



Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2023/2024

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)**

présentée et soutenue publiquement
le 17, mai, 2024 à POITIERS
par **Monsieur DI MAIO Attilio**

Synthèse de nouveaux dérivés aurones et évaluation de leurs activités antibactérienne,
antifongique et anti-inflammatoire

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur MARCHAND Sandrine

Membres : Monsieur GREGOIRE Nicolas, Professeur
Monsieur ROBIN Maxime, Maître de Conférences

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur GUILLARD Jérôme



LISTE DES ENSEIGNANTS

Année universitaire 2022 – 2023

SECTION PHARMACIE

Professeurs des universités-praticiens hospitaliers

- COUET William, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique – **Assesseur pédagogique pharmacie**
- FOUCHER Yohann, santé publique, biostatistiques et épidémiologie
- MARCHAND Sandrine, pharmacologie, pharmacocinétique
- RAGOT Stéphanie, santé publique

Professeurs des universités

- BODET Charles, microbiologie
- CARATO Pascal, chimie thérapeutique
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie
- IMBERT Christine, parasitologie et mycologie médicale
- OLIVIER Jean-Christophe, pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie industrielle
- PAGE Guylène, biologie cellulaire, biothérapeutiques
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique
- SARROUILHE Denis, physiologie humaine – **Directeur de la section pharmacie**

Maîtres de conférences des universités-praticiens hospitaliers

- BARRA Anne, immuno-hématologie
- BINSON Guillaume, pharmacie clinique
- THEVENOT Sarah, hygiène, hydrologie et environnement

Maîtres de conférences

- BARRIER Laurence, biochimie générale et clinique
- BON Delphine, biophysique
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, microbiologie
- CHAUZY Alexia, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, chimie analytique
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie et pharmacométrie (HDR)
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, pharmacochimie (HDR)
- PAIN Stéphanie, toxicologie (HDR)
- PINET Caroline, physiologie, anatomie humaine
- RIOUX-BILAN Agnès, biochimie – **Référente CNAES – Responsable du dispositif COME'in**
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacotechnie
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire et moléculaire
- WAHL Anne, phytothérapie, herborisation, aromathérapie

Maîtres de conférences associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

ENSEIGNEMENT DE L'ANGLAIS

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Remerciements

Par ces quelques mots je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné au cours de mon cursus de Pharmacie, professionnellement, amicalement ou les deux.

Avant toutes choses je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury, le Pr. Sandrine Marchand et le Pr. Nicolas Grégoire, pour avoir accepté de juger ces travaux de recherche et de fin de cursus. Je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de thèse, le Pr. Jérôme Guillard, à la fois pour son rôle dans ce travail, mais également pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ma première expérience avec la chimie pharmaceutique.

Je souhaite également remercier les Dr. Maxime Robin et Dr. Marc Maresca qui m'ont accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs, chez qui ces travaux ont été réalisés. Merci pour leurs conseils, le temps qu'ils m'ont accordé, l'expérience qu'ils m'ont partagée et surtout pour les opportunités qu'ils m'ont offerte.

Merci également à tous les membres de l'équipe BES, le Pr. Michelle Sergent, les Dr. Anh Tuan Lormier, Dr. Magali Claeys-Bruno, Dr. Valérie Pique ainsi que Martine Martinez. Merci pour les conseils, l'intégration au sein de l'équipe et les railleries à la pause repas.

Merci aux membres de ma famille pour leur soutien, particulièrement à ma sœur Ariane.

Merci à mes grands-parents pour leurs oreilles attentives, leurs conseils et les moments passés ensemble. Merci Daddy et Mamoune pour tout ce que vous avez fait pour moi, vous n'y êtes probablement pas pour rien si j'en suis arrivé là.

Merci à Caroline, pour tous ces moments que nous avons passés ensemble, ainsi que tous ceux que nous avons encore à passer. Merci d'être toujours là pour moi, de ton aide et de ton soutien sans faille.

Finalement je souhaite remercier mes parents. Merci Maman pour le temps que tu as consacré à la relecture de cette thèse, même si nous n'étions pas toujours d'accord ! Mais surtout merci de ton soutien indéfectible, merci de me pousser à toujours donner le maximum. Grazie di tutto Papà. Grazie per tutto il tempo che mi hai concesso. Grazie per le partite di calcio sotto casa, grazie per i problemi di matematica la domenica pomeriggio, grazie per le nostre discussioni epistolari. Merci à vous deux pour les exemples que vous m'avez transmis, merci pour les opportunités que vous m'avez créées, merci pour les chances que vous m'avez données.

A Mauretto,

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ACN : Acétonitrile
AMEs: Aminoglycoside modifying enzymes
AMPc: Adenosine monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ASO : Anion superoxide
ATCC : American Type Culture Collection
AUS : Aurésidine synthase
BHI : Brain-Heart infusion (Bouillon Cœur-cervelle)
BoNT : Toxine botulique
CPE : *C. perfringens* enterotoxine
CCM : Chromatographie sur couche mince
CC/U : Chlorure de choline/Urée
CDCl₃ : Chloroforme
CDT : *C. difficile* toxine
CIP : Collection de l'institut Pasteur
CMI : Concentration minimale inhibitrice
DAM : DNA Adénine méthylase
DHFR : Dihydrofolate réductase
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle medium
DMF : *N,N*-Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
EGMs : Eléments génétiques mobiles
Erm : Erythromycin ribosomal méthylase
ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*
EtOAc : Acétate d'éthyle
EtOH : Ethanol
IC 50 : Concentration inhibitrice à 50%
IL-1-β : Interleukine 1-β
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IV : Intraveineux
HCV : Virus de l'hépatite B
hvKP : *K. pneumoniae* hypervirulent
LOX : Lipoxygénase
LPS : Lipopolysaccharides
LUC : Luciférase
MDR : Résistant à plusieurs médicaments
MeOH : Méthanol
MH : Sérum de Mueller-Hitton
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NBS : *N*-bromosuccinimide
NBT : NitroBlue Tetrazolium

NetB : Necrotic enteritis B-like toxin
 NFκB : Nuclear factor κ B
 OmpA : Outer membrane protein A
 OMS : Organisation mondiale de la santé
 PBS : Phosphate-buffered saline (tampon phosphate salin)
 PDTC : Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate
 pH : Potentiel Hydrogène
 PHC : 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone
 PMS : Phenazine methosulphate
 PPO : Polyphénol oxydase
 Rpm : Rotation per minute (Tours par minute)
 PRX : Peroxydase
 Qnr : Quinolone resistance genes (gènes de résistance aux Quinolones)
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 RmpA : Regulator of mucoid phenotype A
 ROS : Reactive oxygen species (Espèces réactives oxygénées)
 SARM (MRSA) : *S. aureus* méticilline résistant
 SARV (VRSA) : *S. aureus* vancomycine résistant
 SVF (FBS) : Sérum de veau fœtal
 THF : Tétrahydrofurane
 TK : Time-Kill
 TLR4 : Toll-Like receptor 4
 TNFα : Facteur de Nécrose Tumorale alpha
 TTN : Trinitrate de thallium (III)
 TTSS : Système de sécrétion de type III
 UV : Ultra-violet
 VISA : Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus
 VRE : Entérocoque résistant à la vancomyc

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	3
Table des figures	7
Table des tableaux	9
1 Introduction	10
2 Etat de l'art	13
2.1 Bactéries, résistances et épidémiologie	13
2.1.1 Résistances bactériennes	13
2.1.1.1 Résistances intrinsèques	13
2.1.1.2 Résistances acquises	13
2.1.1.3 Résistances adaptatives	14
2.1.2 Mécanismes d'action des résistances	14
2.1.2.1 Destruction de l'antibiotique	14
2.1.2.2 Modification de l'antibiotique	15
2.1.2.3 Modification de la cible	15
2.1.2.4 Protection de la cible	16
2.1.2.5 Surproduction de la cible	16
2.1.2.6 Imperméabilisation de la membrane externe	16
2.1.2.7 Production de pompes d'efflux	16
2.1.2.8 Adaptation de la cellule	17
2.1.2.9 Données épidémiologiques et mesures	17
2.1.3 Bactéries d'intérêt	18
2.1.3.1 <i>Enterobacter species</i>	18
2.1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomycine et Méricilline résistant	19
2.1.3.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> résistant aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération	21
2.1.3.4 <i>Acinetobacter baumannii</i> carbapénème résistant	22
2.1.3.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> carbapénème résistant	24
2.1.3.6 <i>Enterococcus faecium</i> Vancomycine résistant	25
2.1.3.7 <i>Clostridioides spp</i>	26
2.2 Les aurones	29
2.2.1 Découverte	29
2.2.2 Occurrences	30
2.2.3 Les aurones dans la nature	30
2.2.4 Biosynthèse des aurones	32

2.2.5	Potentiel thérapeutique	34
2.2.5.1	Activité antioxydante	34
2.2.5.2	Activité antibactérienne	39
2.2.5.3	Activité antivirale	41
2.2.5.4	Activité antiparasitaire.....	44
2.2.5.5	Activité anti-inflammatoire.....	46
2.2.5.6	Activité anticancéreuse.....	48
2.2.6	Synthèse chimique des aurones.....	52
2.2.6.1	Synthèse à partir de dérivés de chalcones	53
2.2.6.2	Synthèse à partir de dérivés d'alkynoylphénols	54
2.2.6.3	Autres voies de synthèse	55
3	Matériel et Méthodes.....	57
3.1	Chimie	57
3.1.1	Synthèse par la condensation de Claisen-Schmidt.....	58
3.1.2	Synthèse par la voie des chalcones	58
3.2	Evaluation des activités biologiques des aurones	60
3.2.1	Evaluation des activités antimicrobiennes.....	60
3.2.1.1	Souches bactériennes et conditions de culture.....	60
3.2.1.2	Principe	60
3.2.1.3	Protocole.....	60
3.2.2	Evaluation de la toxicité	61
3.2.2.1	Espèces cellulaires et condition de culture.....	61
3.2.2.2	Protocole.....	62
3.2.3	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	63
3.2.3.1	Principe	63
3.2.3.2	Culture des cellules HeLa Elucidate	63
3.2.3.3	Protocole.....	64
4	Résultats	65
4.1.1	Chimie.....	65
4.1.2	Concentrations minimales inhibitrices.....	69
4.1.3	Toxicité	72
4.1.4	Activité anti-inflammatoire	74
5	Discussion	75
6	Conclusion.....	79
7	Bibliographie	80

Table des figures

FIGURE 1 SQUELETTE DE PLUSIEURS FAMILLES DE FLAVONOÏDES, EN HAUT A GAUCHE LES FLAVONES, EN HAUT A DROITE LES FLAVONOLS, EN BAS A GAUCHE LES AURONES ET EN BAS A DROITE LES CHALCONES	29
FIGURE 2 LES TROIS AURONES NATURELLES LES PLUS COURANTES.....	30
FIGURE 3 STRUCTURE ET NUMEROTATION DES CARBONES DE L'AURONE.....	31
FIGURE 4 LES DEUX VOIES DE BIOSYNTHESE CONNUES DES AURONES, EN BLEU LA VOIE PPO ET EN ROUGE LA VOIE PRX D'APRES NAKAYMA ET AL (134).....	32
FIGURE 5 BIOSYNTHESE DE L'HISPIDOL VIA LA VOIE PRX.....	33
FIGURE 6 AURONES SYNTHETISEES PAR MAKHMOOR ET AL AINSI QUE LEURS ACTIVITES SUR L'ABTS ET LES ANIONS SUPER OXYDES (ASO) (147))	35
FIGURE 7 AURONES SYNTHETISEES PAR CHEN ET AL, ET LEURS CINETIQUES SUR LA REDUCTION DE L'ABTS ET LE DPPH (148)	35
FIGURE 8 AURONE SYNTHETISEE PAR DETSI ET AL ET SON IC50 SUR LA LIPOXYGENASE (LOX) (149).....	36
FIGURE 9 AURONES SYNTHETISEES PAR NIGAM ET AL ET LEUR IC50 SUR L'ABTS (150)	37
FIGURE 10 AURONES SYNTHETISEES PAR PAN ET AL ET LEUR CAPACITE A REDUIRE LE FER FERRIQUE (FRAP) EXPRIMEE EN EQUIVALENT DE VITAMINE C (MG/MMOL) (151)	38
FIGURE 11 AURONES SYNTHETISEES PAR NAKABO ET AL ET LEUR POURCENTAGE D'INHIBITION DES RADICAUX DPPH (153)	39
FIGURE 12 AURONES SYNTHETISEES PAR OLLEIK ET AL ACTIVES SUR PLUSIEURS PATHOGENES GRAM POSITIF (11).	39
FIGURE 13 AURONE SYNTHETISEE PAR JARDOSH ET AL, ACTIVE CONTRE S. AUREUS (154)	40
FIGURE 14 AURONES SYNTHETISEES PAR YANG ET AL ET LEUR POURCENTAGE D'INHIBITION DE M. TUBERCULOSIS A 100µM (155) .	40
FIGURE 15 AURONES SYNTHETISEES PAR CAMPANIÇO ET AL, ACTIVES CONTRE M. TUBERCULOSIS H37RrV (156).....	41
FIGURE 16 AURONES ANTIVIRALES SYNTHETISEES PAR MEGUELLATI ET AL ET LEUR ACTIVITE SUR L'ARN POLYMERASE DE HCV (157)	42
FIGURE 17 AURONE INHIBITRICE DE LA NEURAMINIDASE D'H1N1 SYNTHETISEE (158,159)	42
FIGURE 18 LES 5 AURONES SYNTHETISEES PAR CALEFFI ET AL CAPABLES D'INHIBER LA REPLICATION DE SARS-COV-2 (160).....	43
FIGURE 19 LES DEUX AURONES ACTIVES CONTRE SCHITOSOMA MANSONI, SYNTHETISEES PAR SILVA TORRES ET AL (161)	44
FIGURE 20 LES AURONES SYNTHETISEES PAR ROUSSAKI ET AL ACTIVES SUR LES AMASTIGOTES INTRACELLULAIRES DE L. INFANTUM (162)	44
FIGURE 21 L'AURONE ACTIVE SUR L. DONOVANI SYNTHETISEE PAR MORIMOTO ET AL (163).....	45
FIGURE 22 AURONES SYNTHETISEES PAR CARASCO ET AL ACTIVES SUR LE CLONE W2 DE P. FALCIPARUM (164).....	45
FIGURE 23 LES 1-AZAAURONES ACTIVES SUR LE CLONE FcM29 DE P. FALCIPARUM SYNTHETISEES PAR SOUARD ET AL (165)	46
FIGURE 24 LES AURONES INHIBANT L'EXPRESSION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE SYNTHETISEES PAR ZHENG ET AL (166)	47
FIGURE 25 AURONE SYNTHETISEE PAR PARK ET AL, INHIBITRICE DE LA SECRETION DES MONOCYTES DU TNFA, IL-1B ET IL-8 (167) ..	47
FIGURE 26 FERROCENYLAURONES SYNTHETISEES PAR MONSERRAT ET AL, ET LEUR IC50 SUR DES CELLULES DE MELANOMES MURINS (B16) (169).....	48
FIGURE 27 AURONES SYNTHETISEES PAR ZHENG ET AL, ET LEUR ACTIVITE SUR LES CELLULES DE LEUCEMIES HL-60 ET D'ADENOCARCINOME COLORECTAL (HT-29) (170).....	49
FIGURE 28 FUROAURONE SYNTHETISEE PAR HASSAN ET AL, ET SON ACTIVITE A L'ENCONTRE DE CELLULE LEUCEMIQUE (K562) ET DE MELANOME (MDA-MB-435) (171)	49
FIGURE 29 AURONES SYNTHETISEES PAR XIE ET AL ET LEUR ACTIVITE SUR LES CELLULES DE CANCER DE LA PROSTATE (PC-3) (172) ...	50
FIGURE 30 AURONES SYNTHETISEES PAR TOTH ET AL, ET LEUR ACTIVITE A L'ENCONTRE DES CELLULES DE DE SARCOME UTERIN HUMAIN (MES-SA) ET LEUR VARIANT MULTI RESISTANT (MES-SA/Dx5) (173)	51
FIGURE 31 : LES DIFFERENTES VOIES DE SYNTHESE DES AURONES	52
FIGURE 32 VOIES DE SYNTHESE 1 A 4 DE DERIVES D'AURONES A PARTIR DES CHALCONES ET DE LEURS DERIVES.	53
FIGURE 33 VOIES DE SYNTHESE 7 A 8 DE DERIVES D'AURONES A PARTIR D'ALYNOYLPHENOLS ET DE DERIVES	54
FIGURE 34 VOIES DE SYNTHESE 4 ET 5 DE DERIVES D'AURONES. LA VOIE 4 UTILISE COMME PRECURSEURS UNE BENZOFURANONE ET UN BENZALDEHYDE. LA VOIE 5 EST UN COUPLAGE DE SUZUKI-MYAURO ENTRE DES ACIDES PHENYLBORONIQUES ET DES DERIVES BROMES DE BENZOFURANONES.	55
FIGURE 35 LES DEUX VOIES UTILISEES POUR LA SYNTHESE DES 5-ACETAMIDO AURONES ET 5-AMINO AURONES. LA VOIE A MET EN JEU UNE CONDENSATION ENTRE UNE BENZOFURANONE ET UN BENZALDEHYDE. LA VOIE B, ELLE, EMPLOIE UNE CYCLISATION DE LA CHALCONE CORRESPONDANTE.....	57
FIGURE 36 STRUCTURE ET NUMEROTATION DES CARBONES DE L'AURONE.....	65

FIGURE 37 : COURBE DES IC50 DE LA TOXICITE DES 4 AURONES (A7=1, B5=7, C11= 11 ET C12 =12) SUR LES CELLULES DE GAUCHE A DROITE ET DE BAS EN HAUT : BEAS, CACO2, HACAT, HUVEC, IMR90, HEPG2 ET A498	73
FIGURE 38 : POURCENTAGES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE VIS-A-VIS DU CONTROLE POSITIF INDUITE PAR UNE EXPOSITION DES CELLULES A IL-1 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES AURONES.....	74
FIGURE 39 LES 4 MOLECULES LES PLUS ACTIVES SUITE AUX CIBLAGES REALISES SUR PLUSIEURS BACTERIES, MYCOBACTERIES ET CHAMPIGNONS	76

Table des tableaux

TABLEAU 1 AURONES SYNTHETISEES ET LEUR STRUCTURE	59
TABLEAU 2 CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (EN μM) DES 12 AURONES SYNTHETISEES SUR <i>S. AUREUS</i> , <i>B. SUBTILIS</i> , <i>E. COL</i> , <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>H. PYLORI</i> , <i>M. SMEGMATIS</i> ET <i>C. ALBICANS</i>	69
TABLEAU 3 CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES MOLECULES 1,7, 11 ET 12 SUR UNE NOUVELLE SERIE DE BACTERIES GRAM POSITIF, NEGATIF ET ANAEROBIES.....	71
TABLEAU 4 IC50 DES 4 AURONES SYNTHETISEES SUR PLUSIEURS TYPES DE CELLULES HUMAINES	72
TABLEAU 5 CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE DE NOUVELLES AURONES SUR <i>C. DIFFICILE</i>	77

1 Introduction

En 1928, Alexander Fleming découvre la Pénicilline, premier antibiotique qui changera l'histoire de la médecine et sera notamment très utilisé par les alliés pendant la seconde guerre mondiale (1). Par la suite, de nombreuses nouvelles familles d'antibiotiques seront découvertes. La plupart de celles-ci constituent encore la majorité de l'arsenal thérapeutique actuel. Ces molécules ont permis d'élargir le spectre d'activité des antibiotiques et, depuis les années cinquante, le catalogue des antibiotiques disponibles ne cesse de s'étoffer.

Naturellement, cela a proportionnellement entraîné une augmentation de l'usage de ces antibiotiques en médecine humaine mais plus encore en médecine vétérinaire. L'utilisation intensive d'antibiotiques dans les élevages d'animaux destinés à la consommation a d'abord eu un effet bénéfique en permettant d'augmenter fortement la production et l'approvisionnement en denrées alimentaires (2).

Cependant cette surconsommation dans l'industrie agro-alimentaire a conduit à l'apparition d'un nombre croissant de souches résistantes. Si, en premier lieu, ces souches apparaissent dans les élevages, elles ne tardent pas à se propager chez l'Homme causant les premiers cas d'infections par des bactéries résistantes aux Tétracyclines ou aux Pénicillines. En effet, ces molécules sont prescrites à la fois chez l'Homme et chez l'animal, comme 40% des antibiotiques disponibles sur le marché. Malgré différents rapports et lois régulant l'utilisation des antibiotiques à usage vétérinaire dans les pays les plus industrialisés, l'apparition de ces résistances n'a depuis cessée d'augmenter.

La situation bactériologique actuelle se caractérise par une augmentation constante des résistances observées chez de nombreux pathogènes, touchant principalement les patients les plus vulnérables mais également les patients immunocompétents. Les prédictions les plus pessimistes estiment que d'ici 2050, le taux de décès imputable aux infections bactériennes sera de 10 millions, dépassant ainsi les 8 millions de décès attendus imputables aux cancers. A titre de comparaison, en 2018, on estime à environ 700 000 le nombre de décès lié aux infections bactériennes (3).

Il est également intéressant de noter la baisse du nombre d'antibiotiques mis sur le marché ces dernières années. Depuis 2017, seuls 12 nouveaux antibiotiques ont été approuvés et parmi ces derniers, 10 font parties de familles déjà connues et apportent moins de plus-value que des antibiotiques avec des mécanismes atypiques. Si on s'intéresse aux molécules en voie de

développement, le constat est similaire. En 2021, 77 nouveaux antibiotiques étaient en cours de développement. Ce nombre est comparable à celui de 2017. En revanche le nombre d'antibiotiques visant des cibles prioritaires de l'OMS est lui en légère baisse, 31 en 2017 contre 27 en 2021. Parmi les 27 antibiotiques cités précédemment seuls 6 remplissent au moins un des critères d'innovation de l'OMS. Il est toutefois intéressant de noter que plusieurs de ces traitements correspondent à des thérapies non conventionnelles comme par exemple des bactériophages ou des anticorps monoclonaux. Ces nouvelles stratégies pourraient ouvrir la voie à de nouvelles solutions (4).

L'une des réponses possibles à ces problématiques est la recherche de nouvelles structures potentiellement antibactériennes. Au sein de la famille des flavonoïdes, plusieurs sous-familles comme les flavones (5,6), flavanones (7,8) et chalcones (9,10) ont été testées à cet effet. En revanche, une sous-famille a été comparativement peu étudiée dans ce domaine, il s'agit des aurones.

Les aurones sont une sous-famille des flavonoïdes caractérisées par la présence d'un hétérocycle B à 5 atomes plutôt que le traditionnel cycle B à 6 atomes des flavonoïdes (exception faite des chalcones). Olleik *et al* ont démontré que ces aurones pouvaient avoir des effets antibactériens intéressants notamment sur des pathogènes Gram-positif (11).

Le but de cette étude est donc de développer de nouveaux dérivés basés sur la structure des aurones et de les tester sur plusieurs pathogènes (Gram-positif, Gram-négatif, mycobactéries et champignons). Pour cela une dizaine de aminoaurones et acetamidoaurones seront synthétisées. Le choix s'est porté sur des aminoaurones et leurs dérivées car la plupart des aurones testées en antibactériens précédemment sont porteuses de substitutions identiques à celles des aurones naturelles. Or, pour le moment aucune aurone naturelle porteuse de groupement amine et acetamide n'a été isolée. Le but est donc de caractériser les effets de substitutions originales sur les aurones.

Dans un premier temps, les aurones synthétisées seront testées contre un panel réduit de pathogènes. A la suite de ce premier criblage, les composés les plus actifs seront sélectionnés pour être testés sur un nombre plus important de pathogènes. Dans un second temps, l'activité cytotoxique sur des lignées immortalisées saines et tumorales des composés sélectionnés sera également évaluée. Finalement, une dernière étude visant à également caractériser leur effet anti-inflammatoire sera mise en place.

Ce travail rend compte de ces différentes études et s'organise en plusieurs parties. Dans un premier temps il s'attardera sur les différents pathogènes testés et leurs mécanismes de résistance. Dans un second temps, nous présenterons les aurones, leurs origines et leurs activités biologiques puis enfin nous détaillerons la partie expérimentale et les résultats obtenus.

2 Etat de l'art

2.1 Bactéries, résistances et épidémiologie

2.1.1 Résistances bactériennes

Les résistances bactériennes peuvent être classifiées en trois catégories : les résistances intrinsèques, les résistances acquises ou les résistances adaptatives (12).

2.1.1.1 Résistances intrinsèques

La résistance intrinsèque définit les mécanismes que met en jeu une bactérie inhérents à ses propriétés physiologiques. Un exemple classique est la résistance des Gram-négatif aux glycopeptides due à la présence de la membrane externe. En général ces résistances sont peu préoccupantes puisqu'elles sont directement prises en compte lors du développement d'un antibiotique. Un traitement ne sera pas prescrit si la bactérie est susceptible de résister à un antibiotique grâce à ses résistances intrinsèques. Pour revenir à l'exemple précédent, les glycopeptides comme la Vancomycine et la Teicoplanine ne sont pas indiqués dans le traitement d'infections à bactéries Gram négatif.

2.1.1.2 Résistances acquises

Les résistances acquises regroupent les mécanismes développés par une bactérie, précédemment sensible, pour résister à un antibiotique. Cela peut se faire de deux manières différentes. Soit par mutation génétique soit par acquisition de matériel génétique *via* une source exogène. Ces deux méthodes sont aussi appelées respectivement transfert vertical et transfert horizontal. Les transferts horizontaux se font principalement par trois mécanismes : la transformation, la conjugaison et la transduction de gènes (13,14).

La transformation consiste en la pénétration de fragments d'ADN libres issus d'une bactérie morte dans une bactérie hôte. Ces fragments d'ADN vont être incorporés dans le matériel génétique de la bactérie hôte, pouvant ainsi lui faire acquérir de nouvelles résistances.

La conjugaison est le transfert de matériel génétique entre deux bactéries par contact physique direct. Lors de ce contact, il y a formation d'un pilus par lequel la bactérie donneuse fait transiter un plasmide. C'est sans aucun doute le mécanisme le plus important et le plus courant dans ce type de résistance. Il est d'autant plus important que les facteurs de multirésistances sont souvent situés sur un seul et même plasmide.

La dernière méthode pouvant être utilisée lors de transferts horizontaux de matériels génétiques est la transduction. Cette dernière implique la transmission de matériels génétiques entre bactéries par l'intermédiaire d'un bactériophage.

Les résistances acquises sont donc les plus dangereuses, à la fois par leur caractère imprévisible et par la diversité des stratégies déployées par la bactérie.

2.1.1.3 Résistances adaptatives

Les résistances adaptatives regroupent un ensemble de résistances induites par des facteurs environnementaux. Parmi ceux-ci, on peut citer le pH, le stress, le stade de croissance, la concentration ionique ou encore, le plus souvent, l'exposition à une concentration à un antibiotiques à dose infra thérapeutique. Contrairement aux autres modèles de résistances, les résistances adaptatives sont souvent réversibles et disparaissent lorsque le facteur environnemental disparaît. On les attribue le plus souvent à des modifications épigénétiques, ce qui explique leur présence transitoire. La méthylation de certains gènes par la DAM méthylase jouerait un rôle clef dans ces mécanismes adaptatifs (15).

Elles représentent donc un risque relativement modéré de résistances mais nécessitent tout de même une surveillance, notamment en ce qui concerne les concentrations non inhibitoires d'antibiotiques, comme par exemple dans des réservoirs d'eau contaminés (16,17).

2.1.2 Mécanismes d'action des résistances

L'acquisition de ces résistances par des bactéries se fait donc par les trois principaux mécanismes vus précédemment. La résultante en est la destruction, l'inactivation ou la neutralisation du principe actif. Pour cela les bactéries peuvent déployer des myriades de mécanismes.

2.1.2.1 Destruction de l'antibiotique

La destruction de l'antibiotique regroupe tous les mécanismes capables de détruire chimiquement un principe actif, la plupart du temps grâce à des enzymes. Ces enzymes sont capables de briser la structure chimique de la molécule active en cassant des liaisons chimiques clefs. L'exemple le plus connu et le plus représentatif de destruction d'antibiotique est, sans aucun doute, représenté par les β -lactamases. Ces enzymes présentes chez de nombreux pathogènes sont capables de détruire la liaison amide du cycle des β -lactamines (18). Il s'agit de la résistance la plus couramment rencontrée, notamment chez les bactéries Gram négatif. Il

existe d'autres enzymes capables d'inactiver des antibiotiques de manière plus spécifique comme les céphalosporinases et les carbapénèmases (19). Néanmoins, du fait de leur similarité, toutes ces enzymes sont le plus souvent regroupées sous le nom de β -lactamases.

2.1.2.2 Modification de l'antibiotique

Un autre mécanisme de résistance mettant en jeu des enzymes est la modification de la structure chimique de l'antibiotique. Cela passe par des réactions de phosphorylation adénylation ou encore d'acétylation. L'exemple le plus probant est celui des aminosides qui vont être structurellement modifiés par des Aminosides modifying enzymes. Ces modifications vont engendrer une perte de l'affinité de l'antibiotique pour la cible, et ainsi une baisse de l'activité. Les gènes codant pour ces genres d'enzymes sont situés sur un élément génétique mobile et sont donc potentiellement présents chez toutes les souches de bactéries. En effet, les EGMs, parmi lesquels on retrouve entre autre les plasmides, sont des éléments du code génétique non fixes et donc capables de facilement se transmettre entre bactéries (20).

Une autre possibilité pour la bactérie est de modifier des enzymes nécessaires au bon fonctionnement d'un antibiotique. Par exemple, la Nitrofurantoïne nécessite d'être réduite par les réductases intra bactériennes pour être active (21). Il a été démontré que des bactéries possédaient une mutation sur les gènes des nitroréductases rendant impossible l'activation de la Nitrofurantoïne (22).

2.1.2.3 Modification de la cible

L'alternative pour les bactéries à la neutralisation de l'antibiotique est l'adaptation de ses structures. L'un des exemples de ce type de mécanismes de résistance est la modification de la protéine cible. Une mutation génétique peut provoquer la modification de la structure de la protéine. Or, une modification, que ce soit sur la structure primaire, secondaire ou tertiaire de la protéine peut diminuer fortement l'affinité de l'antibiotique pour cette cible voire rendre l'interaction impossible. Un exemple est la mutation du gène codant pour le domaine V de l'ARN ribosomique 23S. Cet ARN ribosomique est la cible de plusieurs antibiotiques comme le Linézolide ou encore le Chloramphénicol. La modification du domaine V empêche l'interaction entre l'ARN et l'antibiotique, rendant le traitement inefficace. Une modification des structures L3 et L4 qui bordent le site de liaison du Linézolide à l'ARN bloque également l'activité de ce dernier (23).

