



Approche pluridisciplinaire de la problématique de la résistance bactérienne : conception, synthèse, évaluation de l'activité biologique et de la biodégradabilité de nouveaux agents antibactériens

Thibaut Boibessot

► To cite this version:

Thibaut Boibessot. Approche pluridisciplinaire de la problématique de la résistance bactérienne : conception, synthèse, évaluation de l'activité biologique et de la biodégradabilité de nouveaux agents antibactériens. Chimie thérapeutique. Université de Nîmes, 2016. Français. NNT : 2016NIME0002 . tel-01681283v2

HAL Id: tel-01681283

<https://theses.hal.science/tel-01681283v2>

Submitted on 11 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE DE NIMES**

Préparée au sein de l'Ecole Doctorale 583 - Risques et
Sociétés

Et de l'unité de recherche CHROME

Spécialité : **CHIMIE MEDICINALE**

Présentée par **THIBAUT BOIBESSOT**

**Approche pluridisciplinaire sur la
problématique de la résistance bactérienne :
conception, synthèse, évaluation de
l'activité biologique et de la
biodégradabilité de nouveaux agents
antibactériens**

Soutenue le 13 décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Valérie Declerck , Maître de conférences, Université Paris-Sud.	Rapporteur
M. Jacques Uziel , Maître de conférences, Université de Cergy-Pontoise.	Rapporteur
Mme Valérie Rolland , Professeur des universités, Université de Montpellier.	Examineur
M. Marc Pudlo , Maître de conférences, Université de Franche-Comté.	Examineur
M. Marcel Hibert , Professeur des universités, Université de Strasbourg.	Examineur
M. Benoit Roig , Professeur des universités, Université de Nîmes.	Examineur
M. Patrick Meffre , Professeur des universités, Université de Nîmes.	Directeur de thèse
Mme Zohra Benfodda , Maître de conférences, Université de Nîmes.	Co-directrice de thèse

*« L'amour c'est comme la chimie,
il faut deux corps pour avoir une réaction »*

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe CHROME (Détection et évaluation des risques chroniques et émergents) dirigée par le Pr. Benoit Roig de l'Université de Nîmes. Merci à lui de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, M. Patrick Meffre et ma co-directrice de thèse, Mme Zohra Benfodda pour avoir encadré ce travail de thèse. Leur disponibilité et leurs compétences scientifiques m'ont permis d'achever ce travail dans les meilleures conditions.

Je veux vivement remercier David Bénimélis pour sa grande écoute et son soutien indéfectible pendant ces trois années. N'oublions pas que la Bourgogne-Franche-Comté est la plus belle région de France et que son terroir est de loin le meilleur. Je remercie également Alexandre Lebeau pour les connaissances qu'il m'a transmises sur la modélisation moléculaire. Je n'oublierai pas non plus sa phrase fétiche: « ça va le faire ! ».

Je remercie également le Pr. Jean-Philippe Lavigne et le Dr. Catherine Dunyach pour leur collaboration dans ce travail de recherche. Merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire pour une formation express sur les tests de CMI. Cela m'a permis de progresser dans le domaine de la bactériologie et de connaître de nouvelles méthodes de travail. Je souhaite adresser mes remerciements au Pr. Hendrick Szurmant et au Dr. Christopher Zschiedrich pour tous les tests biologiques réalisés sur le projet TCS.

Je tiens particulièrement à remercier tous les membres de l'Université de Nîmes avec qui j'ai été en contact et avec qui j'ai partagé beaucoup de précieux moments. Je pense bien sûr à Adel, Carole, Didier, Fathi, Geoffrey, Martine, Maryline. Merci à vous !

Je souhaite adresser mes plus grands remerciements à « l'équipe des filles » : Amélie, Audrey, Axelle, Célia 1, Célia 2, Lara, Marine, qui m'ont toujours soutenu. Un clin d'œil à Amélie pour les heures passées sur la LC/MS ! Merci de ton aide !

Je remercie aussi mon acolyte de bureau et de thèse, Kévin Berrou. Merci pour ta sympathie,

ta compagnie, tes réflexions et pour la création du bureau des sports ! Je te souhaite une très bonne route pour la fin de ta thèse, n'oublie pas que le gras c'est la vie et s'il te plaît, pour le prochain thésard, prends quelqu'un qui vient « du NORD ! ».

Je tiens également à remercier les autres thésards de l'Université de Nîmes : Armance, Méryl, et Yannick. Nous avons préparé le même diplôme et pourtant cette expérience était totalement différente pour nous quatre. Ce fut très enrichissant d'échanger avec vous ! Je vous souhaite une très bonne continuation. Merci à mes deux stagiaires : Ludivine et Rémy pour le travail que vous avez effectué ! J'espère que la suite de votre cursus sera tout aussi prolifique !

Je suis extrêmement reconnaissant pour la confiance que le Dr. Marc Pudlo et M. Vincent Luzet m'ont octroyée en 2011. Vous avez été les premiers à m'accueillir dans un laboratoire de recherche dans le domaine de la chimie médicinale et vous m'avez donné le goût de la recherche. Aujourd'hui, je vous présente mon travail de thèse et j'espère que celui-ci sera à la hauteur de vos attentes.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe SYMPA de Clermont-Ferrand : le Pr. Pascale Moreau, le Pr. Fabrice Anizon et le Dr. Francis Giraud. Merci de m'avoir conforté dans mon désir de faire de la recherche et de m'avoir poussé à faire une thèse.

Papa, Maman, merci pour tout. Merci d'avoir toujours fait passer vos enfants en priorité. Merci d'avoir tout fait pour que je puisse réaliser ce travail ! Merci à tout le reste de ma famille, ma sœur, mes grands-parents, mes tantes et oncles (par filiation et ceux d'adoption) ! On dit qu'on ne choisit pas sa famille, cependant, je ne vois pas qui j'aurais pu choisir à votre place ! Vous êtes une famille formidable et je vous dois tout !

Ma princesse, merci d'avoir toujours été là et d'être encore présente à mes côtés. Tu m'apportes tellement de choses au quotidien ! Aujourd'hui, si j'en suis là, c'est grâce à toi !

À mes amis, vous qui êtes ma deuxième famille, merci d'avoir fait le déplacement aujourd'hui ! Vous m'avez toujours soutenu et encouragé !

À mon grand-père ce héros, le moral à Zorro !

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	8
Abréviations et acronymes	13
 Introduction générale	 16
 CHAPITRE 1 - Synthèse d'inhibiteurs des systèmes à deux composants	 20
1. Présentation générale des systèmes à deux composants	21
1.1. Un système d'adaptation	21
1.2. Composition et présence des systèmes à deux composants chez les bactéries.....	21
1.3. Mode de fonctionnement des systèmes à deux composants	22
1.4. Structure des systèmes à deux composants.....	23
1.4.1. Les histidine kinases	23
1.4.2. Les régulateurs de réponse	24
2. Définition des objectifs de recherche	24
2.1. La thérapie combinatoire	24
2.2. Une cible potentielle pour le développement de nouvelles molécules anti-infectieuses.....	25
2.3. L'inhibition des voies de signalisation.....	27
3. État de l'art.....	28
3.1. Inhibiteurs d'histidine kinases connus de la littérature	28
3.2. Cible thérapeutique envisagée par notre équipe	35
3.2.1. Walk/WalR un système à deux composants essentiel pour les bactéries	35
3.2.2. Inhibiteurs du système à deux composants Walk/WalR.....	35
4. Travaux préliminaires réalisés au laboratoire.....	42

4.1. Différences structurales du site actif chez la super famille GHKL.....	42
4.2. Inhibiteurs communs d'histidine kinases et de la protéine Hsp90	43
4.3. Modélisation moléculaire.....	45
4.4. Stratégie de conception des composés	48
4.5. Formule générale des composés.....	49
5. Synthèse d'une bibliothèque de molécules	51
5.1. Généralités sur les réactions de couplage	51
5.2. La réaction de couplage croisé de Suzuki-Miyaura	51
5.3. Synthèse d'une famille de molécules dérivée du thiophène	54
6. Évaluations pharmacologiques des composés dérivés du thiophène	57
6.1. Inhibitions multiples d'histidine kinases	57
6.2. Une inhibition spécifique aux histidine kinases.....	59
6.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	60
6.4. Détermination du caractère bactéricide des composés 66 et 67	62
6.5. Évaluation de l'activité hémolytique	63
6.6. Évaluation de composés plus solubles	63
6.7. Évaluation des composés de la série du thiophène (63 à 86) en tant qu'adjuvant 65	
7. Impact et devenir des résidus pharmaceutiques dans l'environnement ..	67
7.1. Contexte général	67
7.2. Facteurs de contamination environnementale	68
7.3. Le traitement des eaux usées	69
7.4. Les effets secondaires liés à cette contamination environnementale.....	71
7.5. La biodégradabilité des molécules	72
7.5.1. Définition	72
7.5.2. Principe des tests de biodégradabilité	73
7.5.3. Production de nouvelles molécules biodégradables	75
8. Conclusion et perspectives de recherche.....	76
Partie expérimentale	79

Généralités	80
Description des méthodes générales utilisées	83

CHAPITRE 2 - Synthèse d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse du peptidoglycane 121

1. La paroi bactérienne	122
1.1. Généralités.....	122
1.2. La voie de biosynthèse du peptidoglycane.....	123
1.2.1. La synthèse des précurseurs nucléotidiques.....	123
1.2.2. La synthèse des précurseurs des intermédiaires lipidiques	123
1.2.3. La polymérisation du peptidoglycane	124
1.3. Les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne.....	126
1.3.1. Les antibiotiques de la famille des β -lactames.....	126
1.3.2. Les antibiotiques ciblant l'intermédiaire lipide II	128
1.3.3. Les lipopeptides.....	130
1.3.4. Les analogues d'acides aminés.....	132
1.4. Une cible attractive pour le développement de nouveaux agents antibactériens : le cas de la fosfomycine	133
1.4.1. Généralités	133
1.4.2. Mécanisme d'action	134
1.4.3. Activités biologiques.....	135
1.4.4. Mécanismes de résistance à la fosfomycine	136
2. Les cibles biologiques visées par notre équipe	137
2.1. La diaminopimélate épimérase DapF.....	137
2.1.1. Généralités et fonctionnement	137
2.1.2. Les inhibiteurs de l'épimérase DapF connus de la littérature	140
2.2. La famille des ligases Mur.....	145
2.2.1. Généralités	145
2.2.2. Fonctionnement et similitudes.....	147
2.2.3. Le cas particulier : MurE	149
2.2.4. Les inhibiteurs de la ligase MurE	150
2.2.4.1. Les inhibiteurs analogues de l'acide diaminopimélique.....	150
2.2.4.2. Les inhibiteurs analogues de l'état de transition	152
2.2.4.3. Les inhibiteurs obtenus par modélisation moléculaire	153
2.2.4.4. Les inhibiteurs d'origine naturelle.....	159
3. Stratégie thérapeutique envisagée	161
3.1. Contexte géopolitique et biologique.....	161
3.2. Stratégie mise en place.....	162

4. Synthèse des molécules possédant un triazole.....	164
4.1. La chimie click	164
4.1.1. Historique de la réaction	164
4.1.2. Mécanisme de la cycloaddition catalysée par le cuivre (I)	165
4.1.3. Sélectivité 1,4 versus 1,5	167
4.1.4. Principes de base et évolution	169
4.1.5. Molécules biologiquement actives.....	170
4.2. Intérêts du cycle 1,2,3-triazole.....	171
4.2.1. Propriétés physico-chimiques	171
4.2.2. Composés d'intérêts biologiques comportant un cycle 1,2,3- triazole	172
4.2.3. Structures des divers composés envisagés.....	174
4.3. Analyse rétrosynthétique	175
4.4. Préparation de synthons clés.....	175
4.4.1. Synthèse du synthon éthynylglycine 165	176
4.4.2. Synthèse de l'azoture 168	181
4.5. Réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire	182
4.5.1. Synthèse des triazoles 174, 175, 178 et 179	182
4.5.2. Synthèse des triazoles 180 et 181	184
4.5.2.1. Synthèse du triazole aminoalcool 181	184
4.5.2.2. Tentatives d'oxydation de l'aminoolcool 181	186
4.5.2.3. Perspectives de synthèse	187
4.5.3. Synthèse du triazole tricyclique 186	189
5. Synthèse des molécules contenant une triple liaison	191
5.1. Un mécanisme d'action original	191
5.2. Analyse rétrosynthétique	192
5.3. Synthèses de dérivés halogénés	193
5.3.1. Synthèse des dérivés chlorés 187 et bromés 188	193
5.3.2. Synthèse du dérivé iodé 189	194
5.4. Tentatives de couplage.....	195
6. Conclusion et perspectives de recherche.....	197
Suite de la Partie expérimentale	199
<i>Description des méthodes générales utilisées</i>	<i>200</i>
Bibliographie	258
Publications.....	281

Abréviations et acronymes

$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique mesuré à la raie D du sodium (589 nm)
4-DMAP	4-diméthylaminopyridine
Ac	Acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTS-H ₂ O	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique monohydraté
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
cat.	Catalytique
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CI ₅₀	Concentration d'un composé inhibant 50% de l'effet observé
conc.	Concentrée
Cp*	Pentaméthylcyclopentadiényle
Cp	Cyclopentadiényle
DMP	2,2-Diméthoxypropane
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle
DFT	Density functional Theory
DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ERV	Entérocoques résistants à la vancomycine
EdP	Éther de pétrole
e.e.	Excès énantiomérique
G+	Gram-positif
G-	Gram-négatif
GHL	Gyrase B, Hsp90 et MutL
h	Heure
HK	Histidine kinase
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
IR	Infra-rouge
M	Masse molaire en g.mol ⁻¹
MHz	Mégahertz
mL	Millilitre
mM	Millimolaire

mmol	Millimole
Nbr. éq.	Nombre d'équivalent
N	Normalité
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OMS	Organisation mondiale de la santé
pdb	Protein data bank
Pi	Phosphate inorganique
r.d.	Rapport diastéréoisomérique
R _f	Rapport frontal
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
STEP	Station d'épuration
T	Température
TCS	Système à deux composants
THF	Tétrahydrofurane
UDP	Uridine diphosphate
UMP	Uridine monophosphate
UPLC	Chromatographie liquide ultra performance

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique de recherche de l'équipe CHROME (détection, évaluation et gestion de risques CHRONiques et éMERgents) de l'Université de Nîmes.

