97) Giacobbe, D. R.; Dettori, S.; Di Bella, S.; Vena, A.; Granata, G.; Luzzati, R.; Petrosillo, N.; Bassetti, M. Bezlotoxumab for Preventing Recurrent Clostridioides Difficile Infection: A Narrative Review from Pathophysiology to Clinical Studies. *Infect. Dis. Ther.* **2020**, *9* (3), 481–494. https://doi.org/10.1007/s40121-020-00314-5.

(98) Johnson, S.; Gerding, D. N. Bezlotoxumab. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68* (4), 699–704. https://doi.org/10.1093/cid/ciy577.

(99) Bakken, J. S.; Borody, T.; Brandt, L. J.; Brill, J. V.; Demarco, D. C.; Franzos, M. A.; Kelly, C.; Khoruts, A.; Louie, T.; Martinelli, L. P.; Moore, T. A.; Russell, G.; Surawicz, C. Treating

Clostridium Difficile Infection with Fecal Microbiota Transplantation. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *9* (12), 1044–1049. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.08.014.

(100) Wang, J.-W.; Kuo, C.-H.; Kuo, F.-C.; Wang, Y.-K.; Hsu, W.-H.; Yu, F.-J.; Hu, H.-M.; Hsu, P.-I.; Wang, J.-Y.; Wu, D.-C. Fecal Microbiota Transplantation: Review and Update. *J. Formos. Med. Assoc.* **2019**, *118*, S23–S31. https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.08.011.

(101) Debast, S. B.; Bauer, M. P.; Kuijper, E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium Difficile Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1–26. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418.

(102) Khoruts, A.; Staley, C.; Sadowsky, M. J. Faecal Microbiota Transplantation for Clostridioides Difficile: Mechanisms and Pharmacology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18* (1), 67–80. https://doi.org/10.1038/s41575-020-0350-4.

(103) Baunwall, S. M. D.; Lee, M. M.; Eriksen, M. K.; Mullish, B. H.; Marchesi, J. R.; Dahlerup, J. F.; Hvas, C. L. Faecal Microbiota Transplantation for Recurrent Clostridioides Difficile Infection: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *EClinicalMedicine* **2020**, *29–30*, 100642. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100642.

(104) Dieterle, M. G.; Rao, K.; Young, V. B. Novel Therapies and Preventative Strategies for Primary and Recurrent *Clostridium Difficile* Infections: Novel Therapies for *C. Difficile* Infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435* (1), 110–138. https://doi.org/10.1111/nyas.13958.

(105) Kokai-Kun, J. F.; Roberts, T.; Coughlin, O.; Le, C.; Whalen, H.; Stevenson, R.; Wacher, V. J.; Sliman, J. Use of Ribaxamase (SYN-004), a β-Lactamase, to Prevent Clostridium Difficile Infection in β-Lactam-Treated Patients: A Double-Blind, Phase 2b, Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19* (5), 487–496. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30731-X.

(106) Mills, J. P.; Rao, K.; Young, V. B. Probiotics for Prevention of Clostridium Difficile Infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34* (1), 3–10. https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410.

(107) Maziade, P.-J.; Pereira, P.; Goldstein, E. J. C. A Decade of Experience in Primary Prevention of Clostridium Difficile Infection at a Community Hospital Using the Probiotic Combination Lactobacillus Acidophilus CL1285, Lactobacillus Casei LBC80R, and Lactobacillus Rhamnosus CLR2 (Bio-K+). *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60* (suppl_2), S144–S147. https://doi.org/10.1093/cid/civ178.

(108) Sánchez-Hurtado, K.; Corretge, M.; Mutlu, E.; McIlhagger, R.; Starr, J. M.; Poxton, I. R. Systemic Antibody Response to Clostridium Difficile in Colonized Patients with and without Symptoms and Matched Controls. *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57* (6), 717–724. https://doi.org/10.1099/jmm.0.47713-0.

(109) Murray, B.; Wolfe, C.; Marra, A.; Pillar, C.; Shinabarger, D. In Vitro Activity of the Novel Antibacterial Agent Ibezapolstat (ACX-362E) against Clostridioides Difficile. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, dkaa134. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa134.

(110) Nayak, S. U.; Griffiss, J. M.; Blumer, J.; O'Riordan, M. A.; Gray, W.; McKenzie, R.; Jurao, R. A.; An, A. T.; Le, M.; Bell, S. J.; Ochsner, U. A.; Jarvis, T. C.; Janjic, N.; Zenilman, J. M. Safety, Tolerability, Systemic Exposure, and Metabolism of CRS3123, a Methionyl-TRNA Synthetase Inhibitor Developed for Treatment of Clostridium Difficile, in

a Phase 1 Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (8). https://doi.org/10.1128/AAC.02760-16.

(111) DNV3837 | DEINOVE https://www.deinove.com/fr/pipeline/dnv3837 Consulté le 15/09/21.

(112) Cho, J. Ridinilazole: A Novel Antimicrobial for Clostridium Difficile Infection. *Ann. Gastroenterol.* **2018**. https://doi.org/10.20524/aog.2018.0336.

(113) Marshall, J. S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H. L. An Introduction to Immunology and Immunopathology. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2018**, *14* (S2), 49. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1.

(114) Phoenix, D. A.; Dennison, S. R.; Harris, F. *Antimicrobial Peptides*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2013**. https://doi.org/10.1002/9783527652853.

(115) Hancock, R. E. W.; Diamond, G. The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (9), 402–410. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0.

(116) Wiesner, J.; Vilcinskas, A. Antimicrobial Peptides: The Ancient Arm of the Human Immune System. *Virulence* **2010**, *1* (5), 440–464. https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12983.

(117) Mookherjee, N.; Anderson, M. A.; Haagsman, H. P.; Davidson, D. J. Antimicrobial Host Defence Peptides: Functions and Clinical Potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8.

(118) Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 491–511. https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05.

(119) Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 582779. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779.

(120) Bohlmann, H.; Broekaert, W. The Role of Thionins in Plant Protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1994**, *13* (1), 1–16. https://doi.org/10.1080/07352689409701905.

(121) Fleming A; Allison VD. Observations on a Bacteriolytic Substance (“Lysozyme”) Found in Secretions and Tissues. *Br. J. Exp. Pathol.* **1922**, *3* (5), 252–260. https://doi.org/10.1177/0022034516679973.

(122) Dubos, R. J. Studies on a Bactericidal Agent Extracted From a Soil Bacillus: I. Preparation of the Agent. Its Activity in Vitro. *J. Exp. Med.* **1939**, *70* (1), 1–10. https://doi.org/10.1084/jem.70.1.1.

(123) Dubos, R. J.; Hotchkiss, R. D. THE PRODUCTION OF BACTERICIDAL SUBSTANCES BY AEROBIC SPORULATING BACILLI. *J. Exp. Med.* **1941**, *73* (5), 629–640. https://doi.org/10.1084/jem.73.5.629.

(124) Van Epps, H. L. René Dubos: Unearthing Antibiotics. *J. Exp. Med.* **2006**, *203* (2), 259–259. https://doi.org/10.1084/jem.2032fta.

(125) Fleming, A. ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZ?1E. 13.

(126) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008.

(127) Bahar, A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1543–1575. https://doi.org/10.3390/ph6121543.

(128) Zhang, L.; Gallo, R. L. Antimicrobial Peptides. *Curr. Biol.* **2016**, *26* (1), R14–R19. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017.

(129) Li, J.; Hu, S.; Jian, W.; Xie, C.; Yang, X. Plant Antimicrobial Peptides: Structures, Functions, and Applications. *Bot. Stud.* **2021**, *62* (1), 5. https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x.

(130) Manniello, M. D.; Moretta, A.; Salvia, R.; Scieuzo, C.; Lucchetti, D.; Vogel, H.; Sgambato, A.; Falabella, P. Insect Antimicrobial Peptides: Potential Weapons to Counteract the Antibiotic Resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78* (9), 4259–4282. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z.

(131) Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D1087–D1093. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278.

(132) Ganz, T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (9), 710–720. https://doi.org/10.1038/nri1180.

(133) Kościuczuk, E. M.; Lisowski, P.; Jarczak, J.; Strzałkowska, N.; Jóźwik, A.; Horbańczuk, J.; Krzyżewski, J.; Zwierzchowski, L.; Bagnicka, E. Cathelicidins: Family of Antimicrobial Peptides. A Review. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39* (12), 10957–10970. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1997-x.