2.1.2.4 Protection de la cible

Une alternative à la modification de la cible est la stratégie de protection de la cible. L'un des exemples de ce genre de résistance sont les protéines Qnr. Ces protéines, responsables de résistances aux Fluoroquinolones, que l'on retrouve à la fois chez certains Gram positif et Gram négatif, agissent comme des analogues de l'ADN. Ainsi, elles se fixent à la topoisomérase IV et à la gyrase, protégeant ainsi le site d'action des Fluoroquinolones, les rendant inactives (24).

2.1.2.5 Surproduction de la cible

La quantité de cible produite par la bactérie peut jouer un rôle clef dans les stratégies de résistance d'une bactérie. En effet, si cette dernière surproduit la cible de l'antibiotique, celui-ci ne sera pas inhibé mais sera en quantité insuffisante pour bloquer tous les sites. C'est le cas chez certains *E. coli* qui surproduisent la dihydrofolate réductase (DHFR), ainsi la dose de Triméthoprine délivrée devient insuffisante (25).

2.1.2.6 Imperméabilisation de la membrane externe

Les bactéries Gram négatif possèdent, contrairement aux bactéries Gram positif, une membrane extérieure. Cette membrane procure intrinsèquement une meilleure résistance à certains antibiotiques en étant naturellement imperméable à ces derniers. La modification de la perméabilité de cette membrane a également été observée (26). La porte d'entrée à travers la membrane pour la plupart des antibiotiques sont les porines. Ces petites molécules forment des canaux à travers la membrane et permettent le passage de certaines molécules. Le type et le nombre de canaux disponibles sur la membrane peut varier et ainsi affecter la pénétration de l'antibiotique au sein de la cellule bactérienne. Les mutations qui modifient le nombre et altère la structure de ces porines sont le plus souvent responsables de résistances relativement faibles. En revanche, elles peuvent favoriser l'apparition d'autres résistances, puis fonctionner en coopération avec ces nouvelles résistances (27).

2.1.2.7 Production de pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des protéines présentes dans la membrane cytoplasmique capables de pomper en dehors de la cellule certaines molécules, la plupart du temps toxiques pour l'organisme. Ces pompes représentent un mécanisme de résistance extrêmement problématique car elles sont souvent capables d'effluer des composés sans aucun lien entre eux, favorisant ainsi l'acquisition de multi-résistances chez les organismes Gram positif comme Gram négatif.

La première pompe d'efflux, spécifique aux tétracyclines, fut découverte en 1980 chez *E. coli* (28). Depuis de nombreuses autres pompes d'efflux ont été découvertes par la suite.

2.1.2.8 Adaptation de la cellule

Certains mécanismes de résistance impliquent la modification plus globale de la cellule, contrairement aux changements précédents qui impliquent la modification d'un facteur en particulier. La résistance acquise par certains *enterococci* à la Daptomycine en est un des exemples les plus criant. La Daptomycine tue les bactéries en modifiant l'homéostasie de la membrane cellulaire. Des mutations dans les gènes codant dans la régulation du métabolisme des phospholipides et de l'homéostasie membranaire ont été associées à des résistances à cet antibiotique (23,29).

2.1.2.9 Données épidémiologiques et mesures

Les types de résistance bactérienne sont donc nombreux et variés, impliquant des mécanismes complexes. Aujourd'hui, aux Etats-Unis, près de 2 millions d'infections et 29 000 décès par an (30) sont attribués aux résistances aux antibiotiques. En Europe, les résistances bactériennes engendrent le décès d'environ 33 000 malades par an (31). Les coûts pour la société en rapport avec ces infections s'élèvent à plusieurs milliards de dollars. Dans les pays les moins développés les données ne sont pas toujours disponibles mais la situation serait à minima équivalente.

A la lumière de ces données, l'OMS en 2017, a publié un classement des souches bactériennes pour lesquelles il devient urgent de trouver des alternatives thérapeutiques. Ces bactéries sont classées en trois catégories : souches à priorité critique, souches à priorité élevée et souches à priorité modérée (32). Parmi toutes les souches classifiées, six souches se démarquent comme étant les plus à même de représenter un risque important d'épidémie. Quatre souches dites de priorité critique : *A. baumannii* et *P. aeruginosa* carbapénème résistants, *K. pneumoniae* résistant aux céphalosporines de 3ème génération et *Enterobacter spp*, ainsi que deux souches du groupe à priorité élevée : *E. faecium* résistant à la vancomycine et *S. aureus* résistant à la méticilline et à la vancomycine. Ces souches constituent le groupe ESKAPE, chaque lettre correspondant à l'initiale de chaque pathogène. *E. coli* est parfois ajouté à cette liste même si les risques vis-à-vis de cette souche sont moindres.

Dans ce contexte, la nécessité d'avoir de nouvelles molécules antibactériennes est importante. Les aurones pourraient être une des réponses possibles. C'est donc principalement sur ces

pathogènes que cette étude se concentrera. La partie qui suit a pour rôle de les décrire ainsi que leurs mécanismes de résistances.

2.1.3 Bactéries d'intérêt

2.1.3.1 *Enterobacter species*

Les membres du genre *Enterobacter* sont des bactéries de type bacille à Gram négatif et mesurent le plus souvent 2 µm de long. Elles sont anaérobies facultatives et sont dotées de flagelles péritriches grâce auxquels elles se déplacent. Toutes les espèces sont catalase-positives et oxydase-négatives, positives à l'ornithine décarboxylase et fermentent le mannitol. Ce sont des bactéries commensales du microbiote intestinal humain et animal (33). 22 bactéries du genre *Enterobacter* ont, à ce jour, été découvertes : *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* et *E. turicensis*. (33,34).

Ce sont des pathogènes environnementaux, que l'on retrouve couramment dans l'eau, les canalisations, le sol, les plantes ou les excréments d'animaux (35). Certains d'entre eux ont une propension à croître sur du matériel médical comme des sondes ou des cathéters (36). *E. cloacae* a été retrouvé sur certains aliments et dans de l'eau potable (37). Dugleux *et al*, décrivent une épidémie de septicémies à *E. cloacae* mettant en cause des préparations parentérales stockées dans un réfrigérateur (38). Un autre réservoir important du genre *Enterobacter* est l'Homme lui-même. Des échantillons des différents membres de l'espèce ont été retrouvés dans des échantillons d'urine, des prélèvements respiratoires, du sang ou encore sur la peau de patients sains (39). Evidemment, la source principale reste le tractus intestinal, *Enterobacter* en étant un commensal.

Sur le plan clinique, le genre *Enterobacter* a pris une importance toute particulière au cours des dernières décennies en étant responsable d'un nombre croissant d'infections nosocomiales essentiellement dans les services de réanimation (40,41). Les espèces les plus souvent retrouvées au sein des prélèvements sont *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, et *E. hormaechei*. La grande majorité des infections touche des patients immunodéprimés. Un grand nombre de ces agents pathogènes a acquis des résistances multiples par plusieurs mécanismes. Le premier est la résistance intrinsèque du genre à l'Ampicilline, l'Amoxicilline, les céphalosporines de première génération et la Cefoxitine qui s'explique par l'expression d'une β -lactamase AMPc (42). Le deuxième facteur est une combinaison de l'importante capacité d'*Enterobacter* à

acquérir des gènes de résistance et de virulence, et l'utilisation abusive d'antibiotiques à spectre large (43,44).

Comparativement aux autres pathogènes ESKAPE, relativement peu d'études ont été menées pour élucider les facteurs de pathogénicité du genre. Malgré cela, il est très probable que le rôle des flagelles dont ils sont dotés ne s'arrête pas à la mobilité. De récentes études démontrent qu'elles rentrent en jeu dans d'autres mécanismes comme par exemple la formation de biofilms, l'export de protéines ou encore dans l'adhésion (45). Certains facteurs de virulence ont néanmoins été isolés, et parmi ces derniers des toxines comme les entérotoxines, des α -hémolysines et d'autres cytotoxines proches des shigatoxines (46,47). Comme d'autres bactéries Gram négatif, *Enterobacter* est doté d'un système de sécrétion de type III (TTSS), reconnu comme étant un facteur de virulence (47). Des études ont également pu mettre en évidence des phénomènes d'induction d'apoptose chez certaines cellules humaines (48).

Les épidémies nosocomiales à *Enterobacter* correspondent à plus 5% des bactériémies, 5% des pneumonies, 4% des infections urinaires et près de 10% des péritonites post-opératoires. Mais elles sont également responsables de septicémies, méningites et surinfections de plaies (49). Ce sont l'ensemble de ces raisons qui a poussé l'OMS à la classer comme bactérie prioritaire.

2.1.3.2 *Staphylococcus aureus* Vancomycine et Méricilline résistant

Staphylococcus aureus est un coccus Gram positif, d'environ 1 μm de diamètre et immobile. Il possède une capsule polysaccharidique et apparaît souvent sous forme de grappes. C'est une bactérie anaérobie facultative, catalase positive, oxydase négative, capable de fermenter le glucose. C'est un germe ubiquitaire et commensal de l'Homme, chez qui il peut également avoir une action symbiotique, mais également un pathogène opportuniste. On le retrouve chez 27% des individus sains, au niveau de la fosse nasale, mais également au niveau de la peau, du périnée et du tractus digestif (50).

S. aureus fut l'un des premiers pathogènes décrits, ce qui s'explique essentiellement par le fait qu'il est, encore aujourd'hui, l'une des causes d'infections les plus communes. Il est responsable entre autres d'infections de la peau, des tissus mous, de bactériémies, d'endocardites, d'ostéomyélites ou encore d'infections des voies respiratoires inférieures. C'est également un pathogène souvent en cause lors d'infections impliquant du matériel médical, comme par exemple lors de bactériémies associées aux cathéters centraux (51–54). La plupart

des infections à *S. aureus* sont nosocomiales mais de plus en plus d'infections communautaires sont recensées (55).

S. aureus est muni de façon intrinsèque de plusieurs mécanismes de résistance. Il possède ou peut facilement acquérir des systèmes d'efflux, une capacité à produire un nombre relativement important de β -lactamases et une membrane externe assez peu perméable (56). C'est également la première bactérie chez laquelle on a observé la formation d'un biofilm chez un patient (57). Le taux de souches de *S. aureus* prélevées chez l'Homme résistant à la pénicilline est supérieur à 90% (58). Cependant, la résistance la plus préoccupante chez *S. aureus* est celle à la Vancomycine. Cet antibiotique, de la famille des glycopeptides, est actuellement le traitement de dernière intention contre *Staphylococcus aureus* Mécicilline résistant (MRSA). Or la présence d'un cluster de gène dit *van* au sein du génome de la bactérie confère à cette dernière une résistance. A l'heure actuelle, 11 clusters ont été identifiés, ces derniers ne sont d'ailleurs pas spécifiques de *S. aureus* mais sont également présents chez d'autres espèces comme *E. faecalis*, *E. faecium* ou encore *C. difficile* (59–62). Deux nouvelles principales lignées de mutants résistants ont été mises en évidence : VRSA (Vancomycin resistant *S. aureus*) et VISA (Vancomycin intermediate *S. aureus*) (63).

Ces résistances sont la conséquence de modifications relativement importantes de la structure cellulaire globale de *S. aureus* notamment par un épaissement de la paroi cellulaire, une réduction de la perméabilité et une capacité à emprisonner le glycopeptide entre la paroi et la membrane cellulaire (64). De plus, VISA possède un pouvoir pathologique important même chez les patients immunocompétents (65).

VRSA est pour sa part relativement moins répandu que le VISA. Néanmoins, il possède la plupart du temps les gènes de résistance *mecA* (résistance à la Mécicilline) et *vanA* (résistance à la Vancomycine) par transfert du VRE (Vancomycin resistant *enterococcus*) (64).

Si dans la plupart des pays développés le taux d'infections à *S. aureus* résistants est en légère baisse, il reste toujours en augmentation dans la majeure partie des pays en cours de développement. Ces données, associées à sa capacité à acquérir du matériel génétique par transfert inter et intra espèce (66), en font une cible pour les futurs antibiotiques et une priorité en terme de santé publique.

2.1.3.3 *Klebsiella pneumoniae* résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération

Klebsiella pneumoniae est un bacille Gram négatif opportuniste, se caractérisant par son immobilité, la présence d'une capsule et de pili. Elle est anaérobie facultative et fait entre 0.6 et 6 µm de longueur. Les colonies qu'elle forme sont dites mucoïdes en raison de sa production de mucus. Elle est oxydase négative et catalase positive, capable de fermenter le glucose et le lactose et possède une nitrate réductase. On la retrouve dans le tractus digestif de 30% des individus et des animaux et de façon ubiquitaire sur la peau. Elle est présente également dans les sols et les végétaux. Le réservoir principal est l'Homme notamment le tractus intestinal et les mains.

K. pneumoniae touche principalement les patients immunodéprimés mais également des patients immunocompétents de tout âge lors d'infections nosocomiales et lors d'infections communautaires. Elle est responsable d'une grande variété d'infections, telles que des pneumonies, des infections urinaires, des bactériémies et des méningites (67). Certaines lignées sont plus particulièrement virulentes (de *Klebsiella pneumoniae*), et dénommées hypervirulent *K. pneumoniae* ou hvKP. Ces souches représentent un risque accru car ce sont des souches capables d'infecter de façon importante et récurrente des patients immunocompétents.

La virulence de *K. pneumoniae* est aujourd'hui attribuée à 4 facteurs principaux, les pili, la capsule, le LPS et les transporteurs du fer (68). Les pili de type 1 et 3 jouent un rôle lors de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et immunes (69). Le rôle premier de la capsule est de protéger *K. pneumoniae* du système immunitaire de l'hôte. Les mécanismes mis en jeu peuvent différer selon la lignée impliquée. Certaines souches modifient le LPS afin que les cellules de l'hôte soient incapables de le détecter, d'autres se servent de la capsule pour camoufler le LPS et incapaciter les TLR4 (70,71). Dans les deux cas, l'issue est une forte diminution de la réponse inflammatoire. Le facteur de virulence RmpA, situé sur un plasmide, est principalement responsable de la régulation de la synthèse du LPS. L'importance de l'expression de ce gène est souvent associée à des souches hvKP. L'une des particularités de ces lignées est la surproduction de mucus (72). Le dernier facteur de virulence important sont les protéines transporteuses de fer ou sidérophores. A l'heure actuelle, plusieurs de ces protéines ont été identifiées : l'enterobactine, la yersiniabactine, la salmocheline et l'enteromycine. La présence de ces molécules s'explique par l'important besoin de fer de *K. pneumoniae*. Lors de l'infection, elle doit absolument se procurer du fer et le fait en sécrétant les précédents

sidérophores. Ceux-ci ont une plus grande affinité pour le fer que la transferrine ou la lipocaline-2 (73) et permettent à la bactérie de soustraire du fer à son hôte. La synthèse de ces sidérophores n'est pas la même chez toutes les souches. Par exemple, les souches *hvKP* sont plus susceptibles d'exprimer la yerciniabactine et la salmocheline. En revanche, la synthèse d'enterobactine est commune à toutes les souches de *K. pneumoniae* (67,74).

Klebsiella pneumoniae est reconnue pour sa capacité à rapidement disséminer des variants MDR qui se caractérisent par l'acquisition de nombreuses β -lactamases pouvant inhiber l'effet des pénicillines, des céphalosporines et parfois des carbapénèmes. Parmi ces β -lactamases, on peut citer une serine A carbapénémase responsable de nombreuses épidémies aux Etats-Unis (75) et la New Delhi metallo- β -lactamase-1, une super enzyme capable de transmission inter espèces (76). Ces deux enzymes ne sont que des exemples qui démontrent la capacité d'adaptation de *K. pneumoniae* et la nécessité de trouver de nouveaux antibiotiques afin de lutter contre des souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques existants sur le marché.

2.1.3.4 *Acinetobacter baumannii* carbapénème résistant

Acinetobacter baumannii est une bactérie opportuniste Gram négative de forme coccoïde non sporulée. Elle possède une capsule et est aérobic stricte. Elle est considérée comme immobile même si elle est dotée de fimbriae à ses pôles qui lui permettent d'avoir une mobilité limitée. Elle est catalase positive et oxydase négative et incapable de réduire les nitrates. Comme la plupart des bactéries à Gram négatif, *A. baumannii* est particulièrement résistante, peu sensible aux environnements secs, pousse à différents pH, et températures et même lorsque les apports nutritifs sont rares. Certaines souches peuvent survivre près de 5 mois sur une surface donnée (77). Ces caractéristiques, notamment en milieux hospitaliers, expliquent en partie l'importance de ses résistances acquises aux antibiotiques même les plus puissants.

A. baumannii est unanimement reconnue par la communauté scientifique comme une espèce pouvant causer une grande variété d'infections nosocomiales comme des infections de la peau, des infections pulmonaires, des surinfections de plaies, des infections urinaires et des méningites (78–80). Néanmoins les infections à *A. Baumannii* ayant le taux de létalité le plus important restent les pneumonies et les septicémies (81). La plupart de ces infections affectent des patients immunodéprimés, âgés et de sexe masculin (82). Plus rarement, *A. baumannii* est responsable d'infections communautaires, notamment de pneumonies (dans 85% des cas d'infections communautaires à *A. baumannii* mais également de bactériémies. Certains cas de

méningites, d'endocardites et d'infections oculaires ont également été documentés mais restent relativement rares (83,84).

Contrairement à la plupart des membres du genre *Acinetobacter*, *A. baumannii* est retrouvé presque exclusivement en milieu hospitalier, notamment dans les services de réanimation (85). Bien qu'il existe des cas d'infections par des sources non-humaines, la principale cause d'infections à *A. baumannii* reste la transmission interhumaine (85).

La multiplication de ces infections à *A. baumannii* en milieu hospitalier sur des patients fragiles implique l'apparition de clones multi-résistants notamment aux carbapénèmes. Deux des trois principaux clones sont considérés comme multi-résistants et pouvant causer des épidémies au niveau mondial. Néanmoins, de nombreuses autres lignées sont en cours d'étude et parmi ces dernières, plusieurs pourraient également être MDR (86).

De récentes études ont permis la mise en évidence des facteurs de virulence d'*A. baumannii*. Comme pour la plupart des bactéries, ces facteurs sont situés à plusieurs sites de la bactérie et impliquent une multitude de mécanismes. L'invasion des cellules épithéliales est rendue possible grâce à une protéine située sur la membrane extérieure de la bactérie, la protéine OmpA (87). Cette protéine pourrait également jouer un rôle dans la survenue de l'apoptose chez ces mêmes cellules. Les phospholipases C et D recouvrent un rôle semblable que ce soit dans l'adhésion et dans l'apoptose des cellules épithéliales et sont essentielles à la survie du pathogène dans le sang (88,89). La liste des facteurs identifiés est encore longue, on peut par exemple citer la capsule en elle-même et les protéines 7/8 capables de se lier aux pénicillines (90,91). *A. baumannii* est aussi doté de lipopolysaccharides (LPS) qui ont été identifiés comme de possibles inducteurs de chocs septiques (92). Les LPS entreraient également en jeu lors de mécanismes impliquant le TLR4 de l'hôte.

A. baumannii est intrinsèquement résistant à de nombreux antibiotiques d'abord par la protection que lui confère la membrane extérieure des Gram négatif, mais également par l'importante présence de pompes d'efflux et de porines présentes à la surface de cette même membrane (93). De plus, *A. baumannii* possède un îlot de résistance codant pour des résistances aux antibiotiques ainsi qu'aux métaux lourds, ce qui explique en partie sa résistance aux désinfectants à base d'ammoniaque. Les principales lignées résistantes possèdent des cadres de lecture dans leur code génétique pour toutes les pompes d'efflux connues (93). Par ailleurs, *A. baumannii* est souvent considéré comme une bactérie avant-gardiste dans la synthèse de

nouvelles β -lactamases. En effet, les premières imipenem metallo- β -lactamases ainsi que les premières oxacilline serine- β -lactamases ont été isolées à partir de souches d'*A. baumannii*. La grande majorité des OXA-carbapénèmases ont été découvertes chez cette souche (93,94).

Tous ces facteurs font d'*A. baumannii* une souche extrêmement résistante avec un potentiel d'endémie extrêmement élevé bien qu'elle ne touche, à l'heure actuelle, principalement que les patients immunodéprimés.

2.1.3.5 *Pseudomonas aeruginosa* carbapénème résistant

Pseudomonas aeruginosa est également appelé bacille pyocyanique de par sa capacité à produire des pigments comme la pyoverdine ou encore la pyocyanine qui donnent à ses colonies une couleur bleue. C'est une bactérie de type bacille, pourvue de flagelles polaires qui lui confèrent une excellente mobilité. Elle est asporulée et dépourvue de capsule, catalase positive, oxydase positive et coagulase négative. Elle forme la plupart du temps d'importants biofilms.

On la retrouve principalement dans l'eau et les sols, sur toute la surface du globe. Elle croît particulièrement bien dans les milieux humides tels que les canalisations mais également dans le mucus des patients atteints de mucoviscidose. Chez ces derniers, elle est responsable d'infections pulmonaires sévères. Dans les services de réanimation, c'est le pathogène le plus couramment isolé chez tous les patients atteint d'infections des voies aériennes. *P. aeruginosa* est également responsable de nombreuses autres infections telles que des infections oculaires, urinaires, intestinales, des méningites ou encore des septicémies (95).

Le flagelle de *P. aeruginosa* possède plusieurs molécules, FliC, FliD, et FlgE. FliC joue non seulement un rôle dans la mobilité mais permet également au pathogène d'adhérer à la surface des cellules apicales de l'épithélium cellulaire. FliD intervient dans l'adhérence à la mucine humaine (45). Pour sa part, FlgE est responsable de la résistance à la protéine SP-A du surfactant pulmonaire (96). Une fois le pathogène adhérent à la cellule, il se sert de ses pigments comme des sidérophores pour capturer du fer, ce qui lui permet alors de compenser la rareté de ce dernier. En effet, la transferrine ou la lactoferrine confisquent le fer lors de la réaction inflammatoire (97). *P. aeruginosa* possède également plusieurs enzymes protéolytiques nécessaires lors des infections. On peut par exemple citer les élastases LasA et LasB (98) responsables de la lyse de l'élastine de l'hôte (99), de la perturbation des jonctions serrées et du clivage de nombreuses protéines chez l'hôte comme les protéines du surfactant, des cytokines et des immunoglobulines (100–102). Un autre facteur de virulence qui joue un rôle absolument

clef est sans aucun doute la capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilms très résistants. Ces biofilms qui lui permettent de résister aux défenses immunitaires de l'hôte, aux antibiotiques et aux désinfectants, sont considérés comme les plus grands responsables de l'apparition de résistances chez *P. aeruginosa* (103).

Finalement, *P. aeruginosa* possède plusieurs pompes d'efflux. L'une d'elle, la pompe mexAB-OprM se caractérise par sa capacité à cibler simultanément les fluoroquinolones, les β -lactames, les céphalosporines, les sulfonamides, les tétracyclines et les macrolides. D'autres pompes comme MexCD-OprJ, MexXY-OprM ou MexEF-OprN sont respectivement spécifiques des fluoroquinolones, aminosides et β -lactames (104). Comme la plupart des bactéries citées précédemment, *P. aeruginosa* sécrète également des β -lactamases dont une imipenem metallo- β -lactamase et une *K. pneumoniae* carbapénémase témoignant de sa formidable capacité à résister aux antibiotiques même de dernières générations (105).

L'ensemble de ses caractéristiques, couplées au fait qu'aucune molécule en cours de développement ne soit capable de déjouer ces derniers mécanismes de résistance, font de *P. aeruginosa* un des pathogènes les plus dangereux et pour lequel il est prioritaire de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques.

2.1.3.6 *Enterococcus faecium* Vancomycine résistant

Enterococcus faecium est un cocci Gram positif, anaérobie facultatif. Il est catalase et oxydase négatif, commensal du système digestif et de l'appareil génital féminin. Néanmoins, on recense aujourd'hui deux populations distinctes de *E. faecium*. La première, commensale chez l'humain et les animaux, n'est pas ou peu responsable d'infections. En revanche, l'autre population issue de lignées essentiellement hospitalières se caractérise par une presque omniprésence d'une résistance à la vancomycine. Ces VRE (vancomycin resistant *enterococcus*) sont responsables d'un nombre important d'infections nosocomiales (106). On peut citer, entre autres, des bactériémies, des endocardites, des infections urinaires ou encore des infections post-opératoires.

Les réservoirs principaux d'*E. faecium* sont environnementaux : les plantes, le sol, l'eau de surface, les produits alimentaires comme les fruits ou les légumes mais également les produits fermentés (106).

Il est naturellement résistant à plusieurs antibiotiques tels que l'Oxacilline, la Nafcilline, la Ticarcilline, la majorité des céphalosporines, l'Ertapénem, ainsi qu'à l'Aztréonam. Le

traitement de première intention est une association de pénicillines telles que l'ampicilline et d'aminosides. Il n'est cependant pas rare que les souches d'*E. faecium* nosocomiales soient résistantes à l'ampicilline (107). Cette dernière n'est pas le seul antibiotique pour laquelle des souches résistantes ont été isolées. En effet, des colonies résistantes aux aminosides et d'autres β -lactamines ont été observées (108,109). Les VRE sont souvent classés parmi les pathogènes les plus susceptibles de devenir multi-résistants (MDR).

Sans aucun doute les plus importants des facteurs de résistance d'*E. faecium* sont l'ensemble des gènes du cluster *van*. A l'heure actuelle, près de 9 gènes distincts ont été décrits (*van A, B, C, D, E, G, L* et *M*) ainsi que 3 gènes accessoires (*van Y, W* et *Z*) (110–112). L'intégralité de cette cassette génétique peut être transportée par transposon (113,114). Comme dit précédemment, ces gènes sont responsables des résistances acquises aux glycopeptides. De nouvelles AMEs (aminoglycosides modifying enzymes) ont été décrites et permettent à ce pathogène de résister aux aminosides et notamment à la Gentamicine (115).

E. faecium est donc à la fois un pathogène responsable de sévères infections essentiellement nosocomiales et un pathogène multirésistant. Il est capable d'acquérir plusieurs résistances ainsi que de les transmettre aux autres espèces comme le témoigne la présence des gènes du cluster *van* chez de nombreuses autres espèces bactériennes comme par exemple *S. aureus*. Pour toutes ces raisons, l'OMS classe *E. faecium* comme une espèce à risque prioritaire.

2.1.3.7 *Clostridioides spp*

Les membres de la famille *Clostridioides*, anciennement connue comme *Clostridium*, sont des bacilles Gram positif, immobiles, anaérobies et sporulés. Le membre le plus connu est très certainement *C. difficile*. Elle est responsable de la grande majorité des infections à *Clostridioides*. Néanmoins, parmi les autres membres du genre notoires, il est également possible de citer *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani* ou encore *C. coccoïdes*. *C. tetani* et *C. botulinum* qui sont respectivement les agents infectieux responsables du tétanos et du botulisme. Un des points communs à ces bactéries est le relargage de puissantes toxines. En 2017, *C. difficile* était responsable de près de 18.3 millions d'infections dans l'Union Européenne avec un taux de mortalité à 30 jours de 30% (116). Un millions à *C. perfringens* sont recensées tous les ans dans le monde avec un taux de mortalité à 30 jours de 44% (117).

C. difficile est une bactérie commensale de la flore intestinale. En temps normal, elle ne présente peu ou pas de danger pour l'hôte. En revanche, lorsque la flore intestinale est fragilisée par la

prise d'antibiotique telle que l'Amoxicilline, elle peut alors profiter de ce déséquilibre et devenir pathogène. Elle est munie de plusieurs facteurs de virulence comme des toxines, la capacité à former des spores ou encore à former des biofilms (118). Les principales toxines qu'elle secrète sont la toxine A, B et CDT (*C. difficile* toxine). Les deux premières désactivent les GTPases et sont associées à des colites. Quant aux clusters porteurs de CDT, ils sont associés à des colites pseudomembraneuses graves ainsi qu'à des sepsis (119).

C. botulinum, agent responsable du botulisme, produit quant à elle la botuline ou BoNT (neurotoxine botulique). Cette toxine est fortement neurotoxique et est capable d'induire une paralysie (120). Selon les clades, toutes les bactéries ne produisent pas les mêmes toxines. *C. botulinum* est aujourd'hui classé en trois clades I, II et III, chacun associé à des botulines différentes (121).

C. perfringens est souvent associée à de nombreuses infections, comme des gastroentérites, des infections dermiques, des bactériémies ou encore des sepsis. Bien qu'on la retrouve parmi les infections nosocomiales, elle est le plus souvent responsable d'infection communautaires. Comme pour *C. botulinum*, l'infection est souvent causée par la consommation d'aliments avariés ou mal nettoyés. Elle est capable de sécréter plusieurs types de toxines. La plus répandue est l'alpha toxine, principal facteur de virulence de *C. perfringens* (122). La toxine CPE est une entérotoxine, elle est dite « pore-forming » c'est-à-dire qu'elle est capable de former des pores dans les membranes intestinales et peut entraîner la nécrose d'une partie de l'iléum et des colites (123). Elle est excrétée durant la sporulation (122). Le dernier type de toxine est une toxine nécrotique, NetB (Necrotic enteritis B-like toxin), également responsable de nécrose (124).

En ce qui concerne les résistances de la famille des *Clostridioides*, les études portent essentiellement sur *C. difficile*. En effet, c'est le membre le plus répandu et qui touche le plus l'Homme, le botulisme et le tétanos étant devenus des maladies de plus en plus rares du fait de la vaccination et de la meilleure hygiène dans la préparation des aliments.

De nombreuses résistances ont été identifiées chez *C. difficile*, parmi celles-ci la résistance aux pénicillines et aux céphalosporines s'explique par deux principaux facteurs : l'importante production de β -lactamases et la modification de la protéine cible (125). Sa résistance aux macrolides est la conséquence de la méthylation du ribosome. Ce mécanisme qui est le plus courant des mécanismes de résistance aux macrolides est dû à une protéine, l'*erm* (erythromycin

ribosomal méthylase). Une version de ce gène a été retrouvée sur le plasmide *Tn5398* que l'on retrouve chez *C. difficile* (126–130).

Un autre exemple de résistance retrouvé chez *C. difficile* est la résistance aux fluoroquinolones. Cette dernière est principalement due à une modification de la gyrase-A (131–133). Cette résistance serait acquise par une exposition courte à la moxifloxacine et la levofloxacine et serait permanente (134,135).

Ainsi les membres de la famille des *Clostridioides*, bien que ne faisant pas partie des souches prioritaires de l'OMS, comptent parmi eux plusieurs pathogènes préoccupants. Le principal étant *C. difficile* qui, comme dit précédemment, est à la fois responsable d'un nombre important de décès mais est également capable d'acquérir des résistances à de nombreux antibiotiques disponibles.