Un antibiotique (du grec *anti* : « contre » et *bios* : « la vie ») est une substance d'origine naturelle ou synthétique, qui possède la capacité d'inhiber de manière spécifique la vitalité d'une bactérie. Il existe deux types d'antibiotiques : les antibiotiques bactériostatiques, des substances capables de stopper la prolifération des cellules sans pour autant les tuer et les antibiotiques bactéricides, entraînant la mort des bactéries. La première définition du mot antibiotique a été donnée par Selman Abraham Waksman¹, microbiologiste américain d'origine russe. En 1947, il énonça qu'un antibiotique était : « une substance produite par un micro-organisme capable d'interférer avec la croissance et même de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes »^{2,3}. À l'origine, cette définition ne prenait en compte que les substances naturelles et excluait les antibiotiques synthétiques ou encore les substances produites par les plantes. Cette première définition, très restrictive, fut amplifiée par Turpin et Velu en 1957 : « Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse chimique, à coefficient chimiothérapeutique élevé, dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certains êtres pluricellulaires »⁴. Pour finir, une classification des antibiotiques est effectuée en fonction de leur origine, leur nature chimique, leur mode d'action et leur spectre d'action.

Leur découverte dans les années 1940 et notamment de la pénicilline par Sir Alexander Fleming est considérée comme une avancée thérapeutique majeure du 20^{ème} siècle (Figure 1). Celle-ci a complètement bouleversé l'histoire des hommes en réduisant de façon considérable le taux de mortalité engendré par les infections bactériennes. Devant ce constat, le qualificatif de « remède miracle » fut très vite adopté pour parler de ce bien inestimable que sont les antibiotiques. Néanmoins, les bactéries se sont toujours adaptées à leur environnement et il en est de même vis-à-vis des antibiotiques.

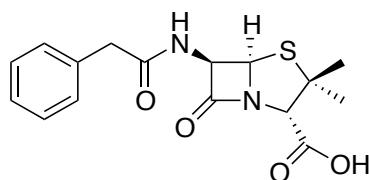


Figure 1. Structure de la pénicilline découverte par Fleming (Benzylpénicilline).

Avant l'introduction de la pénicilline il était presque inenvisageable de guérir d'une infection bactérienne sévère. Entre les années 1950 et la fin des années 1990, avec la période de l'âge d'or des antibiotiques, certains pensaient que l'éradication des bactéries infectieuses était venue. Cependant, aujourd'hui, il n'est plus possible d'imaginer que le traitement d'une infection puisse être réalisé avec le premier antibiotique venu.

La grande majorité des bactéries autrefois sensibles aux antibiotiques ont développé des aptitudes pour se défendre contre ces derniers, c'est ce qu'on appelle la résistance. Une utilisation abusive des antibiotiques combinée à un désintérêt marqué de l'industrie pharmaceutique ont provoqué l'apparition de souches bactériennes devenues résistantes à la plupart des familles d'antibiotiques disponibles sur le marché. Ces phénomènes de résistance se manifestent à différents niveaux d'exigences vis-à-vis de la sélection d'un antibiotique. Ainsi, on trouve deux types de bactéries résistantes :

- les bactéries dites multi-résistantes : ce sont des bactéries qui ne sont sensibles qu'à une certaine partie des antibiotiques disponibles sur le marché (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline⁵, entérobactéries productrices de la β -lactamases à spectre élargi⁶).

- les bactéries dites toto-résistantes : ce terme désigne l'ensemble des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles (*Mycobacterium tuberculosis*⁷, la bactérie responsable de la tuberculose). Ces bactéries sont encore peu répandues mais ce phénomène tendra à s'amplifier dans les décennies futures.

La transmission possible des gènes codants pour les mécanismes de résistance entre différentes espèces bactériennes a provoqué l'émergence de bactéries multi-résistantes qui posent de manière croissante des difficultés thérapeutiques et constituent ainsi un grave problème de santé publique. Chaque année en Europe, plus de 25 000 personnes décèdent d'une bactérie devenue insensible à l'arsenal thérapeutique actuellement disponible. Devant cette impasse médicale, le développement de nouvelles stratégies devient un besoin vital. Un

rapport alarmiste de l'organisation mondiale de la santé (OMS), prévoyait pour 2050, un retour à une ère sans antibiotique si aucune mesure drastique n'était entreprise.

Ce phénomène d'antibiorésistance n'est pas qu'une question de molécules et de bactéries. Ce défi que les hommes relèvent depuis plusieurs années est un problème mondial qui concerne tous les acteurs de la planète : les scientifiques (chimistes, biologistes, écologistes...), les personnels de santé (médecins, infirmiers...), les responsables politiques des grandes puissances mondiales, les industriels (domaine pharmaceutique et agricole) et bien sûr toutes les personnes assujetties à recevoir un jour une dose d'antibiotique⁸. Par ailleurs, quel que soit l'âge, l'origine sociale ou la région du monde, les bactéries résistantes se développent plus rapidement que les innovations thérapeutiques. Ainsi, cette évolution rend les traitements actuels inefficaces⁹. De plus, il faut être conscient que la prise d'un antibiotique a non seulement une influence sur le patient mais aussi sur toute la population (augmentation du taux de mortalité, mise en danger des progrès de la médecine (greffes, chimiothérapies, augmentation du coût des soins de santé, risques sanitaires)).

Ainsi, la mise en place de nouvelles stratégies pour la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques, constitue un challenge de grande envergure pour la communauté scientifique. Avec le besoin croissant de nouveaux antibiotiques, des stratégies alternatives se sont mises en place pour pallier ce manque d'innovations. Par exemple, l'utilisation d'un adjuvant en addition d'un antibiotique s'est déjà montrée efficace pour minimiser l'émergence des résistances. Par définition, un adjuvant est une molécule dépourvue ou possédant une très faible activité antimicrobienne, qui bloque les mécanismes de résistances et restaure l'activité d'un antibiotique¹⁰.

Mon projet de thèse s'inscrit dans une double thématique :

- La synthèse d'un adjuvant d'antibiotique (molécules polyaromatiques) permettant un ciblage thérapeutique spécifique des histidine kinases, des protéines essentielles impliquées dans les voies de signalisation des bactéries (systèmes à deux composants).
- La synthèse d'inhibiteurs potentiels de la voie de biosynthèse du peptidoglycane (constituant principal de la paroi bactérienne), permettant l'obtention de molécules bactéricides.

CHAPITRE 1 - Synthèse d'inhibiteurs des systèmes à deux composants

1. Présentation générale des systèmes à deux composants

1.1. Un système d'adaptation

Pour survivre et s'adapter à des changements environnementaux, les cellules procaryotes et eucaryotes, utilisent des systèmes de transduction du signal plus ou moins complexes. Ces mécanismes biologiques, basés sur un couple stimulus-réponse, permettent de détecter un signal extracellulaire et de le transformer sous forme de réponses cellulaires essentielles (expression de gènes)¹¹. La régulation de ces processus est dans la plupart des cas assurée par un mécanisme de type phosphorylation-déphosphorylation. Les protéines kinases, en charge de cette phosphorylation réversible, sont différenciées suivant la nature de l'acide aminé sur lequel elles agissent (sérine, thréonine, tyrosine ou histidine)¹².

À la fin des années 1990, le terme de « système à deux composants » est utilisé pour la première fois pour décrire un système de régulation de l'azote chez les bactéries¹³. Ces systèmes de régulation, très répandus chez les procaryotes, sont l'un des mécanismes les plus utilisés par les bactéries pour détecter, répondre et s'adapter à différents facteurs de stress : température, pH, concentration en nutriments ou encore la présence d'antibiotique¹⁴.

1.2. Composition et présence des systèmes à deux composants chez les bactéries

D'un point de vue structural, les systèmes à deux composants (TCS : « two-component system ») impliquent deux types de protéines : une histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR). Ils sont généralement identifiés par couple HK/RR et sont présents aussi bien chez les bactéries à gram-positif, qu'à gram-négatif. Des études ont montré une corrélation entre le nombre de TCS présents chez une bactérie et l'environnement dans lequel elle évolue. Les bactéries vivant principalement dans un environnement constant sont généralement pourvues d'un faible nombre de TCS, voire même d'aucun comme pour *Mycoplasma genitalium* (bactérie responsable de maladies sexuellement transmissibles). En revanche, celles qui peuplent un environnement avec une évolution rapide ou subissent des changements environnementaux divers, possèdent un grand nombre de TCS. Par exemple, *Myxococcus xanthus*, une bactérie du sol à gram-négatif, possède plus d'une centaine d'histidine kinases et

de régulateurs de réponse. Cette richesse d'un point de vue génétique suggère que les organismes s'adaptent à leur environnement en développant de manière croissante des gènes contrôlés par les TCS^{15,16}.

1.3. Mode de fonctionnement des systèmes à deux composants

L'histidine kinase, appelée domaine senseur, va s'autophosphoryler sur un résidu histidine conservé en réponse à un stimulus externe. Par la suite, ce groupement phosphate est transféré au régulateur de réponse, appelé domaine receveur, au niveau d'un résidu aspartate conservé. Cette phosphorylation induit un changement conformationnel du régulateur de réponse, permettant au domaine effecteur de se lier à l'ADN bactérien et d'induire une réponse spécifique adaptée¹⁴. Cette réaction de transfert est réalisée de façon stœchiométrique et permet à l'histidine kinase de réguler le niveau de phosphorylation du régulateur de réponse¹⁶ (Figure 2). En effet, elle présente une activité phosphatase permettant de réguler le niveau de phosphorylation du régulateur de réponse¹⁷.

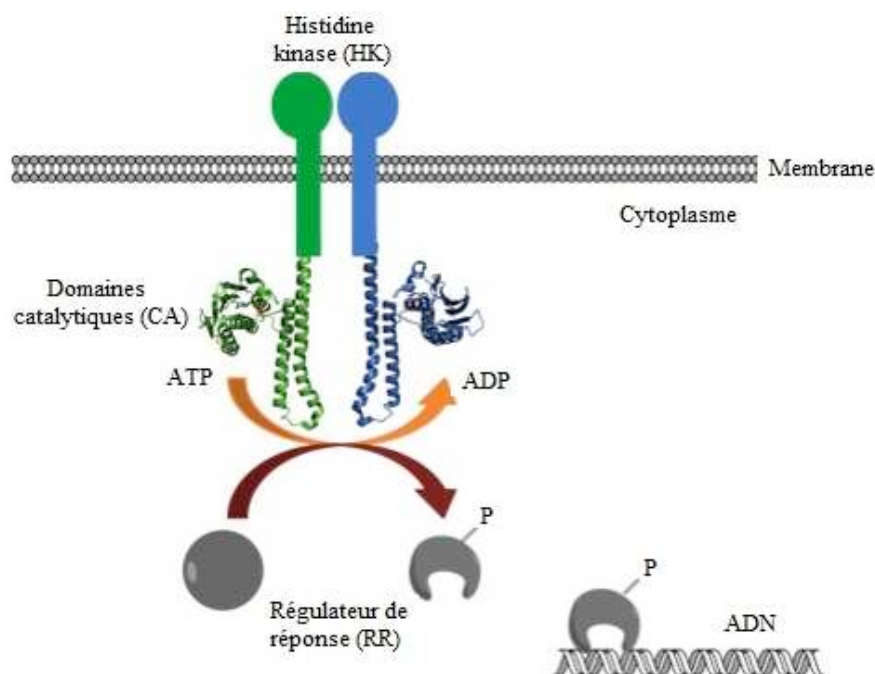


Figure 2. Schéma de principe du fonctionnement des systèmes à deux composants.

1.4. Structure des systèmes à deux composants

1.4.1. Les histidine kinases

Les histidine kinases sont des protéines homodimériques qui catalysent une réaction de phosphorylation. Sous l'action d'un stimulus, un monomère catalyse la phosphorylation du résidu histidine conservé sur le second monomère. Elles sont composées d'un domaine *N*-terminal extra-cytoplasmique et d'un domaine *C*-terminal situé dans le cytoplasme.

Dans un premier temps, les domaines senseurs présentent une grande diversité au niveau de leur séquence, incarnant la grande diversité de signaux perçus par les bactéries¹⁸. Dans un deuxième temps, la partie intra-cytoplasmique est composée de deux sous-domaines : un domaine lié directement à la partie trans-membranaire appelé DHp pour « dimerization and histidine phosphotransférase » et un domaine de liaison de l'ATP, appelé domaine CA pour « catalytic and ATPase »^{14,19}. Dans la majeure partie des cas, les kinases sont des enzymes dites transférases, car elles catalysent le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à une molécule cible. Cependant, les HKs ne catalysent pas directement cette réaction. C'est le domaine DHp qui permet le transfert jusqu'au régulateur de réponse (Figure 3).

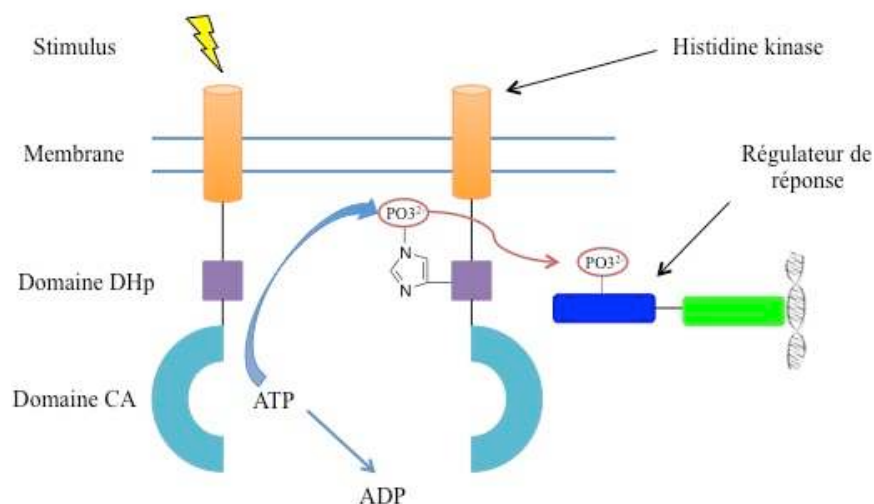


Figure 3. Principe de fonctionnement des histidine kinases.

1.4.2. Les régulateurs de réponse

Le régulateur de réponse est le deuxième composant qui participe aux voies de signalisation. Celui-ci est composé de deux sous-unités : un domaine conservé *N*-terminal dit domaine receveur et un domaine *C*-terminal variable, appelé domaine effecteur¹⁶.

Une étude a montré que les domaines receveurs présentaient une homologie de séquence allant de 20 à 30%, avec un petit nombre de résidus extrêmement conservés contribuant à ses diverses fonctions²⁰. Il confère à lui seul trois activités distinctes : il interagit avec l'histidine kinase phosphorylée et catalyse le transfert du groupement phosphate à un de ses résidus aspartate conservé, il catalyse sa propre auto-déphosphorylation et enfin, il régule l'activité phospho-dépendante du domaine effecteur²¹. Globalement, le site actif forme un cluster avec trois résidus d'acide aspartique extrêmement conservés. De plus, le domaine receveur possède, tout comme l'histidine kinase une activité phosphatase, permettant de réguler la durée de vie de l'état actif du régulateur de réponse²¹.