(134) Oppenheim, F. G.; Xu, T.; McMillian, F. M.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D.; Offner, G. D.; Troxler, R. F. Histatins, a Novel Family of Histidine-Rich Proteins in Human Parotid Secretion. Isolation, Characterization, Primary Structure, and Fungistatic Effects on Candida Albicans. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (16), 7472–7477. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68522-9.

(135) Lee, H.-T.; Lee, C.-C.; Yang, J.-R.; Lai, J. Z. C.; Chang, K. Y. A Large-Scale Structural Classification of Antimicrobial Peptides. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2015/475062.

(136) Li, S.; Wang, Y.; Xue, Z.; Jia, Y.; Li, R.; He, C.; Chen, H. The Structure-Mechanism Relationship and Mode of Actions of Antimicrobial Peptides: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *109*, 103–115. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005.

(137) Lee, J.; Kang, D.; Choi, J.; Huang, W.; Wadman, M.; Barron, A. E.; Seo, J. Effect of Side Chain Hydrophobicity and Cationic Charge on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Helical Peptoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (2), 170–173. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.034.

(138) Saurabh, S.; Sahoo, P. K. Lysozyme: An Important Defence Molecule of Fish Innate Immune System. *Aquac. Res.* **2008**, *39* (3), 223–239. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.

(139) Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schröder, J.-M. Isolation and Characterization of Human β-Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5707–5713. https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200.

(140) Thallinger, B.; Prasetyo, E. N.; Nyanhongo, G. S.; Guebitz, G. M. Antimicrobial Enzymes: An Emerging Strategy to Fight Microbes and Microbial Biofilms. *Biotechnol. J.* **2013**, *8* (1), 97–109. https://doi.org/10.1002/biot.201200313.

(141) Kumar, P.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility in Vivo. *Biomolecules* **2018**, *8* (1). https://doi.org/10.3390/biom8010004.

(142) Powers, J. P. S.; Hancock, R. E. W. The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity. *Peptides* **2003**, *24* (11), 1681–1691. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023.

(143) Imai, Y.; Meyer, K. J.; Iinishi, A.; Favre-Godal, Q.; Green, R.; Manuse, S.; Caboni, M.; Mori, M.; Niles, S.; Ghiglieri, M.; Honrao, C.; Ma, X.; Guo, J. J.; Makriyannis, A.; Linares-Otoya, L.; Böhringer, N.; Wuisan, Z. G.; Kaur, H.; Wu, R.; Mateus, A.; Typas, A.; Savitski, M. M.; Espinoza, J. L.; O'Rourke, A.; Nelson, K. E.; Hiller, S.; Noinaj, N.; Schäberle, T. F.; D'Onofrio, A.; Lewis, K. A New Antibiotic Selectively Kills Gram-Negative Pathogens. *Nature* **2019**, *576* (7787), 459–464. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1.

(144) Ahmed, T. A. E.; Hammami, R. Recent Insights into Structure–Function Relationships of Antimicrobial Peptides. *J. Food Biochem.* **2019**, *43* (1), 1–8. https://doi.org/10.1111/jfbc.12546.

(145) Kapil, S.; Sharma, V. D -Amino Acids in Antimicrobial Peptides: A Potential Approach to Treat and Combat Antimicrobial Resistance. *Can. J. Microbiol.* **2021**, *67* (2), 119–137. https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0142.

(146) Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238–250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098.

(147) Epand, R. M.; Vogel, H. J. Diversity of Antimicrobial Peptides Ant Their Mechanisms of Action. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462*.

(148) Brötz, H.; Bierbaum, G.; Reynolds, P. E.; Sahl, H. G. The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Biosynthesis at the Level of Transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246* (1), 193–199. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x.

(149) Schittek, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Schirle, M.; Schroeder, K.; Blin, N.; Meier, F.; Rassner, G.; Garbe, C. Dermcidin: A Novel Human Antibiotic Peptide Secreted by Sweat Glands. *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (12), 1133–1137. https://doi.org/10.1038/ni732.

(150) Hancock, R. E. W.; Lehrer, R. Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (2), 82–88. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01156-6.

(151) Zhou, C.; Wang, Y. Structure–Activity Relationship of Cationic Surfactants as Antimicrobial Agents. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *45*, 28–43. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.11.009.

(152) Lee, T.-H.; N. Hall, K.; Aguilar, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16* (1), 25–39. https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700.

(153) Findlay, B.; Zhanel, G. G.; Schweizer, F. Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (10), 4049–4058. https://doi.org/10.1128/AAC.00530-10.

(154) Wimley, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (10), 905–917. https://doi.org/10.1021/cb1001558.

(155) Huang, H. W. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8347–8352. https://doi.org/10.1021/bi000946l.

(156) McDonald, M.; Mannion, M.; Pike, D.; Lewis, K.; Flynn, A.; Brannan, A. M.; Browne, M. J.; Jackman, D.; Madera, L.; Power Coombs, M. R.; Hoskin, D. W.; Rise, M. L.; Booth, V. Structure–Function Relationships in Histidine-Rich Antimicrobial Peptides from Atlantic Cod. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (7), 1451–1461. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.030.

(157) Malik, E.; Dennison, S.; Harris, F.; Phoenix, D. PH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals* **2016**, *9* (4), 67. https://doi.org/10.3390/ph9040067.

(158) Hitchner, M. A.; Santiago-Ortiz, L. E.; Necelis, M. R.; Shirley, D. J.; Palmer, T. J.; Tarnawsky, K. E.; Vaden, T. D.; Caputo, G. A. Activity and Characterization of a PH-Sensitive Antimicrobial Peptide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2019**, *1861* (10), 182984. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.006.

(159) Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Antimicrobial Peptides: Key Components of the Innate Immune System. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32* (2), 143–171. https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423.

(160) Edwards, I. A.; Elliott, A. G.; Kavanagh, A. M.; Zuegg, J.; Blaskovich, M. A. T.; Cooper, M. A. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β-Hairpin Peptides. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2* (6), 442–450. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00045.

(161) Matsuzaki, K. Control of Cell Selectivity of Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (8), 1687–1692. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013.

(162) Chen, Y.; Guarnieri, M. T.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α-Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1398–1406. https://doi.org/10.1128/AAC.00925-06.

(163) Stark, M.; Liu, L. P.; Deber, C. M. Cationic Hydrophobic Peptides with Antimicrobial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (11), 3585–3590. https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3585-3590.2002.

(164) Makhlynets, O. V.; Caputo, G. A. Characteristics and Therapeutic Applications of Antimicrobial Peptides. *Biophys. Rev.* **2021**, *2* (1), 011301. https://doi.org/10.1063/5.0035731.

(165) Wieprecht, T.; Dathe, M.; Krause, E.; Beyermann, M.; Maloy, W. L.; MacDonald, D. L.; Bienert, M. Modulation of Membrane Activity of Amphipathic, Antibacterial Peptides by Slight Modifications of the Hydrophobic Moment. *FEBS Lett.* **1997**, *417* (1), 135–140. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01266-0.

(166) Hamamoto, K.; Kida, Y.; Zhang, Y.; Shimizu, T.; Kuwano, K. Antimicrobial Activity and Stability to Proteolysis of Small Linear Cationic Peptides with D-Amino Acid Substitutions.

Microbiol. Immunol. **2002**, *46* (11), 741–749. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02759.x.

(167) Lee, D. L.; Hodges, R. S. Structure-Activity Relationships of de Novo Designed Cyclic Antimicrobial Peptides Based on Gramicidin S. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2003**, *71* (1), 28–48. https://doi.org/10.1002/bip.10374.

(168) Matsuzaki, K. Membrane Permeabilization Mechanisms. In *Antimicrobial Peptides*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, 2019; Vol. 1117, pp 9–16. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_2.

(169) Graf, M.; Mardirossian, M.; Nguyen, F.; Seefeldt, A. C.; Guichard, G.; Scocchi, M.; Innis, C. A.; Wilson, D. N. Proline-Rich Antimicrobial Peptides Targeting Protein Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34* (7), 702–711. https://doi.org/10.1039/C7NP00020K.

(170) van der Does, A. M.; Hiemstra, P. S.; Mookherjee, N. Antimicrobial Host Defence Peptides: Immunomodulatory Functions and Translational Prospects. In *Antimicrobial Peptides*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, 2019; Vol. 1117, pp 149–171. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_10.