D'autres bactéries peuvent s'inscrire dans la lignée de *C. difficile*. Bien que non classées comme prioritaire par l'OMS des bactéries prioritaires à l'instar d'*E. coli*, *L. monocytogenes* ou encore un champignon comme *A. niger* représentent ou pourraient représenter à l'avenir une menace comme le sont aujourd'hui les souches ESKAPE. Bien que non traitées dans cette partie, ces différentes souches ainsi que d'autres moins préoccupantes seront testées

Il est donc impératif d'explorer de nouvelles molécules pouvant avoir des propriétés antibactériennes. Il existe de nombreux exemples de médicaments issus ou du moins inspirés de sources naturelles. L'exemple le plus connu étant sans aucun doute la pénicilline.

Les aurones, petites molécules aromatiques membres de la famille des flavonoïdes, sont décrites dans la littérature comme actives contre de nombreuses pathologies. Certaines d'entre elles ont été identifiées comme actives contre des pathogènes Gram positif. Elles pourraient donc être une piste prometteuse dans la lutte antibactérienne. La section suivante sera dédiée à les décrire et leur potentiel.

2.2 Les aurones

2.2.1 Découverte

Au début du XIX^{ème}, débute la description des différentes familles de pigments floraux, notamment par le biais des travaux du pharmacien allemand Ludwig Clamor Marquart. Ce dernier décrit deux grandes familles de pigments, les anthoxanthines et les anthocyanines. Comme le suggère leur étymologie, ces familles rassemblent respectivement des molécules de couleur jaune et bleue. Ce n'est que plus tard qu'une troisième catégorie est mise en évidence, les anthochlorées. Les molécules de cette dernière catégorie ont la particularité d'être jaunes en milieu acide et rouges en milieu alcalin. C'est dans ce groupe que l'on retrouve notamment les chalcones et les aurones.

Parmi ces trois familles de pigments, deux d'entre elles sont relativement comparables en termes de structures chimiques et sont regroupées sous l'appellation de flavonoïdes, les anthochlorées et les anthoxanthines. (136)

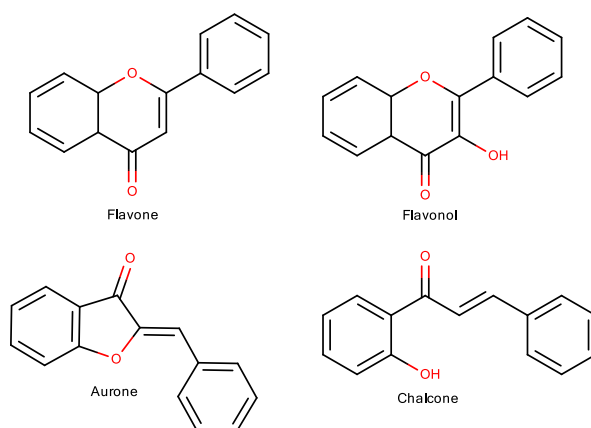


Figure 1 squelette de plusieurs familles de flavonoïdes, en haut à gauche les flavones, en haut à droite les flavonols, en bas à gauche les aurones et en bas à droite les chalcones

2.2.2 Occurrences

On retrouve les aurones essentiellement chez les eudicotylédones, comme les astéracées, les fabacées ou encore les rubiacées. Les familles les plus riches en aurones sont les familles des Heliantheae et des Helenieae. Ces familles font parties des plus évoluées parmi les astéracées.

Néanmoins, des aurones ont été découvertes chez certaines plantes de la famille des monocotylédones comme les cypéracées. Bien que la plupart des aurones soient isolées dans les fleurs, de faibles proportions l'ont été dans les racines ainsi que dans les graines.

2.2.3 Les aurones dans la nature

En 2000, Iwashima *et al* publient la première importante description moderne des aurones. Ils rapportent et détaillent 27 aurones O-glycosylées ainsi que 18 non-glycosylées. Parmi ces dernières, ils dénombrent également 11 auronols, c'est-à-dire la forme hydratée des aurones. Au total aujourd'hui, une centaine de molécules naturelles ont été décrites.

Les aurones les plus fréquentes sont la sulfurétine, la maritimétine et la leptosidine. Comme la plupart des flavonoïdes, on les retrouve également sous forme de génine.

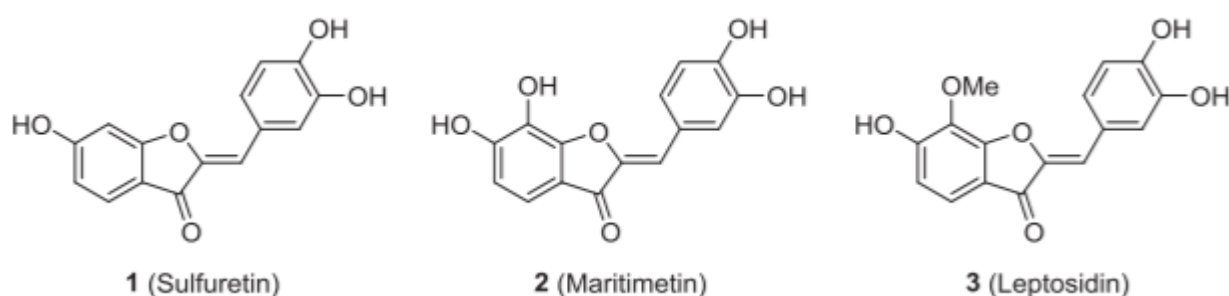


Figure 2 les trois aurones naturelles les plus courantes

Grâce à leur intense coloration jaune, et donc leur forte absorbance dans les UV, elles participent de façon importante à l'attractivité des pollinisateurs comme les abeilles ou les oiseaux. Chez certaines espèces, la production d'aurones est strictement limitée à des zones distinctes de la fleur, indiquant au potentiel pollinisateur la présence de nectar en un lieu précis.

Néanmoins, il existe une importante contrepartie à ce mécanisme. En effet, la forte absorption de radiation solaire, notamment dans les UV (280- 315 nm), est responsable de la génération d'espèces oxygénées réactives (136). Ces espèces oxygénées réactives (ROS) engendrent une toxicité importante au sein même de la cellule et doivent donc être neutralisées. A nouveau, les aurones jouent un rôle puisque, comme la majorité des flavonoïdes, elles ont un important potentiel antioxydant.

Parmi la multitude de flavonoïdes, les composés les plus étudiés sont les anthoxanthines. En effet, on retrouve dans ce groupe des familles très connues telles que les flavones et les flavonols. Mais récemment le nombre de publications sur les aurones est en croissance constante.

La structure des aurones est semblable aux autres flavonoïdes. Tout comme les flavones, la chaîne tricarbonée est cyclisée, mais à la différence de ces dernières, le cycle des aurones est un cycle à cinq sommets contre six pour les flavones. La structure peut se décomposer en un cœur de benzofuranone (cycle A et C) lié par une double liaison carbone-carbone à un phényle (cycle B) majoritairement de forme Z.

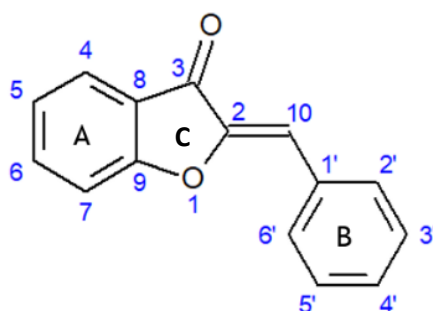


Figure 3 Structure et numérotation des carbones de l'aurone

La plupart des substituants naturels sont en position 4 et 6 sur le cycle A. Les substitutions naturelles sont principalement des groupements hydroxy, méthoxy et glycosyl. En revanche, par voie de la synthèse, des substitutions sur toutes les positions du cycle B et A sont possibles. Il est également envisageable d'insérer un groupement en position 10. La plupart des molécules actives sont substituées en position 5 et 6 du cycle A, même si certaines molécules substituées en 7 ont également été synthétisées. Sur le cycle B, des substitutions sur la totalité des positions ont permis de synthétiser des molécules à intérêt thérapeutique.

2.2.4 Biosynthèse des aurones

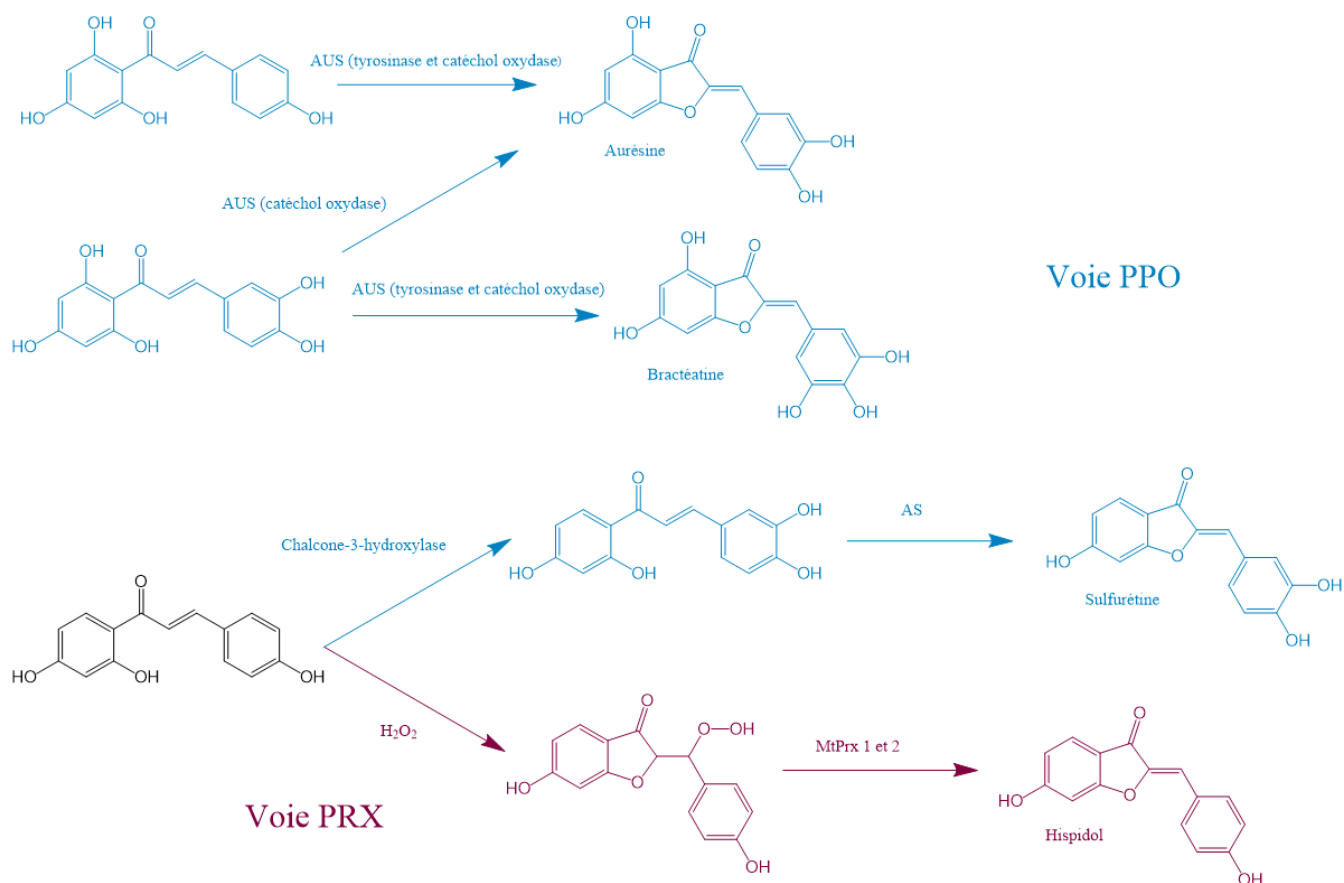


Figure 4 Les deux voies de biosynthèse connues des aurones, en bleu la voie PPO et en rouge la voie PRX d'après Nakayma et al (134)

Peu connues jusqu'au début des années 2000, ce n'est qu'après l'élucidation de la biosynthèse des aurones chez *A. majus* par Nakayma et al (137), que d'autres travaux ont permis de partiellement résoudre les différentes voies de synthèse des aurones chez les végétaux.

On retient à l'heure actuelle deux voies principales de biosynthèse. La première dite voie « PPO » met en jeu des mécanismes enzymatiques via l'aurésidine synthase (AUS), enzyme similaire à la polyphénol oxydase (PPO) et par l'intermédiaire des cytochromes P450. On attribue à cette enzyme une activité catéchol oxydase, capable de convertir des ortho-diphénols en ortho-quinones, ainsi qu'une activité tyrosinase, capable de convertir des monophénols en ortho-diphénols. Le rôle précis du cytochrome n'est pas encore totalement élucidé. Cette voie permet notamment la biosynthèse de l'aurésidine, de la bractréanine et de la sulfurétine par l'intermédiaire de deux chalcones la 2',4',6',4'-tetrahydroxychalcone ou plus couramment appelée THC, et la 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone ou PHC. Ces chalcones sont tout d'abord converties en ortho-quinones puis cyclisées via une oxydation.

La deuxième voie, dite voie « PRX », met cette fois en jeu un mécanisme radicalaire. Elle concerne des aurones mono ou non hydroxylées sur le cycle B à l'instar de l'hispidol. La molécule de départ de cette voie est l'isoliquiritigénine qui forme un radical en position 4'. Cet intermédiaire réagit ensuite avec du peroxyde d'hydrogène, s'en suit une addition de Michael formant une structure dioxétane. Cette forme instable s'ouvre spontanément et résulte en une hydroperoxyde qui sera clivée par des peroxydases MtPRX1 et MtPRX2 puis déshydratée pour donner l'hispidol (figure 5) (138,139).

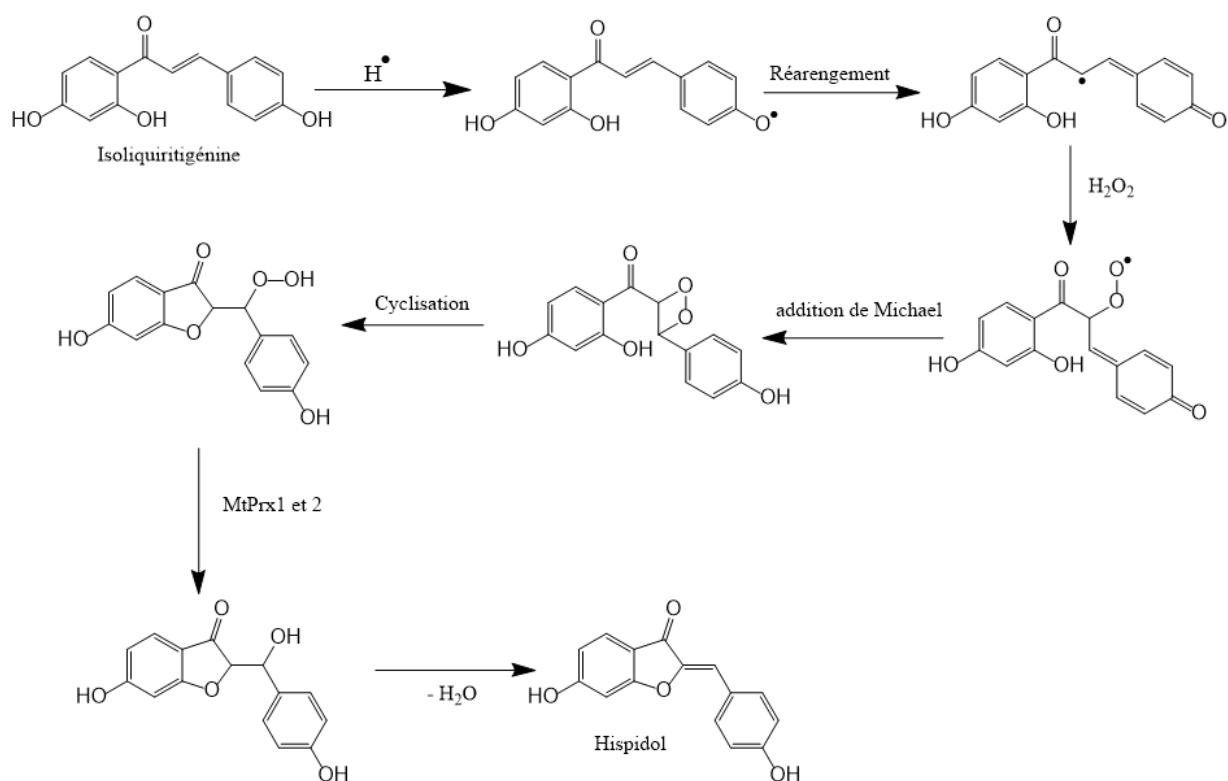


Figure 5 Biosynthèse de l'hispidol via la voie PRX

2.2.5 Potentiel thérapeutique

Longtemps utilisées comme pigment naturel, les aures, comme la plupart des flavonoïdes se sont avérées avoir également d'intéressantes propriétés pharmacologiques. Les études, dont le nombre n'a eu cesse d'augmenter au cours des dix dernières années, ont permis de mettre en valeur leur potentiel. On peut citer par exemple la mise en évidence de leurs effets comme molécules antibactériennes (11), anticancéreuses (140), antioxydantes (141), antivirales (142) ou encore anti-inflammatoires (143,144). Ces différentes activités pharmacologiques ainsi que les mécanismes qui leurs sont associés seront décrits dans la partie suivante.

2.2.5.1 Activité antioxydante

Naturellement riche en groupement hydroxy, les aures sont par nature de bons antioxydants capables d'inactiver les espèces réactives oxygénées (ROS). Le mécanisme qui rentre en jeu lors de cette inactivation est un transfert de proton aux ROS, les rendant ainsi inoffensives pour la structure cellulaire (145). Les deux principaux tests utilisés pour évaluer leur activité inhibitrice des ROS sont le DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) et l'ABTS (2,2'-azinobis (3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate)). Des tests visant à quantifier l'inhibition des anions superoxydes sont souvent faits en complément. Pour cela, un test évaluant la réduction du radical NBT en présence de NADH et de PMS est utilisé. C'est ainsi que Makhmoor *et al*, ont isolé de l'algue brune *Spatoglossum variable* puis synthétisé 2 aures chlorées (A1 et A2) ayant des IC₅₀_{DPPH} de respectivement 54 et 92 µM et une activité anti anions superoxydes (ASO) avec des IC₅₀_{SOA} de respectivement 95 et 87 µM (146). Xiao *et al* ont isolé une autre aure à partir de *Astragalus englerianus* (A3), qui lorsque testée avec le DPPH a une IC₅₀_{DPPH} de 35.9 µM (147).

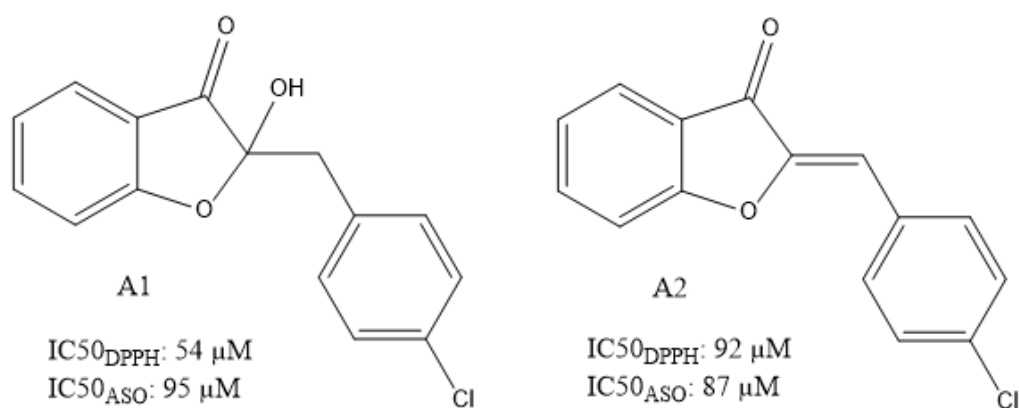


Figure 6 Aurones synthétisées par Makhmoor et al ainsi que leurs activités sur l'ABTS et les anions super oxydes (ASO) (147))

En 2015, Chen *et al* synthétisent une série de ferrocenyl-aurones et les testent à la fois à l'encontre de l'ABTS et du DPPH. Ces composés se sont révélés avoir une excellente activité antioxydante à des constantes de vitesse allant respectivement de 29.61 et 34.54 mM/s sur l'ABTS (A3 et A4) et 4.37 et 4.45 mM/s sur le DPPH (A5 et A6). Dans ce test cinétique, on mesure la vitesse à laquelle les radicaux DPPH et ABTS en présence d'un composé donné sont réduits et on obtient une constante de vitesse k qui permet de connaître la vitesse à laquelle le composé capte les radicaux libres. Plus k est élevée plus le composé est antioxydant (148).

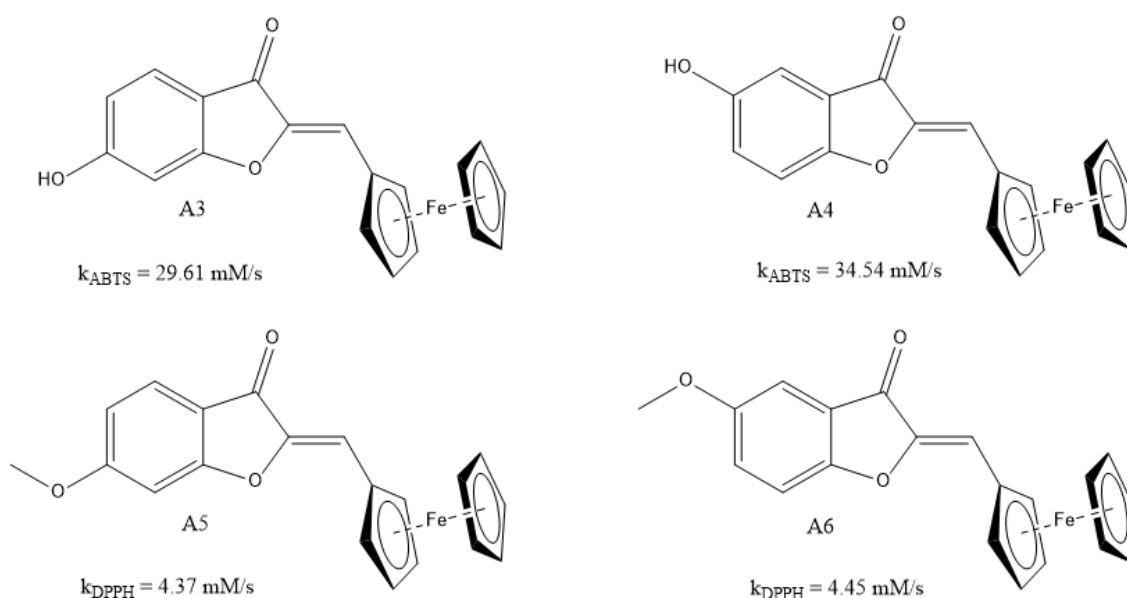


Figure 7 Aurones synthétisées par Chen et al, et leurs cinétiques sur la réduction de l'ABTS et le DPPH (148)

Néanmoins, le caractère antioxydant des aurones ne tient pas qu'à leur capacité à inactiver les ROS. Ainsi en 2009, Detsi *et al* caractérisent leur capacité à inhiber les lipoxygénases (LOX). En effet, ces dernières enzymes sont responsables de l'oxydation des acides gras insaturés comme l'acide arachidonique. Elles jouent un rôle majeur dans les processus pro-inflammatoires. Les composés inhibiteurs de la lipoxygénase sont, la plupart du temps, des antioxydants, puisque ce processus met en jeu des mécanismes radicalaires. Parmi les aurones synthétisées dans cette étude, l'une d'entre elles (A7) s'est avérée être un intéressant inhibiteur de LOX avec une IC₅₀ de 50 μ M (149).

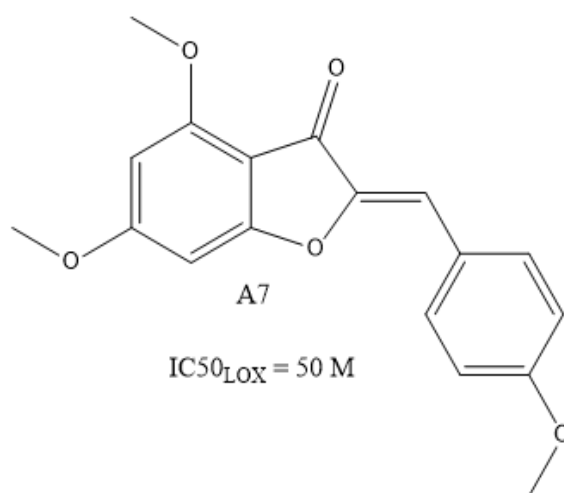


Figure 8 Aurone synthétisée par Detsi *et al* et son IC₅₀ sur la lipoxygénase (LOX) (149)

En 2017, Nigam *et al* mettent en lumière le potentiel antioxydant de deux molécules (A8 et A9) avec des IC₅₀ sur l'ABTS de respectivement 71.67 et 87 μ M. Ces résultats, bien que meilleurs que ceux de la quercétine et de l'acide ascorbique (respectivement 32.75 et 22.13 μ M), sont considérés par les auteurs difficilement comparables aux antioxydants standards car les mécanismes ne seraient pas les mêmes (150).

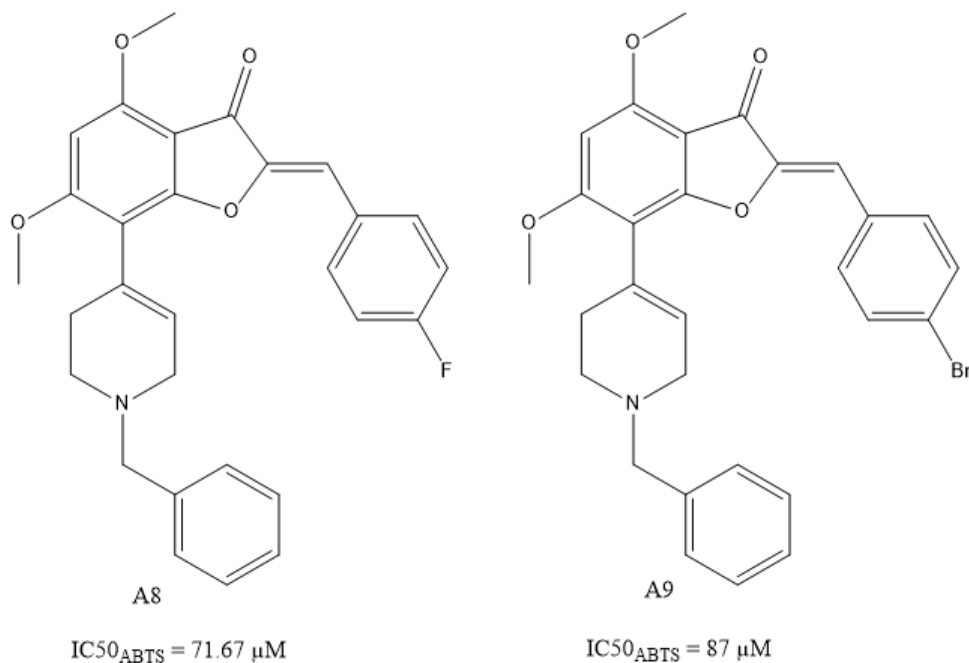


Figure 9 Aurones synthétisées par Nigam et al et leur IC_{50} sur l'ABTS (150)

Cette même année, l'étude de Pan *et al* se concentre sur la capacité des aurones à réduire le fer ferrique en ions ferreux. Ce test est comparable à l'ABTS et au DPPH, et les résultats obtenus entre ces 3 tests sont concordants (151). Les résultats ne sont pas exprimés en pourcentage d'inhibition comme il est usuellement fait avec ce test mais bien en équivalent de vitamine C en mg/mmol. L'équivalence est donnée grâce à une courbe de calibration obtenue à partir d'une série de dilutions de vitamine C (100 à 600 mg/ml). Au cours de cette étude, 6 aurones (A10-15) parmi celles synthétisées ont obtenu de meilleurs résultats comparés au composé témoin, l'acide gallique (335.32 mg/mmol).

À la suite de ces résultats encourageants, les auteurs ont testé la capacité antioxydante *in vivo* sur des cellules PC12 (phéochromocytome de rat) exposées à l' H_2O_2 . Au cours de ces tests, le composé A12 est celui pour qui les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec 85.94% de viabilité cellulaire. Ces résultats ont été confirmés par une cytométrie en flux. Pour les cellules exposées à H_2O_2 sans prétraitement, le taux apoptotique était de 62.7%, contre 5.9% pour le composé A12 et 12.5% pour l'acide gallique (152).

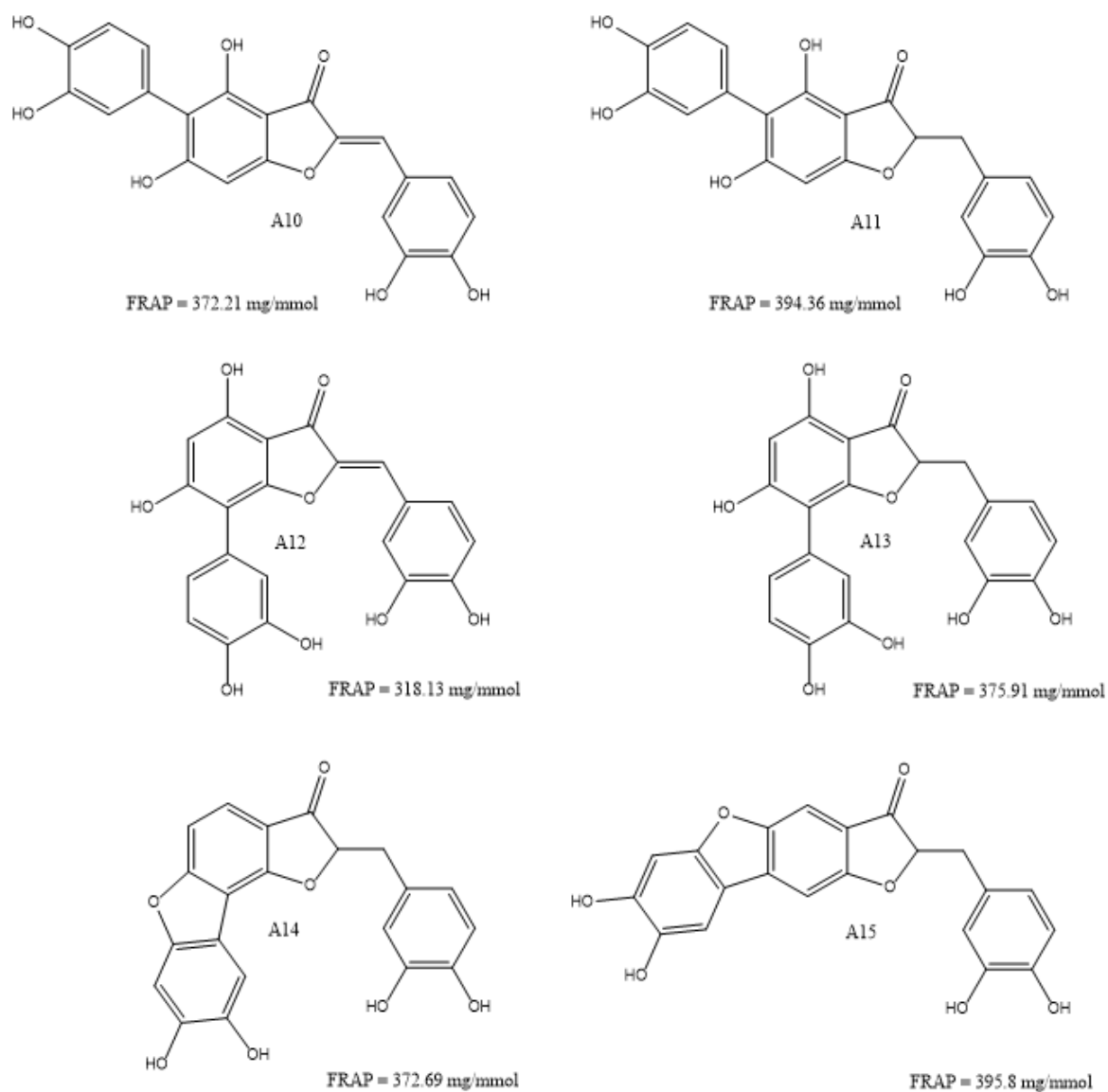


Figure 10 Aurones synthétisées par Pan et al et leur capacité à réduire le fer ferrique (FRAP) exprimée en équivalent de vitamine C (mg/mmol) (151)

En 2018, Nakabo *et al* synthétisent une série de flavonoïdes issues des pétales de *Coreopsis lanceolata* L. et leurs dérivés. Parmi ces flavonoïdes, on retrouve notamment des flavones, des chalcones et surtout des aurones proches de la leptosidine. Parmi les aurones synthétisées, 2 d'entre elles (A16 et A17) se caractérisent par de bon pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH respectivement de 84.2% et 85.8%. Par ailleurs, les composés méthoxylés sur le cycle B se sont avérés être bien moins actifs que les composés hydroxylés comme les composés A16 et A17. Cela semble logique puisque la capacité antioxydante des groupements hydroxy est bien supérieure à celle des groupements méthoxy (153).