Le domaine effecteur, quant à lui, présente une variabilité assez importante au niveau des séquences d'acides aminés, résultant de la grande diversité de réponses biologiques qu'il peut fournir²⁰. Chez les organismes procaryotes, la majeure partie des domaines effecteurs agit comme des facteurs de transcription, ce qui induit la transcription de gènes spécifiques. Par exemple, chez *Escherichia coli*, 25 régulateurs de réponse sur 32 recensés se lient à l'ADN bactérien. Les autres possèdent une activité enzymatique (méthylestérase) ou une activité permettant une interaction avec d'autres protéines¹⁶.

2. Définition des objectifs de recherche

2.1. La thérapie combinatoire

Nous l'avons expliqué précédemment, la résistance aux antibiotiques constitue l'un des plus gros challenges pour le monde de la recherche médicale au 21^{ème} siècle. À la question : « Faut-il développer de nouveaux antibiotiques ? », la réponse est oui, même si celle-ci aurait semblé être en total décalage avec son temps il y a une vingtaine d'années²².

Cependant, les bactéries développent invariablement une résistance à toute monothérapie basée sur un mécanisme bactéricide/bactériostatique. Ces résistances, peuvent apparaître quelques mois seulement après l'introduction de l'antibiotique sur le marché (cas de la

daptomycine)²³. Parallèlement au développement de nouveaux antibiotiques, des alternatives thérapeutiques doivent être développées. La thérapie combinatoire, basée sur l'utilisation de plusieurs antibiotiques ou sur l'utilisation d'un adjuvant, est une des approches les plus utilisées pour le traitement d'infections compliquées. L'utilisation de plusieurs antibiotiques, comme pour le traitement séquentiel de la tuberculose²⁴, provoque une accumulation de mutations, conduisant à une résistance plus accrue. De ce fait, l'utilisation d'un adjuvant, permettant d'augmenter l'efficacité de l'antibiotique et de diminuer l'émergence de résistance constitue une thérapie de choix²⁵.

Dans notre stratégie, il n'est pas envisagé de cibler directement les mécanismes de résistance, comme le ferait l'acide clavulanique avec les β -lactamases, mais plutôt d'interagir de façon indirecte, en interférant avec les voies de signalisations impliquées dans l'expression des gènes de résistances comme les TCS²⁶.

2.2. Une cible potentielle pour le développement de nouvelles molécules anti-infectieuses

Les systèmes à deux composants ont un rôle crucial dans les voies de transduction du signal chez les bactéries, leur permettant de s'adapter à divers changements environnementaux. Cependant, les champs d'actions des TCS ne s'arrêtent pas aux besoins élémentaires et énergétiques (azote, carbone, phosphore...) ou à la régulation des facteurs physiques et chimiques (pH, température, pression osmotique...). En effet, depuis plus de 25 ans, l'étude de ces processus biologiques a connu un essor important et a permis de mettre en évidence leur implication dans la croissance bactérienne, l'expression de facteurs de virulence et dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques (Tableau 1)^{27,28}.

Systèmes à deux composants (HK/RR)	Bactérie	Fonction
NtrB/NtrC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Voie de régulation de l'azote
WalK/WalR	<i>Bacillus subtilis</i>	Métabolisme de la paroi cellulaire
AgrA/AgrC	<i>Staphylococcus aureus</i>	Régulation des facteurs de virulence
FsrC/FsrA	<i>Enterococcus faecalis</i>	Régulation des facteurs de virulence
VanR/VanS	<i>Enterococcus faecalis</i>	Résistance à la vancomycine
BaeS/BaeR	<i>Escherichia coli</i>	Résistance à la novobiocine

Tableau 1. Exemples de systèmes à deux composants et leurs implications chez les bactéries.

De plus, les systèmes à deux composants ont montré plusieurs caractéristiques très intéressantes pour devenir une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies antibactériennes^{27,29} :

- les TCS sont présents chez les bactéries, les levures, les champignons filamenteux et les plantes. Cependant, ils sont totalement absents chez les mammifères, y compris les humains.

- les HKs et les RRs possèdent un haut degré d'homologie de séquence au niveau de leur site actif, ce qui pourrait engendrer le développement d'une molécule à large spectre.

- une thérapie multicible supposerait un ralentissement considérable dans le développement de résistance, dû au fait qu'une mutation simultanée de plusieurs gènes codant pour la molécule biologiquement active est peu probable.

- certains TCS sont considérés comme essentiels pour les bactéries et leur inhibition conduirait à la mort des cellules bactériennes. D'autres TCS sont impliqués dans les mécanismes de résistance et leur inhibition pourrait conduire à une atténuation de ces mécanismes.

Compte tenu de l'implication importante des TCS dans la résistance aux antibiotiques et de son absence chez les eucaryotes supérieurs, cette cible biologique présente un fort potentiel pour le développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux adjuvants²³.

2.3. L'inhibition des voies de signalisation

La caractérisation aux rayons X de plusieurs structures d'histidine kinases et de régulateurs de réponse a permis d'identifier les caractéristiques structurales qui régissent l'activité de ces protéines. Par conséquent, plusieurs cibles ont été identifiées comme attractives pour l'action d'un inhibiteur potentiel, permettant de moduler l'activité de systèmes de signalisation : le domaine senseur de l'histidine kinase, le domaine de dimérisation (DHp), le domaine de liaison de l'ATP (CA), le domaine receveur et le domaine effecteur du régulateur de réponse^{30,31} (Figure 4).

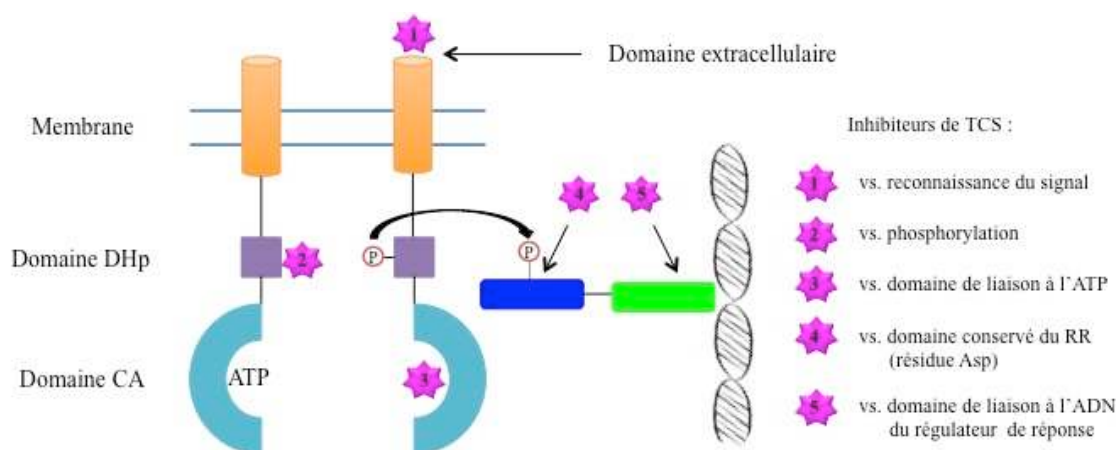


Figure 4. Les différentes cibles pour les inhibiteurs de systèmes à deux composants.

Cependant, certains domaines présentent de nombreux inconvénients pour le développement d'inhibiteurs. Le domaine senseur présente généralement une structure unique pour chaque histidine kinase. Le même constat est remarqué avec le domaine de liaison à l'ADN du régulateur de réponse. La multitude des signaux perçus par le domaine senseur se reflète au niveau du domaine effecteur du régulateur de réponse. Ainsi, le développement de molécules permettant de cibler spécifiquement ces domaines s'avère difficile. À l'inverse, le domaine de dimérisation contenant le résidu histidine conservé (domaine DHp), le domaine catalytique de l'histidine kinase (domaine CA) et le domaine receveur du régulateur de réponse présentent un haut degré d'homologie structurale. De ce fait, cela suggère qu'une seule molécule pourrait inhiber plusieurs TCS de manière quasi-simultanée en ciblant l'un des trois domaines^{30,32}.

De plus, chez les bactéries à gram-positif et à gram-négatif, la structure du domaine catalytique n'a révélé aucune similitude avec les sérine, thréonine et tyrosine kinases présentes chez les eucaryotes. En d'autres termes, un ciblage hautement spécifique des

histidine kinases est possible sans pour autant risquer une interaction avec des kinases humaines. Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence une homologie avec d'autres protéines : la protéine gyrase de la famille des ADN topoisomérases, la protéine chaperonne Hsp90 et la protéine de réparation de l'ADN MutL. Collectivement, les membres de cette superfamille appelée GHKL (ADN Gyrase, Hsp90, histidine Kinase et MutL), ont montré un ensemble de motifs communs pour le site de liaison à l'ATP, appelé : « Bergerat fold ». D'autre part, il n'y a pas de telle homologie pour les régulateurs de réponse^{15,33}.

En conclusion, le choix de cibler les systèmes à deux composants et plus particulièrement le domaine catalytique des histidine kinases s'avère être une stratégie de choix pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes.

3. État de l'art

Depuis 1995, le nombre d'articles scientifiques relatant des informations (fonctions, mécanisme) sur les systèmes à deux composants n'a cessé de croître. De plus, avec l'émergence de nombreuses études structurales sur les histidine kinases, la conception rationnelle d'inhibiteurs a pu être envisagée. Ainsi, un grand nombre de composés ont émergé de programmes de recherches intensifs comme le criblage à haut débit de bibliothèque de composés chimiques^{34,35}. Une revue non exhaustive des inhibiteurs synthétiques est présentée par la suite. Les molécules possédant les meilleures activités biologiques sont exposées, ainsi que les problèmes rencontrés pour leur développement.

3.1. Inhibiteurs d'histidine kinases connus de la littérature

En 1993, les premiers inhibiteurs synthétiques ont été rapportés par Roychoudhury et ses collaborateurs. Les isothiazolones **1** et **2** modulaient l'activité de AlgR2/AlgR1, un système à deux composants impliqué dans la synthèse d'un polysaccharide (alginate) servant à améliorer l'adhérence des biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, l'activité de deux imidazoliums **3** et **4** a été évaluée et a montré une activité assez faible sur AlgR2. Par contre, ceux-ci se sont montrés plus actifs sur trois kinases impliquées dans la régulation de facteurs de virulence chez les humains (Figure 5). Cependant, ces quatre inhibiteurs n'ont pas montré

une inhibition de la croissance bactérienne à des concentrations supérieures à 50 µg/mL lorsqu'ils étaient utilisés seuls³⁶.

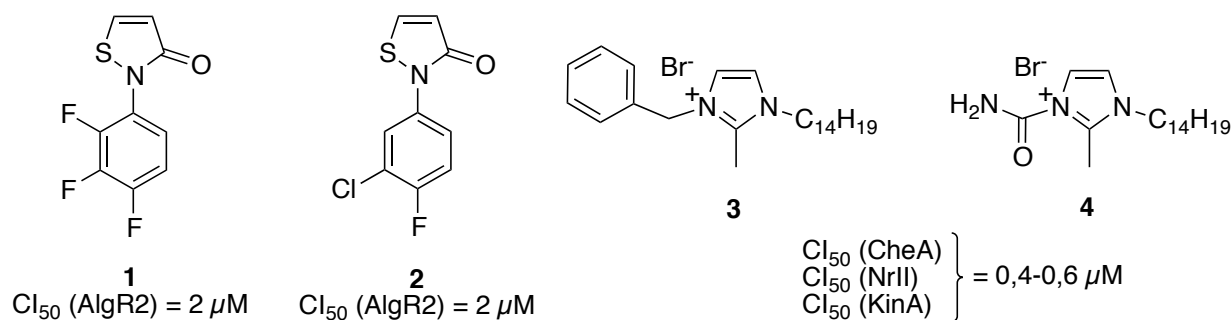


Figure 5. Structures des composés 1 à 4.

Par la suite, plusieurs séries d'inhibiteurs de système à deux composants vont être développées par des chercheurs du R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute. Ils vont principalement s'intéresser au TCS KinA/Spo0F, responsable du phénomène de sporulation chez *Bacillus subtilis*. Les composés 5, 6 et 7 vont présenter une activité inhibitrice (Cl_{50}) comprise entre 1,6 et 45 µM, corrélée avec une activité antibactérienne contre plusieurs agents pathogènes à gram-positif tels que : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Escherichia faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline (Figure 6)^{37,38}.

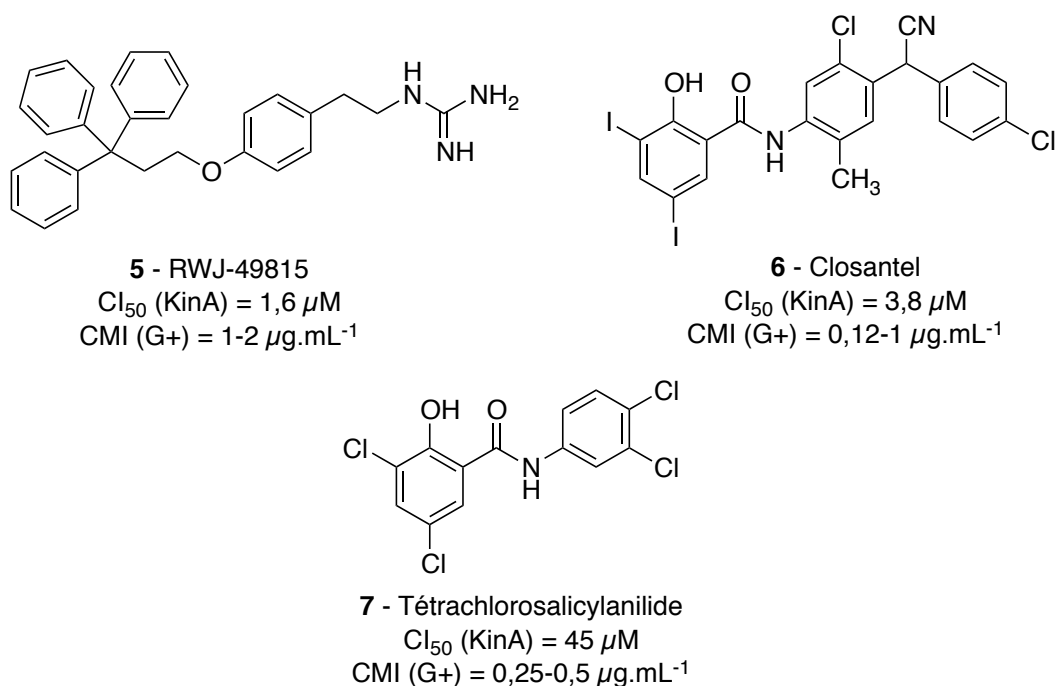


Figure 6. Structures du composé RWJ-49815, du closantel et du tétrachlorosalicylanilide.