(171) *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, **2019**; Vol. 1117. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4.

(172) Park, C. B.; Kim, H. S.; Kim, S. C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244* (1), 253–257. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159.

(173) Subbalakshmi, C.; Sitaram, N. Mechanism of Antimicrobial Action of Indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *160* (1), 91–96. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00008-1.

(174) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Daher, K. A.; Harwig, S. S. L.; Ganz, T.; Selsted, M. E. Interaction of Human Defensins with Escherichia Coli. Mechanism of Bactericidal Activity. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84* (2), 553–561. https://doi.org/10.1172/JCI114198.

(175) Boman, H. G.; Agerberth, B.; Boman, A. Mechanisms of Action on Escherichia Coli of Cecropin P1 and PR-39, Two Antibacterial Peptides from Pig Intestine. *Infect. Immun.* **1993**, *61* (7), 2978–2984. https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2978-2984.1993.

(176) Wang, G. Structures of Human Host Defense Cathelicidin LL-37 and Its Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (47), 32637–32643. https://doi.org/10.1074/jbc.M805533200.

(177) Engelberg, Y.; Landau, M. The Human LL-37(17-29) Antimicrobial Peptide Reveals a Functional Supramolecular Structure. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 3894. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17736-x.

(178) Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (5), a000414–a000414. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414.

(179) Schleifer, K. H.; Kandler, O. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications. *Bacteriol. Rev,* **1972***, 36,* 407 - 477.

(180) Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Hesek, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. Three-Dimensional Structure of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (12), 4404–4409. https://doi.org/10.1073/pnas.0510182103.

(181) Wood, J. M. Bacterial Responses to Osmotic Challenges. *J. Gen. Physiol.* **2015**, *145* (5), 381–388. https://doi.org/10.1085/jgp.201411296.

(182) Vollmer, W.; Born, P. Bacterial Cell Envelope Peptidoglycan. In *Microbial Glycobiology*; Elsevier, **2010**; pp 15–28. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00002-X.

(183) Delcour, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2009**, *1794* (5), 808–816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

(184) Sara, P.; Adam, M.; La Trobe Institute for Molecular Science, La Trobe University, Melbourne, Australia. Latest Developments on the Mechanism of Action of Membrane Disrupting Peptides. *Biophys. Rep.* **2021**, *7* (3), 173–184. https://doi.org/10.52601/bpr.2021.200037.

(185) Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial Peptides: Premises and Promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24* (6), 536–547. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2004.09.005.

(186) Bessin, Y.; Saint, N.; Marri, L.; Marchini, D.; Molle, G. Antibacterial Activity and Pore-Forming Properties of Ceratotoxins: A Mechanism of Action Based on the Barrel Stave Model. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2004**, *1667* (2), 148–156. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.011.

(187) Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry* **1996**, *35* (43), 13723–13728. https://doi.org/10.1021/bi9620621.

(188) Sengupta, D.; Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S.-J. Toroidal Pores Formed by Antimicrobial Peptides Show Significant Disorder. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (10), 2308–2317. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.06.007.

(189) Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.* **2001**, *81* (3), 1475–1485. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X.

(190) Lee, E. Y.; Lee, M. W.; Fulan, B. M.; Ferguson, A. L.; Wong, G. C. L. What Can Machine Learning Do for Antimicrobial Peptides, and What Can Antimicrobial Peptides Do for Machine Learning? *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160153. https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0153.

(191) Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Miyajima, K.; Epand, R. M. Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2 †. *Biochemistry* **1998**, *37* (34), 11856–11863. https://doi.org/10.1021/bi980539y.

(192) Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Miyajima, K. Pore Formation and Translocation of Melittin. *Biophys. J.* **1997**, *73* (2), 831–838. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78115-3.

(193) Banaschewski, B. J. H.; Veldhuizen, E. J. A.; Keating, E.; Haagsman, H. P.; Zuo, Y. Y.; Yamashita, C. M.; Veldhuizen, R. A. W. Antimicrobial and Biophysical Properties of

Surfactant Supplemented with an Antimicrobial Peptide for Treatment of Bacterial Pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (6), 3075–3083. https://doi.org/10.1128/AAC.04937-14.

(194) Schmidt, N. W.; Mishra, A.; Lai, G. H.; Davis, M.; Sanders, L. K.; Tran, D.; Garcia, A.; Tai, K. P.; McCray, P. B.; Ouellette, A. J.; Selsted, M. E.; Wong, G. C. L. Criterion for Amino Acid Composition of Defensins and Antimicrobial Peptides Based on Geometry of Membrane Destabilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (17), 6720–6727. https://doi.org/10.1021/ja200079a.

(195) Schmidt, N. W.; Wong, G. C. L. Antimicrobial Peptides and Induced Membrane Curvature: Geometry, Coordination Chemistry, and Molecular Engineering. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2013**, *17* (4), 151–163. https://doi.org/10.1016/j.cossms.2013.09.004.

(196) Arora, A.; Majhi, S.; Mishra, A. Antibacterial Properties of Human Beta Defensin-3 Derivative: CHRG01. *J. Biosci.* **2018**, *43* (4), 707–715. https://doi.org/10.1007/s12038-018-9790-1.

(197) Datta, S.; Roy, A. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, *27* (1), 555–577. https://doi.org/10.1007/s10989-020-10110-x.

(198) Roque-Borda, C. A.; da Silva, P. B.; Rodrigues, M. C.; Azevedo, R. B.; Di Filippo, L.; Duarte, J. L.; Chorilli, M.; Festozo Vicente, E.; Pavan, F. R. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (6), 773. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060773.

(199) Ryu, M.; Park, J.; Yeom, J.-H.; Joo, M.; Lee, K. Rediscovery of Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents. *J. Microbiol.* **2021**, *59* (2), 113–123. https://doi.org/10.1007/s12275-021-0649-z.

(200) Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A. L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M. A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A. L.; Cherkasov, A.; Seleem, M. N.; Pinilla, C.; de la Fuente-Nunez, C.; Lazaridis, T.; Dai, T.; Houghten, R. A.; Hancock, R. E. W.; Tegos, G. P. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20* (9), e216–e230. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3.

(201) Ordooei Javan, A.; Shokouhi, S.; Sahraei, Z. A Review on Colistin Nephrotoxicity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71* (7), 801–810. https://doi.org/10.1007/s00228-015-1865-4.

(202) Jiang, X.; Zhang, S.; Azad, M. A. K.; Roberts, K. D.; Wan, L.; Gong, B.; Yang, K.; Yuan, B.; Uddin, H.; Li, J.; Thompson, P. E.; Velkov, T.; Fu, J.; Wang, L.; Li, J. Structure–Interaction Relationship of Polymyxins with the Membrane of Human Kidney Proximal Tubular Cells. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (8), 2110–2119. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00190.

(203) Sun, B.; Wibowo, D.; Middelberg, A. P. J.; Zhao, C. X. Cost-Effective Downstream Processing of Recombinantly Produced Pexiganan Peptide and Its Antimicrobial Activity. *AMB Express* **2018**, *8* (1). https://doi.org/10.1186/s13568-018-0541-3.

(204) Gaglione, R.; Pane, K.; Dell'Olmo, E.; Cafaro, V.; Pizzo, E.; Olivieri, G.; Notomista, E.; Arciello, A. Cost-Effective Production of Recombinant Peptides in Escherichia Coli. *New Biotechnol.* **2019**, *51* (December 2017), 39–48. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.004.

(205) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154. https://doi.org/10.1021/ja00897a025.

(206) Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; Nilsson, B.; Verlander, M. Large-Scale Synthesis of Peptides. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2000**, *55* (3), 227–250. https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7.

(207) Zasloff, M.; Martin, B.; Chen, H. C. Antimicrobial Activity of Synthetic Magainin Peptides and Several Analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85* (3), 910–913. https://doi.org/10.1073/pnas.85.3.910.

(208) IMAZU, S.; SHIMOHIGASHI, Y.; KODAMA, H.; SAKAGUCHI, K.; WAKI, M.; KATO, T.; IZUMIYA, N. Conformationally Stabilized Gramicidin S Analog Containing Dehydrophenylalanine in Place of D-Phenylalanine4,4′. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32* (4), 298–306. https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1988.tb01264.x.

(209) Lobo-Ruiz, A.; Tulla-Puche, J. *Synthetic Approaches of Naturally and Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics*; Elsevier Ltd, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00002-8.