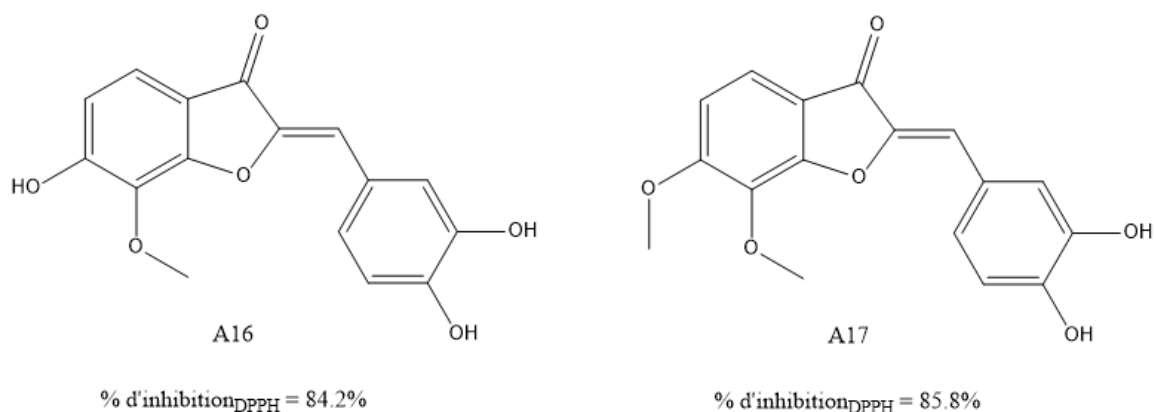


Figure 11 Aurones synthétisées par Nakabo et al et leur pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH (153)

2.2.5.2 Activité antibactérienne

C'est probablement l'un des domaines dans lequel les aurones ont été le moins étudiées. Néanmoins, plusieurs études ont permis de mettre en évidence le potentiel important de cette famille de molécules contre les pathogènes Gram positif.

Olleik *et al* synthétisent (11) en 2019 une série d'hydroxyaurones parmi lesquelles trois en particulier se révèlent être actives contre plusieurs pathogènes Gram positif (B1-B3) et particulièrement sur *MRSA* ($\text{CMI}_{\text{B1}} = 15.6 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B2}} = 15.6 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B3}} = 7.8 \mu\text{M}$), *C. perfringens* ($\text{CMI}_{\text{B1}} = 7.8 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B2}} = 31.25 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B3}} = 31.25 \mu\text{M}$), *C. difficile* ($\text{CMI}_{\text{B2}} = 15.6 \mu\text{M}$), *E. faecalis* ($\text{CMI}_{\text{B1}} = 15.6 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B2}} = 15.6 \mu\text{M}$), *H. pylori* ($\text{CMI}_{\text{B1}} = 15.6 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B2}} = 15.6 \mu\text{M}$) et *P. acnes* ($\text{CMI}_{\text{B1}} = 31.25 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B2}} = 31.25 \mu\text{M}$, $\text{CMI}_{\text{B3}} = 31.25 \mu\text{M}$).

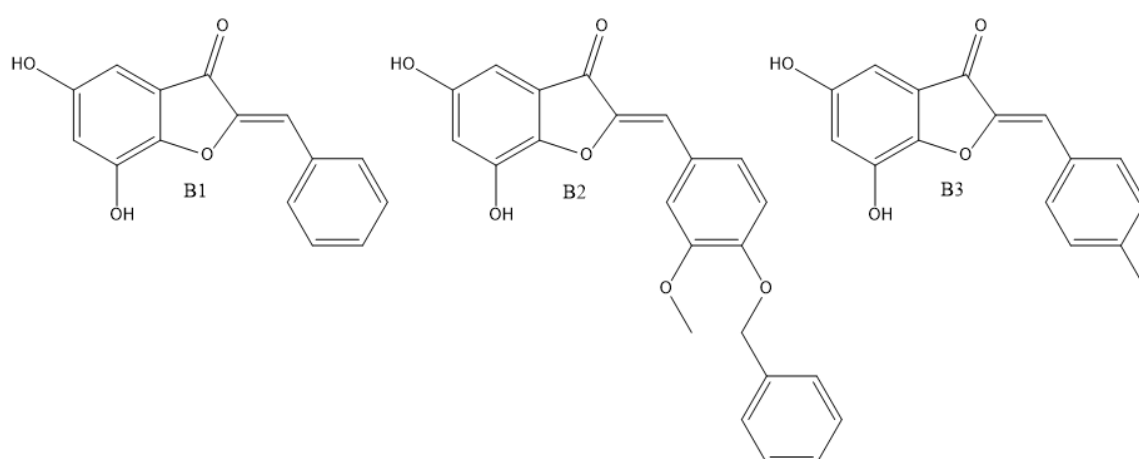


Figure 12 Aurones synthétisées par Olleik et al actives sur plusieurs pathogènes Gram positif (11).

D'autres études ont permis de confirmer le potentiel antimicrobien des aurones contre les pathogènes Gram positif. Ainsi Jardosh *et al* synthétisent une série d'aurones quinoléiques, dont une d'entre elles (B4) à une CMI de 12.5 µg/ml contre *S. aureus* (154).

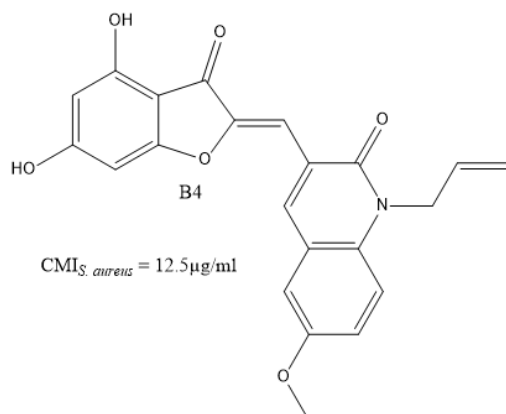
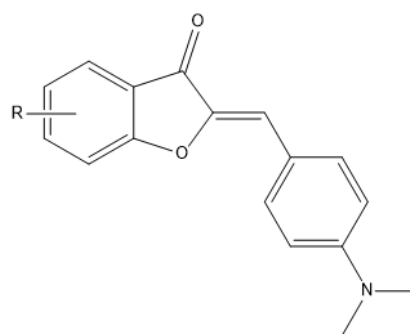


Figure 13 Aurone synthétisée par Jardosh *et al*, active contre *S. aureus* (154)



% d'inhibition sur <i>M. tuberculosis</i> à 100µM:	
R= B5: 6-Cl	84.99%
B6: 6-Br	88.29%
B7: 7-Br	84.44%
B8: 5,6-CH ₃	83.14%

Figure 14 Aurones synthétisées par Yang *et al* et leur pourcentage d'inhibition de *M. tuberculosis* à 100µM (155)

Néanmoins, le spectre d'activité des aurones ne se limite pas aux bactéries Gram positif, mais également aux mycobactéries. Plusieurs criblages d'aurones à l'encontre de *M. tuberculosis*, agent de la tuberculose, ont été publiés. En 2020 Yang *et al* démontrent l'effet de certaines 4'-*N,N*-dimethyl aurones contre *M. tuberculosis*. Parmi les composés synthétisés, des effets antibiotiques ont été observés sur 4 d'entre eux (B5-B8), avec des pourcentages d'inhibition à 100µM variant de 83.14 à 84,99% (155). L'étude de Campaniço *et al* confirme les effets antimycobactériens des aurones. Sur les près de 50 acetylaurones et acetylazaaurones synthétisées, trois sont actives (B9-B11) avec des concentrations minimales inhibitrices entre 0.3 et 0.64 µM. Il est intéressant de noter que la souche testée lors de cette étude est la souche multirésistante H37Rv (156).

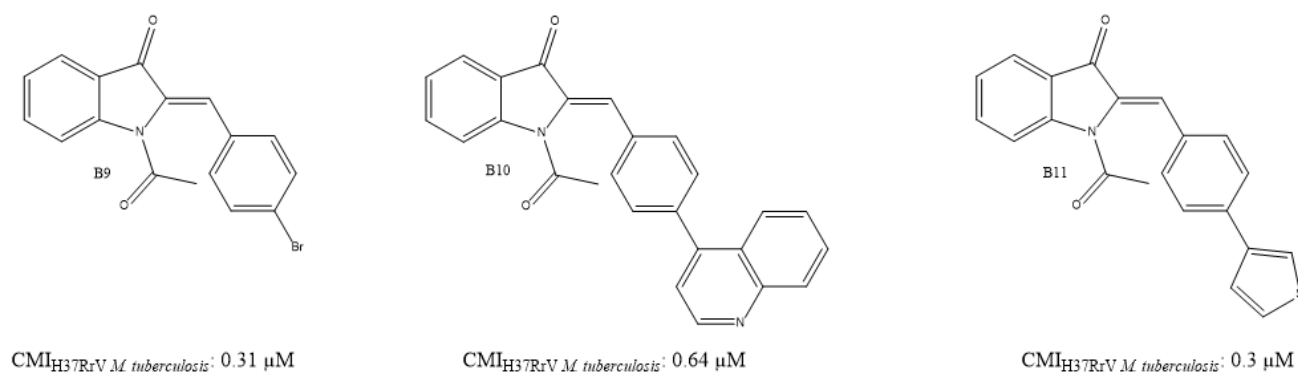


Figure 15 Aurones synthétisées par Campaniço et al, actives contre *M. tuberculosis* H37RrV (156)

2.2.5.3 Activité antivirale

En complément de leur activité antibactérienne précédemment décrite, les aurones possèdent également des propriétés antivirales intéressantes. Par exemple, en 2014, Meguellati *et al* démontrent avoir synthétisé des aurones actives contre le virus de l'hépatite C (HCV) en remplaçant le cycle B classique par des groupements indoles de différentes tailles et substituants (V1-V8) (157). Les études des auteurs sur le mécanisme d'action ont permis de montrer que ces aurones sont capables d'inhiber l'ARN polymérase ARN dépendante de HCV avec des IC₅₀ variant entre 2.2 et 2.7 μM . Soit dit en passant, au cours de cette étude, les auteurs ont également démontré que l'aurésidine, une aurone naturelle donc, avait une IC₅₀ de 5.2 μM sur cette même cible démontrant à nouveau le potentiel antiviral des aurones.

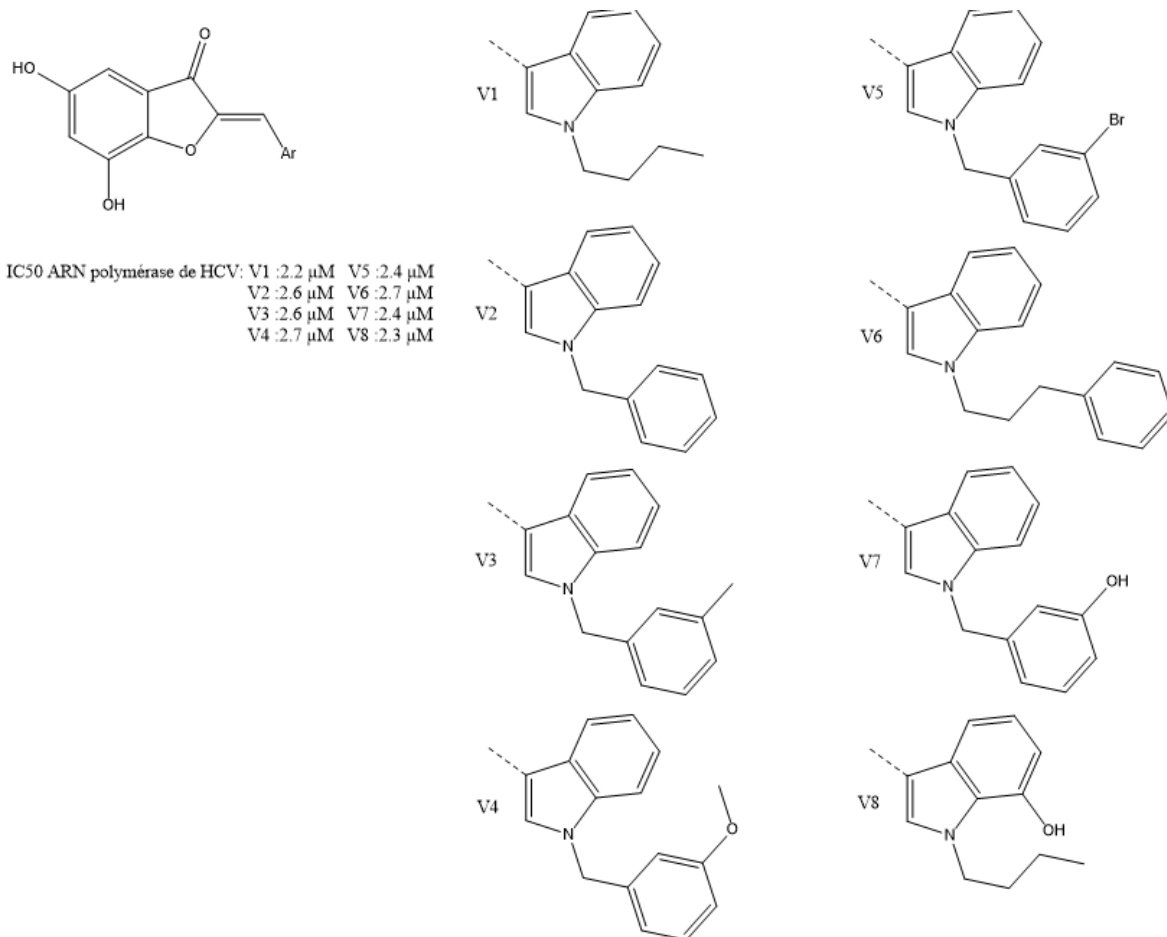


Figure 16 Aurones antivirales synthétisées par Meguellati et al et leur activité sur l'ARN polymérase de HCV (157)

De la même façon, des aurones modifiées sur le cycle C se sont relevées être des molécules prometteuses contre le virus H1N1 en inhibant la neuraminidase virale. En effet, deux études ont permis de mettre en évidence qu'une aurone (V9) possédait une capacité à inhiber l'expression de la neuraminidase de H1N1 avec des IC_{50} de 37.5 μ M (158,159).

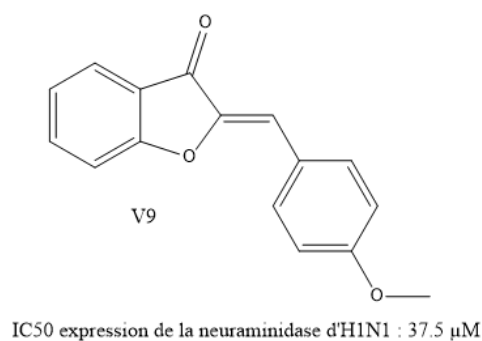


Figure 17 Aurone inhibitrice de la neuraminidase d'H1N1 synthétisée (158,159)

En 2023, Caleffi *et al* synthétisent 25 aurones portant principalement des groupements oxygénés et évaluent leur potentiel à inhiber la réplication de SARS-COV-2 dans des cellules pulmonaires malignes humaines (Calu-3). Parmi les composés synthétisés, 5 ont inhibé de façon prometteuse la réplication virale avec des IC₅₀ comprises entre 0.9 et 0.4 μ M (V10-V14) (160).

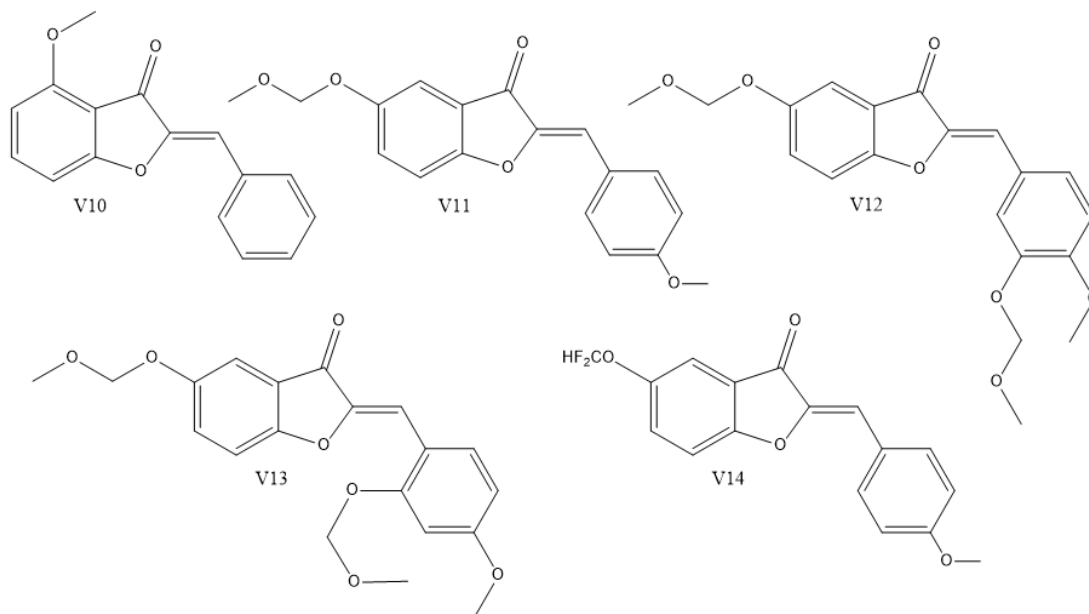


Figure 18 Les 5 aurones synthétisées par Caleffi *et al* capables d'inhiber la réplication de SARS-COV-2 (160)

2.2.5.4 Activité antiparasitaire

Au cours des dernières années, les publications démontrant le potentiel du squelette aurone dans la lutte antiparasitaire se sont multipliées. En 2012, Silva Torres *et al* démontrent *in vitro* et *in vivo* l'efficacité de deux aurones de synthèse (P1 et P2) ayant des IC₅₀ de 34.02 µM contre le ver adulte de *Schistosoma mansoni*. Dans le cas de ces molécules, le cycle B des aurones, habituellement un benzène, est remplacé soit par un furane soit par un indole (161).

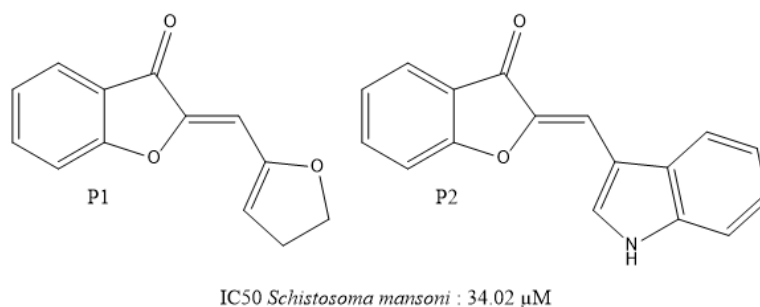


Figure 19 Les deux aurones actives contre *Schistosoma mansoni*, synthétisées par Silva Torres *et al* (161)

D'autres études ont également mis en lumière les capacités anti-leishmaniose des aurones. Roussaki *et al* synthétisent une série de 4,6-diméthoxyaurones. Parmi celles-ci, trois (P3, P4 et P5) se sont révélées posséder une IC₅₀ contre les amastigotes intracellulaires de *L. infantum* de 1.3, 1.6 et 2.1 µM (162). Ces propriétés sont confirmées plus tard par l'étude de Morimoto *et al* en 2014, qui décrit la synthèse d'une 3'-chloroaurone possédant une IC₅₀ de 19.1 µM, cette fois contre *L. donovani* adulte. Par ailleurs, cette étude révèle qu'une des molécules testées précédemment par Roussaki *et al* (P4), a une IC₅₀ de 13.2 µM contre *L. donovani* adulte en complément de son action anti-amastigotes (163).

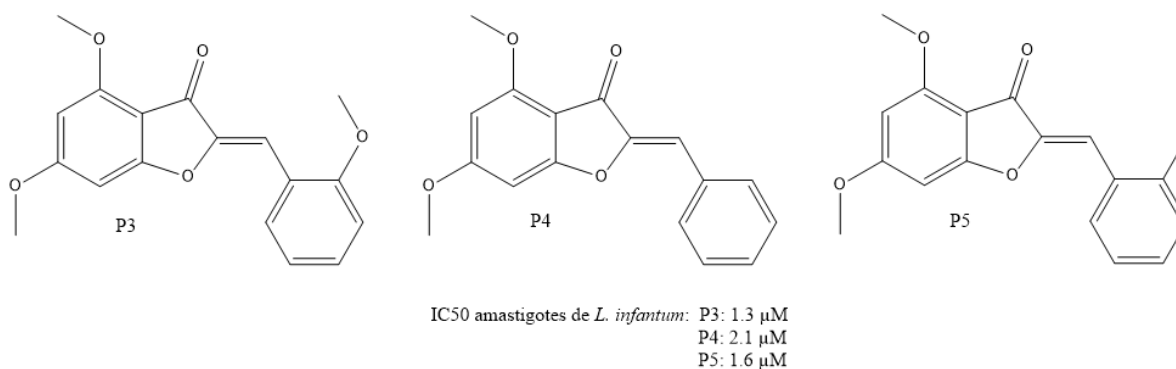


Figure 20 Les aurones synthétisées par Roussaki *et al* actives sur les amastigotes intracellulaires de *L. infantum* (162)

L'étude de Morimoto *et al* explore également les activités antimalariales des aurones. Ainsi le composé précédemment synthétisé par Roussaki *et al* se révèle posséder également une IC₅₀ de 16.9 μ M sur le clone W2 de *P. falciparum* (résistant à la chloroquine).

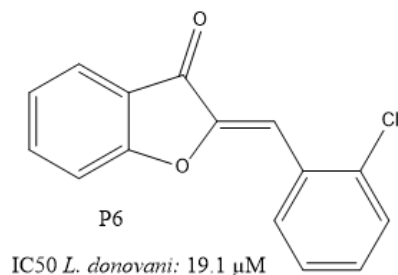


Figure 21 L'aurone active sur *L. donovani* synthétisée par Morimoto *et al* (163)

Un autre composé, la 4,6,3',4'-tetramethoxyaurone, possède une IC₅₀ de 13.9 μ M sur le clone D6 (sensible à la chloroquine) (163). En 2014, Carrasco *et al* synthétisent une chimiothèque de 44 aurones assez variées. Parmi ces dernières, une 3'-benzoaurone (P8), une 6-hydroxy-7-pipéridinoaurone (P7) et une 3'-pyridinoaurone (P9) possèdent respectivement une IC₅₀ de 1.18, 2.31 et 2.56 μ M contre le clone W2 de *P. falciparum* (164).

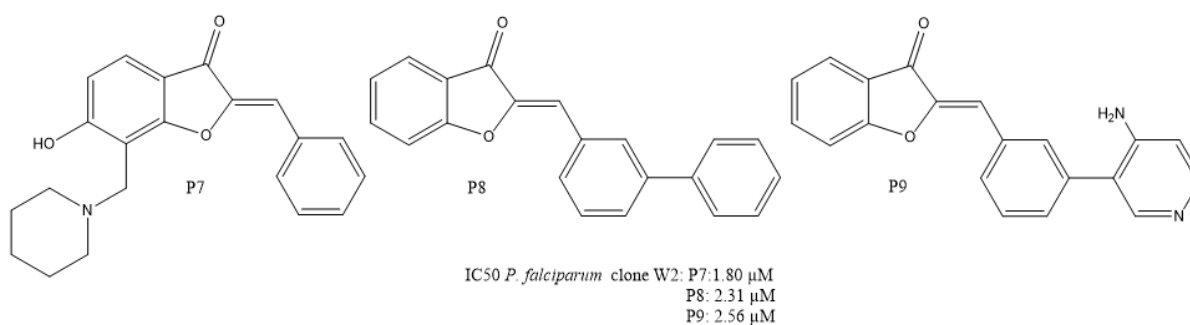


Figure 22 Aurones synthétisées par Carrasco *et al* actives sur le clone W2 de *P. falciparum* (164)

La structure 1-azaurones semble également pouvoir posséder une activité antimalariale. Cela a été mis en évidence, entre autres, par l'étude de Souard *et al.* Dans cette étude, une série de dérivées de la 4,6-methoxy-1-azaurones ont été synthétisées et 3 molécules essentiellement méthylées et méthoxylées (P10, P11 et P12) ont démontré avoir une activité avec des IC50 contre le clone FcM29 (résistant à la chloroquine) de *P. falciparum* entre 1 et 1.9 μM (165).

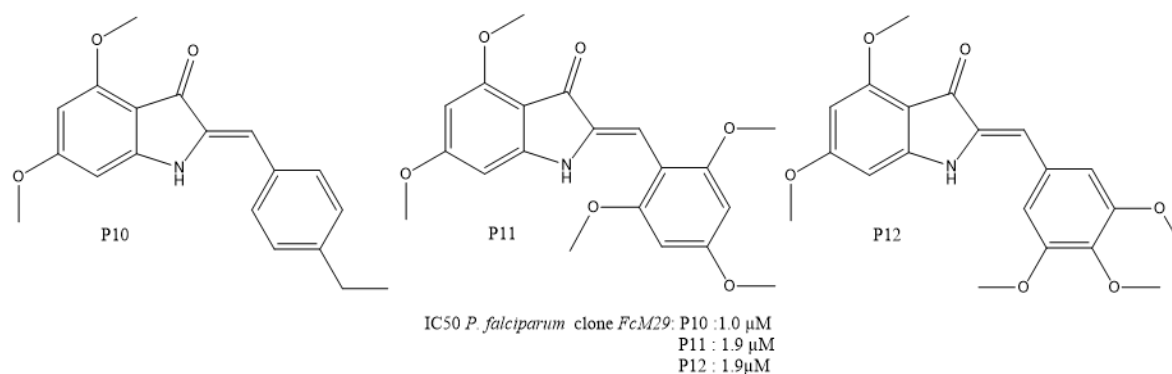


Figure 23 Les 1-azaurones actives sur le clone FcM29 de *P. falciparum* synthétisées par Souard *et al* (165)

2.2.5.5 Activité anti-inflammatoire

Les publications sur les applications anti-inflammatoires des aurones ne sont pas très nombreuses. Néanmoins, en 2017, Zheng *et al* synthétisent une série de dihydropyranoneaurones et évaluent leur potentiel anti-inflammatoire dans des macrophages (RAW 267.4). Le mécanisme mis en avant par les auteurs est l'inhibition de l'expression de l'oxyde nitrique synthase et donc de NO₂ avec des IC50 variant entre 5.22 et 12.23 μM (166).

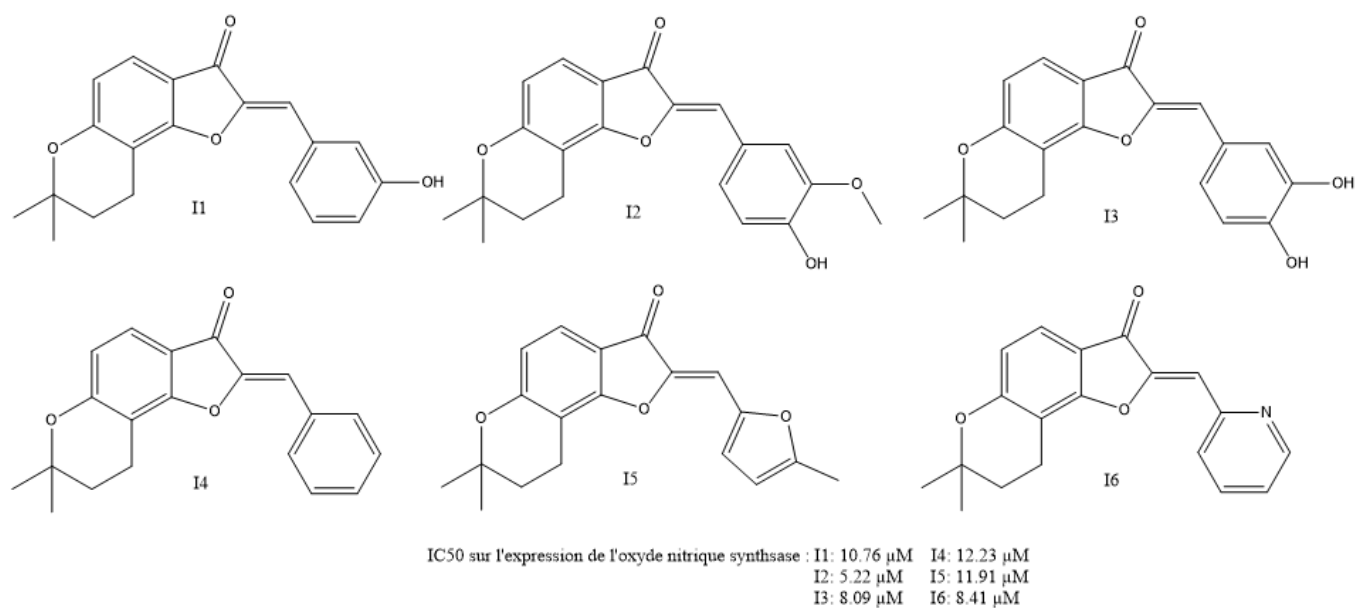


Figure 24 les aurones inhibant l'expression de l'oxyde nitrique synthase synthétisées par Zheng et al (166)

La même année, Park *et al* synthétisent une nouvelle série d'aurones et évaluent leur capacité à inhiber les signaux pro-inflammatoires dans des monocytes humains (THP-1) et des macrophages murins (RAW 267.4) inflammés par contact avec du LPS. Parmi cette série, une aurone (I7) se révèle pouvoir inhiber la sécrétion de TNF α , d'interleukine 1 β et d'interleukine 8 par les monocytes. Les auteurs démontrent ensuite que cela lui est conféré par sa capacité à bloquer la voie NF κ B (167).