Des modifications structurales vont être entreprises pour essayer d'améliorer l'activité de ces inhibiteurs. Dans un premier temps, la position du phénol et celle de la fonction amide ont été modifiées. Dans un deuxième temps, la fonction amide a été remplacée par un cycle 1,2,4-triazole pour ses propriétés bioisostériques, sa meilleure solubilité dans les milieux aqueux et sa capacité à réaliser des liaisons hydrogènes avec le substrat. Cependant, aucune amélioration significative n'a été observée^{39,40} (Figure 7).

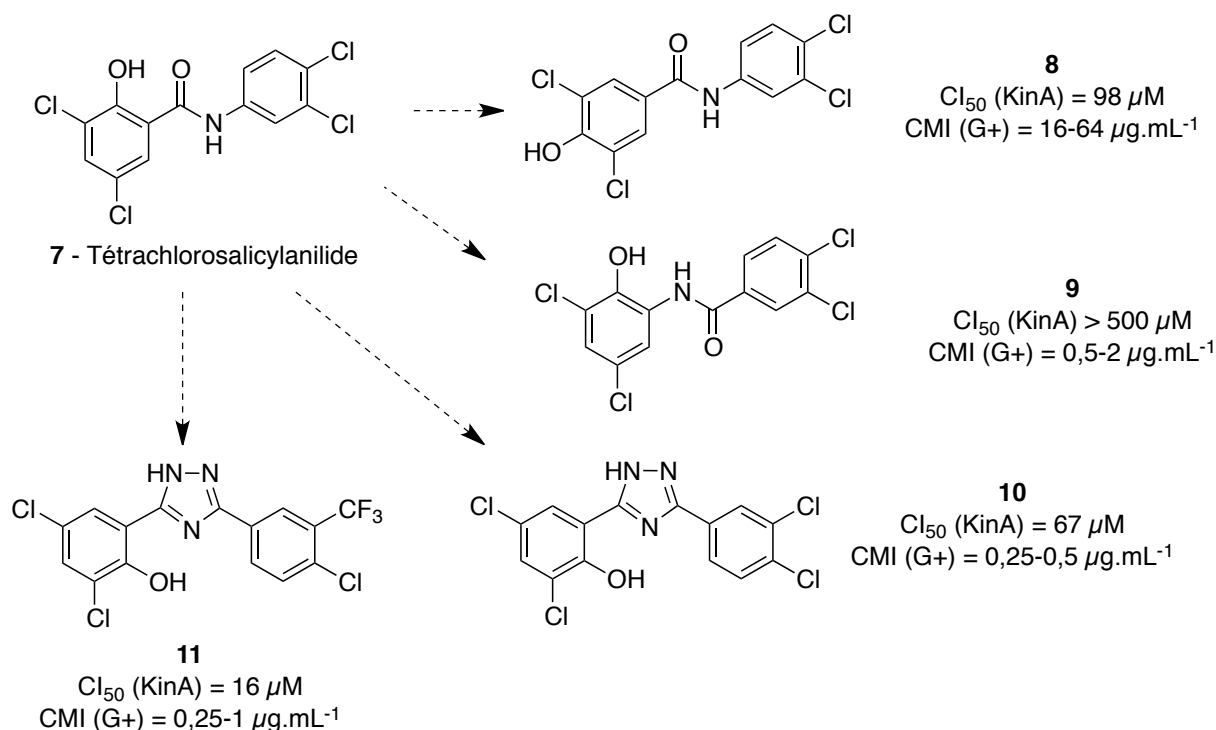


Figure 7. Structures des inhibiteurs dérivés du tétrachlorosalicylanilide 7.

À ce stade, plusieurs familles de composés hydrophobes ont été décrites comme ciblant le domaine catalytique de l'histidine kinase KinA. Cependant, des études menées par Stephenson, Yamaguchi et Hoch ont permis de mettre en évidence un mécanisme d'action totalement différent de ce qui avait été rapporté. Les composés **5** et **6** n'étaient pas des inhibiteurs ATP compétitifs mais provoquaient l'agrégation de la protéine⁴¹.

D'autres recherches furent entreprises par la même entreprise. En 1999, un total de 24 molécules incluant des benzoxazines, des benzimidazoles, des bisphénols, des cyclohexènes, des trityles et des salicylanilides furent testées en tant qu'inhibiteurs de la kinase KinA. Les molécules présentaient une activité inhibitrice comprise entre 1,9 et plus de 500 μ M et une CMI (concentration minimale inhibitrice) comprise entre 0,5 et plus de 16 μ g.mL⁻¹.

Cependant, des études menées par le groupe de recherche confirmaient de multiples mécanismes d'actions autres que l'inhibition des TCS. De plus, deux tiers des molécules causaient l'hémolyse des globules rouges des équidés⁴² (Figure 8).

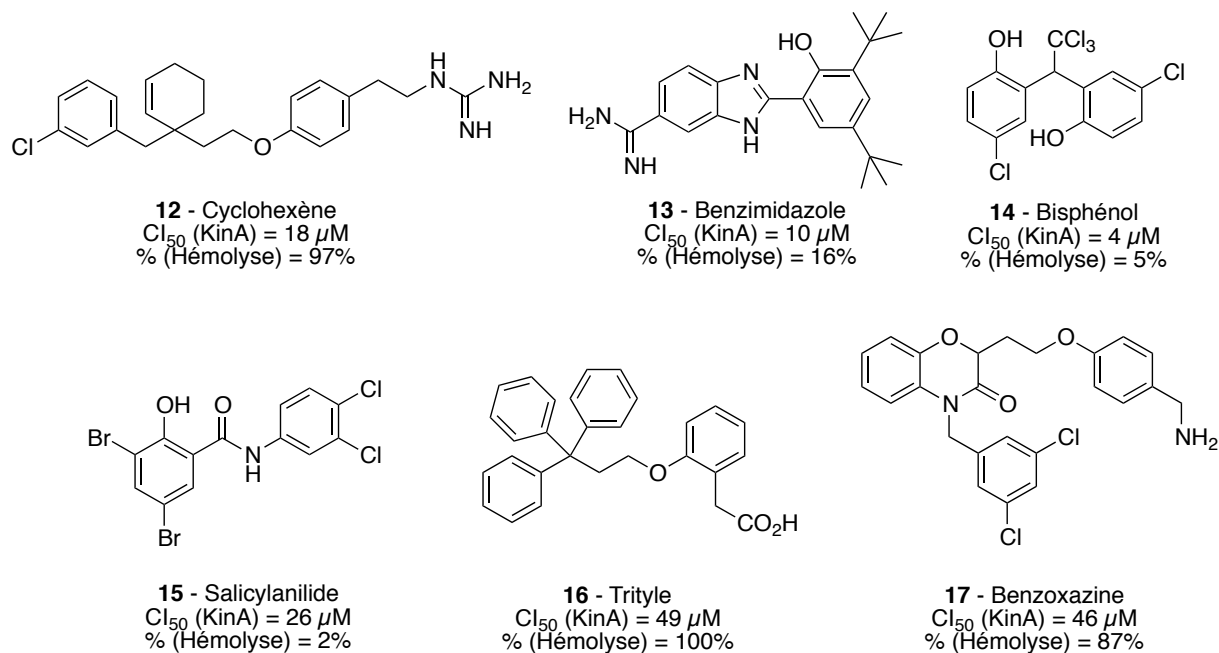


Figure 8. Structures de différentes familles d'inhibiteurs de l'histidine kinase KinA.

Pour finir, deux autres études du R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute furent publiées sur la même histidine kinase. La première étude s'était intéressée à des benzimidazoles substitués en position 5 par une fonction amidine⁴³ (analogues du composé **13**). La deuxième étude menée s'intéressait à l'étude de dérivés de l'acide anacardique, un composé naturel retrouvé chez les plantes et dans la coquille de la noix de cajou. Des membres de cette famille avaient démontré une activité antibactérienne sur plusieurs bactéries à gram-positif (Figure 9). Comme dans beaucoup de cas, la majeure partie des inhibiteurs possède une activité inhibitrice qui n'est pas en relation avec l'activité antibactérienne déterminée⁴⁴.

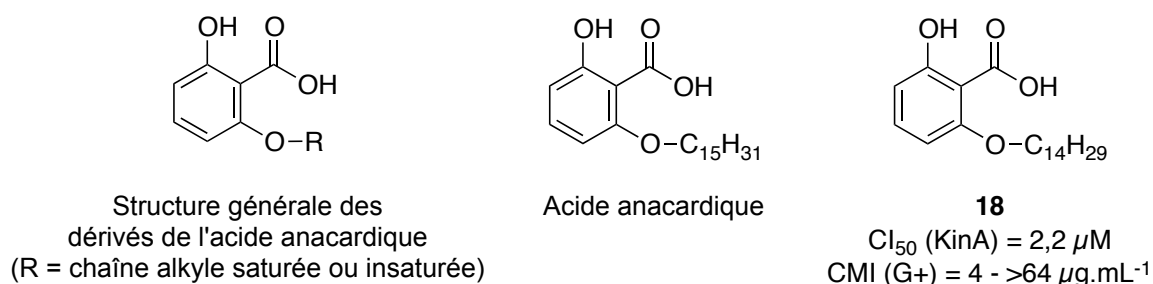


Figure 9. Structures des dérivés de l'acide anacardique.

En 2005, Gilmour et ses collaborateurs décrivent la structure d'un dérivé de la pyridine, obtenu par criblage à haut débit. Le composé **19** (TEP) présentait une activité inhibitrice sur un panel de quatre histidine kinases comprises entre 5,5 et 103,8 μM. De plus, celui-ci était sélectif car il n'occasionnait pas d'inhibition sur un panel de 10 protéines kinases (sérine et thréonine) présentes chez les mammifères. Néanmoins, il n'y avait pas d'inhibition de la croissance bactérienne avec une CMI supérieure à 256 μg.mL⁻¹ sur plusieurs bactéries à gram-positif et gram-négatif⁴⁵ (Figure 10).

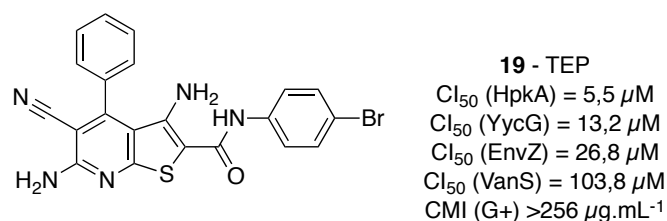


Figure 10. Structure de l'inhibiteur TEP.

En 2008, un criblage de 150 000 molécules fut réalisé par Rasko et ses collaborateurs, pour trouver un inhibiteur spécifique du système à deux composants QseC/QseB (facteurs de virulence). Le composé **20** (LED209) a présenté la meilleure activité inhibitrice de l'histidine kinase QseC à une concentration de 5 pM. De plus, celui-ci ne présente pas de toxicité chez la souris et n'interfère pas avec les récepteurs β-adrénergiques humains⁴⁶ (Figure 11).

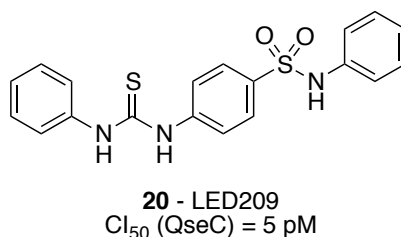
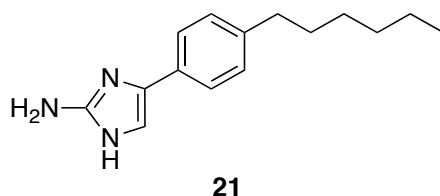


Figure 11. Structure du composé LED209.

Plus récemment, une équipe américaine a confirmé le fait que les systèmes à deux composants, en plus d'être une cible idéale pour le développement d'agents antibactériens, constituaient une cible attractive pour le développement de nouveaux adjuvants d'antibiotiques. En effet, l'utilisation d'une molécule (dérivé d'imidazole) a permis de supprimer la résistance à la colistine (antibiotique polypeptidique) chez *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. Ainsi, en interférant avec le système à deux composants PmrA/PmrB, une relation dose-réponse est observée avec la diminution de la CMI à des valeurs comprises entre 0,5 et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour une concentration de 30 μM de l'inhibiteur **21**⁴⁷ (Figure 12). En conséquence, cette molécule est la première à avoir été décrite dans la littérature en tant qu'adjuvant d'antibiotique, par un mécanisme d'inhibition des voies de signalisation des systèmes à deux composants. Cet exemple nous confirme que la modulation de l'activité des TCS est une approche viable pour combattre les phénomènes de résistances aux antibiotiques.



Souche <i>A. baumannii</i>	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Colistine + 10 μM (21)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Colistine + 20 μM (21)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Colistine + 30 μM (21)
3941	512	> 128	32	4
3942	512	> 128	16	2
4119	512	> 128	4	0,5

Figure 12. Structure et activité du composé 21.

Pour terminer, en 2015, des chercheurs de l'Université d'Indiana aux États-Unis ont réalisé un criblage haut débit grâce à une technique basée sur la variation de la polarisation de fluorescence. Le principe est basé sur le déplacement d'un ligand (ADP) marqué par une molécule fluorescente (BODIPY), de son site d'action (site actif de la protéine) par une molécule (inhibiteur). En d'autres termes, cette méthode permet la détermination d'interactions moléculaires entre une protéine et un ligand, s'appuyant sur une variation de l'émission de la fluorescence⁴⁸. Ainsi, 53 000 molécules ont été étudiées par cette méthode pour leur aptitude à se lier au domaine de liaison de l'ATP de diverses histidine kinases. Deux

séries de molécules, l'une possédant un noyau purine (**22-25**) et l'autre basée sur des hétérocycles aromatiques (**26-30**), ont montré une activité inhibitrice sur trois histidine kinases : HK853, VicK et CheA⁴⁹ ($1,21\mu\text{M} < \text{CI}_{50} < 1340\mu\text{M}$; Figure 13). Cependant, plusieurs composés ont montré une cytotoxicité contre des cellules épithéliales du singe.