(210) Zhou, C.; Qi, X.; Li, P.; Chen, W. N.; Mouad, L.; Chang, M. W.; Leong, S. S. J.; Chan-Park, M. B. High Potency and Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides Synthesized via Ring-Opening Polymerization of α-Aminoacid- *N* -Carboxyanhydrides. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 60–67. https://doi.org/10.1021/bm900896h.

(211) Chin, W.; Yang, C.; Ng, V. W. L.; Huang, Y.; Cheng, J.; Tong, Y. W.; Coady, D. J.; Fan, W.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Biodegradable Broad-Spectrum Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Role of Chemical Structure on Activity and Selectivity. *Macromolecules* **2013**, *46* (22), 8797–8807. https://doi.org/10.1021/ma4019685.

(212) Cheng, Y.; Qu, H.; Ma, M.; Xu, Z.; Xu, P.; Fang, Y.; Xu, T. Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers as Biocompatible Carriers of Quinolone Antimicrobials: An in Vitro Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42* (7), 1032–1038. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.12.035.

(213) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (2), 281–339. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005.

(214) Kenawy, E.-R.; Worley, S. D.; Broughton, R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1359–1384. https://doi.org/10.1021/bm061150q.

(215) Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, *4* (1), 46–71. https://doi.org/10.3390/polym4010046.

(216) Chen, A.; Peng, H.; Blakey, I.; Whittaker, A. K. Biocidal Polymers: A Mechanistic Overview. *Polym. Rev.* **2017**, *57* (2), 276–310. https://doi.org/10.1080/15583724.2016.1223131.

(217) Bucheńska, J. Polyamide Fibers (PA6) with Antibacterial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *61* (3), 567–576. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19960718)61:3<567::aid-app21>3.3.co;2-p.

(218) Tyagi, M.; Singh, H. Iodinated P(MMA-NVP): An Efficient Matrix for Disinfection of Water. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *76* (7), 1109–1116. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(20000516)76:7<1109::aid-app15>3.0.co;2-#.

(219) Goldberg, S.; Doyle, R. J.; Rosenberg, M. Mechanism of Enhancement of Microbial Cell Hydrophobicity by Cationic Polymers. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (10), 5650–5654. https://doi.org/10.1128/jb.172.10.5650-5654.1990.

(220) Konradi, R.; Pidhatika, B.; Mühlebach, A.; Textor, M. Poly-2-Methyl-2-Oxazoline: A Peptide-like Polymer for Protein-Repellent Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24* (3), 613–616. https://doi.org/10.1021/la702917z.

(221) Mizerska, U.; Fortuniak, W.; Chojnowski, J.; Ha\lasa, R.; Konopacka, A.; Werel, W. Polysiloxane Cationic Biocides with Imidazolium Salt (ImS) Groups, Synthesis and Antibacterial Properties. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45* (3), 779–787. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.11.045.

(222) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Antibacterial Activity of Polymeric Sulfonium Salts. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1993**, *31* (11), 2873–2876. https://doi.org/10.1002/pola.1993.080311126.

(223) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Polymeric Phosphonium Salts as a Novel Class of Cationic Biocides. X. Antibacterial Activity of Filters Incorporating Phosphonium Biocides. *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *54* (9), 1305–1310. https://doi.org/10.1002/app.1994.070540912.

(224) Ergene, C.; Yasuhara, K.; Palermo, E. F. Biomimetic Antimicrobial Polymers: Recent Advances in Molecular Design. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (18), 2407–2427. https://doi.org/10.1039/C8PY00012C.

(225) Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Musante, A.; Nelson, C. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. Antimicrobial Polymers Prepared by ROMP with Unprecedented Selectivity: A Molecular Construction Kit Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9836–9843. https://doi.org/10.1021/ja801662y.

(226) Nimmagadda, A.; Liu, X.; Teng, P.; Su, M.; Li, Y.; Qiao, Q.; Khadka, N. K.; Sun, X.; Pan, J.; Xu, H.; Li, Q.; Cai, J. Polycarbonates with Potent and Selective Antimicrobial Activity toward Gram-Positive Bacteria. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (1), 87–95. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01385.

(227) Park, E. S.; Kim, H. S.; Kim, M. N.; Yoon, J. S. Antibacterial Activities of Polystyrene-Block-Poly(4-Vinyl Pyridine) and Poly(Styrene-Random-4-Vinyl Pyridine). *Eur. Polym. J.* **2004**, *40* (12), 2819–2822. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.07.025.

(228) Mowery, B. P.; Lee, S. E.; Kissounko, D. A.; Epand, R. M. R. F.; Epand, R. M. R. F.; Weisblum, B.; Stahl, S. S.; Gellman, S. H. Mimicry of Antimicrobial Host-Defense Peptides by Random Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (50), 15474–15476. https://doi.org/10.1021/ja077288d.

(229) Zamfir, M.; Lutz, J. F. Ultra-Precise Insertion of Functional Monomers in Chain-Growth Polymerizations. *Nat. Commun.* **2012**, *3*. https://doi.org/10.1038/ncomms2151.

(230) Kuroki, A.; Sangwan, P.; Qu, Y.; Peltier, R.; Sanchez-Cano, C.; Moat, J.; Dowson, C. G.; Williams, E. G. L.; Locock, K. E. S.; Hartlieb, M.; Perrier, S. Sequence Control as a Powerful Tool for Improving the Selectivity of Antimicrobial Polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (46), 40117–40126. https://doi.org/10.1021/acsami.7b14996.

(231) Hong, S.; Takahashi, H.; Nadres, E. T.; Mortazavian, H.; Caputo, G. A.; Younger, J. G.; Kuroda, K. A Cationic Amphiphilic Random Copolymer with PH-Responsive Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *PLOS ONE* **2017**, *12* (1), e0169262. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169262.

(232) Hu, K.; Schmidt, N. W.; Zhu, R.; Jiang, Y.; Lai, G. H.; Wei, G.; Palermo, E. F.; Kuroda, K.; Wong, G. C. L.; Yang, L. A Critical Evaluation of Random Copolymer Mimesis of Homogeneous Antimicrobial Peptides. *Macromolecules* **2013**, *46* (5), 1908–1915. https://doi.org/10.1021/ma302577e.

(233) Palermo, E. F.; Sovadinova, I.; Kuroda, K. Structural Determinants of Antimicrobial Activity and Biocompatibility in Membrane-Disrupting Methacrylamide Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 3098–3107. https://doi.org/10.1021/bm900784x.

(234) Palermo, E. F.; Kuroda, K. Chemical Structure of Cationic Groups in Amphiphilic Polymethacrylates Modulates the Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1416–1428. https://doi.org/10.1021/bm900044x.

(235) Zhang, Y.; Jiang, J.; Chen, Y. Synthesis and Antimicrobial Activity of Polymeric Guanidine and Biguanidine Salts. *Polymer* **1999**, *40* (22), 6189–6198. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00828-3.

(236) Konai, M. M.; Bhattacharjee, B.; Ghosh, S.; Haldar, J. Recent Progress in Polymer Research to Tackle Infections and Antimicrobial Resistance. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (6), 1888–1917. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00458.

(237) Cheng, J.; Chin, W.; Dong, H.; Xu, L.; Zhong, G.; Huang, Y.; Li, L.; Xu, K.; Wu, M.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y.; Fan, W. Biodegradable Antimicrobial Polycarbonates with In Vivo Efficacy against Multidrug-Resistant MRSA Systemic Infection. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4* (14), 2128–2136. https://doi.org/10.1002/adhm.201500471.

(238) Tiller, J. C.; Liao, C.-J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. Designing Surfaces That Kill Bacteria on Contact. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (11), 5981–5985. https://doi.org/10.1073/pnas.111143098.

(239) Lu, G.; Wu, D.; Fu, R. Studies on the Synthesis and Antibacterial Activities of Polymeric Quaternary Ammonium Salts from Dimethylaminoethyl Methacrylate. *React. Funct. Polym.* **2007**, *67* (4), 355–366. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.01.008.

(240) Ilker, M. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N.; Coughlin, E. B. Tuning the Hemolytic and Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (48), 15870–15875. https://doi.org/10.1021/ja045664d.

(241) Palermo, E. F.; Vemparala, S.; Kuroda, K. Cationic Spacer Arm Design Strategy for Control of Antimicrobial Activity and Conformation of Amphiphilic Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1632–1641. https://doi.org/10.1021/bm300342u.