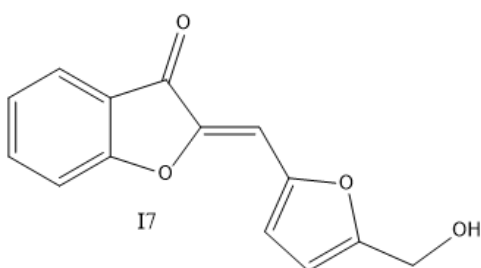


Figure 25 Aurone synthétisée par Park et al, inhibitrice de la sécrétion des monocytes du TNF α , IL-1 β et IL-8 (167)

2.2.5.6 Activité anticancéreuse

Les cancers sont un groupe de pathologies qui impliquent la prolifération incontrôlée de cellules malignes et invasives. En 2018, 10 millions de personnes en sont décédés, tout type de cancer confondus (168). C'est donc en toute logique que plusieurs équipes ont tenté d'exploiter le potentiel anticancéreux des aurones. En 2013, Monserrat *et al* ont synthétisés plusieurs ferrocenylaurones et les testent contre des cellules de mélanomes murins B16. Parmi les composés synthétisés, 4 (C1-4) affichent d'intéressantes activités avec des IC₅₀ variant entre 12 et 18 μ M (169). Ces composés sont tous porteur d'au moins un atome halogéné (Fluor, Chlore et Brome), ce qui pourrait indiquer leur importance dans les mécanismes des aurones anticancéreuses.

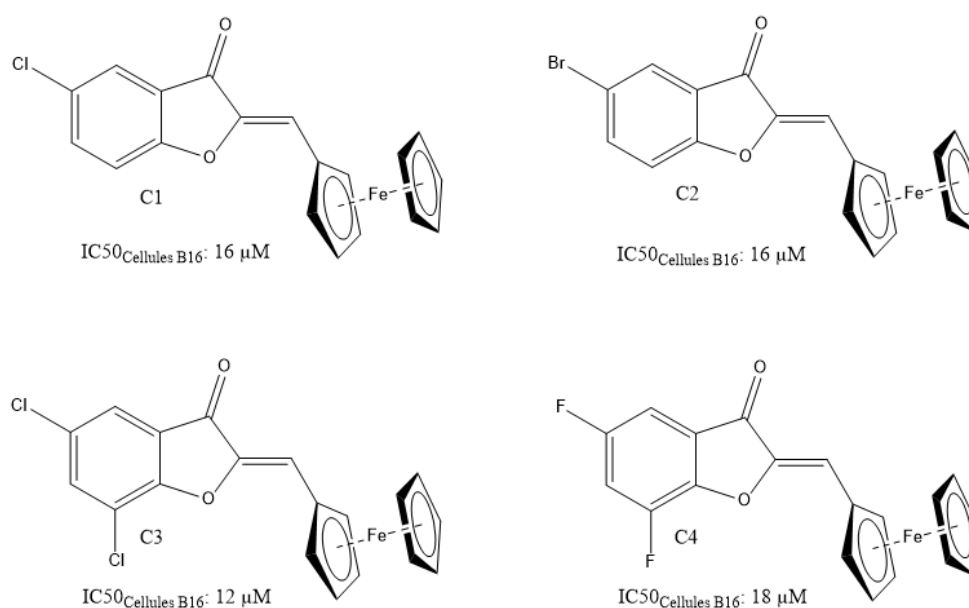


Figure 26 Ferrocenylaurones synthétisées par Monserrat *et al*, et leur IC₅₀ sur des cellules de mélanomes murins (B16) (169)

En 2015, Zheng *et al* ont testé sur des cellules HL-60 de leucémie et HT-29 d'adénocarcinome colorectal une série de trifluorométhylaurones. Parmi ces composés, 6 aurones (C5-10) ont été identifiées comme les plus prometteuses avec des IC₅₀ sur les cellules de leucémies allant de 1.54 à 3.53 μ M et des IC₅₀ sur les cellules colorectales allant de 4.12 à 9.12 μ M. Ces aurones ont toutes d'ailleurs de meilleures IC₅₀ que le 5-fluorouracil sur ces cellules (170).

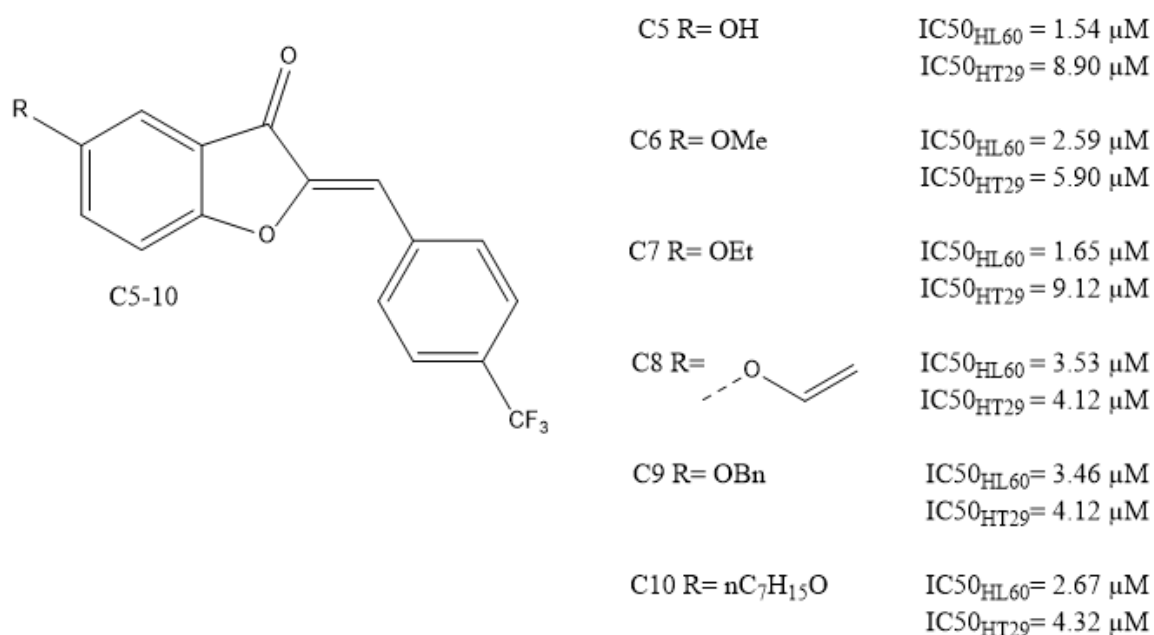


Figure 27 Aurones synthétisées par Zheng *et al*, et leur activité sur les cellules de leucémies HL-60 et d'adénocarcinome colorectal (HT-29) (170)

En 2018, Hassan *et al* mettent en lumière le potentiel des furoaurones dans la lutte contre les cancers en synthétisant un composé (C11) actif à la fois sur les cellules de leucémies (K562) et sur les cellules de mélanomes (MDA-MB-435). En effet, C11 possède une IC₅₀ de 1.11 μM sur les cellules de leucémies, et de 1.14 sur les cellules de mélanomes. Les études de mécanistique menées par l'équipe semblent indiquer que la cible soit la voie de CDK2 (171).

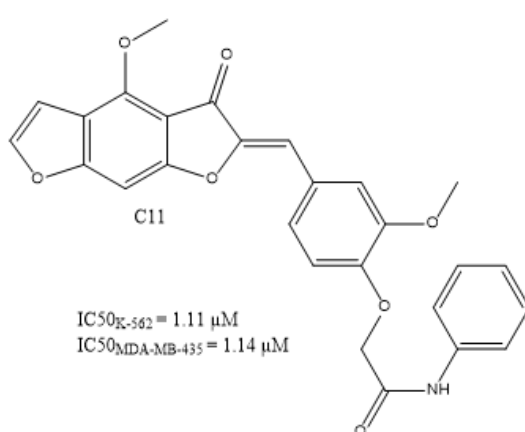


Figure 28 Furoaurone synthétisée par Hassan *et al*, et son activité à l'encontre de cellule leucémique (K562) et de mélanome (MDA-MB-435) (171)

La polymérisation de la tubuline est un mécanisme souvent utilisée dans les traitements antitumoraux. Ainsi, en 2019, l'équipe de Xie *et al* a synthétisé une série d'aurones (C12 et C13) parmi lesquelles 2 possèdent des IC₅₀ sur des cellules de cancer de la prostate PC-3 de souris de 66 et 58.7 μ M respectivement. De plus, ces molécules ont également été efficaces en *in vivo* sur ces mêmes souris sans affecter leur état de santé global (172).

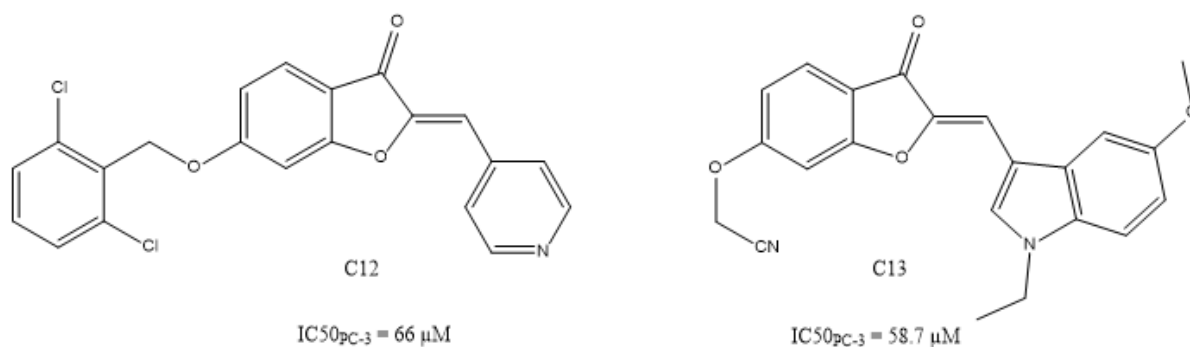


Figure 29 Aurones synthétisées par Xie *et al* et leur activité sur les cellules de cancer de la prostate (PC-3) (172)

En 2020, Toth *et al* synthétisent une série d'azaurones et les ont testées sur des cellules de sarcome utérin humain (MES-SA). Parmi les composés synthétisés ; 4 (C14-C17) ont démontré un intéressant potentiel anticancéreux avec des IC₅₀ variant entre 17. 8 et 9.2 μ M. De plus, après avoir sélectionné les meilleures molécules, les auteurs les ont testées sur des cellules dites MDR, donc multi résistantes dérivées des MES-SA, les MES-SA/Dx5. Ces cellules semblables aux premières sont habituellement moins sensibles. En revanche, il est intéressant de noter que le composé le plus actif du premier screening, C17, est dans ce deuxième cas jusqu'à 5 fois moins actif que certains des autres composés (3.4 μ M pour C16 contre 19.5 μ M pour C17). Ces composés ont d'ailleurs été comparés à leurs équivalents aurones et sont beaucoup plus actifs, cela tendrait à indiquer que l'atome d'azote en position 1, jouerait un rôle crucial dans l'activité de la molécule (173).

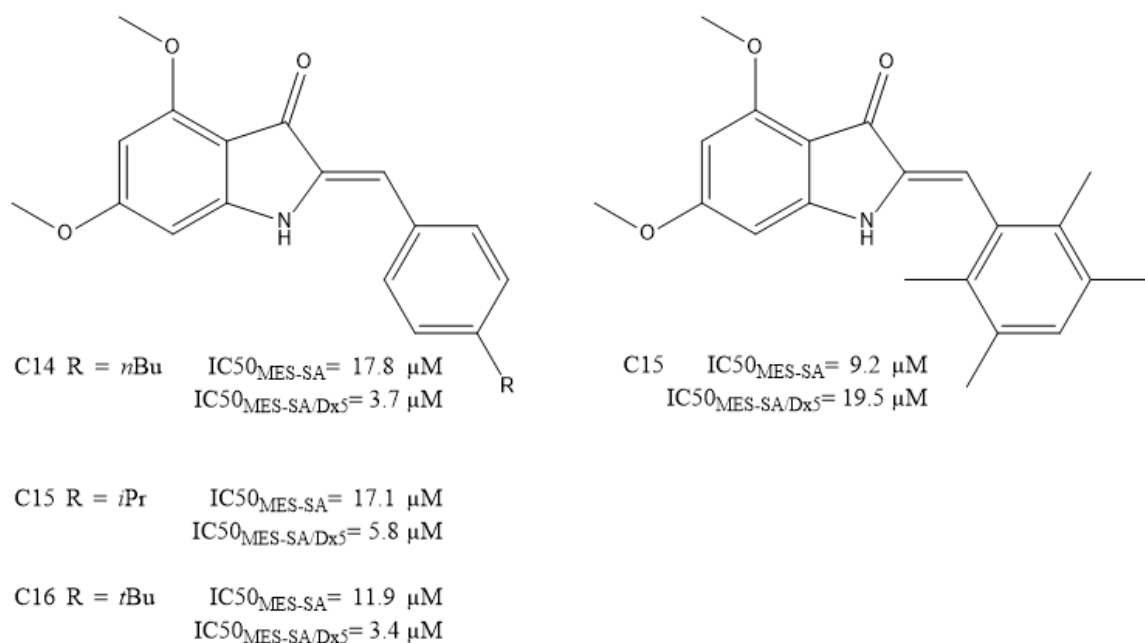


Figure 30 Aurones synthétisées par Toth et al, et leur activité à l'encontre des cellules de de sarcome utérin humain (MES-SA) et leur variant multi résistant (MES-SA/Dx5) (173)

Les aurones sont donc une famille de molécules riches en activités pharmacologiques. La possibilité de faire varier facilement les deux cycles permet une grande variété de combinaisons, et ainsi l'optimisation de l'effet recherché. De par leur nature, leurs effets sont similaires à ceux des autres membres des flavonoïdes mais la plus grande flexibilité qui leur est conférée par la présence d'un cycle à 5 carbones plutôt qu'à 6 carbones est probablement l'une des raisons de leur meilleure activité. Il existe une grande variété de voies de synthèse des aurones qui seront présentées dans la section suivante.

2.2.6 Synthèse chimique des aurones

Comme explicité précédemment, l'occurrence et la diversité des aurones chez les plantes est faible, l'extraction de ces dernières serait donc, peu intéressante et peu variée. Ainsi, plusieurs voies de synthèse (figure 31) ont été élaborées au cours du temps et ont permis de diversifier les substitutions possibles. La section qui vient a pour but de décrire ces différentes voies.

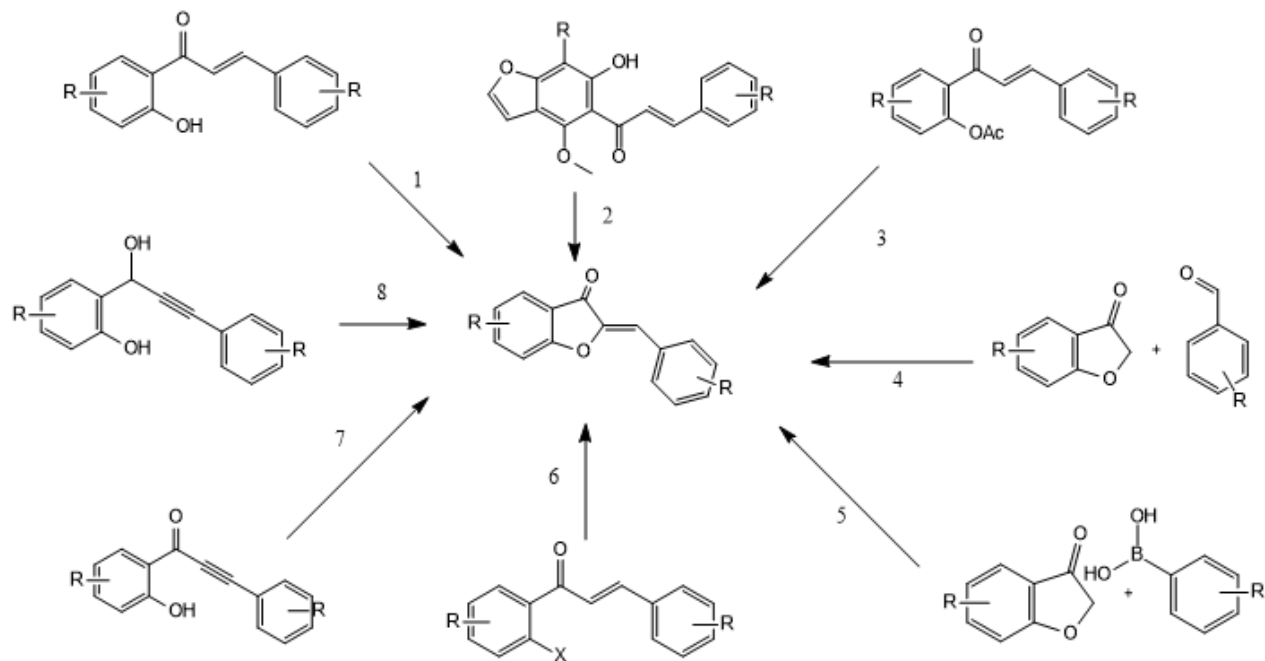


Figure 31 : Les différentes voies de synthèse des aurones

2.2.6.1 Synthèse à partir de dérivés de chalcones

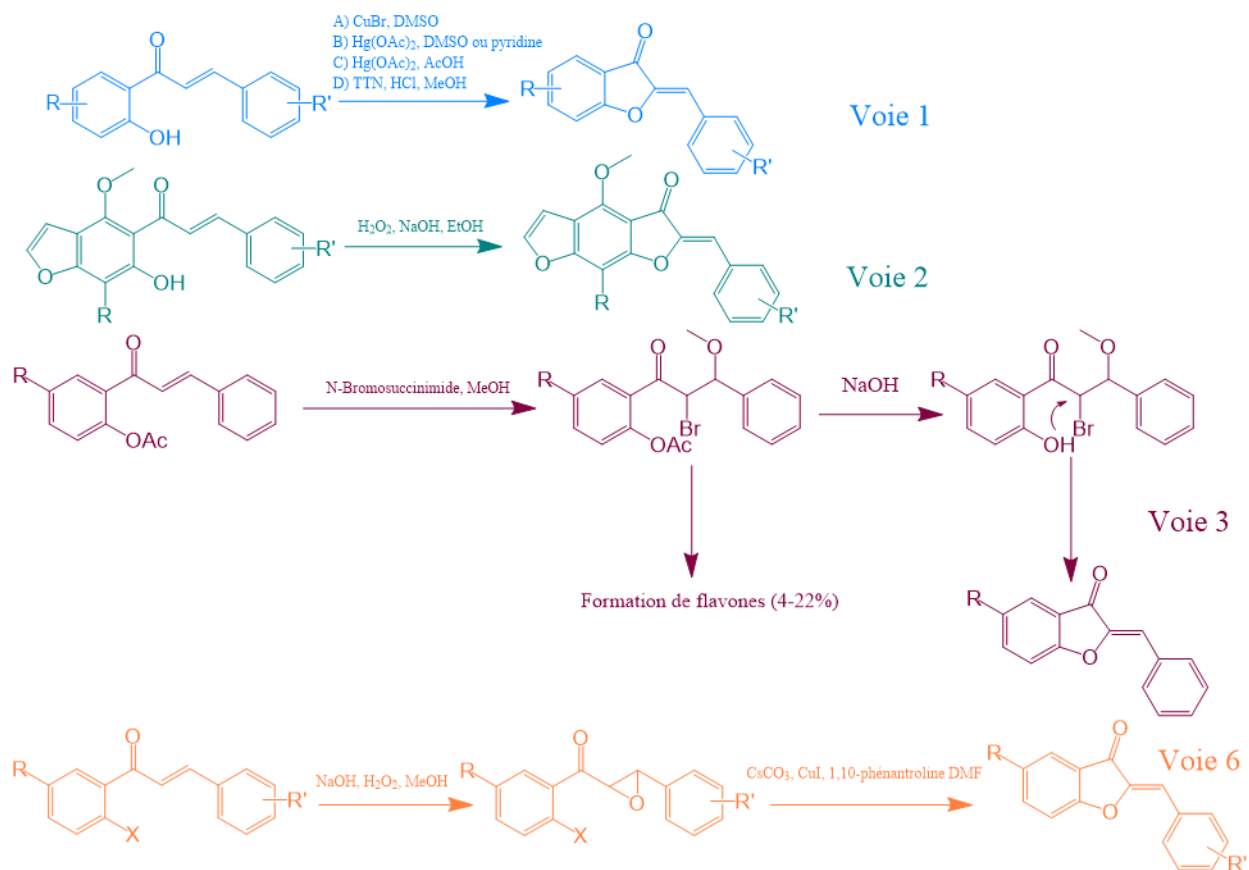


Figure 32 Voies de Synthèse 1 à 4 de dérivés d'aurones à partir des chalcones et de leurs dérivés.

La voie la plus communément utilisée est la voie qui s'inspire de la biosynthèse naturelle par les plantes en cyclisant la chalcone correspondante. La première méthode identifiée en 1988 implique la cyclisation de la 2'-hydroxychalcone à l'aide d'acétate de mercure (III) dans l'acide acétique (174). Plus tard, d'autres méthodes sont mises au point, il est possible de remplacer par exemple l'acide acétique par de la pyridine ou du diméthylsulfoxyde (DMSO), le rendement est alors supérieur. La cyclisation de la 2'-hydroxychalcone à l'aide de bromure de cuivre dans le DMSO (175) est également une méthode éprouvée. Une dernière alternative propose d'utiliser le trinitrate de thallium (III) (TTN) en milieu acide dans le méthanol (176) (Voie 1, **bleue**). L'utilisation de la 2'-hydroxychalcone comme produit de départ n'est pas la seule voie possible. Une alternative est la voie utilisant la 2'-hydroxyméthoxychalcone. Une autre solution est la voie utilisant la 2'-acétoxychalcone en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) dans le méthanol. Cette réaction permet de former un intermédiaire bromé qui, dans un milieu basique, permet de donner une aurone (Voie 3, **magenta**) (177).

D'autres méthodes utilisent des dérivés de la 2'-hydroxychalcone, comme par exemple à partir de dérivé de la 6'-methoxy-2'-hydroxychalcone en présence de peroxyde d'hydrogène en milieu basique (Voie 2, [verte](#)) (178). Une autre alternative est l'utilisation de la 2'-halogénochalcone, d'abord par son époxydation en milieu basique en présence de peroxyde d'hydrogène, puis sa cyclisation en aurone en présence de carbonate de césium et d'iodure de Cuivre dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF), La 1,10-phénantroline jouant un rôle de catalyseur (Voie 6, [orange](#)) (179).

2.2.6.2 Synthèse à partir de dérivés d'alkynoylphénols

Une alternative à l'utilisation de chalcones pour la synthèse d'aurones est l'usage de d'alkynoylphénols. Garcia *et al* ont mis en évidence une méthode permettant de synthétiser des aurones en milieu basique en présence de carbonate de potassium ou d'éthanolate de sodium dans l'éthanol (180). Plus tard, d'autres voies alternatives seront réalisées, en utilisant la tributylsulfine dans le DCM (181), le carbonate de Césium dans l'acétone (182) ou encore du nitrate d'argent dans le méthanol (183). Cette dernière méthode présente l'avantage de produire exclusivement des aurones. Les autres voies produisant entre 4 et 18% de flavones (voie 7, [violette](#)).

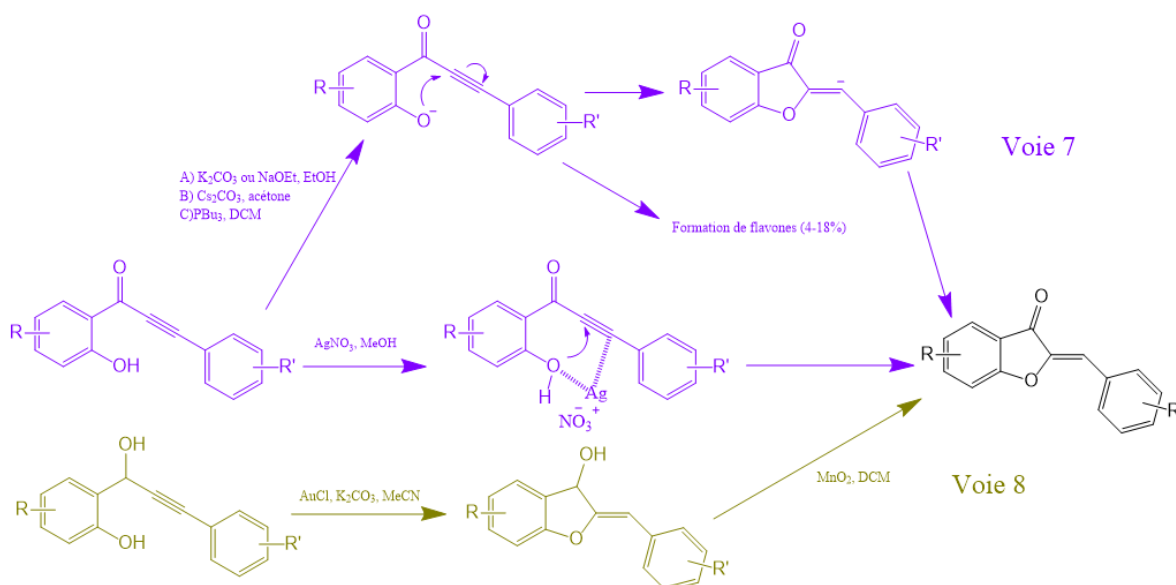


Figure 33 Voies de synthèse 7 à 8 de dérivés d'aurones à partir d'alkynoylphénols et de dérivés

Il est également possible d'obtenir des aurones en utilisant une voie mettant en jeu le 2-(1-hydroxyprop-2-ynyl)phénol en présence d'or et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile (voie 8, **ocre**) (184).

2.2.6.3 Autres voies de synthèse

Il existe néanmoins d'autres voies utilisant des intermédiaires telle que les benzofuranones avec les benzaldéhydes. Cette méthode est la plus couramment utilisée en raison de son efficacité, de son rendement et du fait que de nombreux benzaldéhydes soient disponibles commercialement. Elle peut se faire en milieu acide (185), en milieu neutre avec de l'alumine dans le DCM (186) ou à l'aide d'hydroxyde de baryum par application de force de frottement (187) ou le plus souvent en milieu basique avec de l'hydroxyde de potassium dans l'éthanol ou le méthanol (188). Il existe une alternative mettant en jeu un solvant eutectique de chlorure de choline et d'urée avec un ratio 1 : 2 à la place de l'éthanol (voie 4, **rose**) (189).

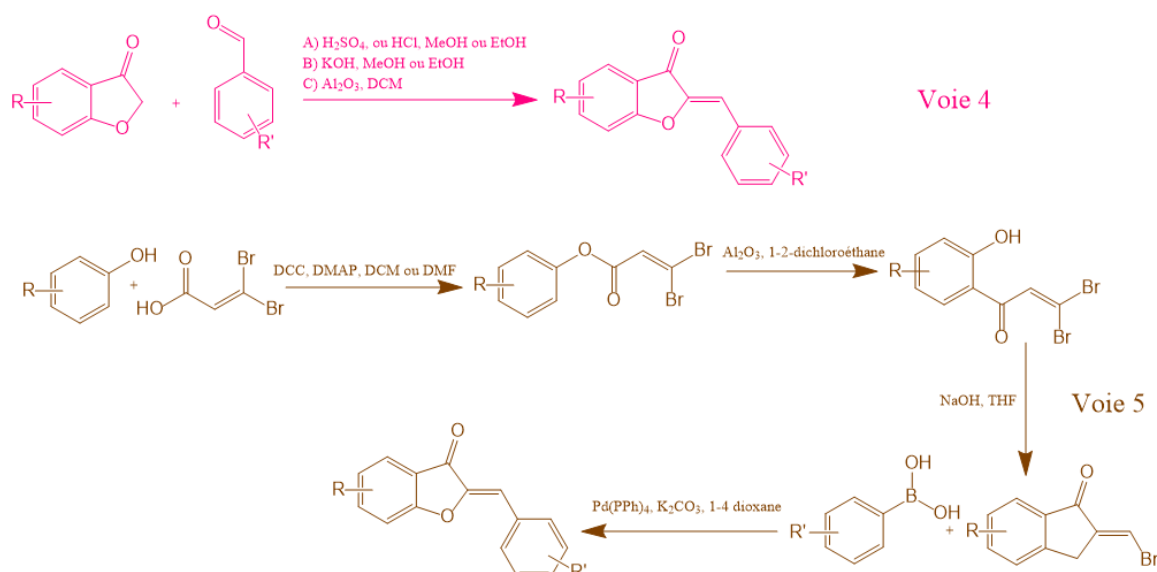


Figure 34 Voies de synthèse 4 et 5 de dérivés d'aurones. La voie 4 utilise comme précurseurs une benzofuranone et un benzaldéhyde. La voie 5 est un couplage de Suzuki-Miyaura entre des acides phénylboroniques et des dérivés bromés de benzofuranones.

La dernière et principale méthode pour synthétiser des aurones utilise le couplage de Suzuki-Myaura entre des acides phénylboroniques et des dérivés du (Z)-2-bromométhylènebenzofuran-3(2H)-one. Afin de synthétiser ces derniers, des dérivés phénoliques et des dérivés dibromés d'acide acrylique sont couplés puis réarrangés avec la méthode de Fries en présence d'alumine dans le DCM. S'en suit une déshalogénéation en milieu basique dans le tétrahydrofurane (THF) (voie 5, [marron](#)) (190).