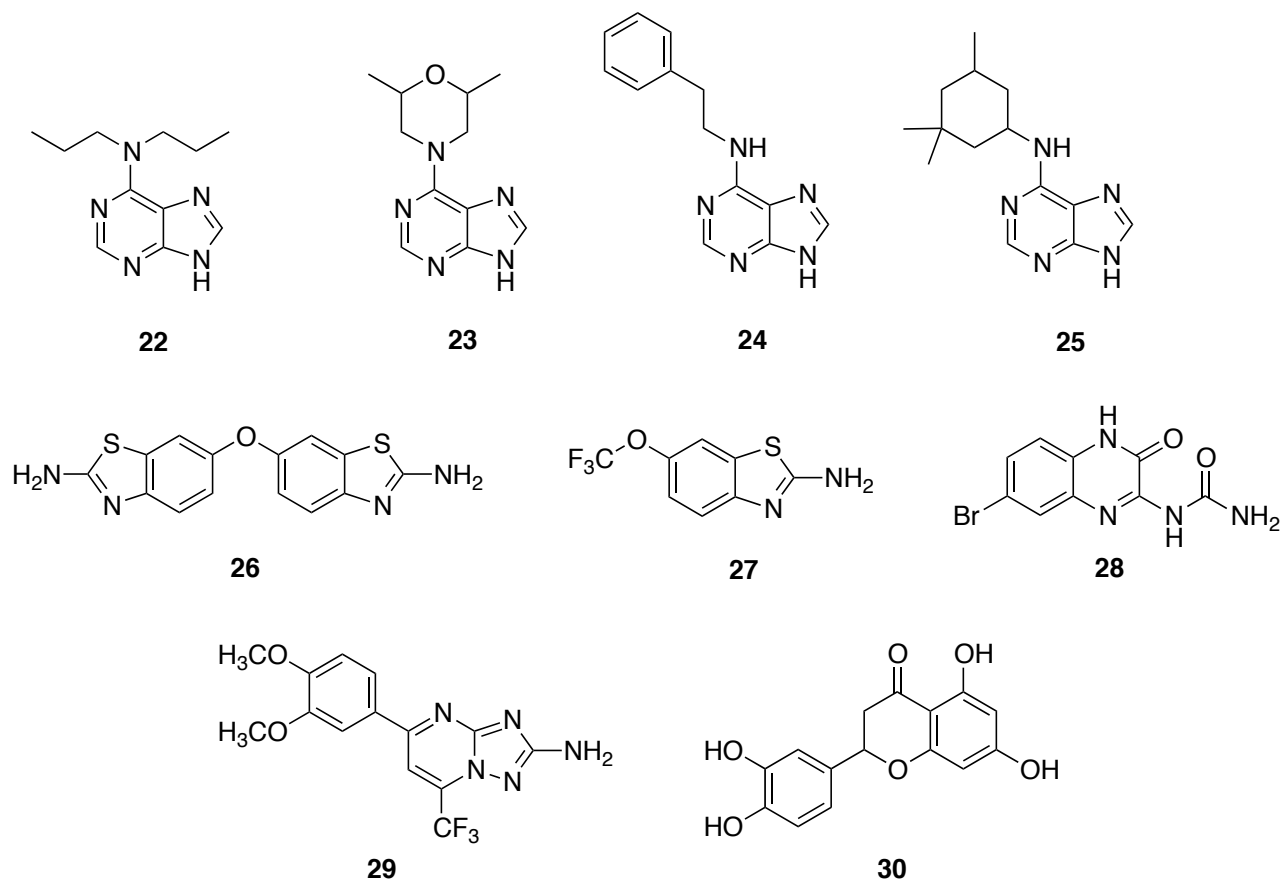


Figure 13. Structures des inhibiteurs d'histidine kinases 22 à 30.

Nous avons pu le voir, l'inhibition des voies de signalisation et plus précisément des histidine kinases est une approche rationnelle pour le développement de nouveaux agents antibactériens. De plus, cette approche constitue un axe prometteur dans la synthèse d'adjuvants d'antibiotiques, permettant de lutter contre l'antibiorésistance.

3.2. Cible thérapeutique envisagée par notre équipe

3.2.1. Walk/WalR un système à deux composants essentiel pour les bactéries

Les systèmes à deux composants contrôlent diverses fonctions tant au niveau de l'adaptation, que dans la virulence de certains pathogènes. De plus, certains ont été caractérisés comme essentiels pour la survie de la bactérie car impliqués dans la biogénèse de l'enveloppe bactérienne, comme MtrB/MtrA chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Parmi ceux-ci, le système de régulation Walk/WalR (connu aussi sous la désignation YycG/YycF, VicK/VicR, MicA/MicB) est le plus largement rencontré chez les bactéries à gram-positif pauvres en bases azotées guanines et cytosines (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*)⁵⁰. Celui-ci présente un degré d'homologie de séquence important entre les différentes espèces bactériennes : environ 45% pour l'histidine kinase et près de 70% pour le régulateur de réponse, particulièrement conservé au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Cependant, comme pour les autres systèmes à deux composants, le domaine senseur N-terminal présente quant à lui une grande variabilité⁵¹. Son implication principale chez les bactéries se reflète par la régulation de gènes responsables du métabolisme de la paroi cellulaire, une capacité essentielle pour la survie et la croissance de souches bactériennes. En conséquence, ce système à deux composants s'est avéré indispensable pour les bactéries à gram-positif et constitue une cible attractive pour le développement de nouvelles thérapies antibactériennes^{27,52-54}.

3.2.2. Inhibiteurs du système à deux composants Walk/WalR

La majeure partie des inhibiteurs de systèmes à deux composants Walk/WalR a été publiée par deux équipes. Les premières investigations menées par l'équipe de Ryutaro Utsumi ont conduit à l'identification de dérivés d'imidazoliums avec une CI_{50} comprise entre 6,6 et 40 μM et une CMI de 1,56 à 12,5 μM ⁵⁵ (Figure 14).

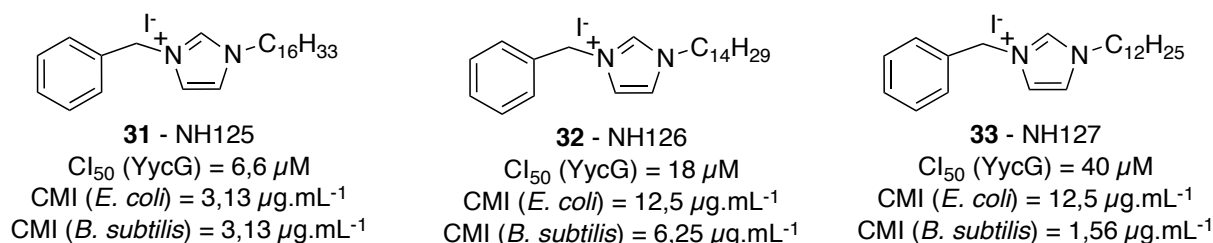


Figure 14. Structures et activités des inhibiteurs 31 à 33.

Dans le même travail, l'équipe japonaise s'est intéressée à la zérumbone, un composé naturel retrouvé dans le gingembre sauvage. Ce composé de la famille des terpènes ainsi que certains de ses dérivés ont présenté diverses activités biologiques⁵⁶ (propriétés anticancéreuses et antibactériennes). Cependant, la zérumbone n'a pas montré une forte activité inhibitrice sur le système à deux composants WalK/WalR⁵⁵. Ainsi, deux séries de dérivés non cyclisés ont été synthétisées et ont montré un intérêt certain. Dans un premier temps, le composé **34** a été obtenu sous forme d'un ratio d'isomères (*E/Z* : 3/2). Par la suite, d'autres conditions de synthèses ont permis d'obtenir cette même molécule sous forme d'un unique diastéréoisomère⁵⁷. La diminution de la valeur de la Cl_{50} a mis en évidence l'importance de la configuration (*E*) de l'alcène en position 10. Dans un deuxième temps, l'incorporation de différents acides aminés au niveau de la fonction acide carboxylique du composé **34** a été réalisée. Sur un total de trente-trois composés synthétisés, un seul s'est révélé être actif sur WalK⁵⁸. Cependant, aucune preuve n'a confirmé que l'activité biologique était due à l'inhibition de l'histidine kinase (Figure 15).

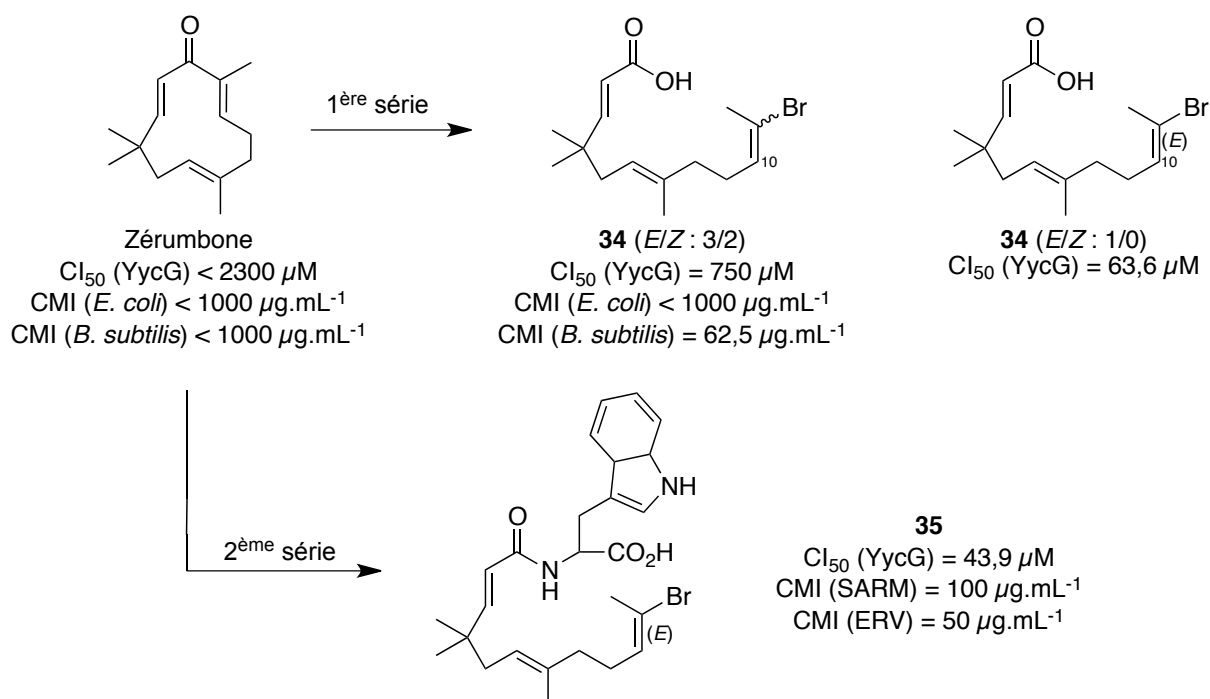
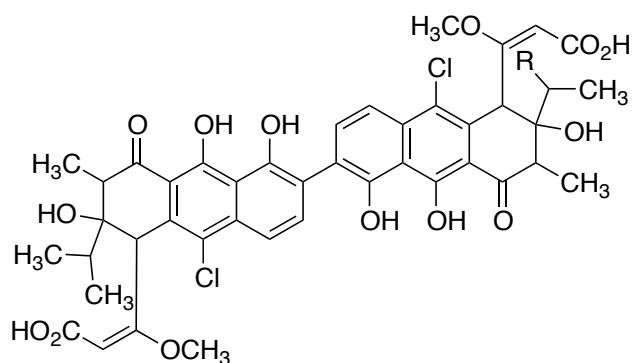


Figure 15. Structures et activités de la zérumbone et de ses dérivés.

Par la suite, les recherches de cette équipe se sont orientées vers le screening de 1368 bouillons de cultures de *Streptomyces*, un genre de bactérie filamenteuse appartenant à l'ordre des Actinobactéries. Ce type de bactérie présente de nombreux avantages dans le développement de molécules antibactériennes car à l'heure actuelle, près de 80% des antibiotiques proviennent du genre *Streptomyces*⁵⁹. Par cette méthode, deux molécules de la famille des walkamycines ont été isolées et évaluées pour leurs propriétés biologiques. En premier lieu, la walkamycine B s'est montrée particulièrement active contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec une CMI respective de 0,39 et 0,2 μ g.mL⁻¹. De plus, il a été confirmé que la walkamycine B ciblait spécifiquement le domaine catalytique de YycG chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de concentration dans le micromolaire⁶⁰. En deuxième lieu, la walkamycine C, a également montré une inhibition de l'autophosphorylation de YycG chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, confirmé par une activité antibactérienne importante contre des bactéries à gram-positif seulement. Par ailleurs, une activité multiple sur d'autres histidine kinases a été rapportée⁶¹ (Figure 16).

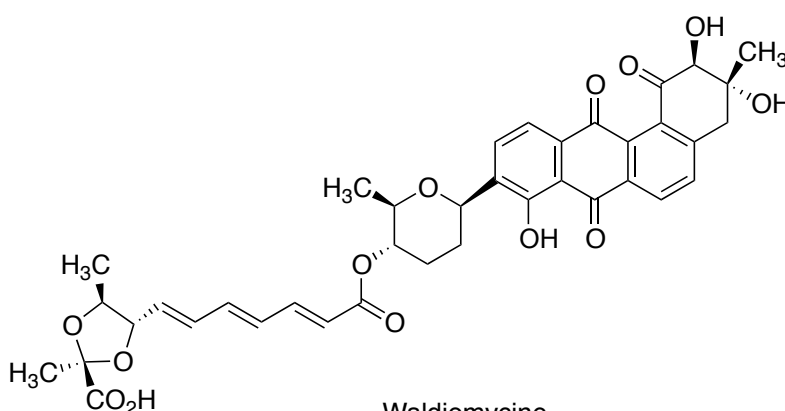


Walkamycine B (R = CH₃)
 CI₅₀ (YycG) = 1,6 - 5,7 μ M
 CMI (*B. subtilis*) = 0,39 μ g.mL⁻¹
 CMI (*S. aureus*) = 0,2 μ g.mL⁻¹

Walkamycine C (R = CH₂CH₃)
 CI₅₀ (VicK) = 2,87 μ M
 CI₅₀ (CiaH) = 4,87 μ M
 CI₅₀ (LiaS) = 5,63 μ M
 0,06 μ g.mL⁻¹ < MIC (G+) < 16 μ g.mL⁻¹
 CMI (G-) > 64 μ g.mL⁻¹

Figure 16. Structures et activités de la walkamycine B et C.

En 2013, de nouvelles recherches réalisées sur les métabolites synthétisés par les actinomycètes, ont mis en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'histidine kinase WalK⁶². La waldiomycine est une molécule hexacyclique appartenant à la famille des angucyclines, des antibiotiques qui présentent un motif tétracyclique⁶³. Celle-ci a montré une activité biologique contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus mutans* avec une CI₅₀ comprise entre 8,8 et 25,8 μ M et une CMI entre 4 et 8 μ g.mL⁻¹ contre deux agents pathogènes à gram-positif⁶⁴ (Figure 17).



Waldiomycine
 CI₅₀ (WalK) = 8,8 - 25,8 μ M
 CMI (SARM) = 2 μ g.mL⁻¹
 CMI (*B. subtilis*) = 2 μ g.mL⁻¹

Figure 17. Structure et activités de la waldiomycine.