(242) Waschinski, C. J.; Barnert, S.; Theobald, A.; Schubert, R.; Kleinschmidt, F.; Hoffmann, A.; Saalwächter, K.; Tiller, J. C. Insights in the Antibacterial Action of Poly(Methyloxazoline)s with a Biocidal End Group and Varying Satellite Groups. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (7), 1764–1771. https://doi.org/10.1021/bm7013944.

(243) Oda, Y.; Kanaoka, S.; Sato, T.; Aoshima, S.; Kuroda, K. Block versus Random Amphiphilic Copolymers as Antibacterial Agents. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3581–3591. https://doi.org/10.1021/bm200780r.

(244) Kuroda, K.; DeGrado, W. F. Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives as Antimicrobial Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (12), 4128–4129. https://doi.org/10.1021/ja044205+.

(245) Liu, R.; Suárez, J. M.; Weisblum, B.; Gellman, S. H.; McBride, S. M. Synthetic Polymers Active against Clostridium Difficile Vegetative Cell Growth and Spore Outgrowth. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14498–14504. https://doi.org/10.1021/ja506798e.

(246) Jones, J. B.; Liu, L.; Rank, L. A.; Wetzel, D.; Woods, E. C.; Biok, N.; Anderson, S. E.; Lee, M.; Liu, R.; Huth, S.; Sandhu, B. K.; Gellman, S. H.; McBride, S. M. Cationic Homopolymers Inhibit Spore and Vegetative Cell Growth of *Clostridioides Difficile*. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (5), 1236–1247. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00843.

(247) Bonduelle, C. Secondary Structures of Synthetic Polypeptide Polymers. *Polym. Chem.* **2018**. https://doi.org/10.1039/C7PY01725A.

(248) Huang, M. L.; Benson, M. A.; Shin, S. B. Y.; Torres, V. J.; Kirshenbaum, K. Amphiphilic Cyclic Peptoids That Exhibit Antimicrobial Activity by Disrupting Staphylococcus Aureus Membranes. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, No. 17, 3560–3566. https://doi.org/10.1002/ejoc.201300077.

(249) Kramer, J. R.; Deming, T. J. General Method for Purification of α-Amino Acid- *N* -Carboxyanhydrides Using Flash Chromatography. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3668–3672. https://doi.org/10.1021/bm101123k.

(250) Deming, T. J. Synthesis of Side-Chain Modified Polypeptides. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 786–808. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00292.

(251) Hwang, J.; Deming, T. J. Methylated Mono- and Di(Ethylene Glycol)-Functionalized β-Sheet Forming Polypeptides. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (1), 17–21. https://doi.org/10.1021/bm005597p.

(252) Katchalski, E.; Berger, A.; Bichowsky-Slomonicki, L.; Joseph, K. Antibiotically Active Amino-Acid Copolymers Related to Gramicidin S. *Nature* **1955**, *176* (4472), 118–119. https://doi.org/10.1038/176118a0.

(253) Katchalski, E.; Sela, M.; Silman, H. I.; Berger, A. Chapter 10 - Polyamino Acids as Protein Models; NEURATH Structure, and Function (Second Edition), H. B. T.-T. P. C., Ed.; Academic Press, 1964; pp 405–602. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395724-5.50014-4.

(254) Deming, T. J. Facile Synthesis of Block Copolypeptides of Defined Architecture. *Nature* **1997**, *390* (6658), 386–389. https://doi.org/10.1038/37084.

(255) Wyrsta, M. D.; Cogen, A. L.; Deming, T. J. A Parallel Synthetic Approach for the Analysis of Membrane Interactive Copolypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12919–12920. https://doi.org/10.1021/ja017307y.

(256) Engler, A. C.; Shukla, A.; Puranam, S.; Buss, H. G.; Jreige, N.; Hammond, P. T. Effects of Side Group Functionality and Molecular Weight on the Activity of Synthetic Antimicrobial Polypeptides. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1666–1674. https://doi.org/10.1021/bm2000583.

(257) Zhen, J. B.; Zhao, M. H.; Ge, Y.; Liu, Y.; Xu, L. W.; Chen, C.; Gong, Y. K.; Yang, K. W. Construction, Mechanism, and Antibacterial Resistance Insight into Polypeptide-Based Nanoparticles. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4142–4152. https://doi.org/10.1039/c9bm01050e.

(258) Su, X.; Zhou, X.; Tan, Z.; Zhou, C. Highly Efficient Antibacterial Diblock Copolypeptides Based on Lysine and Phenylalanine. *Biopolymers* **2017**, *107* (11), e23041. https://doi.org/10.1002/bip.23041.

(259) Xiong, M.; Lee, M. W.; Mansbach, R. A.; Song, Z.; Bao, Y.; Peek, R. M.; Yao, C.; Chen, L. F.; Ferguson, A. L.; Wong, G. C. L.; Cheng, J. Helical Antimicrobial Polypeptides with Radial Amphiphilicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (43), 13155–13160. https://doi.org/10.1073/pnas.1507893112.

(260) Chen, J.; Peek, R. M.; Bao, Y.; Liu, Y.; Chen, L.-F.; Yin, L.; Wang, Z.; Song, Z.; Cheng, J.; Han, Z.; Wang, H.; Xiong, M.; Huang, S.; Xu, X. Selective Killing of Helicobacter Pylori with PH-Responsive Helix–Coil Conformation Transitionable Antimicrobial Polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (48), 12675–12680. https://doi.org/10.1073/pnas.1710408114.

(261) Nguyen, M.; Stigliani, J. L.; Bijani, C.; Verhaeghe, P.; Pratviel, G.; Bonduelle, C. Ionic Polypeptide Polymers with Unusual β-Sheet Stability. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (10), 4068–4074. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01084.

(262) Leigh, T.; Fernandez-Trillo, P. Helical Polymers for Biological and Medical Applications. *Nat. Rev. Chem.* **2020**. https://doi.org/10.1038/s41570-020-0180-5.

(263) Gong, C.; Sun, J.; Xiao, Y.; Qu, X.; Lang, M. Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides for the Targeted Therapy of Multidrug-Resistant Bacterial Infection. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, 2101244. https://doi.org/10.1002/adhm.202101244.

(264) Grazon, C.; Salas-Ambrosio, P.; Ibarboure, E.; Buol, A.; Garanger, E.; Grinstaff, M. W.; Lecommandoux, S.; Bonduelle, C. Aqueous Ring-Opening Polymerization-Induced Self-Assembly (ROPISA) of N-Carboxyanhydrides. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59* (2). https://doi.org/10.1002/anie.201912028.

(265) Song, Z.; Fu, H.; Wang, J.; Hui, J.; Xue, T.; Pacheco, L. A.; Yan, H.; Baumgartner, R.; Wang, Z.; Xia, Y.; Wang, X.; Yin, L.; Chen, C.; Rodríguez-López, J.; Ferguson, A. L.; Lin, Y.; Cheng, J. Synthesis of Polypeptides via Bioinspired Polymerization of in Situ Purified N-Carboxyanhydrides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *166* (22), 10658–10663. https://doi.org/10.1073/pnas.1901442116.

(266) Wu, Y.; Zhang, D.; Ma, P.; Zhou, R.; Hua, L.; Liu, R. Lithium Hexamethyldisilazide Initiated Superfast Ring Opening Polymerization of Alpha-Amino Acid N-Carboxyanhydrides. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 5297. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07711-y.

(267) Kricheldorf, H. R. Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α-Amino AcidN-Carboxyanhydrides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (35), 5752–5784. https://doi.org/10.1002/anie.200600693.

(268) Leuchs, H. Ueber die Glycin-carbonsäure. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39* (1), 857–861. https://doi.org/10.1002/cber.190603901133.

(269) Leuchs, H.; Manasse, W. Über Die Isomerie Der Carbäthoxyl-Glycyl Glycinester. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40* (3), 3235–3249. https://doi.org/10.1002/cber.19070400387.

(270) Leuchs, H.; Geiger, W. Über Die Anhydride von α-Amino-N-Carbonsäuren Und Die von α-Aminosäuren. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41* (2), 1721–1726. https://doi.org/10.1002/cber.19080410232.

(271) Kricheldorf, H. R. *α-Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles*, Universität Hamburg, Hamburg, Germany, **1987**, 214

(272) Ben-Ishai, D.; Katchalski, E. Synthesis of N-Carboxy-α-Amino Acid Anhydrides from N-Carbalkoxy-α-Amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (14), 3688–3689. https://doi.org/10.1021/ja01134a501.