En conclusion, il existe une grande multitude de méthodes pour synthétiser des aurones. Cette importante diversité permet non seulement d'avoir d'excellents rendements, mais également de synthétiser une grande variété d'aurones différentes. En revanche, plusieurs de ces voies de synthèse entraînent la formation de d'autres flavones en parallèle, seule la voie utilisant les benzofuranones fait exception. Cette voie a, par ailleurs, également l'avantage de ne pas utiliser de métaux souvent toxiques et coûteux. C'est la méthode que nous avons retenue pour la suite de ces travaux.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Chimie

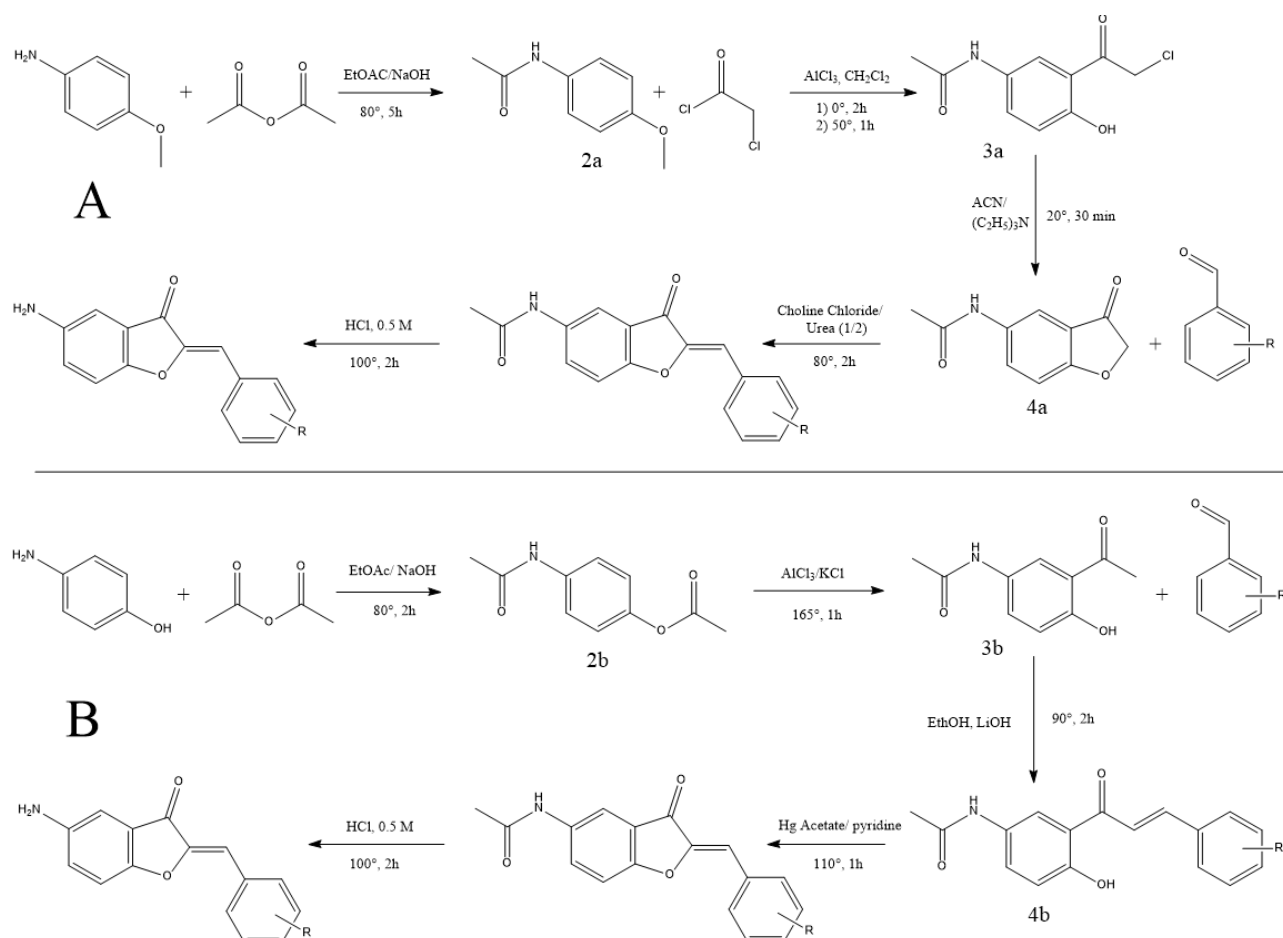


Figure 35 Les deux voies utilisées pour la synthèse des 5-acétamidoaurones et 5-aminoaurones. La voie A met en jeu une condensation entre une benzofuranone et un benzaldéhyde. La voie B, elle, emploie une cyclisation de la chalcone correspondante

Les dérivés des aurones ont été synthétisés par deux voies principales. Soit par cyclisation de la chalcone correspondante en utilisant l'acétate de mercure dans la pyridine avec des rendements variant de 47 à 87%, soit par condensation de Claisen-Schmidt des benzofuranones et des benzaldéhydes correspondants dans un solvant polaire, par catalyse basique ou acide.

3.1.1 Synthèse par la condensation de Claisen-Schmidt

Pour la première méthode (A) on ajoute 1 équivalent de benzaldéhyde et 1 équivalent de benzofuranone dans 20 ml de solvant eutectique de type chlorure de choline/urée au ratio 1 : 2, avec 3 ml de solution de KOH à 50%. Laisser réagir, sous agitation, 2h à 80°, tout en suivant la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM). Une fois que la réaction est totale, ajouter 50 ml d'eau et 5 ml d'une solution de HCl à 1M. Laisser précipiter pendant 1h et filtrer. Laver si besoin la poudre obtenue à l'éther. Une poudre variant dans des nuances allant du jaune ou rouge en fonction des substituants est obtenue avec des rendements de 40 à 78%.

3.1.2 Synthèse par la voie des chalcones

Pour la seconde méthode (B), la chalcone est obtenue en faisant réagir 1 équivalent de benzaldéhyde avec 1 équivalent d'une acétophénone dans 7,5 ml d'éthanol. Après une brève agitation et dissolution des réactifs dans l'éthanol, ajouter 2,5 ml de solution d'hydroxyde de potassium à 50%. Laisser réagir 24h à température ambiante ou 2h à 90°. L'évolution de la réaction est évaluée par CCM. Une fois la réaction totale, ajouter 20 ml d'eau froide et 5 ml d'une solution d'acide chloridrique à 1M. Filtrer ensuite sous vide le précipité obtenu. Laver si nécessaire à l'acétate d'éthyle. Une poudre variant dans des nuances allant du jaune au rouge selon les substituants est obtenue avec des rendements entre 47 et 72%.

Ajouter ensuite la chalcone obtenue à 20 ml de pyridine et 1.1 équivalent d'acétate de mercure. Sous agitation laisser réagir 1h à 110°. Une fois la réaction totale, arrêter l'agitation afin de faire précipiter les sels de mercure au fond du ballon. Une fois que ceux-ci ont précipité, récupérer la solution de pyridine en veillant à éliminer le plus possible de sels de mercure. Ajouter 20 ml d'eau et 5 ml d'HCl, laisser précipiter pendant plusieurs heures, une poudre jaune ou rouge précipite. La rincer plusieurs fois à l'eau afin d'éliminer toute la pyridine et le mercure. Si nécessaire, solubiliser le mélange dans le DMSO, pour faire précipiter les restants de sel de pyridine et de mercure. Une poudre jaune ou rouge selon les substituants est obtenue avec des rendements variants de 77 à 87%.

Les molécules synthétisées lors de cette étude ainsi que leurs substitutions sont listées dans le tableau 1.

	STRUCTURE	5	6	2'	3'	4'	5'
1		acétamido	/	/	benzyloxy	/	/
2		acétamido	/	/	/	benzyloxy	/
3		amine	/	/	benzyloxy	/	/
4		amine	/	/	/	benzyloxy	/
5		acétamido	/	isopropoxy	/	/	/
6		acétamido	/	/	isopropoxy	/	/
7		acétamido	/	/	/	isopropyl	/
8		amine	/	isopropoxy	/	/	/
9		amine	/	/	isopropoxy	/	/
10		amine	/	/	/	isopropoxy	/
11		/	amine	/	/		/
12		/	/	benzyloxy	/	benzyloxy	/

Tableau 1 Aurones synthétisées et leur structure

3.2 Evaluation des activités biologiques des aures

3.2.1 Evaluation des activités antimicrobiennes

3.2.1.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les bactéries utilisées sont des souches de référence provenant de la « the American Type Culture Collection » (ATCC) et de la « German collection of microorganism and cell culture » (DSMZ). Les bactéries Gram négatif utilisées sont : *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* EHEC (ATCC K88), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Acinetobacter baumannii* (CIP 103572), *Acinetobacter baumannii* résistante (CIP 110431), *Klebsiella pneumoniae* (DSM 26371), *Salmonella enterica* (CIP 80.39). Les bactéries Gram positif utilisées sont : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus subtilis* Nisin resistant (DSM 347), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC BAA-1717), *Listeria monocytogenes* (DSMZ 20600), *Micrococcus luteus* (DSM 20030), *Bacillus cereus* (DSM 31), *Enterococcus faecalis* vancomycin résistante (DSM 13591). Les bactéries anaérobies utilisées sont : *Clostridium difficile* (DSMZ 1296), *Clostridium perfringens* type A (ATCC 13124), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504), *Clostridium coccoïdes* (DSM 935), *Clostridium botulinum* (DSM 1985), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Streptococcus pyogenes* (DSM 20565). Les champignons utilisés sont : *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), comme modèle de mycobactérie, *Aspergillus niger* (ATCC 9142), *Candida albicans* (DSM 10697).

3.2.1.2 Principe

Les méthodes de dilution utilisées pour déterminer la CMI sont considérées comme les méthodes de référence pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens. (191) (192)

Dans cette étude, la CMI a été évaluée par la méthode de micro-dilution des aures dans un milieu liquide de bactéries selon les recommandations de « the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) » comme décrit précédemment.

3.2.1.3 Protocole

Pour les bactéries aérobies : 30 μ L de la culture bactérienne ont été transférés dans 3 mL du milieu Mueller Hinton (MH) frais puis incubés à 37 °C, 200 rpm, toujours dans des conditions micro aérophiles.

Pour les bactéries anaérobies : 30 μL de la culture bactérienne ont été transférés dans 3 mL du milieu cœur cerveau (BHI) frais puis incubés à 37 °C, 200 rpm, toujours dans des conditions anaérobies.

Dans tous les cas, une fois que la densité optique (DO) de la suspension bactérienne, mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 600 nm, est égale à 1 (c'est-à-dire 10^{8-9} bactéries/mL) une dilution au 1/10 000 a été faite dans du milieu BHI/MH frais afin d'obtenir une suspension de bactéries approximativement à 10^{4-5} bactéries/mL.

L'inoculum a été réparti sur une plaque stérile à fond plat en polypropylène à 96 puits (Greiner BioOne) de façon à avoir 100 μL de suspension bactérienne par puit. Dans les puits de la première colonne, 100 μL supplémentaires ont été ajoutés afin d'obtenir un volume final de 200 μL .

Les solutions des différentes molécules sont préparées à la concentration de 100 mM dans du DMSO.

Chaque aurone à tester a été ajoutée à un puit de la première colonne à une concentration initiale bien déterminée. Ensuite, les composés ont été dilués en série au demi en utilisant une pipette multicanaux (Eppendorf Research plus 8 channel pipette ES-8-300), en partant du premier puit jusqu'au 11^{ème} puit de façon à avoir une gamme de 11 concentrations décroissantes pour chaque composé testé par dilution au 1/2. La dernière ligne de la plaque ne contenant que les bactéries diluées dans le milieu de culture MH ou BHI selon la souche, sans aurone était considérée comme un contrôle non traité.

Les plaques ainsi préparées ont été incubées à la température optimale de croissance des bactéries, à 37°C pendant 18-24 h dans des conditions, si nécessaire, micro-aérophiles générées par BD GasPak system.

À la suite de l'incubation, la CMI est déterminée par une inspection visuelle : elle correspond à la plus faible concentration en aurone inhibant totalement la croissance bactérienne

3.2.2 Evaluation de la toxicité

3.2.2.1 Espèces cellulaires et condition de culture

La toxicité des aurones sur les cellules humaines a été évaluée en utilisant un test à la Résazurine comme décrit précédemment (193–195). Les lignées cellulaires humaines utilisées dans le cadre de ces travaux sont BEAS (ATCC CRL-9609), Caco 2 (ATCC HTB-37), HepG2 (ATCC

HB-8065), HaCaT, HUVEC, IMR90, A498, qui correspondent respectivement à des cellules humaines épithéliales pulmonaires, épithéliales intestinales, des cellules hépatiques, des kératinocytes, de l'épithélium vasculaire, des fibroblastes pulmonaires et des cellules épithéliales rénales. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture modifié Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 1% de L-glutamine et 1% d'antibiotiques (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Les cellules ont été cultivées régulièrement dans des flasques de 25 cm² et maintenues à 5% de CO₂ dans un incubateur à 37°.

3.2.2.2 Protocole

Pour les essais de toxicité, les cellules ont été détachées en utilisant une solution de Trypsine-EDTA (Thermo Fisher Scientific), comptées en utilisant une cellule de comptage de Mallasez et inséminées dans des plaques de culture de 96 puits (Greiner bio-One, Dominique Dutscher, Antibiotics, Brumath, France) à approximativement 10 000 cellules par puit. Les cellules ont été laissées en croissance entre 48 et 72h à 37° dans un incubateur à 5% de CO₂ jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence. Le milieu de culture a été ensuite aspiré et les cellules ont été traitées avec 100 µL de milieu de culture contenant des concentrations croissantes d'aurones obtenues par des dilutions en cascade (de 500 à 0 µM, dilution à ½), du DMSO (0,5% en concentration finale) a été utilisé comme témoin négatif. Après 48h d'incubation à 37° dans un incubateur à 5% de CO₂, la viabilité des cellules a été évaluée en utilisant un kit de test de toxicité in-vitro à la Résazurine (Sigma Aldrich) selon les instructions fournies par le fabricant. Les puits sont vidés et les cellules traitées avec 100 µL de Résazurine dilués à 1 :10 dans du PBS stérile contenant du calcium et du magnésium (PBS ++, pH 7.4). Après 4h d'incubation à 37°, l'intensité de la fluorescence (à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission 590 nm) a été mesurée en utilisant le Synergy Mx microplate reader (Biotek). Les valeurs de fluorescences obtenues ont été normalisées par le contrôle (les cellules traitées par du DMSO) et exprimées en pourcentage de viabilité des cellules. Les valeurs des IC₅₀ des aurones sur la viabilité cellulaire (c.à.d, la concentration d'aurones provoquant la réduction de 50% de la viabilité cellulaire) ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPad® Prism 7 software (San Diego, CA, USA).

3.2.3 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

3.2.3.1 Principe

Le but de cette expérience est de rechercher si les auronnes pourraient avoir également un effet anti-inflammatoire qui pourrait s'avérer utile en complément de leur effet antibactérien. Pour cela, on caractérise la capacité des auronnes à inhiber la voie NF- κ B en stimulant les cellules avec une solution d'interleukine-1, activateur connu de l'inflammation via ses récepteurs présents à la surface des cellules et activateur du facteur de transcription NF- κ B. NF- κ B intervient dans la régulation des gènes responsables de l'inflammation comme les gènes du TNF α , l'interleukine-6 et l'interleukine-8. Si la présence de ces facteurs est diminuée alors cela signifie que les auronnes sont capables de bloquer cette voie de transcription.

Cette étude est menée sur des cellules "eLUCidate™ HeLa, NF- κ B Reporter Cell Line". Ce sont des cellules HeLa qui sont stablement transfectées pour exprimer un gène rapporteur LUC (la Luciférase de Renilla) sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'activité du facteur de transcription NF- κ B. Une fois transcrite et traduite par la cellule, la luciférase se fixe à la luciférine, catalysant son oxydation en présence d'ATP et d'oxygène. Cette réaction émet des photons et donc de la lumière. Ce signal lumineux est ensuite lu grâce à un luminomètre à plaque de 96 puits.

3.2.3.2 Culture des cellules HeLa Elucidate

Les cellules HeLa Elucidate ont été obtenues chez Genlantis, San Diego, US. Les cellules HeLa étaient cultivées dans un milieu contenant 5% de DMSO dans des cryotubes dans l'azote liquide. Cette lignée a été cultivée dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% d'antibiotiques Pénicilline-Streptomycine et des agents antimétaboliques de sélection (i.e. Puromycine (3 μ g/mL), Blastidicine (5 μ g/mL) et G418 (500 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Les cellules sont ensuite incubées dans un flacon de culture cellulaire de 75 cm² (Greiner BioOne, Monroe, NC, USA) dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide (> 95%) contenant 5% de CO₂.

Après avoir atteint une confluence de 80%, les cellules ont été décollées avec 10 ml d'une solution de Trypsine-EDTA (Thermo Fisher Scientific) quelques minutes à 37°C puis re-suspendues dans un milieu de culture frais afin d'inhiber l'effet de la Trypsine. Les cellules sont par la suite diluées dans du milieu de culture etensemencées dans des plaques pour culture

cellulaire à 96 puits (Greiner bio-one) à raison de 25 000 cellules/puits dans le milieu de culture puis incubées à 37°C toute une nuit.

3.2.3.3 Protocole

Le lendemain, le milieu est aspiré et on stimule les cellules avec une solution contenant de l'IL-1 dilué à 10 ng/ml en présence d'aurones à concentrations décroissantes (de 100 à 0,78 μ M, dilution au $\frac{1}{2}$ en série). On utilise comme contrôle une molécule de référence : l'Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC).

Après 6h d'incubation à 37°, on élimine le milieu et les cellules sont lysées avec 70 μ L d'un tampon de lyse (PBS/ 1% de Triton X-100). On place les plaques sous agitation orbitale à 200 rpm pendant 2 min. 50 μ L sont prélevés de ce lysat et transférés dans des plaques 96 puits blanches opaques pour luminescence contenant déjà 50 μ L de substrat de la luciférase Renilla (Genofax C fourni par la société Yelen, Marseille, France et contenant de la luciférine et de l'ATP notamment).

4 Résultats

4.1.1 Chimie

Tous les réactifs ont été manipulés et conservés à température ambiante. Les spectres RMN ^1H ont été mesurés sur des spectromètres *Brucker* AC 300 et AC 400 (respectivement 300 et 400 MHz). Les données ont été classées et rapportées comme il suit : le déplacement chimique en ppm en fonction du signal du solvant (pic à 7.26 ppm pour CDCl_3 ; pic à 2.49 ppm pour du $\text{DMSO}-d_6$), la multiplicité du signal (s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, dd = doublet de doublet, m = multiplet), les constantes de couplage (en Hz), et l'assignation. Les spectres RMN ^{13}C ^1H ont été mesurés sur des spectromètres *Brucker* AC 300 et AC 400 (respectivement 75 et 100 MHz). Les déplacements chimiques ont été mesurés vis-à-vis des pics des solvants (77 ppm pour CDCl_3 et 39,5 ppm pour le $\text{DMSO}-d_6$). L'analyse élémentaire est obtenue sur analyseur élémentaire CHNSO Thermo Finnigan EA 1112.

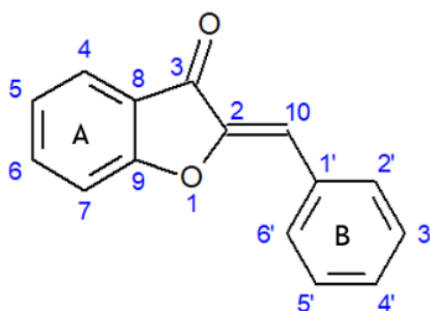


Figure 36 Structure et numérotation des carbones de l'aurone

1 : *Z*-*N*-(2-(3-(benzyloxy)benzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 80%; ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.16 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, $J=2$ Hz, C-H₄), 7.84-7.80 (dd, 1H, $J=2.2;8.9$ Hz, C-H₆), 7.63 (s, 1H, C-H_{2'}), 7.58-7.32 (m, 8H), 7.14-7.11 (dd, 1H, $J=7.9$ Hz, C-H_{4'}), 6.89 (s, 1H, C-H₁₀), 5.18 (m, 2H, CH₂), 2.07 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 183.74 (C-4), 168.51 (CO), 161.36 (C-8), 158.53 (C-3'), 146.92 (C-2), 136.87 (C-1bn), 135.64 (C-5), 133.14 (C-5'), 130.1 (C-6'), 128.87 (C-6), 128.48 (C-3bn), 127.94 (C-4bn), 127.83 (C-2bn), 124.14 (C-1'), 120.62 (C-9), 117.27 (C-4'), 116.75 (C-2'), 113.45 (C-7), 113.17 (C-4), 112.09 (C-10), 69.34 (CH₂), 23.91 (CH₃). Analyse élémentaire calculée (en %) pour $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 74.79; H, 4.97; N, 3.63; trouvée :C, 74.74; H, 5.01; N, 3.60. m/z: 385.13141.

2 : (Z)-N-(2-(4-(benzyloxy)benzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 72%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 10.14 (s, 1H, NH), 8.09 (d, 1H, $J=2.02$ Hz, C-H₄), 7.96-7.93 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H_{2'}), 7.82-7.79 (dd, 1H, $J=2.2;8.9$ Hz, C-H₆), 7.50-7.34 (m, 6H, C-H_{7, bn}), 7.16-7.13 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H_{3'}), 6.90 (s, 1H, C-H₁₀), 5.18 (m, 2H, CH₂), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.37 (C-3), 168.48 (CO), 161.06 (C-8), 159.93 (C-4'), 145.75 (C-2), 136.58 (C-1bn), 135.45 (C-5), 133.39 (C-2'), 128.56 (C-1'), 128.49 (C-3bn), 128 (C-4bn), 127.84 (C-2bn), 124.64 (C-6), 120.95 (C-9), 115.52 (C-3'), 113.33 (C-7), 113.08 (C-4), 112.68 (C-10), 69.44 (CH₂), 23.9 (CH₃). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₄H₁₉NO₄: C, 74.79; H, 4.97; N, 3.63; trouvée : C, 74.77; H, 4.96; N, 3.61. m/z: 385.13141.

3 : (Z)-5-amino-2-(3-(benzyloxy)benzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 80%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 7.61 (bs, 1H, C-H_{2'}), 7.55-7.53 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, C-H₇), 7.50-7.48 (d, 2H, C-H_{2bn}), 7.41 (dt, 2H, C-H_{3bn}), 7.36-7.33 (m, 2H, C-H_{5', 4bn}), 7.11-7.09 (dd, 1H, $J=7.9$ Hz, C-H₆), 7.06-7.04 (dd, 1H, $J=7.9$ Hz, C-H_{4'}), 6.83 (d, 1H, $J=2$ Hz, C-H₄), 6.77 (s, 1H, C-H₁₀), 5.26 (bs, 2H, NH₂), 5.17 (m, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 184.24 (C-3), 158.48 (C-3'), 158.14 (C-8), 147.21 (C-2), 145.63 (C-5), 136.87 (C-1bn), 133.43 (C-1'), 129.97 (C-5'), 128.42 (C-3bn), 127.86 (C-4bn), 127.75 (C-2bn), 124.71 (C-6), 123.89 (C-7), 120.91 (C-9), 117.04 (C-4'), 116.4 (C-2'), 113.21 (C-6'), 110.73 (C-10), 105.45 (C-4), 69.31 (CH₂). Analyse élémentaire calculé (en %) pour C₂₂H₁₇NO₃: C, 76.95; H, 4.99; N, 4.08; trouvée C, 76.88; H, 5.01; N, 4.04. m/z: 343.12084.

4 : (Z)-N-(3-oxo-2-(4-phenoxybenzylidène)-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 67%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 10.15 (s, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, $J=2$ Hz, C-H₄), 8.03-8.00 (d, 2H, $J=7.9$ Hz, C-H_{2'}), 7.83-7.79 (dd, 1H, $J=2.2;8.9$ Hz, C-H₆), 7.50-7.42 (m, 3H, C-H_{7, 7'}), 7.22 (t, 1H, $J=7.4$ Hz, C-H_{8'}), 7.12-7.09 (m, 4H, C-H_{3', 6'}), 6.94 (s, 1H, C-H₁₀), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.43 (C-3), 168.38 (CO), 161.14 (C-8), 158.41 (C-1''), 155.43 (C-4'), 146.18 (C-2), 135.5 (C-5), 133.43 (C-3''), 130.15 (C-2'), 128.67 (C-6), 126.79 (C-1'), 124.27 (C-4''), 120.76 (C-9), 119.41 (C-3'), 118.28 (C-2''), 113.24 (C-7), 113.11 (C-4), 111.83 (C-10), 23.82 (CH₃). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₃H₁₇NO₄: C, 74.38; H, 4.61; N, 3.77; trouvée : C, 74.35; H, 4.67; N, 3.73. m/z: 371.11576.

5 : (Z)-N-(2-(2-isopropoxybenzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 93%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 10.15 (s, 1H, NH), 8.21-8.19 (d, 1H, $J=1.2;7.8$ Hz, C-H_{6'}), 8.12 (bs, 1H, C-H₄), 7.81-7.78 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, C-H₆), 7.52-7.49 (d, 1H, $J=8.9$ Hz, C-H₇), 7.42 (dt, 1H, $J=7.7$ Hz, C-H_{4'}), 7.20 (s, 1H, C-H₁₀), 7.16-7.13 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, C-H_{3'}), 7.08 (dt, 1H, $J=7.6$ Hz, C-H_{5'}), 4.75 (q, 1H, $J=5.9;11.9$ Hz, C-H_{isop}), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.35-1.33 (d, 6H, $J=5.8$ Hz, C-H_{3isop}). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.52 (C-3), 168.39 (CO), 161.15 (C-8), 156.76 (C-2'), 146.69 (C-2), 135.5 (C-5), 131.85 (C-6'), 131.38 (C-4'), 128.64 (C-6), 121.03 (C-9), 120.73 (C-1'), 120.69 (C-5'), 113.85 (C-7), 113.28 (C-4), 113.11 (C-10), 105.92 (C-3'), 70.49 (CHiPr), 23.83 (CH₃), 21.74 (CH₃iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₀H₁₉NO₄: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée :C, 71.14; H, 5.67; N, 4.12. m/z: m/z: 337,13.

6 : (Z)-N-(2-(3-isopropoxybenzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 91%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 10.19 (s, 1H, NH), 8.12 (d, 1H, $J=2$ Hz, C-H₄), 7.83-7.80 (dd, 1H, $J=2.2;8.9$ Hz, C-H₆), 7.57-7.52 (m, 3H, C-H_{2',4',7}), 7.40 (dt, 1H, $J=8.0$ Hz, C-H_{5'}), 7.04-7.01 (dd, 1H, $J=2.6;8.2$ Hz, C-H_{6'}), 6.91 (s, 1H, C-H₁₀), 4.68 (q, 1H, $J=5.9;11.9$ Hz, C-H_{isop}), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.31-1.29 (d, 6H, $J=5.8$ Hz, C-H_{3isop}). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.73 (C-3), 168.49 (CO), 161.35 (C-8), 157.66 (C-3'), 146.87 (C-2), 135.62 (C-5), 133.17 (C-1'), 130.1 (C-5'), 128.86 (C-6), 123.56 (C-6'), 120.64 (C-9), 118.25 (C-2'), 117.32 (C-3'), 113.41 (C-7), 113.17 (C-4), 112.28 (C-10), 69.35 (CHiPr), 23.88 (CH₃), 21.77 (CH₃iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₀H₁₉NO₄: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée C, 71.18; H, 5.66; N, 4.16. m/z: m/z: 337,13.

7 : (Z)-N-(2-(4-isopropoxybenzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acétamide

Rendement : 93%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 10.14 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, $J=1.9$ Hz, C-H₄), 7.94-7.91 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H_{2'}), 7.82-7.78 (dd, 1H, $J=2.2;8.8$ Hz, C-H₆), 7.51-7.48 (d, 1H, $J=8.89$ Hz, C-H₇), 7.06-7.03 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H_{3'}), 6.90 (s, 1H, C-H₁₀), 4.72 (q, 1H, $J=5.9;11.9$ Hz, C-H_{isop}), 2.07 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.30-1.28 (d, 6H, $J=5.8$ Hz, C-H_{3isop}). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.25 (C-3), 168.39 (CO), 160.98 (C-8), 159.16 (C-4'), 145.6 (C-2), 135.39 (C-5), 133.41 (C-2'), 128.48 (C-6), 124.02 (C-1'), 120.94 (C-9), 115.94 (C-3'), 113.2 (C-7), 113.06 (C-4), 112.77 (C-10), 69.5 (CHiPr), 23.83 (CH₃), 21.68 (CH₃iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₀H₁₉NO₄: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée C, 71.18; H, 5.69; N, 4.12. m/z: m/z: 337,13.

8 : (Z)-5-amino-2-(2-isopropoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 68%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 8.19-8.17 (d, 1H, $J=6.9$ Hz, C-H_{6'}), 7.39 (t, 1H, $J=7.3$ Hz, C-H_{4'}), 7.26-7.24 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, C-H₇), 7.14 (d, 1H, C-H_{3'}), 7.11 (bs, 2H, NH₂), 7.08-7.06 (d, 1H, C-H_{5'}), 7.06-7.04 (dd, 1H, $J=2.2;7.7$ Hz, C-H₆), 6.95 (s, 1H, C-H₁₀), 6.85 (d, 1H, $J=2.2$ Hz, C-H₄), 4.73 (q, 1H, $J=5.9;11.9$ Hz, C-H_{isop}), 1.34-1.32 (d, 6H, $J=5.8$ Hz, C-H_{3isop}). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): 184.16 (CO), 158.14 (C-8), 156.62 (C-2'), 147.02 (C-2), 145.24 (C-5), 131.55 (C-6'), 131.33 (C-4'), 124.76 (C-6), 121.4 (C-9), 121.11 (C-5'), 120.72 (C-1'), 113.85 (C-7), 113.23 (C-10), 105.77 (C-3'), 104.8 (C-4), 70.46 (CHiPr), 21.82 (CH₃iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₂₀H₁₉NO₄: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée C, 71.24; H, 5.74; N, 4.18. m/z: m/z: 337,13.

9 : (Z)-5-amino-2-(3-isopropoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 51%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 7.57-7.54 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, C-H_{6'}), 7.51 (bs, 1H, C-H_{2'}), 7.51-7.48 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, C-H₇), 7.43-7.40 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, C-H_{4'}), 7.41 (dt, 1H, $J=7.8$ Hz, C-H_{5'}), 7.27 (d, 1H, $J=1.9$ Hz, C-H₄), 7.04-7.01 (dd, 1H, $J=2.0;8.0$ Hz, C-H₆), 6.89 (s, 1H, C-H₁₀), 4.68 (q, 1H, $J=5.9;11.9$ Hz, C-H_{isop}), 1.31-1.29 (d, 6H, $J=5.8$ Hz, C-H_{3isop}). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.65 (C-3), 160.93 (C-8), 157.67 (C-3'), 146.95 (C-2), 137.64 (C-5), 133.24 (C-1'), 130.11 (C-5'), 128.17 (C-6), 123.56 (C-6'), 121.25 (C-9), 118.24 (C-2'), 117.28 (C-3'), 113.96 (C-7), 112.14 (C-4), 111.46 (C-10), 69.35 (CHiPr), 21.79 (CH₃iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C₁₀H₁₇NO₃: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée C, 71.18; H, 5.65; N, 4.12. m/z: 295,12.