La deuxième équipe à s'être intéressée au développement d'inhibiteurs du système à deux composants WalK/WalR est celle de Di Qu. Leurs recherches se sont uniquement basées sur des molécules synthétiques, obtenues par modélisation moléculaire. En 2006, un criblage virtuel est réalisé sur soixante-seize molécules et a mis en évidence sept chefs de file potentiels avec une inhibition de la croissance chez *Staphylococcus epidermidis*. Ensuite, six molécules (**36-41**) provenant des chefs de file identifiés ont montré une inhibition de la phosphorylation de la protéine YycG. Par ailleurs, les composés n'ont pas montré d'activité hémolytique et ne présentent pas de toxicité sur des cellules de mammifères⁶⁵ (Figure 18).

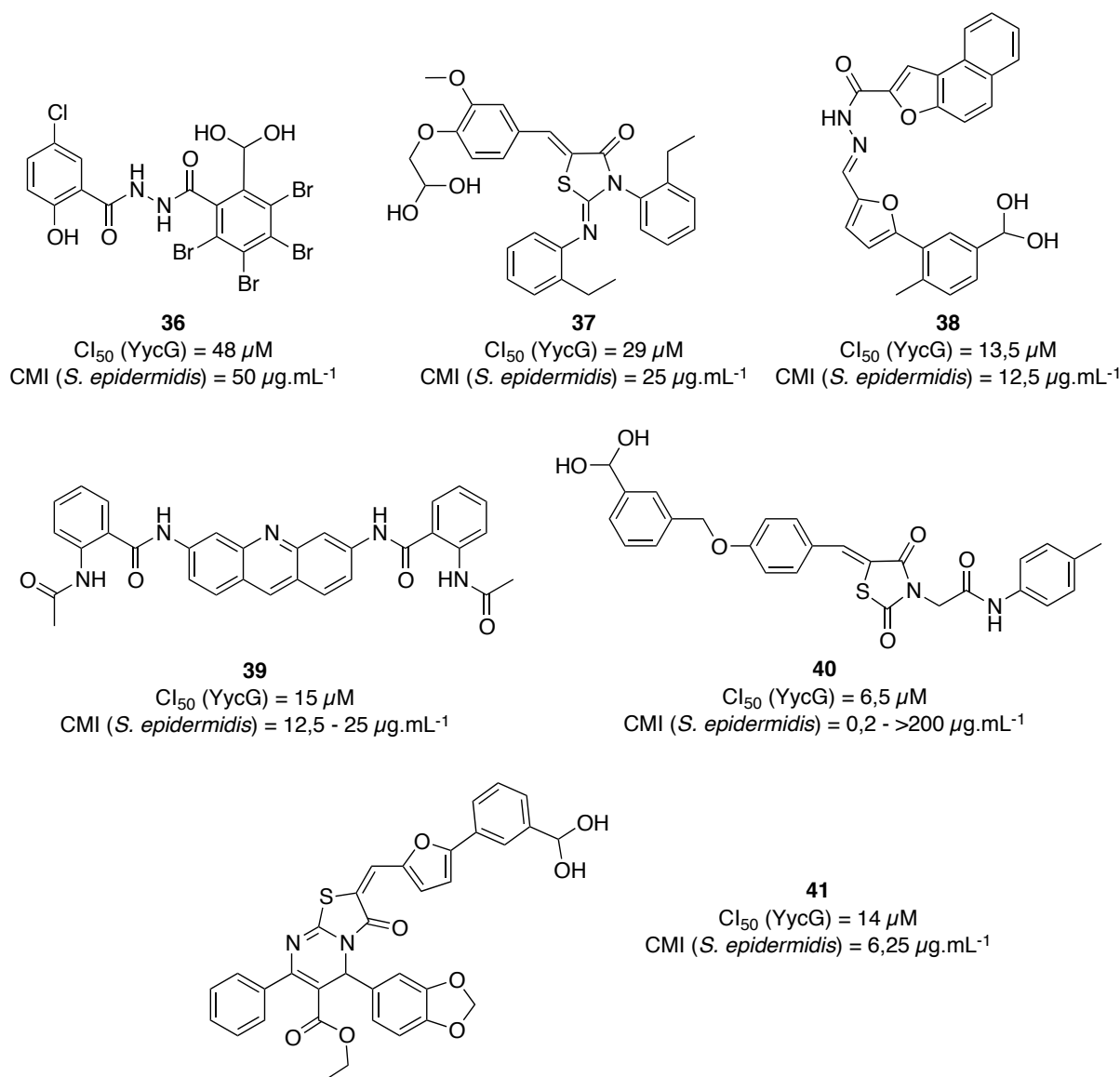


Figure 18. Structures et activités des chefs de file obtenus par l'équipe de Di Qu.

À la vue de ces résultats prometteurs, l'équipe a entrepris des modifications structurales des divers chefs de file obtenus. Par exemple, six dérivés du composé **37** ont été réalisés en conservant le cycle thiazolidione central, accompagnés d'une augmentation significative de l'activité bactéricide sur *Staphylococcus epidermidis*⁶⁶ (Figure 19).

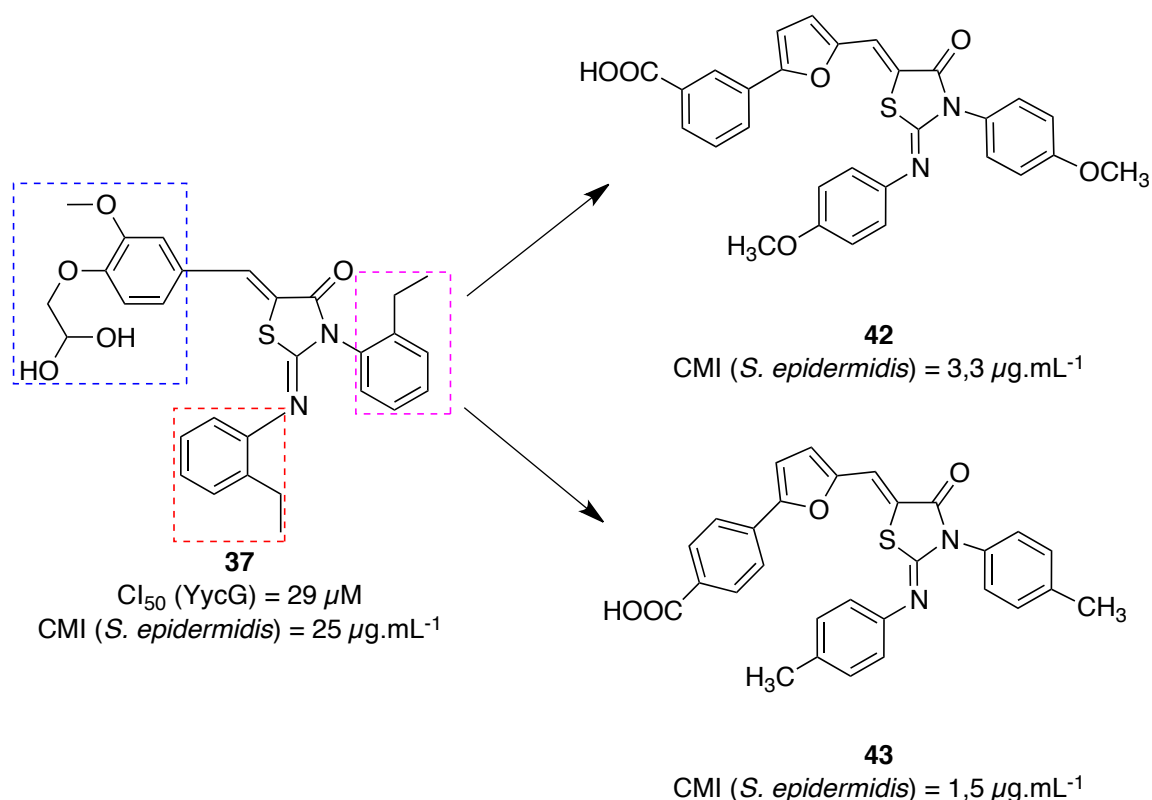


Figure 19. Structures et activités des inhibiteurs dérivés du composé 37.

De 2011 à 2014, de nombreuses modifications ont été entreprises sur le composé **41** et ont conduit à plusieurs séries d'inhibiteurs s'articulant là aussi autour du cycle thiazolidione^{67,68}. Dans un premier temps, l'ouverture du cycle A (pyrimidine) a permis d'obtenir un dérivé plus actif (**44**) contre *Staphylococcus epidermidis* que le composé **41**. Cependant, la modification du substituant 1,3-benzodioxole (composé **45**) n'a pas eu d'influence sur l'activité antibactérienne. Dans un deuxième temps, des atomes d'halogènes ont été incorporés aux différents substituants du cycle pyrimidine. Le dérivé chloré (**46**) a montré une inhibition de croissance chez *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* ainsi qu'une Cl_{50} de 12,65 μ M. De plus, sur la vingtaine de composés obtenus, aucun n'a présenté d'activité hémolytique sur des globules rouges humains à une concentration de 50 μ M⁶⁹ (Figure 20).

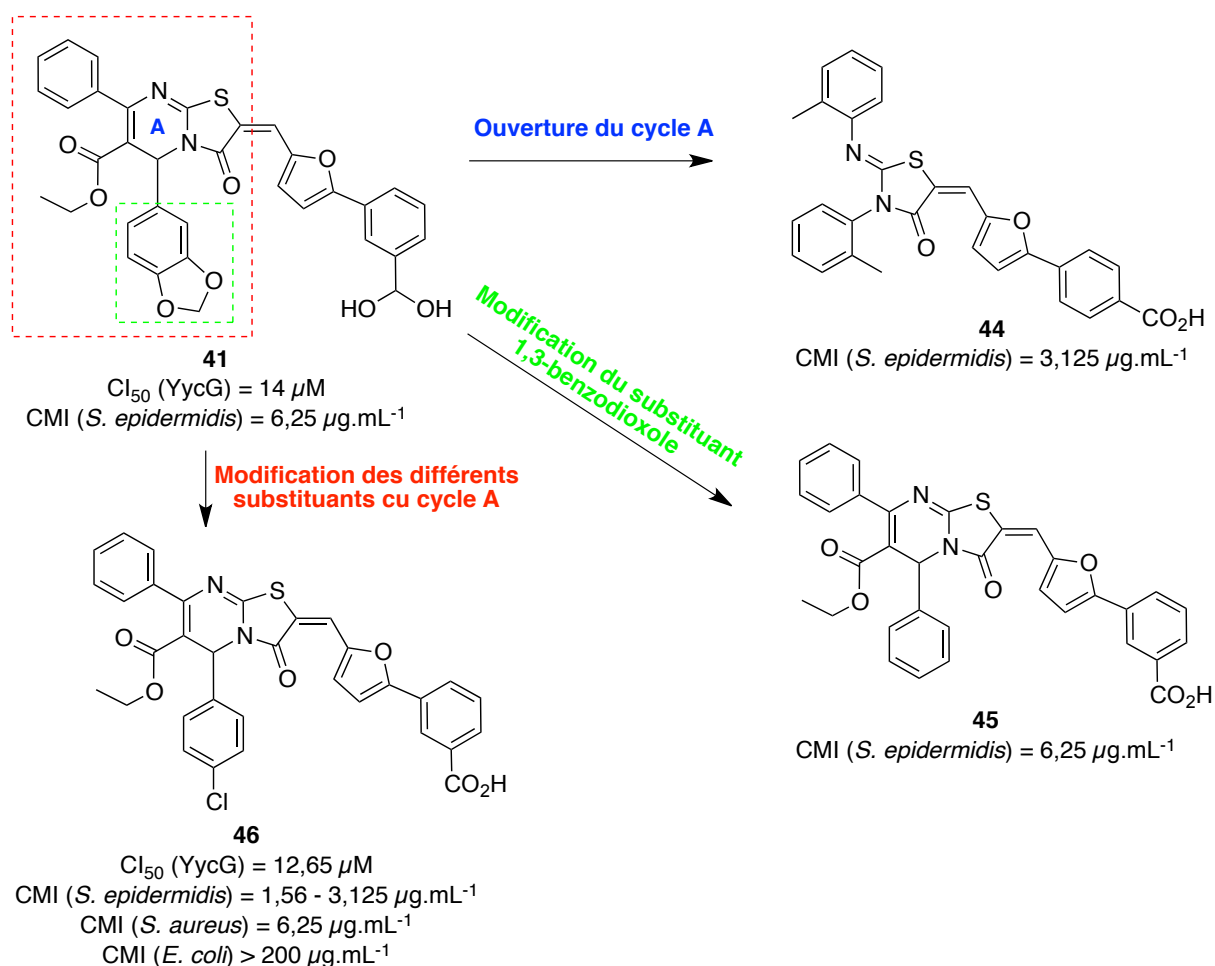


Figure 20. Structures et activités des inhibiteurs dérivés du composé 41.

Les systèmes à deux composants représentent une cible thérapeutique de choix dans le développement de nouvelles thérapies antibactériennes. L'augmentation des connaissances sur ces voies de signalisation a permis le développement de plusieurs familles d'inhibiteurs d'histine kinases, obtenus majoritairement par criblage de bibliothèques de molécules ou par l'isolation de métabolites secondaires provenant de souches bactériennes. Cependant, plusieurs molécules ont montré une activité hémolytique, une toxicité contre des cellules de mammifères et surtout un mécanisme d'inhibition attribué à l'agrégation de la protéine cible²⁷.

4. Travaux préliminaires réalisés au laboratoire

4.1. Différences structurales du site actif chez la super famille GHKL

Une caractéristique commune aux histidine kinases bactériennes est la conservation du domaine de liaison à l'ATP. Auparavant, nous avons expliqué que celui-ci ne présentait pas de similarité avec les kinases retrouvées chez les eucaryotes (sérine, thréonine et tyrosine). Par ailleurs, l'obtention de plusieurs structures cristallines de domaines catalytiques a mis en évidence un domaine conservé appelé le « Bergerat Fold », retrouvé chez l'ADN gyrase, Hsp90 et MutL (GHL). Cependant, cette caractéristique structurale commune à plusieurs protéines n'a été que très peu exploitée pour le développement de nouveaux inhibiteurs⁷⁰ (Figure 21).

Parmi les protéines qui composent la superfamille GHKL, des différences existent au niveau des résidus retrouvés dans le site de liaison de l'ATP⁷¹ :

- (1) : l'histidine kinase possède une interaction de type π -stacking permettant de positionner le cycle adénine de l'ATP. Les résidus Tyr (tyrosine), Phe (phénylalanine) et His (histidine) sont uniquement retrouvés chez les histidine kinases.

- (2) : le résidu Glu (acide glutamique) conservé dans les protéines GHL intervient dans la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Celui-ci est remplacé par un résidu Asn (asparagine) qui facilite la formation d'un complexe de coordination entre un ion divalent indispensable à l'activité kinase⁷² (Mg^{2+}) et les groupements phosphates de l'ATP.