(273) Fuchs, F. Über N -Carbonsäure-Anhydride. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1922**, *55* (9), 2943–2943. https://doi.org/10.1002/cber.19220550902.

(274) Farthing, A. C. 627. Synthetic Polypeptides. Part I. Synthesis of Oxaxolid- 2 :5-Diones and a New Reaction of Glycine. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 3213–3217.

(275) Phosgène (FT 72). Généralités - Fiche toxicologique - INRS https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_72 Consulté le 15/01/2021

(276) Katakai, R.; Iizuka, Y. An Improved Rapid Method for the Synthesis of N-Carboxy .Alpha.-Amino Acid Anhydrides Using Trichloromethyl Chloroformate. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (5), 715–716. https://doi.org/10.1021/jo00205a039.

(277) Wilder, R.; Mobashery, S. The Use of Triphosgene in Preparation of N-Carboxy .Alpha.-Amino Acid Anhydrides. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (9), 2755–2756. https://doi.org/10.1021/jo00035a044.

(278) Fujita, Y.; Koga, K.; Kim, H.-K.; Wang, X.-S.; Sudo, A.; Nishida, H.; Endo, T. Phosgene-Free Synthesis OfN-Carboxyanhydrides of α-Amino Acids Based on Bisarylcarbonates as Starting Compounds. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (22), 5365–5370. https://doi.org/10.1002/pola.22281.

(279) Koga, K.; Sudo, A.; Endo, T. Revolutionary Phosgene-Free Synthesis of α-Amino Acid N-Carboxyanhydrides Using Diphenyl Carbonate Based on Activation of α-Amino Acids by Converting into Imidazolium Salts. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (19), 4351–4355. https://doi.org/10.1002/pola.24213.

(280) Laconde, G.; Amblard, M.; Martinez, J. Synthesis of α-Amino Acid *N* -Carboxyanhydrides. *Org. Lett.* **2021**, *23* (16), 6412–6416. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c02224.

(281) Fetsch, C.; Grossmann, A.; Holz, L.; Nawroth, J. F.; Luxenhofer, R. Polypeptoids from N-Substituted Glycine n-Carboxyanhydrides: Hydrophilic, Hydrophobic, and Amphiphilic Polymers with Poisson Distribution. *Macromolecules* **2011**, *44* (17), 6746–6758. https://doi.org/10.1021/ma201015y.

(282) Bossler, H. G.; Seebach, D. Peptide Enolates.C-Alkylation of Glycine Residues in Linear Tri-, Tetra-, and Pentapeptidesvia Dilithium Azadienediolates. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77* (4), 1124–1165. https://doi.org/10.1002/hlca.19940770424.

(283) Mouna, A. M.; Nguyen, C.; Rage, I.; Xie, J.; Née, G.; Mazaleyrat, J. P.; Wakselman, M. Preparation of N-Boc N-Alkyl Glycines for Peptoid Synthesis. *Synth. Commun.* **1994**, *24* (17), 2429–2435. https://doi.org/10.1080/00397919408010550.

(284) Akssira, M. Boumzebra, M., Kasmi, H., Dahdouh, A., Roumestant, M.-L., Viallefont, Ph. *Tetrahedron*, **1994**, *50* (30), 9051-9060

(285) Akssira, M.; Boumzebra, M.; Hakmaoui, A. E.; Kasmi, H.; Mamouni, R. A CONVENIENT ONE-POT PREPARATION OF N-METHYL-N- CARBOXYAMINOACID ANHYDRIDES (□-METHYL-NCAs). *J. Mar. Chim. Heterocycl*. **2002**, *1*, 44-47.

(286) Fu, X.; Li, Z.; Wei, J.; Sun, J.; Li, Z. Schiff Base and Reductive Amination Reactions of α-Amino Acids: A Facile Route toward *N* -Alkylated Amino Acids and Peptoid Synthesis. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (37), 4617–4624. https://doi.org/10.1039/C8PY00924D.

(287) Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B. Synthetic Preparation of *N* -Methyl-α-Amino Acids. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 5823–5846. https://doi.org/10.1021/cr030024z.

(288) Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *N* -Methylamino Acids in Peptide Synthesis. VII. Studies on the Enantiomeric Purity of *N* -Methylamino Acids Prepared by Various Procedures. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 916–921. https://doi.org/10.1139/v77-127.

(289) da Silva, R. A.; Estevam, I. H. S.; Bieber, L. W. Reductive Methylation of Primary and Secondary Amines and Amino Acids by Aqueous Formaldehyde and Zinc. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (43), 7680–7682. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.08.092.

(290) Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *N* -Methylamino Acids in Peptide Synthesis. V. The Synthesis of *N* - *Tert* -Butyloxycarbonyl, *N* -Methylamino Acids by *N* -Methylation. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (5), 906–910. https://doi.org/10.1139/v77-125.

(291) Cakici, M.; Catir, M.; Karabuga, S.; Ulukanli, S.; Kilic, H. Synthesis and Asymmetric Catalytic Activity of (1S,1′S)-4,4′-Biquinazoline-Based Primary Amines. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (3), 300–308. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2011.01.009.

(292) Pozdnev, V. F.; Podgornova, N. N.; Zentsova, N. K.; Aukone, G. I.; Kalei, U. O. Preparation of Tert-Butoxycarbonyl Derivatives of Amino Acids Using Di-Tert-Butyl Pyrocarbonate. *Chem. Nat. Compd.* **1979**, *15* (4), 471–476. https://doi.org/10.1007/BF00565050.

(293) Shen, Z.-L.; Goh, K. K. K.; Wong, C. H. A.; Loo, W.-Y.; Yang, Y.-S.; Lu, J.; Loh, T.-P. Synthesis and Application of Recyclable Ionic Liquid- Supported Imidazolidinone Catalyst in Enantioselective 1,3- Dipolar Cycloaddition. **2012**, 25.

(294) Ohfune, Y., Kurokawa, N., Higuchi, N., Saito, M., Hashimoto, M., Tanaka, T., *Chem. Lett.* (Jpn), **1984**, *13* (3), 441-444

(295) Merryman, C.; Green, R. Transformation of Aminoacyl TRNAs for the In Vitro Selection of “Drug-like” Molecules. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (4), 575–582. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.009.

(296) Prashad, M.; Har, D.; Hu, B.; Kim, H.-Y.; Repic, O.; Blacklock, T. J. An Efficient and Practical N-Methylation of Amino Acid Derivatives. *Org. Lett.* **2003**, *5* (2), 125–128. https://doi.org/10.1021/ol0268440.

(297) Moraczewski, A. L.; Banaszynski, L. A.; From, A. M.; White, C. E.; Smith, B. D. Using Hydrogen Bonding to Control Carbamate C−N Rotamer Equilibria. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (21), 7258–7262. https://doi.org/10.1021/jo980644d.

(298) van Est-Stammer, R.; Engberts, J. B. F. N. Hindered Internal Rotation in Carbamates: An NMR Study of the Conformations of Alkyl and Aryl N-(Alkylsulfonylmethyl)-N-Methylcarbamates and Aryl N-(Arylsulfonylmethyl)-N-Methylcarbamates. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **2010**, *90* (12), 1307–1319. https://doi.org/10.1002/recl.19710901204.

(299) Xue, C-H ; DeGrado. F., Novel synthesis of Nα-methyl-arginine and Nα-methyl ornithine derivatives, *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 55 - 58

(300) Brenner, M.; Photaki, I. Zur Herstellung Der Chlorid-hydrochloride Der A-Aminosäuren. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39* (6), 1525–1528. https://doi.org/10.1002/hlca.19560390610.

(301) Katchalski, E.; Sela, M. Synthesis and Chemical Properties of Poly-α-Amino Acids. *Adv. Protein Chem.* **1958**, *13* (C), 243–492. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60600-2.

(302) Dorman, L. C.; Shiang, W. R.; Meyers, P. A. Purification of γ-Benzyl and γ-Methyl L-Glutamate N-Carboxyanhydrides by Rephosgenation. *Synth. Commun.* **1992**, *22* (22), 3257–3262. https://doi.org/10.1080/00397919208021140.

(303) Waley, S. G.; Watson, J. The Kinetics of the Polymerization of Sarcosine Carbonic Anhydride. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1949**, *199* (1059), 499–517. https://doi.org/10.1098/rspa.1949.0151.