10 : (Z)-5-amino-2-(4-isopropoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 50%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 7.97-7.95 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H $_2$ '), 7.66-7.64 (m, 3H, C-H $_{4,6,7}$), 7.07-7.05 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, C-H $_3$ '), 6.98 (s, 1H, C-H $_{10}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 183.22 (C-3), 160.22 (C-8), 159.12 (C-4'), 145.7 (C-2), 133.38 (C-2'), 138.33 (C-5), 127.35 (C-7), 124.1 (C-1'), 121.52 (C-9), 115.94 (C-3'), 113.69 (C-6), 112.51 (C-4), 110.58 (C-10), 69.49 (CH $_2$ iPr), 21.68 (CH $_3$ iPr). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C $_{10}$ H $_{17}$ NO $_3$: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; trouvée C, 71.15; H, 5.66; N, 4.18. m/z: 295,12.

11 : (Z)-6-amino-2-(4-methoxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 57%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 7.87-7.84 (d, 2H, $J=7.9$ Hz, C-H $_2$ '), 7.41-7.38 (d, 1H, $J=8.25$ Hz, C-H $_4$), 7.06-7.03 (d, 2H, $J=7.4$ Hz, C-H $_3$ '), 6.59 (bs, 1H, C-H $_7$), 6.47-6.44 (dd, 1H, $J=8.5$ Hz, C-H $_5$), 6.41 (s, 1H, C-H $_{10}$), 3.82 (s, 3H, OCH $_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 179.72 (C-4), 168.04 (C-8), 159.96 (C-6), 158.02 (C-4'), 146.99 (C-2), 132.36 (C-2'), 125.59 (C-4), 124.99 (C-1'), 114.47 (C-3'), 110.99 (C-10), 109.13 (C-9), 108.49 (C-5), 93.52 (C-7), 55.24 (OCH $_3$). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C $_{16}$ H $_{13}$ NO $_3$: C, 71.90; H, 4.90; N, 5.24; trouvée C, 71.78; H, 4.97; N, 5.21. m/z: 267.08954.

12 : (Z)-2-(2,4-bis(benzyloxy)benzylidène)benzofuran-3(2H)-one

Rendement : 79%; ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 8.22-8.20 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, C-H $_6$ '), 7.78-7.75 (m, 2H, C-H $_{4,6}$), 7.55-7.53 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, C-H $_7$), 7.48-7.30 (m, 11H), 7.20 (s, 1H, C-H $_{10}$), 6.91 (d, 1H, $J=2$ Hz, C-H $_3$ '), 6.84-6.81 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, C-H $_5$ '), 5.26 (s, 2H, CH $_2$), 5.20 (s, 2H, CH $_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 182.97 (C-3), 164.92 (C-8), 161.66 (C-4'), 159.09 (C-2'), 145.17 (C-2), 137.08 (C-1'), 136.44 (C-1Bn), 136.42 (C-1Bn), 132.6 (C-6), 128.55 (C-3Bn), 128.43 (C-3Bn), 128.05 (C-4bn), 127.98 (C-4Bn), 127.83 (C-2Bn), 127.72 (C-2Bn), 124.04 (C-4), 123.69 (C-5), 121.16 (C-9), 113.54 (C-7), 113.1 (C-5'), 107.81 (C-6'), 106.07 (C-10), 100.46 (C-3'), 70.06 (CH $_2$), 69.64 (CH $_2$). Analyse élémentaire calculée (en %) pour C $_{29}$ H $_{22}$ O $_4$: C, 80.1*7; H, 5.10; trouvée : C, 80.22; H, 5.11. m/z: 434.15181.

4.1.2 Concentrations minimales inhibitrices

CMI (μM)	<i>S.</i> <i>AUREUS</i>	<i>B.</i> <i>SUBTILIS</i>	<i>E.</i> <i>COLI</i>	<i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i>	<i>H.</i> <i>PYLORI</i>	<i>M.</i> <i>SMEGMATIS</i>	<i>C.</i> <i>ALBICANS</i>
GEMIFLOXACINE	0.06	0.02	0.06	0.25	-	2	-
AMPHOTERICINE	-	-	-	-	-	-	1.1
B							
1	25	3.9	7.8	100	12.5	50	>100
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3	>100	15.8	>100	>100	50	50	>100
4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100	>100	>100	100	>100
6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
7	25	15.8	15.6	>100	12.5	50	>100
8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
11	12.5	7.8	7.8	100	6.25	50	>100
12	25	31.25	62.5	>100	12.5	100	>100

Tableau 2 Concentration minimale inhibitrice (en μM) des 12 aurones synthétisées sur *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *M. smegmatis* et *C. albicans*

Un premier screening sur une série de pathogènes a été réalisé : *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *M. smegmatis*, *C. albicans*. Celui-ci a eu pour but de sélectionner les premières molécules intéressantes en les testant sur un panel de pathogènes différents, parmi eux des bactéries Gram positif (*S. aureus*, *B. subtilis*), des Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*), mycobactéries (*M. smegmatis*) et des champignons (*C. albicans*).

Les résultats obtenus (tableau 2) sur ces premiers essais ont permis d'identifier quatre molécules actives. La molécules **1** est active sur la plupart des pathogènes notamment *B. subtilis* (CMI = 3.9 μM), *S. aureus* (CMI = 25 μM), *E. Coli* (CMI = 7.8 μM) et *H. pylori* (CMI = 12.5 μM) mais pas sur le Gram négatif *P. aeruginosa* (CMI = 100 μM). Elle présente également une légère activité sur *M. smegmatis* (50 μM) mais aucune sur *C. albicans* (CMI > 100). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour la molécule **7** qui est inactive sur les mêmes souches (CMI_{*P. aeruginosa*} > 100, CMI_{*C. albicans*} >100). Elle est également peu active sur *M. smegmatis* (CMI = 50μM), et active sur *B. subtilis* (CMI = 15.8 μM), *S. aureus* (CMI = 25 μM), *E. Coli* (CMI = 15.6 μM) et *H. pylori* (CMI = 12.5 μM). On note tout de même qu'elle est légèrement moins active que la molécule **1**. Ce schéma se répète sur les deux autres molécules

actives, **11** est active sur *B. subtilis* (CMI = 7.8 µM), *S. aureus* (CMI = 12.5 µM), *E. Coli* (CMI = 62.5 µM) et *H. pylori* (CMI = 6.25 µM), peu active sur *M. smegmatis* (CMI = 50µM) et inactive sur *P. aeruginosa* et *C. albicans* (CMI_{*P. aeruginosa*} = 100, CMI_{*C. albicans*} >100). La molécule **12**, quant à elle a des CMI sur *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. Coli* et *H. pylori* de respectivement 31.25, 25, 62.5 et 12.5 µM. Comme les précédentes elle est inactive sur *P. aeruginosa* (CMI > 100 µM) et *C. albicans* (CMI > 100 µM). Les autres molécules de cette chimiothèque ne sont actives sur aucune de ces souches, à l'exception de la molécule **3** qui possède une légère activité sur *H. pylori* et *M. smegmatis* (CMI = 50 µM).

Afin de pouvoir mieux caractériser et tester leur effets sur plusieurs autres pathogènes, ces 4 molécules vont être testées sur une plus grande collection de pathogènes parmi lesquels des bactéries Gram positif : *S. aureus* *méticilline résistant*, *Listeria monocytogenes*, *M. luteus*, *B. cereus*, *B. subtilis* *nisine résistant*, *C. perfringes*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. coccoides*, *C. propionicum*, *E. faecalis*, *P. acnes*, *S. pyogènes*, des bactéries Gram négatif : *E. coli* *EHEC*, *A. baumannii*, *A. baumannii* *méticilline résistant*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* et une espèce de champignon filamenteux : *A. niger*. (Tableau 3)

Avec ces nouveaux tests, la plupart des bactéries ESKAPE sont testées. Parmi celles-ci, les seules souches sur lesquelles ces dérivés d'aurones semblent avoir une activité intéressante sont *S. aureus* (et *S. aureus* *méticilline résistant*) et *E. coli* (et *E. coli* *entérohémorragique*) avec respectivement des CMI variant entre 3.9 et 50 µM et entre 7.8 et 50 µM. Un effet est également observé sur *A. baumannii* avec des CMI entre 12.5 et 50 µM.

En revanche, sur les souches anaérobies, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. coccoides* et *C. propionicum*, les résultats sont très prometteurs avec notamment des MIC de 0.78 µM pour les molécules **11** et **12** sur *C. difficile*, et de 0.78 µM sur *C. bottulunim* pour les molécules **1**, **11** et **12**. Il semblerait donc que les aurones possèdent d'excellentes propriétés antibiotiques sur les bactéries du genre *clostridioides*. Néanmoins, ces résultats ne sont pas transposables à toutes les souches anaérobies testées puisque l'on ne constate pas ou peu d'effet chez *C. perfringes* et *P. acnes*.

MIC (µM)	1	7	11	12
Sarm	12.5	25	12.5	50
<i>L. monocytogenes</i>	3.12	6.25	12.5	25
<i>M. luteus</i>	50	12.5	50	100
<i>B. cereus</i>	12.5	25	12.5	25
<i>B. subtilis nisine resistant</i>	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>C. perfringens</i>	>100	>100	>100	>100
<i>C. difficile</i>	12.5	3.12	0.78	0.78
<i>C. botulinum</i>	0.78	3.12	0.78	0.78
<i>C. coccoides</i>	0.78	3.12	50	6.25
<i>C. propionicum</i>	3.12	100	3.12	50
<i>E. faecalis</i>	100	>100	100	>100
<i>P. acnes</i>	100	>100	50	>100
<i>S. pyogenes</i>	50	50	50	100
<i>Ehec</i>	12.5	25	12.5	50
<i>A. baumannii</i>	12.5	25	12.5	50
<i>A. baumannii carbapeneme resistant</i>	>100	>100	100	>100
<i>S. enterica</i>	25	50	25	100
<i>K. pneumoniae</i>	>100	>100	>100	>100
<i>A. niger</i>	12.5	25	12.5	25

Tableau 3 concentrations minimales inhibitrices des molécules 1,7, 11 et 12 sur une nouvelle série de bactéries Gram positif, négatif et anaérobies

De plus, les aurones semblent avoir une activité supérieure sur les bactéries Gram positif. En effet, outre leurs activités importantes sur la famille des clostridioides, les tests ont mis en évidence une activité sur *S. aureus* (et MRSA) avec des CMI variant de 12.5 µM pour **1** et **11** à 25 µM pour **7** et **12**. On peut également relever une excellente activité sur *Listeria monocytogenes* avec des valeurs de CMI allant de 3.12 à 25 µM. La même remarque peut être faite pour *B. subtilis* et *B. cereus*. En revanche, en ce qui concerne les bactéries Gram négatif : *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *A. Baumannii* méticilline résistant, *S. enterica* les valeurs des MIC sont bien plus élevées. Néanmoins, *H. pylori* semble être très sensible aux aurones avec des MIC de 6.25 µM pour la molécule **11** et 12,5 µM pour les molécules **1,7** et **12**. Ce pathogène, bien qu'il soit Gram négatif, est connu pour avoir la sensibilité des bactéries Gram positif, ce qui explique ces résultats prometteurs.

Un dernier point important est la présence d'un effet sur *Aspergillus niger*, avec des CMI variant entre 1,5 et 25 μM . Même si cette souche n'est pas la plus dangereuse des membres du genre *Aspergillus*, elle témoigne d'une potentielle activité sur des souches comme *A. fumigatus* et peut-être sur d'autres champignons.

4.1.3 Toxicité

IC50 (μM)	BEAS	CACO 2	HACAT	HUVEC	IMR90	HEPG2	A498
1	169	199.6	268.5	123.1	421.4	472.4	398.2
7	125.9	186.5	322.9	120.3	437.6	639.4	453
11	153.8	198.3	246.5	68.4	446.2	453.7	378.3
12	379.7	460.5	1684	757	688.5	1528	614.5

Tableau 4 IC50 des 4 aurones synthétisées sur plusieurs types de cellules humaines

Les données obtenues suite aux études de toxicité sont encourageantes (tableau 4). En effet, il semblerait que la structure aurone présente une toxicité intrinsèque faible. Les données montrent que les IC₅₀ sont obtenues à des doses entre 150 et 700 μM pour la plupart. La seule aurone qui présente une toxicité relativement importante est la molécule **11** sur les cellules HUVEC qui sont des cellules de l'épithélium vasculaire. Cette IC₅₀ reste tout de même bien plus élevée que les CMI obtenues pour cette même molécule sur les pathogènes sur lesquels elle a un effet.

Il ne semble pas y avoir de toxicité supérieure sur les cellules cancéreuses (CACO 2, A498) vis-à-vis des cellules saines (BEAS, Hacat, Huvec, IMR90).

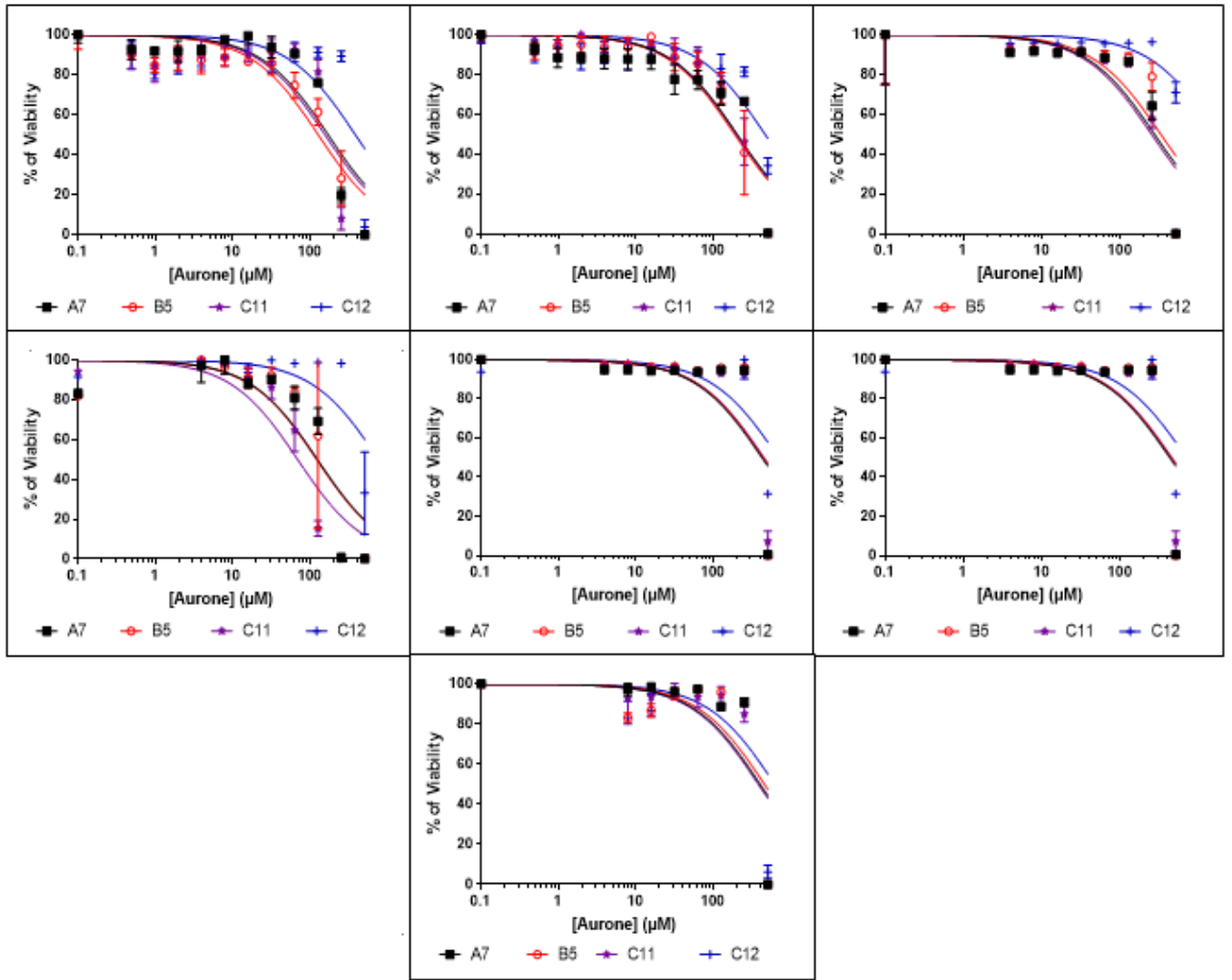


Figure 37 : Courbe des IC50 de la toxicité des 4 aurones (A7=1, B5=7, C11= 11 et C12 =12) sur les cellules de gauche à droite et de bas en haut : BEAS, Caco2, HaCaT, HUVEC, IMR90, HepG2 et A498

4.1.4 Activité anti-inflammatoire

À la suite du test de l'activité anti-inflammatoire sur IL-1- β , les 4 aurones (molécules **1**, **7**, **11** et **12**) n'ont pas un effet anti-inflammatoire probant, ou du moins n'ont pas un effet inhibiteur sur la voie NF- κ B. En effet, bien que l'on remarque une nette chute de la concentration en marqueurs de l'inflammation à des concentrations de 100 μ M, l'effet à des concentrations plus basses tend vers un effet pro-inflammatoire. De plus, si on s'intéresse plus spécifiquement à la plage d'action antibactérienne de ces aurones (entre 0.78 μ M et 25 μ M en fonction des souches), on se rend compte que les composés testés ont plutôt un effet pro-inflammatoire.

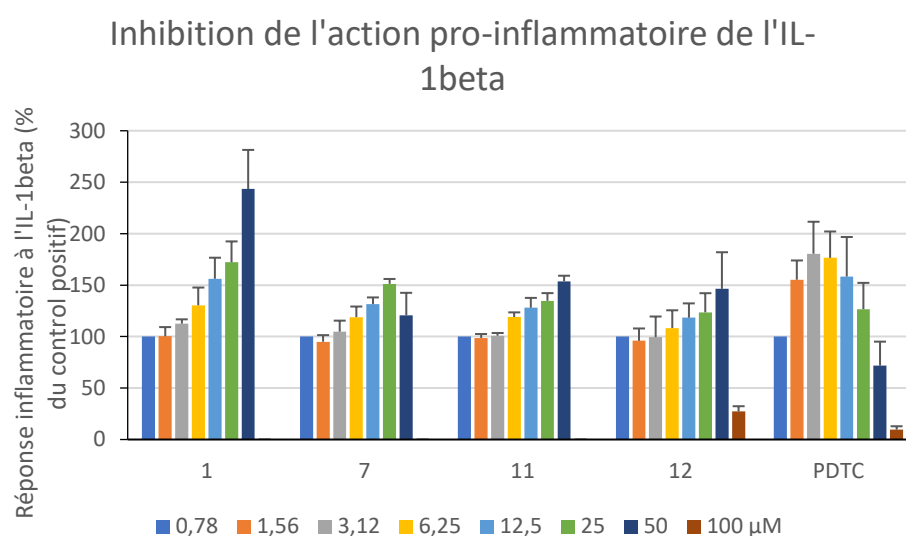


Figure 38 : Pourcentages de la réponse inflammatoire vis-à-vis du contrôle positif induite par une exposition des cellules à IL-1 en fonction de la concentration des aurones

5 Discussion

Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment que les aurones ont bien une activité contre les bactéries Gram positif, résultat préalablement obtenu dans la littérature (11,154). Notamment avec les aurones **1,7,11** et **12** contre *S. aureus* (sensible et résistant à la Mécicilline), *L. monocytogenes*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. coccoides* et *B. subtilis* avec des CMI entre 0.78 et 25 μ M. Les activités sur les différents variants de *S. aureus* permettent de mettre en évidence que l'acquisition de résistance à la Mécicilline ne diminue pas la sensibilité aux aurones.

Cette étude a également permis de mettre en lumière pour la première fois des aurones actives contre des pathogènes Gram négatif comme *E. coli* et *A. baumannii*. En effet, les 4 aurones sélectionnées sont actives contre *E. coli* ainsi qu'*E. coli* entero-hémorragique. En revanche, elles ne sont actives que contre *A. baumannii* sensible mais pas la souche résistante aux carbapénèmes.

Cependant, aucun composé n'a eu d'activité sur *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Témoignant que l'activité est encore supérieure sur les bactéries Gram positif. Il est également intéressant de noter une activité contre un champignon filamenteux, *A. niger*, contrairement à *C. albicans* pour lequel il n'y a aucune molécule active et qui est une levure.

Malgré le nombre assez faible de molécules testées, il peut être intéressant d'analyser la relation structure activité des composés. La molécule **1** possède un groupement *acétamido* en position 5 et un groupement *benzyloxy* en position 3'. En la comparant avec les molécules 2,3 et 4 on peut en déduire que le groupement *acétamido* présente un intérêt supérieur au groupement *amine* présent sur les molécules 3 et 4. De plus, le groupement *benzyloxy* semble avoir une activité plus importante en position 3' plutôt qu'en position 4' comme sur la molécule 2 et 4 (Tableaux 2 et 3).

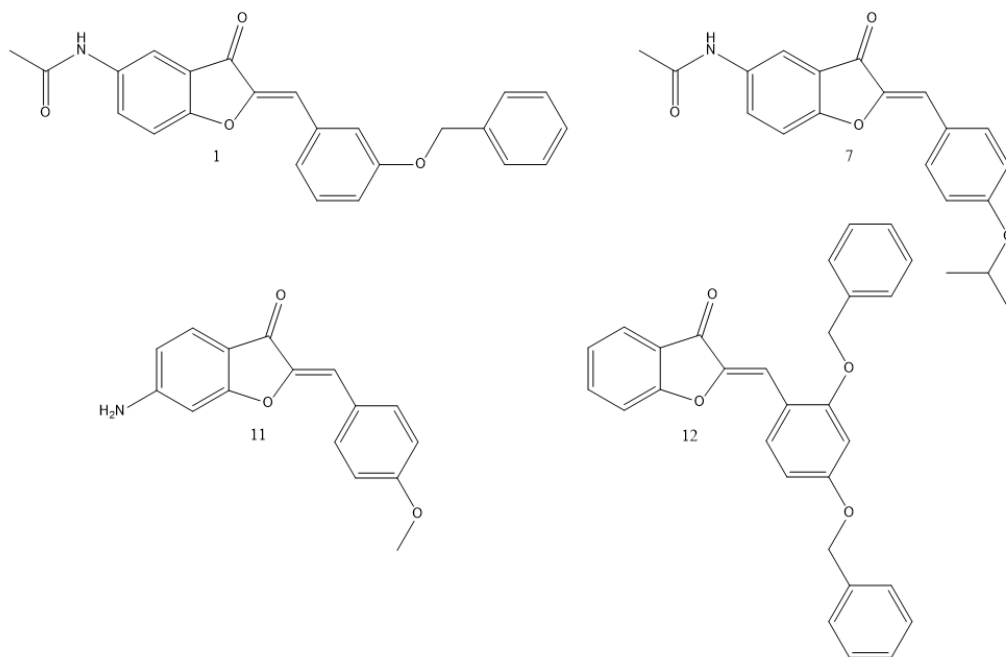


Figure 39 Les 4 molécules les plus actives suite aux criblages réalisés sur plusieurs bactéries, mycobactéries et champignons

Concernant la molécule **7**, il est intéressant de la comparer aux molécules **5** à **9**, toutes porteuses de groupements *isopropyl* mais à des positions différentes et avec, en position 5, soit des groupements *amines* soit des groupements *acétamido*. La position 4' pour le groupement *isopropyl* semble en effet être la meilleure si l'on compare avec les molécules **5** et **8** qui portent le *benzyloxy* en position 2' ou aux molécules **6** et **9** qui portent ce même groupement en position 3'. De plus, comme pour la molécule **1**, le groupement *acétamido* semble avoir un effet supérieur au groupement *amine*, puisque, si on compare les molécules **7** et **10**, on remarque que la molécule **7** est bien plus active.

La molécule **11** quant à elle, semble indiquer que le groupement *amine* pourrait donner un effet en position 6 et que le groupement *méthoxy* pourrait lui aussi apporter une plus-value thérapeutique. Il serait également intéressant de comparer les groupements *méthoxy* en position 2',3',4' et 5' ainsi que de comparer les groupements *amine* et *acétamido* en position 6.

Finalement la molécule **12** permet de mettre en évidence l'intérêt de molécules polysubstituées sur le cycle B, mais il n'y a pas de molécule de comparaison. Cela pose néanmoins la question de l'effet attribuable aux substituants 5 et 6. En effet, la molécule **12** a des CMI très intéressantes sur certaines souches sans pour autant porter de groupement en position 5 et 6. Cependant, les valeurs des CMI attribuables à cette molécule sont légèrement plus basses que pour les autres molécules intéressantes.

Ces résultats sont d'autant plus encourageants que les aurones semblent être des molécules très peu toxiques avec des IC₅₀ sur cellules humaines entre 64 et 1528 µM ce qui en fait des molécules à excellent indice thérapeutique avec une marge thérapeutique importante. Il n'y a pas de différence notable entre la toxicité sur cellules saines et malignes.

L'analyse de la relation structure activité par rapport à la toxicité des molécules n'est pas particulièrement pertinente. Contrairement à celle sur l'activité antibactérienne, toutes les molécules ont une toxicité très faible, il est donc plus probable que les aurones en générale ne soient pas toxiques et que les substitutions réalisées dans ces études n'influent que très peu dessus. À nouveau, à la vue du faible nombre de composés, toute analyse définitive de la relation structure activité est impossible.

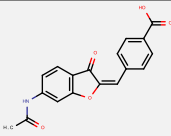
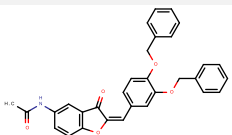
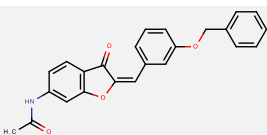
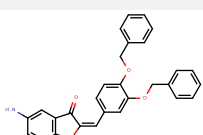
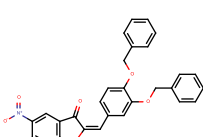
CMI (µM)	C. DIFFICILE
	>100
	25
	25
	12,5
	3,25

Tableau 5 Concentration minimale inhibitrice de nouvelles aurones sur C. Difficile

Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens. Tout d'abord en ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire. Les aures testées durant cette étude ont bien un effet contre l'inflammation mais à des doses bien plus élevées que les CMI. Les résultats à fortes concentrations vont dans le sens de la littérature (166,167), en revanche les résultats à faible dose semble avoir un effet pro-inflammatoire. Ce phénomène n'a pas été observé dans les études précédemment citées.

Il est également important de noter qu'aucune recherche du mécanisme d'action des aures n'a été réalisée. Aucune autre étude n'a réussi à caractériser la nature de leur effet, mais Olleik *et al* ont mis en évidence que les aures ne sont pas pore-forming (11). Il pourrait être intéressant de réaliser des études de docking et de dynamique moléculaire *in silico*. Une fois ces données collectées, il pourrait être plus facile de caractériser les modifications clés pour optimiser l'effet antibactérien. Des études de cinétiques sont en cours. Il faut également élargir les tests sur un nombre plus grand de souches fongiques comme *A. fumigatus* ou encore *C. neoformans* pour confirmer ou non l'intérêt des aures dans le traitement d'infections fongiques, notamment sur les champignons filamenteux.

Concernant le mécanisme d'action, il peut être légitime de s'interroger si l'action des groupements *isopropyl* et *benzyloxy* n'est que protectrice vis-à-vis d'un groupement *hydroxy* à l'instar d'une prodrogue ou s'ils ont un effet direct du fait de leur structure.

D'autres questions restent en suspens telles que le potentiel d'homo et d'hétérodimère. En effet dans le contexte de molécule naturelle cela peut être intéressant et de nombreux cas de figure peuvent être retrouvés.

A la lumière de toutes ces données, il est indéniable que les aures sont des composés prometteurs dans la lutte antibactérienne. Néanmoins, les activités obtenues lors de cette étude sont encore en dessous des activités requises pour que l'on puisse envisager les aures comme une solution exploitable rapidement. En effet, d'autres composés, comme par exemple la Gémifloxacine, ont encore des activités bien supérieures. Il est donc absolument nécessaire de continuer à optimiser la structure des molécules les plus prometteuses de cette étude, en explorant d'autres modifications. C'est en partie ce qui a été fait avec les nouveaux composés présentés dans le tableau 6. Ces nouvelles aures ont déjà en partie été synthétisées et testées sur plusieurs souches, comme sur *C. difficile* (tableau 5), sur lequel de nouveaux essais ont permis de confirmer qu'une di-substitution du cycle B avec des groupements benzyloxy jouait un rôle clef dans l'activité des aures.

6 Conclusion

Les infections bactériennes et leurs résistances aux traitements antibiotiques actuels sont un enjeu majeur de la recherche médicale à tel point que l'OMS a classé les bactéries en plusieurs catégories selon l'importance de leurs résistances et la gravité des infections dont elles sont responsables. Développer de nouvelles molécules capables de cibler ces pathogènes potentiellement résistants tout en poursuivant les efforts déjà engagés pour améliorer la gestion et réglementer l'utilisation des antibiotiques devient ainsi un enjeu capital.

Les résultats obtenus montrent, en accord avec la littérature (11,154), que les aurones sont des molécules ayant un important potentiel antibactérien. En effet, d'excellentes concentrations inhibitrices sont atteintes sur certaines souches comme notamment *Clostridium difficile*. D'autres souches semblent avoir une sensibilité intéressante à la structure aurone, essentiellement parmi les bactéries Gram positif. Les résultats obtenus sur des souches comme les *SARM* ou *L. monocytogenes* vont dans ce sens et sont encourageants. Les résultats obtenus sur *A. niger* semblent indiquer des effets intéressants en ce qui concerne l'action sur des champignons. Parmi les molécules testées, quatre ont été retenues comme les plus prometteuses, **1,7,11** et **12**.

Un autre point clé de cette étude est la faible toxicité des aurones sur les cellules humaines, à la fois malignes et saines. Aucune molécule ne présente une toxicité importante et tous les index thérapeutiques sont très élevés.

L'analyse de la relation structure activité, même si le nombre de molécules est faible, a permis d'isoler les groupements les plus intéressants et peut ouvrir la voie à la synthèse de nouveaux composés encore plus actifs.

En conclusion, ces travaux ont permis de confirmer le potentiel de la structure aurone en tant qu'agent antimicrobien. Leur faible toxicité est un réel atout vis-à-vis des molécules classiquement utilisées dans ce domaine. Néanmoins, les résultats sont encore loin d'être suffisamment probants, il faut donc continuer à synthétiser de nouvelles molécules afin d'enrichir la chimiothèque et d'affiner au maximum l'étude de la relation structure activité. Ce travail, accompagné par la recherche du mécanisme d'action et l'optimisation de la synthèse, permettra d'isoler et d'optimiser les molécules les plus prometteuses.