- (3) : la partie en 3' forme une face hydrophobe unique chez les histidine kinases.

- (4) : la longueur, la structure et la conformation de la boucle de liaison de l'ATP varient entre les protéines GHL et HK.

- (5) : les interactions présentes au niveau de la partie bleue ne sont pas conservées entre les protéines GHL et HK.

- (6) et (7) : par ailleurs, les résidus les plus conservés entre les protéines sont le résidu Asp (acide aspartique) établissant une liaison avec la fonction amine du cycle adénine et le résidu Asn qui se coordonne au groupement α -phosphate.

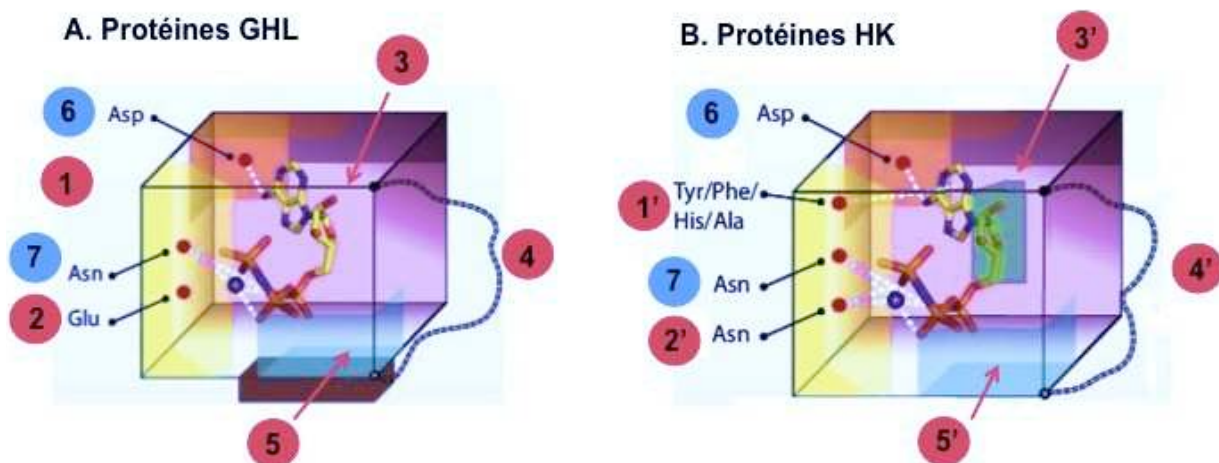


Figure 21. Représentation du site de liaison de l'ATP chez les protéines de la famille GHKL. Les différences structurales entre les protéines GHL (A: ADN Gyrase, Hsp90, MufL) et l'histidine kinase B (PhoQ) sont indiquées par des numéros rouges et les points communs par des numéros bleus.

De ce fait, la conception de nouvelles familles de molécules potentiellement actives pourrait être réalisée en tirant partie de ces diverses variations et ainsi être sélectives des histidine kinases ou des protéines GHL.

4.2. Inhibiteurs communs d'histidine kinases et de la protéine Hsp90

Cette stratégie fut confirmée par une étude menée en 2008 par quatre chercheurs américains. Ils démontraient ainsi que des inhibiteurs spécifiques de la famille GHL pouvaient présenter une activité sur les protéines histidine kinases. L'étude portait sur des inhibiteurs de Hsp90 : le radicicol (antifongique naturel), la geldanamycine et la tanespimycine (17-AAG) et sur un inhibiteur ciblant l'ADN gyrase : la novobiocine⁷³ (Figure 22).

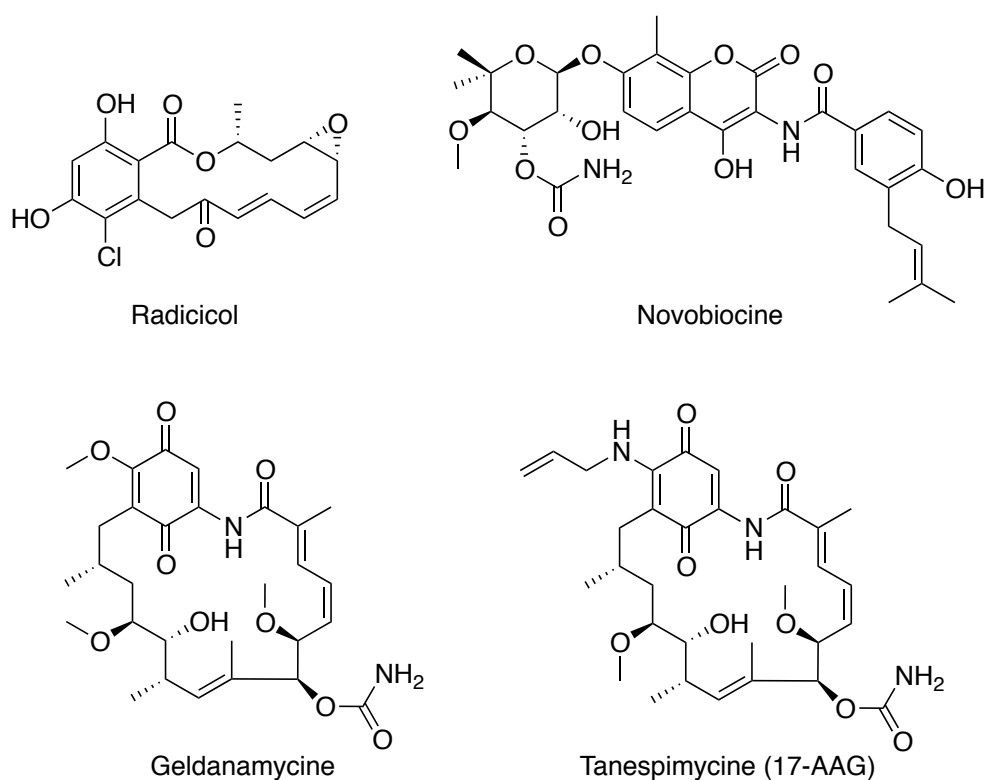


Figure 22. Structures d'inhibiteurs de la famille GHL ciblant le système à deux composants PhoQ.

Du fait de la conservation relativement importante du « Bergerat fold », le radicicol a démontré une inhibition de la phosphorylation de PhoQ ($K_d(\text{PhoQ}) = 715 \mu\text{M}$ contre $K_d(\text{Hsp90}) = 19 \text{ nM}$), une histidine kinase impliquée dans les facteurs de virulence chez *Salmonella*. Cette inhibition fut démontrée par des analyses RMN et confirmée par l'obtention de la structure cristallographique du radicicol interagissant avec le site actif de PhoQ. La novobiocine, la geldanamycine et la tanespimycine ne présentaient quant à elles qu'une activité plus faible ou l'absence de liaison au site actif. Cette différence de sélectivité est liée en partie, à une disparité rencontrée au niveau de la boucle de liaison à l'ATP entre les deux protéines. Les structures cristallographiques ont confirmé que le radicicol présentait une orientation opposée au niveau du site actif de Hsp90 et de PhoQ, impliquant une diminution du nombre de liaisons hydrophobes avec PhoQ⁷³.

Pour conclure, le radicicol a montré pour la première fois que des inhibiteurs de la famille GHL pouvaient interagir avec le site de liaison de l'ATP d'une histidine kinase. Ainsi, la conception de nouveaux inhibiteurs spécifiques aux histidine kinases et présentant une affinité limitée pour les protéines eucaryotes peut être réalisée en exploitant les variations structurales de ces protéines^{49,70}.

4.3. Modélisation moléculaire

Ce travail de modélisation moléculaire a été effectué par le Dr. Alexandre Lebeau, attaché temporaire d'enseignement et de recherche à l'Université de Nîmes de 2013 à 2015.

À la suite de ces travaux, notre objectif s'est orienté vers le développement, de manière rationnelle de nouveaux inhibiteurs ciblant spécifiquement le domaine de liaison de l'ATP de l'histidine kinase. De plus, il a été envisagé de cibler de manière simultanée plusieurs histidine kinases, permettant une évolution plus difficile des gènes de résistance que dans le cas d'une thérapie à cible unique. Pour cela, notre approche s'est fondée sur l'utilisation de la modélisation moléculaire et plus précisément sur la conception de molécules basées sur la structure de la protéine cible.

Pour concevoir et orienter les travaux de synthèses, nous nous sommes basés sur la structure cristallographique du domaine de liaison de l'ATP de l'histidine kinase WalK (code pdb : 3SL2) chez *Bacillus subtilis*, publiée récemment avec une résolution de 1,61Å⁷⁴. En étudiant le mode de liaison de l'ATP chez *Bacillus subtilis*, nous avons pu confirmer le fait que certaines interactions étaient essentielles à la stabilité ainsi qu'à la formation du complexe entre l'ATP et l'histidine kinase. Dans un premier temps, nous avons observé des liaisons hydrogène entre le résidu Asp533, le cycle adénine de l'ATP et une molécule d'eau (Water822). Dans un deuxième temps, nous avons remarqué une interaction de type « π -stacking » entre le noyau purine et le résidu Tyr507. Ainsi, ces deux types d'interactions sont indispensables pour la liaison de l'ATP dans le site actif de l'histidine kinase (Figure 23). Ces observations ont confirmé une différence de taille au niveau du site de liaison de l'ATP entre les membres de la superfamille GHKL. La présence d'une liaison hydrophobe « π -stacking » est indispensable chez WalK et absente chez l'ADN gyrase, Hsp90 et MutL (Figure 21). De ce fait, deux critères de choix s'offrent à nous pour concevoir des ligands de manière rationnelle : la formation de liaisons hydrogènes et l'établissement d'interactions hydrophobes avec ces différents éléments.

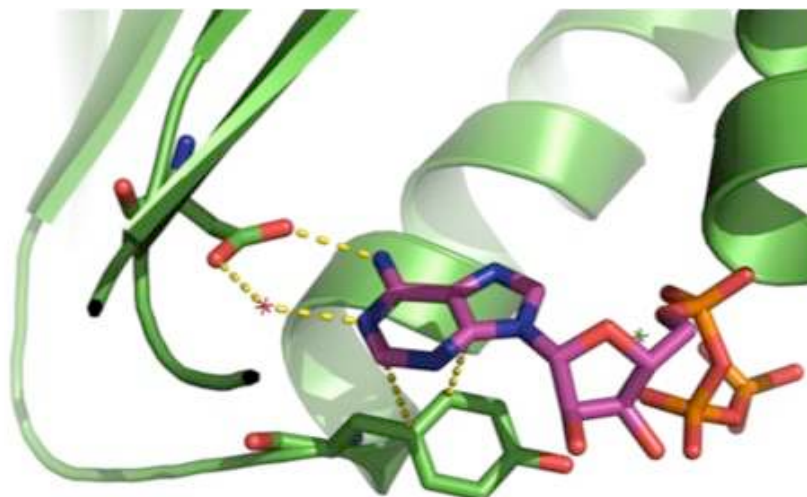


Figure 23. Mode de liaison de l'ATP chez Walk.

Précédemment, nous avons mis en avant une nouvelle stratégie encore peu utilisée, pour la conception de molécules spécifiques des histidine kinases. Nos recherches se sont orientées vers la base de données des protéines (PDB) pour identifier différentes structures de complexes protéine-ligand chez la famille GHL. L'ADN gyrase apparaît comme le choix le plus intéressant, puisque plusieurs ligands ont été publiés dans la littérature avec une affinité de l'ordre du nanomolaire^{75,76}. En d'autres termes, nous avons choisi une structure cristalline avec une résolution de 1,63Å (code pdb : 3TTZ) et un ligand de type pyrrolamide (**47**) (acide 2-[(3*S*,4*R*)-4-[(3,4-dichloro-5-méthyl-1*H*-pyrrol-2-yl)carbonyl]amino}-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylique), démontrant une CI_{50} de 4nM⁷⁷ (Figure 24).

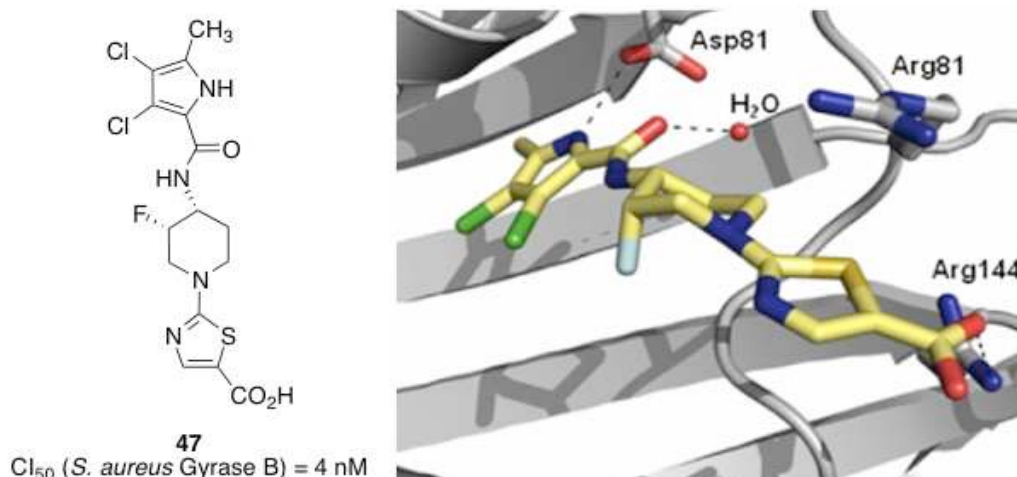


Figure 24. Structure topologique et cristallographique du pyrrolamide 47.

Par la suite, des études comparatives de modélisation moléculaire ont été effectuées^{78,79}. Dans un premier temps, la superposition des deux protéines (histidine kinase et l'ADN gyrase) a été réalisée par le logiciel ViTO⁸⁰. Cet alignement de séquences permet l'identification de zones de similarité entre acides aminés. Dans un deuxième temps, le ligand **47** (inhibiteur de l'ADN gyrase) est transféré dans la structure cible (histidine kinase) permettant la visualisation du complexe et la déduction des interactions protéine-ligand. Ainsi, l'affinité du dérivé pyrrolamide (**47**) a été évaluée avec le logiciel DSX⁸¹. En conséquence, nous avons observé une liaison hydrogène entre la fonction NH du cycle pyrrole et le résidu Asp533 dans le fond de la poche ATP. Cependant, il existe un encombrement stérique relativement important au bord de cette même poche (Figure 25). Cette gêne stérique est expliquée par une différence notable au niveau des effets électroniques de cette partie de la poche ATP. En effet, chez l'ADN gyrase, le bord de la poche est chargé avec la présence de deux résidus : Arg84 (arginine) et Glu58 (acide glutamique) formant un pont salin et le résidu Arg144, interagissant avec la fonction acide du pyrrolamide. Au contraire, chez l'histidine kinase, cette partie de la poche ATP est plus hydrophobe avec la présence de trois résidus : Tyr507 (tyrosine), Leu568 (leucine) et Ile536 (isoleucine).