(304) Ballard, D. G. H.; Bamford, C. H. Studies in Polymerization - VII. The Polymerization of *N* -Carboxy-α-Amino Acid Anhydrides. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1954**, *223* (1155), 495–520. https://doi.org/10.1098/rspa.1954.0133.

(305) Semple, J. E.; Sullivan, B.; Sill, K. N. Large-Scale Synthesis of α-Amino Acid- *N* -Carboxyanhydrides. *Synth. Commun.* **2017**, *47* (1), 53–61. https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1249289.

(306) Niello, M.; Cintulova, D.; Hellsberg, E.; Jäntsch, K.; Holy, M.; Ayatollahi, L. H.; Cozzi, N. V.; Freissmuth, M.; Sandtner, W.; Ecker, G. F.; Mihovilovic, M. D.; Sitte, H. H. Para-Trifluoromethyl-Methcathinone Is an Allosteric Modulator of the Serotonin Transporter. *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107615. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.021.

(307) Anderson, G. W.; McGregor, A. C. T-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (23), 6180–6183. https://doi.org/10.1021/ja01580a020.

(308) Boman, H. G. Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *13* (1), 61–92. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425.

(309) Yang, Y.; Cai, Z.; Huang, Z.; Tang, X.; Zhang, X. Antimicrobial Cationic Polymers: From Structural Design to Functional Control. *Polym. J.* **2018**, *50* (1), 33–44. https://doi.org/10.1038/pj.2017.72.

(310) Rasines Mazo, A.; Allison-Logan, S.; Karimi, F.; Chan, N. J.-A.; Qiu, W.; Duan, W.; O'Brien-Simpson, N. M.; Qiao, G. G. Ring Opening Polymerization of α-Amino Acids: Advances in Synthesis, Architecture and Applications of Polypeptides and Their Hybrids. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (14), 4737–4834. https://doi.org/10.1039/C9CS00738E.

(311) Moncla, B. J.; Pryke, K.; Rohan, L. C.; Graebing, P. W. Degradation of Naturally Occurring and Engineered Antimicrobial Peptides by Proteases. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2011**, *02* (06), 404–408. https://doi.org/10.4236/abb.2011.26059.

(312) Zuckermann, R. N. Peptoid Origins. *Biopolymers* **2011**, *96* (5), 545–555. https://doi.org/10.1002/bip.21573.

(313) Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1331–1342. https://doi.org/10.1021/ar8000603.

(314) Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kessler, H. Synthesis of N-Methylated Cyclic Peptides. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (3), 432–444. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.450.

(315) Szloszár, A.; Mándity, I. M.; Fülöp, F. Sustainable Synthesis of N-Methylated Peptides in a Continuous-Flow Fixed Bed Reactor. *J. Flow Chem.* **2018**, *8* (1), 21–27. https://doi.org/10.1007/s41981-018-0002-9.

(316) Salas-Ambrosio, P.; Tronnet, A.; Verhaeghe, P.; Bonduelle, C. Synthetic Polypeptide Polymers as Simplified Analogues of Antimicrobial Peptides. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (1), 57–75. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00797.

(317) Birke, A.; Ling, J.; Barz, M. Polysarcosine-Containing Copolymers: Synthesis, Characterization, Self-Assembly, and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *81*, 163–208. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.01.002.

(318) Hu, Y.; Hou, Y.; Wang, H.; Lu, H. Polysarcosine as an Alternative to PEG for Therapeutic Protein Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (7), 2232–2238. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00237.

(319) Goodman, Murray.; Fried, Maria. Conformational Aspects of Polypeptide Structure. XX. Helical Poly-N-Methyl-L-Alanine. Experimental Results. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (5), 1264–1267. https://doi.org/10.1021/ja00981a042.

(320) Mark, J. E.; Goodman, M. Conformational Aspects of Polypeptides. XXIV. Conformational Energies of Poly-N-Methyl-L-Alanine Chains. *Biopolymers* **1967**, *5* (9), 809–814. https://doi.org/10.1002/bip.1967.360050903.

(321) Cosani, A.; Palumbo, M.; Terbojevich, M.; Peggion, E. N-Substituted Poly(a-Amino Acids). 1. Synthesis and Characterization of PolyCZV-Methyl-7-Methyl L-Glutamate) and Poly(IV-Methyl-7-Ethyl L-Glutamate). 5.

(322) Cosani, A.; Terbojevich, M.; Palumbo, M.; Peggion, E. N-Substituted Poly(«-Amino Acids). 2. Conformational Properties of Poly(7-Ethyl IV-Methyl-L-Glutamate) in Various Solvent Mixtures. **1979**, *12* (5), 3.

(323) Muhl, C.; Zengerling, L.; Groß, J.; Eckhardt, P.; Opatz, T.; Besenius, P.; Barz, M. Insight into the Synthesis of *N* -Methylated Polypeptides. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (43), 6919–6927. https://doi.org/10.1039/D0PY01055C.

(324) Steinberg, I. Z.; Harrington, W. F.; Berger, A.; Sela, M.; Katchalski, E. The Configurational Changes of Poly-L-Proline in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (20), 5263–5279. https://doi.org/10.1021/ja01505a001.

(325) Szwarc, M. The Kinetics and Mechanism O~ N-Carboxy- ,~-Amino-Acid Anhydride (NCA) Polymerisation to Poly-Amino Acids. Adv. Polymer Sci. **1965**, 4, 1-65.

(326) Bai, T.; Ling, J. Polymerization Rate Difference of *N* -alkyl Glycine NCAs: Steric Hindrance or Not? *Biopolymers* **2019**, *110* (4), e23261. https://doi.org/10.1002/bip.23261.

(327) Sui, Q.; Borchardt, D.; Rabenstein, D. L. Kinetics and Equilibria of Cis/Trans Isomerization of Backbone Amide Bonds in Peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 12042–12048. https://doi.org/10.1021/ja0740925.

(328) Chan, B. A.; Xuan, S.; Li, A.; Simpson, J. M.; Sternhagen, G. L.; Yu, T.; Darvish, O. A.; Jiang, N.; Zhang, D. Polypeptoid Polymers: Synthesis, Characterization, and Properties. *Biopolymers* **2018**, *109* (1). https://doi.org/10.1002/bip.23070.

(329) Habraken, G. J. M.; Wilsens, K. H. R. M.; Koning, C. E.; Heise, A. Optimization of N-Carboxyanhydride (NCA) Polymerization by Variation of Reaction Temperature and Pressure. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (6), 1322. https://doi.org/10.1039/c1py00079a.

(330) Vacogne, C. D.; Schlaad, H. Primary Ammonium/Tertiary Amine-Mediated Controlled Ring Opening Polymerisation of Amino Acid N-Carboxyanhydrides. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (86), 15645–15648. https://doi.org/10.1039/c5cc06905j.

(331) Vacogne, C. D.; Schlaad, H. Controlled Ring-Opening Polymerization of α-Amino Acid N-Carboxyanhydrides in the Presence of Tertiary Amines. *Polymer* **2017**, *124*, 203–209. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.07.062.

(332) Guo, L.; Zhang, D. Cyclic Poly(α-Peptoid)s and Their Block Copolymers from N-Heterocyclic Carbene-Mediated Ring-Opening Polymerizations of N-Substituted N - Carboxylanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (50), 18072–18074. https://doi.org/10.1021/ja907380d.

(333) Guo, L.; Lahasky, S. H.; Ghale, K.; Zhang, D. N -Heterocyclic Carbene-Mediated Zwitterionic Polymerization of N -Substituted N - Carboxyanhydrides towards Poly (a - Peptoid) S : Kinetic , Mechanism and Architectural Control. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *2* (Scheme 1), 9163–9171. https://doi.org/10.1021/ja210842b.0.3.

(334) Salas-Ambrosio, P.; Tronnet, A.; Since, M.; Bourgeade-Delmas, S.; Stigliani, J.-L.; Vax, A.; Lecommandoux, S.; Dupuy, B.; Verhaeghe, P.; Bonduelle, C. Cyclic Poly(α-Peptoid)s by Lithium Bis(Trimethylsilyl)Amide (LiHMDS)-Mediated Ring-Expansion Polymerization: Simple Access to Bioactive Backbones. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (10), 3697–3702. https://doi.org/10.1021/jacs.0c13231.