7 Bibliographie

1. Gaynes R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis.* mai 2017;23(5):849-53.
2. GUILLOT JF. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Ann Rech Vét.* 1989;20(1):3-16.
3. Berthuin J, Miras M. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES:
4. Lack of innovation set to undermine antibiotic performance and health gains [Internet]. [cité 17 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains>
5. Mostahar S, Alam S, Islam A. Cytotoxic and antimicrobial activities of some synthetic flavones. *IJC-B Vol45B06 June 2006* [Internet]. juin 2006 [cité 9 févr 2024]; Disponible sur: <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/6487>
6. Suresh Babu K, Hari Babu T, Srinivas PV, Sastry BS, Hara Kishore K, Murty USN, et al. Synthesis and in vitro study of novel 7-O-acyl derivatives of Oroxylin A as antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 sept 2005;15(17):3953-6.
7. Zaki MA, Nanayakkara NPD, Hetta MH, Jacob MR, Khan SI, Mohammed R, et al. Bioactive Formylated Flavonoids from *Eugenia rigida*: Isolation, Synthesis, and X-ray Crystallography. *J Nat Prod.* 23 sept 2016;79(9):2341-9.
8. Moorthy NSHN, Singh RJ, Singh HP, Dutta Gupta S. Synthesis, biological evaluation and in silico metabolic and toxicity prediction of some flavanone derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* oct 2006;54(10):1384-90.
9. Olivella MS, Zarelli VEP, Pappano NB, Debattista NB. A COMPARATIVE STUDY OF BACTERIOSTATIC ACTIVITY OF SYNTHETIC HYDROXYLATED FLAVONOIDS. *Braz J Microbiol.* oct 2001;32:229-32.
10. Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur J Med Chem.* mai 2009;44(5):2211-8.
11. Olleik H, Yahiaoui S, Roulier B, Courvoisier-Dezord E, Perrier J, Pérès B, et al. Aurone derivatives as promising antibacterial agents against resistant Gram-positive pathogens. *Eur J Med Chem.* 1 mars 2019;165:133-41.
12. Lee JH. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *J Microbiol.* 1 mars 2019;57(3):181-4.
13. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet.* 9 janv 2016;387(10014):176-87.
14. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 8 avr 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
15. Salimiyan Rizi K, Ghazvini K, Noghondar MK. Adaptive Antibiotic Resistance: Overview and Perspectives. *J Infect Dis Ther* [Internet]. 2018 [cité 22 août 2023];06(03). Disponible sur:

16. Motta SS, Cluzel P, Aldana M. Adaptive Resistance in Bacteria Requires Epigenetic Inheritance, Genetic Noise, and Cost of Efflux Pumps. *PLOS ONE*. 17 mars 2015;10(3):e0118464.
17. Fernández L, Breidenstein EBM, Hancock REW. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*. 1 févr 2011;14(1):1-21.
18. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:825-69.
19. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 1995;39(6):1211-33.
20. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 1 déc 2010;13(6):151-71.
21. McOsker CC, Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother*. 1 mai 1994;33(suppl_A):23-30.
22. Osei Sekyere J. Genomic insights into nitrofurantoin resistance mechanisms and epidemiology in clinical Enterobacteriaceae. *Future Sci OA*. 27 févr 2018;4(5):FSO293.
23. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. oct 2014;12(10):1221-36.
24. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 18 mars 2014;53(10):1565-74.
25. Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis*. 1 juin 2001;32(11):1608-14.
26. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 1989;33(11):1831-6.
27. Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. oct 2012;25(4):661-81.
28. Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in escherichia coli involves increased efflux of the antibiotic. *Biochem Biophys Res Commun*. 13 mars 1980;93(1):74-81.
29. Miller WR, Bayer AS, Arias CA. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb Perspect Med*. nov 2016;6(11):a026997.
30. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 nov [cité 11 juin 2021]. Disponible sur: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
31. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. 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*. janv 2019;19(1):56-66.

32. PPLreport_2017_09_19.pdf [Internet]. [cité 11 juin 2021]. Disponible sur: https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf
33. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol. juill 2012;7(7):887-902.
34. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev. 17 juill 2019;32(4):10.1128/cmr.00002-19.
35. Humann JL, Wildung M, Cheng CH, Lee T, Stewart JE, Drew JC, et al. Complete genome of the onion pathogen Enterobacter cloacae EcWSU1. Stand Genomic Sci. 31 déc 2011;5(3):279.
36. Richard C. [New Enterobacteriaceae found in medical bacteriology *Moellerella wisconsensis*, *Koserella trabulsii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asburiae*, *Rahnella aquatilis*]. Ann Biol Clin (Paris). 1989;47(5):231-6.
37. Cordoba MA, Rocchia IL, De Luca MM, Pezzani BC, Basualdo JA. Resistance to Antibiotics in Injured Coliforms Isolated from Drinking Water. Microbiol Immunol. 2001;45(5):383-6.
38. Dugleux G, Le Coutour X, Hecquard C, Oblin I. Septicemia Caused by Contaminated Parenteral Nutrition Pouches: The Refrigerator as an Unusual Cause. J Parenter Enter Nutr. 1991;15(4):474-5.
39. Zhu B, Wang S, Li O, Hussain A, Hussain A, Shen J, et al. High-quality genome sequence of human pathogen Enterobacter asburiae type strain 1497-78T. J Glob Antimicrob Resist. 1 mars 2017;8:104-5.
40. Paauw A, Caspers MPM, Leverstein-van Hall MA, Schuren FHJ, Montijn RC, Verhoef J, et al. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic Enterobacter hormaechei outbreak strain. Microbiology. 2009;155(5):1478-88.
41. Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, et al. Specific Distribution within the Enterobacter cloacae Complex of Strains Isolated from Infected Orthopedic Implants. J Clin Microbiol. août 2009;47(8):2489-95.
42. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev. 18 sept 2019;32(4):e00002-19.
43. Bosi C, Davin-Regli A, Bornet C, Mallea M, Pages JM, Bollet C. Most Enterobacter aerogenes strains in France belong to a prevalent clone. J Clin Microbiol. juill 1999;37(7):2165-9.
44. Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon H. Épidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1999–2007. Pathol Biol. 1 avr 2013;61(2):38-43.
45. Haiko J, Westerlund-Wikström B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. Biology. déc 2013;2(4):1242-67.
46. Barnes AI, Ortiz C, Paraje MG, Balanzino LE, Albesa I. Purification and characterization of a cytotoxin from Enterobacter cloacae. Can J Microbiol. août 1997;43(8):729-33.
47. Krzysińska S, Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Cytotoxic activity of Enterobacter cloacae human isolates. FEMS Immunol Med Microbiol. 1 août 2009;56(3):248-52.

48. Krzysińska S, Koczura R, Mokracka J, Puton T, Kaznowski A. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 1 sept 2010;49(3):83-9.
49. Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev.* avr 1997;10(2):220-41.
50. Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *J Clin Nurs.* 1995;4(1):5-12.
51. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 20 août 1998;339(8):520-32.
52. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis.* 15 mai 2001;32(Supplement_2):S114-32.
53. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 1 janv 2006;12:3-8.
54. Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 1 août 2004;12(8):378-85.
55. Loewen K, Schreiber Y, Kirlew M, Bocking N, Kelly L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Can Fam Physician.* juill 2017;63(7):512-20.
56. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:107.
57. Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.* déc 1982;66(6):1339-41.
58. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med.* juin 2017;90(2):269-81.
59. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4643-7.
60. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. d-Ala-d-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium* ▽ . *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2011;55(10):4606-12.
61. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular Characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with Low-Level Vancomycin Resistance Harboring a Novel d-Ala-d-Ser Gene Cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2008;52(7):2667-72.
62. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res.* janv 2020;21:169-76.
63. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* sept 2009;7(9):629-41.
64. Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents.* nov 2007;30(5):398-408.

65. Masson E. EM-Consulte. [cité 12 oct 2023]. Standing Medical Advisory Committee Sub-Group on Antimicrobial Resistance. *The path of least resistance*. London: Stationery Office; 1998. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/489742/standing-medical-advisory-committee-sub-group-on-a>
66. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP. *Pharmaceutical Microbiology*.
67. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 15 juin 2016;80(3):629-61.
68. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*. 15 févr 2013;4(2):107-18.
69. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 28 août 2020;17(17):6278.
70. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*. juin 1992;60(6):2529-35.
71. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc Natl Acad Sci*. 17 nov 2015;112(46):E6369-78.
72. Li G, Sun S, Zhao ZY, Sun Y. The pathogenicity of *rmpA* or aerobactin-positive *Klebsiella pneumoniae* in infected mice. *J Int Med Res*. 1 sept 2019;47(9):4344-52.
73. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio*. 13 sept 2016;7(5):10.1128/mbio.01397-16.
74. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 12 sept 2005;202(6):761-9.
75. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. juill 2007;20(3):440-58, table of contents.
76. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2009;53(12):5046-54.
77. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 16 août 2006;6:130.
78. Roca Subirà I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila Estapé J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol* [Internet]. 2012 [cité 21 juill 2023];3. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00148>
79. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. mars 2013;37(2):130-55.
80. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. avr 1996;9(2):148-65.

81. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. déc 2007;5(12):939-51.
82. Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk Factors for Nosocomial Bloodstream Infections Due to *Acinetobacter baumannii*: A Case-Control Study of Adult Burn Patients. *Clin Infect Dis*. 1 janv 1999;28(1):59-66.
83. Chang WN, Lu CH, Huang CR, Chuang YC. Community-Acquired *Acinetobacter* Meningitis in Adults. *Infection*. 1 déc 2000;28(6):395-7.
84. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 déc 2007;26(12):857-68.
85. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. août 2014;71(3):292-301.
86. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. août 2012;15(4):237-47.
87. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2005;7(8):1127-38.
88. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Infect Immun*. mai 2010;78(5):1952-62.
89. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. *PLOS Pathog*. 1 avr 2010;6(4):e1000834.
90. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberman SL, MacDonald U, et al. The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor. *Infect Immun*. sept 2010;78(9):3993-4000.
91. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberman SL, et al. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 15 févr 2009;199(4):513-21.
92. Lipopolysaccharides of *Acinetobacter* [Internet]. [cité 24 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.caister.com/hsp/abstracts/acineto/03.html>
93. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. juin 2007;59(6):1210-5.
94. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis*. juill 1990;162(1):96-102.
95. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2018 [Internet]. [cité 19 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-report-2018>

96. Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. The Flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Resistance to Clearance by Surfactant Protein A. *PLOS ONE*. 27 juin 2007;2(6):e564.
97. Dauner M, Skerra A. Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *Chembiochem*. 2 mars 2020;21(5):601-6.
98. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol*. déc 2011;61(4):717-32.
99. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K ichi, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res*. 18 févr 2014;15(1):21.
100. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor L. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In: Chakraborti S, Dhalla NS, éditeurs. *Pathophysiological Aspects of Proteases* [Internet]. Singapore: Springer; 2017 [cité 19 sept 2023]. p. 381-97. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16
101. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol*. avr 2003;28(4):528-37.
102. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLoS ONE*. 1 nov 2011;6(11):e27091.
103. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 28 juin 2017;27(6):1053-64.
104. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 mars 2002;34(5):634-40.
105. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol*. oct 2010;13(5):558-64.
106. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*. 10 août 2020;9(1):130.
107. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 13 oct 2015;132(15):1435-86.
108. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Pol J Microbiol*. 2008;57(2):173-8.
109. Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist*. mars 2019;16:36-47.
110. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb Drug Resist Larchmt N*. juin 2018;24(5):590-606.

111. Lebreton F, Valentino MD, Schaufler K, Earl AM, Cattoir V, Gilmore MS. Transferable vancomycin resistance in clade B commensal-type *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin 2018;73(6):1479-86.
112. Teo JWP, Krishnan P, Jureen R, Lin RTP. Detection of an unusual van genotype in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital isolate. *J Clin Microbiol.* déc 2011;49(12):4297-8.
113. Papagiannitsis CC, Malli E, Florou Z, Medvecky M, Sarrou S, Hrabak J, et al. First description in Europe of the emergence of *Enterococcus faecium* ST117 carrying both vanA and vanB genes, isolated in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 1 déc 2017;11:68-70.
114. Evers S, Quintiliani R, Courvalin P. Genetics of Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Microb Drug Resist.* janv 1996;2(2):219-23.
115. Labibzadeh M, Kaydani GA, Savari M, Ekrami A. Emergence of High-level Gentamicin Resistance among Clinical Isolates from Burn Patients in South-west of Iran: Vancomycin Still Working. *Pol J Microbiol.* 1 déc 2018;67(4):401-6.
116. Finn E, Andersson FL, Madin-Warburton M. Burden of *Clostridioides difficile* infection (CDI) - a systematic review of the epidemiology of primary and recurrent CDI. *BMC Infect Dis.* 19 mai 2021;21(1):456.
117. Yang CC, Hsu PC, Chang HJ, Cheng CW, Lee MH. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia—a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Int J Infect Dis.* 1 nov 2013;17(11):e955-60.
118. Garvey M. Foodborne *Clostridioides* Species: Pathogenicity, Virulence and Biocontrol Options. *Microorganisms.* 3 oct 2023;11(10):2483.
119. Marcos P, Whyte P, Rogers T, McElroy M, Fanning S, Frias J, et al. The prevalence of *Clostridioides difficile* on farms, in abattoirs and in retail foods in Ireland. *Food Microbiol.* 1 sept 2021;98:103781.
120. Tiwari A, Nagalli S. *Clostridium botulinum* Infection. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cité 18 déc 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553081/>
121. Munir MT, Mtimet N, Guillier L, Meurens F, Fravallo P, Federighi M, et al. Physical Treatments to Control *Clostridium botulinum* Hazards in Food. *Foods.* janv 2023;12(8):1580.
122. AlJindan R, AlEraky DM, Farhat M, Almandil NB, AbdulAzeed S, Borgio JF. Genomic Insights into Virulence Factors and Multi-Drug Resistance in *Clostridium perfringens* IRLC2505A. *Toxins.* juin 2023;15(6):359.
123. Kiu R, Brown J, Bedwell H, Leclaire C, Caim S, Pickard D, et al. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *Anim Microbiome.* 18 oct 2019;1(1):12.
124. Suzaki A, Hayakawa S. Clinical and Microbiological Features of Fulminant Haemolysis Caused by *Clostridium perfringens* Bacteraemia: Unknown Pathogenesis. *Microorganisms.* avr 2023;11(4):824.
125. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis.* févr 2016;3(1):23-42.

126. Wasels F, Spigaglia P, Barbanti F, Monot M, Villa L, Dupuy B, et al. Integration of erm(B)-containing elements through large chromosome fragment exchange in *Clostridium difficile*. *Mob Genet Elem.* 3 févr 2015;5(1):12-6.
127. Mullany P, Allan E, Roberts AP. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Res Microbiol.* mai 2015;166(4):361-7.
128. Farrow KA, Lyras D, Rood JI. Genomic analysis of the erythromycin resistance element Tn5398 from *Clostridium difficile* The GenBank accession number for the Tn5398 element and flanking sequence is AF109075. *Microbiology.* 1 oct 2001;147(10):2717-28.
129. Spigaglia P, Carucci V, Barbanti F, Mastrantonio P. ErmB Determinants and Tn916-Like Elements in Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2005;49(6):2550-3.
130. Spigaglia P, Drigo I, Barbanti F, Mastrantonio P, Bano L, Bacchin C, et al. Antibiotic resistance patterns and PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains isolated from swine and dogs in Italy. *Anaerobe.* févr 2015;31:42-6.
131. Dridi L, Tankovic J, Burghoffer B, Barbut F, Petit JC. gyrA and gyrB Mutations Are Implicated in Cross-Resistance to Ciprofloxacin and Moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2002;46(11):3418-21.
132. Ackermann G, Tang YJ, Kueper R, Heisig P, Rodloff AC, Silva J, et al. Resistance to Moxifloxacin in Toxigenic *Clostridium difficile* Isolates Is Associated with Mutations in gyrA. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2001;45(8):2348-53.
133. Kuwata Y, Tanimoto S, Sawabe E, Shima M, Takahashi Y, Ushizawa H, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 avr 2015;34(4):763-72.
134. Spigaglia P, Barbanti F, Louie T, Barbut F, Mastrantonio P. Molecular analysis of the gyrA and gyrB quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2009;53(6):2463-8.
135. Wasels F, Kuehne SA, Cartman ST, Spigaglia P, Barbanti F, Minton NP, et al. Fluoroquinolone resistance does not impose a cost on the fitness of *Clostridium difficile* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2015;59(3):1794-6.
136. Boucherle B, Peuchmaur M, Boumendjel A, Haudecoeur R. Occurrences, biosynthesis and properties of aurones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry.* 1 oct 2017;142:92-111.
137. Nakayama T, Sato T, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Hayashi H, Tanaka Y, et al. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.* 15 juin 2001;499(1-2):107-11.
138. Wong E. Occurrence and biosynthesis of 4',6-dihydroxyaurone in soybean. *Phytochemistry.* 1 mai 1966;5(3):463-7.
139. Farag MA, Deavours BE, de Fátima A, Naoumkina M, Dixon RA, Sumner LW. Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* nov 2009;151(3):1096-113.
140. Alsayari A, Muhsinah AB, Hassan MZ, Ahsan MJ, Alshehri JA, Begum N. Aurone: A biologically attractive scaffold as anticancer agent. *Eur J Med Chem.* 15 mars 2019;166:417-31.

141. Muzychka OV, Kobzar OL, Popova AV, Frasinyuk MS, Vovk AI. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg Med Chem.* 15 juill 2017;25(14):3606-13.
142. Sui G, Li T, Zhang B, Wang R, Hao H, Zhou W. Recent advances on synthesis and biological activities of aurones. *Bioorg Med Chem.* 1 janv 2021;29:115895.
143. Bandgar BP, Patil SA, Korbad BL, Biradar SC, Nile SN, Khobragade CN. Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Eur J Med Chem.* juill 2010;45(7):3223-7.
144. Shin SY, Shin MC, Shin JS, Lee KT, Lee YS. Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 août 2011;21(15):4520-3.
145. Brewer M s. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2011;10(4):221-47.
146. Makhmoor T, Naheed S, Shujaat S, Jalil S, Hayat S, Choudhary MI, et al. Hepatoprotection by chemical constituents of the marine brown alga *Spatoglossum variabile*: A relation to free radical scavenging potential. *Pharm Biol.* 1 mars 2013;51(3):383-90.
147. Xiao CJ, Zhang Y, Qiu L, Dong X, Jiang B. Schistosomicidal and antioxidant flavonoids from *Astragalus englerianus*. *Planta Med.* déc 2014;80(18):1727-31.
148. Chen JF, Liu ZQ. Ferrocenyl-Appended Aurone and Flavone: Which Possesses Higher Inhibitory Effects on DNA Oxidation and Radicals? *Chem Res Toxicol.* 16 mars 2015;28(3):451-9.
149. Detsi A, Majdalani M, Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina D, Kefalas P. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem.* 1 déc 2009;17(23):8073-85.
150. Nigam S, Jayashree BS. Limitation of Algar–Flynn–Oyamada reaction using methoxy substituted chalcones as reactants and evaluation of the newly transformed aurones for their biological activities. *Res Chem Intermed.* 1 mai 2017;43(5):2839-64.
151. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 1 sept 2006;19(6):669-75.
152. Pan G, Li X, Zhao L, Wu M, Su C, Li X, et al. Synthesis and anti-oxidant activity evaluation of (±)-Anastatins A, B and their analogs. *Eur J Med Chem.* 29 sept 2017;138:577-89.
153. Nakabo D, Okano Y, Kandori N, Satohira T, Kataoka N, Akamatsu J, et al. Convenient Synthesis and Physiological Activities of Flavonoids in *Coreopsis lanceolata* L. Petals and Their Related Compounds. *Molecules.* juill 2018;23(7):1671.
154. Jardosh HH, Patel MP. Antimicrobial and antioxidant evaluation of new quinolone based aurone analogs. *Arab J Chem.* 1 mai 2017;10:S3781-91.
155. Yang D, Taylor ZE, Handy S, Li S, Liu J, Stabenow J, et al. Identification of Anti-tuberculosis Compounds From Aurone Analogs. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cité 15 nov 2023];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01004>

156. Campaniço A, Carrasco MP, Njoroge M, Seldon R, Chibale K, Perdigão J, et al. Azaaurones as Potent Antimycobacterial Agents Active against MDR- and XDR-TB. *ChemMedChem*. 20 août 2019;14(16):1537-46.
157. Meguellati A, Ahmed-Belkacem A, Yi W, Haudecoeur R, Crouillère M, Brillet R, et al. B-ring modified aurones as promising allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Eur J Med Chem*. 10 juin 2014;80:579-92.
158. Chintakrindi AS, Gohil DJ, Chowdhary AS, Kanyalkar MA. Design, synthesis and biological evaluation of substituted flavones and aurones as potential anti-influenza agents. *Bioorg Med Chem*. 1 janv 2020;28(1):115191.
159. Malbari KD, Chintakrindi AS, Ganji LR, Gohil DJ, Kothari ST, Joshi MV, et al. Structure-aided drug development of potential neuraminidase inhibitors against pandemic H1N1 exploring alternate binding mechanism. *Mol Divers*. nov 2019;23(4):927-51.
160. Caleffi GS, Rosa AS, de Souza LG, Avelar JLS, Nascimento SMR, de Almeida VM, et al. Aurones: A Promising Scaffold to Inhibit SARS-CoV-2 Replication. *J Nat Prod*. 23 juin 2023;86(6):1536-49.
161. Silva Torres D, Alves de Oliveira B, Souza D Silveira L, Paulo da Silva M, Rodrigues Durães Pereira V, Moraes J, et al. Synthetic Aurones: New Features for *Schistosoma mansoni* Therapy. *Chem Biodivers*. nov 2021;18(11):e2100439.
162. Roussaki M, Costa Lima S, Kypreou AM, Kefalas P, Cordeiro da Silva A, Detsi A. Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents. *Int J Med Chem*. 25 sept 2012;2012:e196921.
163. Morimoto M, Cantrell CL, Khan S, Tekwani BL, Duke SO. Antimalarial and Antileishmanial Activities of Phytophenolics and Their Synthetic Analogues. *Chem Biodivers*. déc 2017;14(12).
164. Carrasco MP, Newton AS, Gonçalves L, Góis A, Machado M, Gut J, et al. Probing the aurone scaffold against *Plasmodium falciparum*: Design, synthesis and antimalarial activity. *Eur J Med Chem*. 10 juin 2014;80:523-34.
165. Souard F, Okombi S, Beney C, Chevalley S, Valentin A, Boumendjel A. 1-Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs. *Bioorg Med Chem*. 1 août 2010;18(15):5724-31.
166. Wang Z, Bae EJ, Han YT. Synthesis and anti-inflammatory activities of novel dihydropyranoaurone derivatives. *Arch Pharm Res*. 1 juin 2017;40(6):695-703.
167. Park HS, Nelson DE, Taylor ZE, Hayes JB, Cunningham KD, Arivett BA, et al. Suppression of LPS-induced NF- κ B activity in macrophages by the synthetic aurone, (Z)-2-((5-(hydroxymethyl) furan-2-yl) methylene) benzofuran-3(2H)-one. *Int Immunopharmacol*. 1 févr 2017;43:116-28.
168. Cancer [Internet]. [cité 3 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
169. Monserrat JP, Tiwari KN, Quentin L, Pigeon P, Jaouen G, Vessièrès A, et al. Ferrocenyl flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells and cytotoxicity against B16 murine melanoma cells. *J Organomet Chem*. 15 juin 2013;734:78-85.

170. Zheng X, Wang H, Liu YM, Yao X, Tong M, Wang YH, et al. Synthesis, Characterization, and Anticancer Effect of Trifluoromethylated Aurone Derivatives. *J Heterocycl Chem.* 2015;52(1):296-301.
171. Hassan GS, Georgey HH, George RF, Mohammed ER. Construction of some cytotoxic agents with aurone and furoaurone scaffolds. *Future Med Chem.* janv 2018;10(1):27-52.
172. Xie Y, Kril LM, Yu T, Zhang W, Frasnayuk MS, Bondarenko SP, et al. Semisynthetic aurones inhibit tubulin polymerization at the colchicine-binding site and repress PC-3 tumor xenografts in nude mice and myc-induced T-ALL in zebrafish. *Sci Rep.* 23 avr 2019;9:6439.
173. Tóth S, Szepesi Á, Tran-Nguyen VK, Sarkadi B, Németh K, Falson P, et al. Synthesis and Anticancer Cytotoxicity of Azaaurones Overcoming Multidrug Resistance. *Molecules.* janv 2020;25(3):764.
174. Sekizaki H. Synthesis of 2-Benzylidene-3(2H)-benzofuran-3-ones (Aurones) by Oxidation of 2'-Hydroxychalcones with Mercury(II) Acetate. *Bull Chem Soc Jpn.* avr 1988;61(4):1407-9.
175. Agrawal NN, Soni PA. A new process for the synthesis of aurones by using mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethyl sulfoxide. *IJC-B Vol45B05 May 2006* [Internet]. mai 2006 [cité 7 sept 2023]; Disponible sur: <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/6452>
176. Thakkar K, Cushman M. A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4-methoxyaurones by thallium (III) nitrate. *Tetrahedron Lett.* 29 août 1994;35(35):6441-4.
177. Donnelly JA, Higginbotham CL. Flavone formation in the wheeler aurone synthesis. *Tetrahedron.* 1 janv 1990;46(20):7219-26.
178. Ragab FA, Yahya TAA, El-Naa MM, Arafa RK. Design, synthesis and structure-activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. *Eur J Med Chem.* 23 juill 2014;82:506-20.
179. Weng Y, Chen Q, Su W. Copper-Catalyzed Intramolecular Tandem Reaction of (2-Halogenphenyl)(3-phenyloxiran-2-yl)methanones: Synthesis of (Z)-Aurones. *J Org Chem.* 2 mai 2014;79(9):4218-24.
180. Garcia H, Iborra S, Primo J, Miranda MA. 6-Endo-Dig vs. 5-Exo-Dig ring closure in o-hydroxyaryl phenylethynyl ketones. A new approach to the synthesis of flavones and aurones. *J Org Chem.* 1 nov 1986;51(23):4432-6.
181. Liu C, Zhang Z, Zhang J, Liu X, Xie M. Regioselective Synthesis of Aurone Derivatives via PBu3-Catalyzed Cyclization of 2-Alkynoylphenols. *Chin J Chem.* 2014;32(12):1233-7.
182. Taylor C, Bolshan Y. Metal-free methodology for the preparation of sterically hindered alkynoylphenols and its application to the synthesis of flavones and aurones. *Tetrahedron Lett.* 15 juill 2015;56(29):4392-6.
183. Jong TT, Leu SJ. Intramolecular cyclisation catalysed by silver(I) ion; a convenient synthesis of aurones. *J Chem Soc Perkin 1.* 1 janv 1990;(2):423-4.
184. Harkat H, Blanc A, Weibel JM, Pale P. Versatile and Expeditious Synthesis of Aurones via AuI-Catalyzed Cyclization. *J Org Chem.* 1 févr 2008;73(4):1620-3.
185. Geissman TA, Harborne JB. Anthochlor Pigments. X. Aureusin and Cernuoside. *J Am Chem Soc.* 1 sept 1955;77(17):4622-4.

186. Varma RS, Varma M. Alumina-mediated condensation. A simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Lett.* 29 sept 1992;33(40):5937-40.
187. Kumar S. An improved one-pot and eco-friendly synthesis of aurones under solvent-free conditions. *Green Chem Lett Rev.* 2 janv 2014;7(1):95-9.
188. Boumendjel A, Mariotte AM, Beney C. An efficient synthesis of 4,6-dimethoxyaurones. *Heterocycles.* 2001;55:967.
189. Hawkins I, Handy ST. Synthesis of aurones under neutral conditions using a deep eutectic solvent. *Tetrahedron.* 4 nov 2013;69(44):9200-4.
190. Kraus GA, Gupta V. Divergent Approach to Flavones and Aurones via Dihaloacrylic Acids. Unexpected Dependence on the Halogen Atom. *Org Lett.* 19 nov 2010;12(22):5278-80.
191. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* juill 2001;48 Suppl 1:5-16.
192. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(8):ix-xv.
193. Olleik H, Nicoletti C, Lafond M, Courvoisier-Dezord E, Xue P, Hijazi A, et al. Comparative Structure-Activity Analysis of the Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatins and Beauvericin. *Toxins.* 3 sept 2019;11(9):514.
194. Casanova M, Olleik H, Hdiouech S, Roblin C, Cavalier JF, Point V, et al. Evaluation of the Efficiency of Random and Diblock Methacrylate-Based Amphiphilic Cationic Polymers against Major Bacterial Pathogens Associated with Cystic Fibrosis. *Antibiot Basel Switz.* 8 janv 2023;12(1):120.
195. Benkhaled BT, Hadiouch S, Olleik H, Perrier J, Ysacco C, Guillaneuf Y, et al. Elaboration of antimicrobial polymeric materials by dispersion of well-defined amphiphilic methacrylic SG1-based copolymers. *Polym Chem.* 5 juin 2018;9(22):3127-41.

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE POITIERS

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2023/2024

Nom : DI MAIO

Prénom : Attilio

Titre de la thèse : Synthèse de nouveaux dérivés aurones et évaluation de leurs activités antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire

RESUME DE LA THESE :

Le développement de nouvelles molécules antibactériennes est, depuis quelques années, urgent. Cela est notamment dû à l'apparition de plus en plus de résistances bactériennes associées ou non à un mésusage. Dans ce contexte, les molécules naturelles et leurs dérivés sont une source importante de structures potentielles de par leur nombre et leur variété.

Les aurones sont des molécules naturelles de la famille des flavonoïdes qui, contrairement aux autres membres de cette famille, ont été relativement peu étudiées. Néanmoins, plusieurs études récentes ont démontré qu'elles possèdent un potentiel thérapeutique élevé dans plusieurs cas de pathologies, et particulièrement comme agent antibactérien.

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés antibactériennes et antifongiques d'aurones de synthèse possédant des substitutions non naturelles de type *amine* et *acetamide*. Plusieurs pathogènes ont été ciblés au cours de cette étude, notamment les bactéries du groupe ESKAPE classées comme bactéries prioritaires par l'OMS mais également des bactéries de type *Clostridioides* ou *E. coli* ainsi que des champignons comme *C. albicans* et *A. niger*. En complément, l'activité anti-inflammatoire des aurones a également été évaluée.

Les résultats obtenus ont démontré que les aurones possèdent une activité antibactérienne sur de nombreuses souches, à la fois à Gram-positif et à Gram-négatif, parfois même sur des souches résistantes comme le SARM. Des substitutions clés ont été identifiées afin de pouvoir établir une relation structure-activité. En revanche, les aurones synthétisées ne semblent pas avoir d'activité anti-inflammatoire notable.

MOTS CLES :

Aurones - ESKAPE - Antibiotique - Toxicité - Relation structure-activité-Flavonoïdes

Membres du jury :

Madame le Professeur MARCHAND Sandrine, Professeur des Universités à la Faculté de Poitiers.

Monsieur le Professeur GUILLARD Jérôme, Professeur des Universités à la Faculté de Poitiers.

Monsieur le Professeur GREGOIRE Nicolas, Professeur des Universités à la Faculté de Poitiers.

Monsieur ROBIN Maxime, Maître de Conférence Universitaires à Aix-Marseille Université

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Signature de l'étudiant

Nom :

Prénom :

du Président du jury

Nom :

Prénom :