(335) Chan, B. A.; Xuan, S.; Horton, M.; Zhang, D. 1,1,3,3-Tetramethylguanidine-Promoted Ring-Opening Polymerization of N-Butyl N-Carboxyanhydride Using Alcohol Initiators. *Macromolecules* **2016**, *49* (6), 2002–2012. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b02520.

(336) Guha, R. On Exploring Structure–Activity Relationships. In *In Silico Models for Drug Discovery*; Kortagere, S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 993, pp 81–94. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-342-8_6.

(337) Mowery, B. P.; Lindner, A. H.; Weisblum, B.; Stahl, S. S.; Gellman, S. H. Structure-Activity Relationships among Random Nylon-3 Copolymers That Mimic Antibacterial Host-Defense Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (28), 9735–9745. https://doi.org/10.1021/ja901613g.

(338) Chakraborty, S.; Liu, R.; Hayouka, Z.; Chen, X.; Ehrhardt, J.; Lu, Q.; Burke, E.; Yang, Y.; Weisblum, B.; Wong, G. C. L.; Masters, K. S.; Gellman, S. H. Ternary Nylon-3 Copolymers as Host-Defense Peptide Mimics: Beyond Hydrophobic and Cationic Subunits. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14530–14535. https://doi.org/10.1021/ja507576a.

(339) Liu, H.; Zhang, X.; Zhao, Z.; Yang, F.; Xue, R.; Yin, L.; Song, Z.; Cheng, J.; Luan, S.; Tang, H. Efficient Synthesis and Excellent Antimicrobial Activity of Star-Shaped Cationic Polypeptides with Improved Biocompatibility. *Biomater. Sci.* **2021**, *9* (7), 2721–2731. https://doi.org/10.1039/D0BM02151B.

(340) Fetsch, C.; Luxenhofer, R. Highly Defi Ned Multiblock Copolypeptoids : Pushing the Limits of Living Nucleophilic. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (19), 1708–1713.

(341) Greco, I.; Molchanova, N.; Holmedal, E.; Jenssen, H.; Hummel, B. D.; Watts, J. L.; Håkansson, J.; Hansen, P. R.; Svenson, J. Correlation between Hemolytic Activity, Cytotoxicity and Systemic in Vivo Toxicity of Synthetic Antimicrobial Peptides. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 13206. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9.

(342) Lea, T. Caco-2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 103–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10.

(343) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic Studies of Homologous Peptide and N-Substituted Glycine Peptoid Oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (22), 2657–2662. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80691-0.

(344) Haque, F. M.; Grayson, S. M. The Synthesis, Properties and Potential Applications of Cyclic Polymers. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (5), 433–444. https://doi.org/10.1038/s41557-020-0440-5.

(345) Hussain, H. A.; Roberts, A. P.; Mullany, P. Generation of an Erythromycin-Sensitive Derivative of Clostridium Difficile Strain 630 (630Δerm) and Demonstration That the Conjugative Transposon Tn916ΔE Enters the Genome of This Strain at Multiple Sites. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54* (2), 137–141. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45790-0.

(346) European Committee for Antimicrobial Suscpetibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9* (8), ix–xv.

(347) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Résumé

Clostridioides difficile (*C. difficile*) est un bacille Gram positif anaérobie strict et sporulé qui se développe souvent dans la flore intestinale de patients dont le microbiote est déstabilisé par une antibiothérapie à spectre large. Aujourd'hui, l'infection à *C. difficile* (ICD) fait partie des principales causes d'infections associées aux soins, aussi appelées infections nosocomiales. L'antibiothérapie anti-*C. difficile* repose principalement sur trois molécules qui offrent des résultats contrastés et depuis quelques années : les ICD deviennent plus fréquentes, plus sévères et récidivent souvent. En 2020, l'OMS a classé *C. difficile* parmi les micro-organismes présentant une menace urgente et un risque important pour la santé humaine.

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des biomolécules constituées d'acides aminés notamment produites par certains micro-organismes et ciblant virus, bactéries, fungi et parasites. L'efficacité des PAM s'explique par leur capacité à déstabiliser les membranes, une propriété physicochimique liée à leur caractère amphiphile. A ce jour, le développement industriel des PAM reste assez limité à cause de leur cout de production élevé et de leur sensibilité aux peptidases, empêchant leur administration par voie orale. Des analogues polymériques comme mimes simplifiés des PAM ont été proposés pour tenter de lever ces contraintes et les polymères d'acides aminés sont certainement de très bons supports pour se rapprocher des PAM.

Cette thèse présente la préparation de nouveaux copolymères amphiphiles obtenus par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) de monomères de type *N*-carboxyanhydrides-*N*-méthylés (NNCA). Ces monomères NNCA ont été obtenus à partir d'acides aminés issus de la biomasse possédant une chaine latérale « hydrophobe » (L-Alanine ; D-Alanine ; L-Leucine et L-Phénylalanine) ou « cationique » à pH physiologique (L-Lysine) en deux temps : 1) la synthèse d'intermédiaires *N*-Boc-*N*-méthylés en 2 étapes puis 2) cyclisation en NNCA par la méthode de Leuchs. Cette méthodologie a permis de préparer 4 monomères NNCA « hydrophobes » et 1 monomère « cationique ». Ensuite, nous avons analysé les cinétiques de polymérisation de certains NNCA en préparant des homopolymères puis nous avons mis en œuvre des réactions de copolymérisation en mélangeant les NNCA « hydrophobes » et « cationiques ». En parallèle, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de *C. difficile* d'une bibliothèque de copolypeptoïdes, en étudiant l'influence de paramètres structuraux tels que l'hydrophobicité, la nature de la chaine latérale, la nature de l'amorceur et le degré de polymérisation et avons pu identifier plusieurs polymères aussi actifs que deux molécules de référence et peu cytotoxiques vis-à-vis de la lignée épithéliale Caco-2.

Mots clés :

Clostridioides difficile, peptides antimicrobiens, *N*-carboxyanhydrides-*N*-alkylés, polymérisation par ouverture de cycle, polymères antimicrobiens, polypeptoïdes

Abstract

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a spore-forming, strict anaerobic Gram-positive bacillus that often develops in the gut of patients whose intestinal microbiota is destabilized by broad-spectrum antibiotherapy. Currently, *C. difficile* infection (CDI) is one of the leading causes of healthcare-associated infections, also known as nosocomial infections. Anti-*C. difficile* antibiotic therapy is mainly based on three molecules that offer contrasting results and in recent years, CDI has become more frequent, more severe and more often recurrent. In 2020, the WHO classified *C. difficile* as a microorganism posing an urgent threat and a significant risk to human health.

Antimicrobial peptides (AMP) are biomolecules constituted of amino acids produced by microorganisms that target viruses, bacteria, fungi and parasites. The effectiveness of AMP is due to their ability to destabilize membranes, a physicochemical property linked to their amphiphilic character. To date, the industrial development of AMP is limited by their high production cost and their sensitivity to peptidases, which prevents their oral administration. Polymeric analogues as simplified mimetics of AMP have been proposed to tackle these constraints and amino acid polymers are certainly very suitable supports to approach AMP.

In this thesis, we present the preparation of new amphiphilic copolymers obtained by ring-opening polymerization (ROP) of *N*-methylated-*N*-carboxyanhydrides (NNCA) monomers. These NNCA monomers were obtained from bio-sourced amino acids with a "hydrophobic" (L-Alanine; D-Alanine; L-Leucine and L-Phenylalanine) side chain or "cationic" side chain at physiological pH (L-Lysine) in two steps: 1) synthesis of *N*-Boc-*N*-methylated intermediates in 2 steps and 2) cyclization into NNCA by the Leuchs method. This methodology allowed to prepare 4 "hydrophobic" NNCA monomers and 1 "cationic" monomer. Then, we analyzed the polymerization kinetics of some NNCA by preparing homopolymers and then we implemented copolymerization reactions by mixing the "hydrophobic" and "cationic" NNCA. In the same time, we determined the minimum inhibitory concentrations (MIC) towards *C. difficile* of a library of copolypeptoids, by studying the influence of structural parameters such as hydrophobicity, the nature of the side chain, the nature of the initiator and the degree of polymerization, and were able to identify polymers that were as active as two reference molecules and not significantly cytotoxic towards the epithelial line Caco-2.

Key words:

Clostridioides difficile, antimicrobial peptides, *N*-carboxyanhydrides-*N*-alkylated, Ring opening polymerization, antimicrobial polymers, polypeptoïds