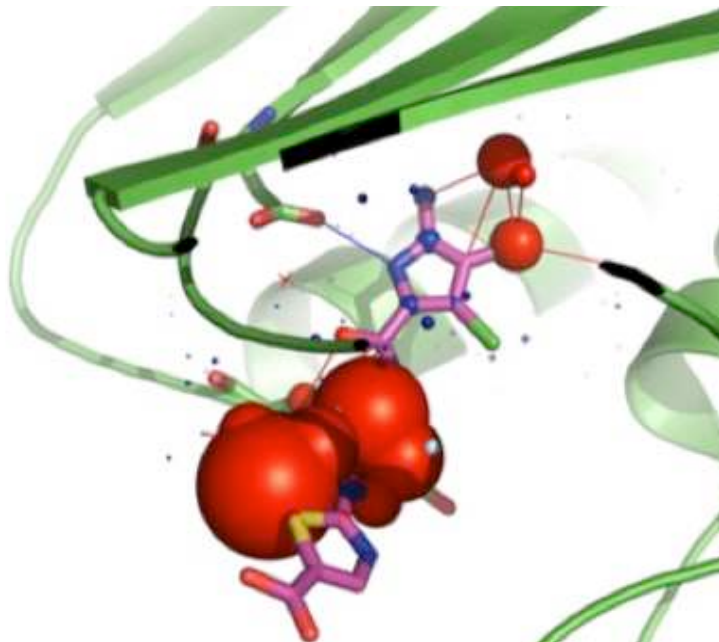


Figure 25. Évaluation de l'affinité du pyrrolamide 47 pour le domaine de liaison à l'ATP de l'histidine kinase Walk. Les sphères bleues représentent une interaction favorable alors que les sphères rouges représentent une interaction défavorable.

4.4. Stratégie de conception des composés

Les différentes observations réalisées précédemment ont permis une caractérisation rapide des changements structuraux nécessaires pour obtenir une spécificité et une affinité pour de futurs ligands. La stratégie imaginée pour la conception des molécules est présentée à la Figure 26 et expliquée dans la suite.

Dans un premier temps, la fonction amine (-NH) du cycle pyrrole réalise une liaison hydrogène avec le résidu Asp533 et la fonction amide est capable de réaliser le même type de liaison avec la molécule d'eau (Water822). Ainsi, la rigidification de la fonction amide est réalisée par cyclisation pour donner l'intermédiaire **48**. Dans un deuxième temps, l'ajout d'un cycle aromatique permet de maintenir une certaine hydrophobie et cela conduit à une géométrie plane comme dans le cas du pyrrolamide **47** (intermédiaire **49**). Dans un troisième temps, du fait de la gêne stérique, la réduction de la taille de la molécule est envisagée avec la suppression du cycle pipéridine. De plus, la chiralité n'est pas maintenue car elle peut être difficile à maîtriser (intermédiaire **50**). Pour finir, une dernière simplification est envisagée avec le remplacement du cycle thiazole par un thiophène, plus rapidement et plus facilement accessible, conduisant à la structure générale **51** (Figure 26).

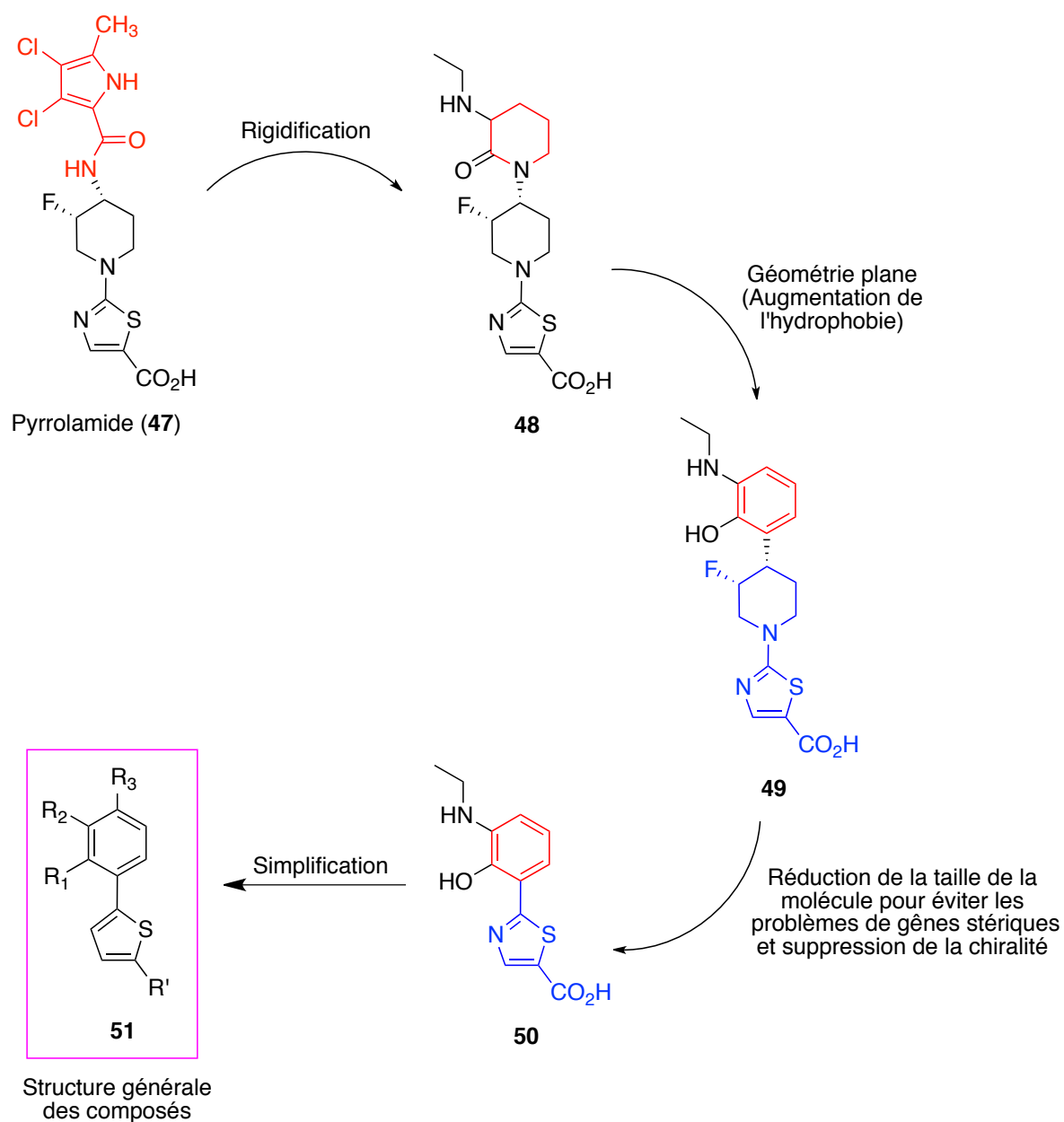


Figure 26. Stratégie de design.

4.5. Formule générale des composés

Une bibliothèque de composés basée sur la structure générale **51** a été développée. En premier lieu, le cycle benzénique a été substitué en position R_1 , R_2 , R_3 par différents groupements qui peuvent être donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes. Dans la majeure partie des cas, la substitution ne sera effective que sur une seule position à la fois. Dans un deuxième temps, le cycle thiophène sera substitué par des groupements polaires dans le but d'augmenter la solubilité (Figure 27).

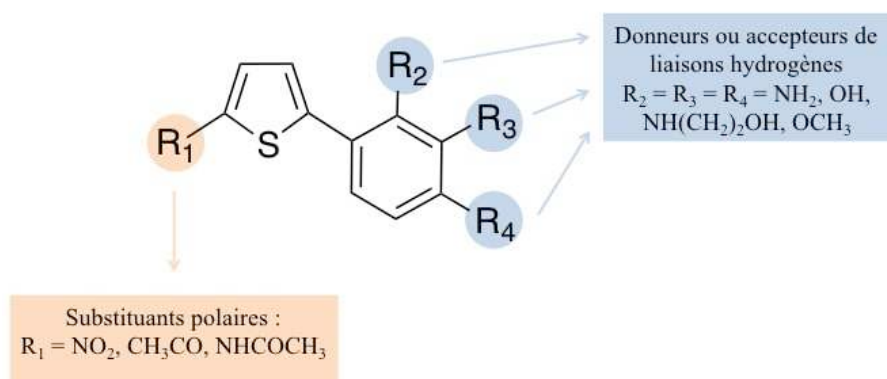


Figure 27. Structure générale des composés développés en tant qu'inhibiteurs potentiels de WalK.

Pour finir, le mode de liaison de cette bibliothèque virtuelle au niveau du site de liaison de l'ATP de WalK, a été évalué grâce aux logiciels PLANTS et DSX⁸². Ainsi, il apparaît que le cycle benzénique se trouve au fond de la poche ATP et que les substituants sont orientés en direction du résidu Asp533. Le cycle thiophène pourrait, quant à lui, être engagé dans une interaction de type π -stacking avec le résidu Tyr507. De plus, les substituants polaires seraient orientés en direction du solvant (Figure 28).

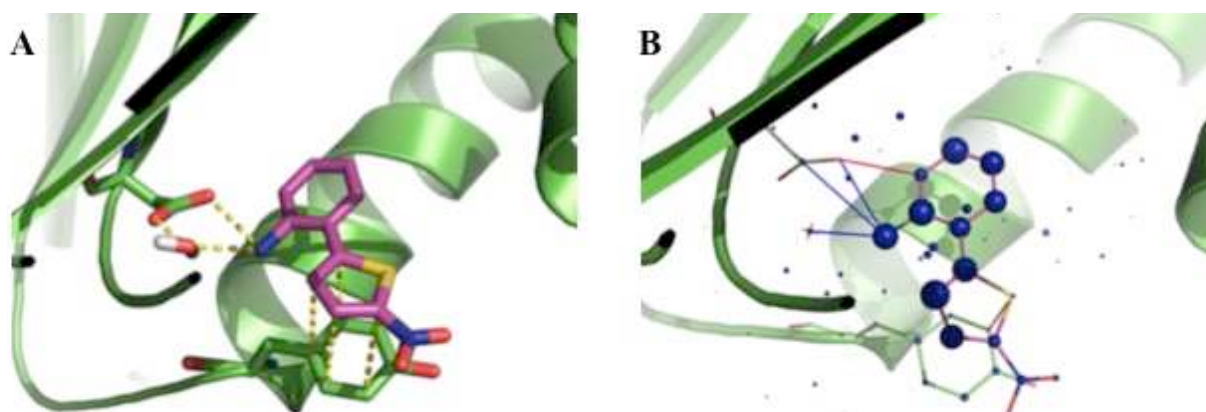


Figure 28. A: Mode de liaison du composé 63 dans le site de liaison de l'ATP de WalK obtenu avec le logiciel PLANTS. B: Evaluation du composé 63 avec le logiciel DSX. Les sphères bleues représentent une interaction favorable. Les lignes bleues représentent une distance favorable alors que les lignes rouges représentent une distance défavorable.

En conclusion, vingt-quatre molécules de cette bibliothèque virtuelle ont été envisagées pour le développement de nouveaux inhibiteurs de l'histidine kinase WalK.

5. Synthèse d'une bibliothèque de molécules

5.1. Généralités sur les réactions de couplage

Les réactions de couplage organométalliques représentent un outil essentiel pour le chimiste dans le domaine de la synthèse organique. De plus, la formation des liaisons C-C a toujours constitué un challenge de taille pour l'obtention de molécules novatrices. Cependant, plusieurs découvertes majeures dans le domaine de la catalyse par les métaux de transition ont permis l'élaboration de méthodes simples et puissantes pour obtenir ce type de liaison. Au cours de la dernière décennie, les réactions catalysées par les métaux de transition ont connu une expansion formidable en termes de publications et de brevets avec en première place le couplage de Suzuki, suivi du couplage de Heck et de Sonogashira (catalyse palladium/cuivre). En 2010, Richard Heck, Ei-ichi Negishi et Akira Suzuki reçurent le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur la catalyse au palladium (Tableau 2)^{83,84}.

Nom de la réaction	Année de découverte	Réactif A (X = halogènes)	Réactif B (R = alkyle)	Catalyseur	Produit obtenu
Heck	1972	R ₁ -X	 R ₂	Pd	R ₁ -  R ₂
Sonogashira	1975	R ₁ -X	 R ₂	Pd/Cu	R ₁ -  R ₂
Negishi	1976	R ₁ -X	XZn-R ₂	Pd	R ₁ -R ₂
Stille	1978	R ₁ -X	(R) ₃ Sn-R ₂	Pd	R ₁ -R ₂
Suzuki	1979	R ₁ -X	(HO) ₂ B-R ₂	Pd	R ₁ -R ₂

Tableau 2. Principales réactions de couplages catalysées par les métaux de transition.

Par la suite, leurs observations ont inspiré d'autres chercheurs pour permettre le développement d'une large gamme de réactions comme le couplage carbone-hétéroatome (couplage de Buchwald-Hartwig : liaison carbone-azote) ou encore des α -arylations⁸⁴.

5.2. La réaction de couplage croisé de Suzuki-Miyaura

La réaction de couplage impliquant un dérivé organoboré, comme un acide ou un ester boronique, et un dérivé halogéné (brome ou iode) ou plus récemment décrit un dérivé pseudo-halogéné comme le groupement triflate (CF₃SO₃) est connue sous le nom de couplage de Suzuki-Miyaura. Cette découverte réalisée en 1979 par Akira Suzuki et Norio Miyaura,

décrit en premier lieu l'arylation de vinylboranes vinyliques par une réaction entre un dérivé acétylénique et un halogénure d'aryle^{85,86} (Figure 29).

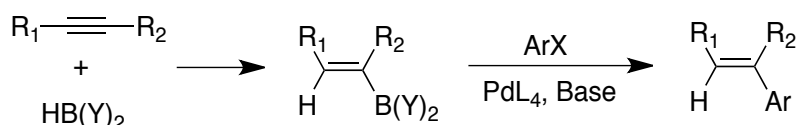


Figure 29. Exemple du premier couplage réalisé par Suzuki et Miyaura.

À ce jour, le couplage de Suzuki-Miyaura est une des réactions les plus utilisées tant au niveau de la recherche académique qu'au niveau industriel⁸⁷. En effet, que ce soit dans les produits naturels, les polymères, les ligands ou les produits pharmaceutiques, un grand nombre de structures possèdent généralement une structure de base de type biaryle⁸⁸⁻⁹⁰ (Figure 30).

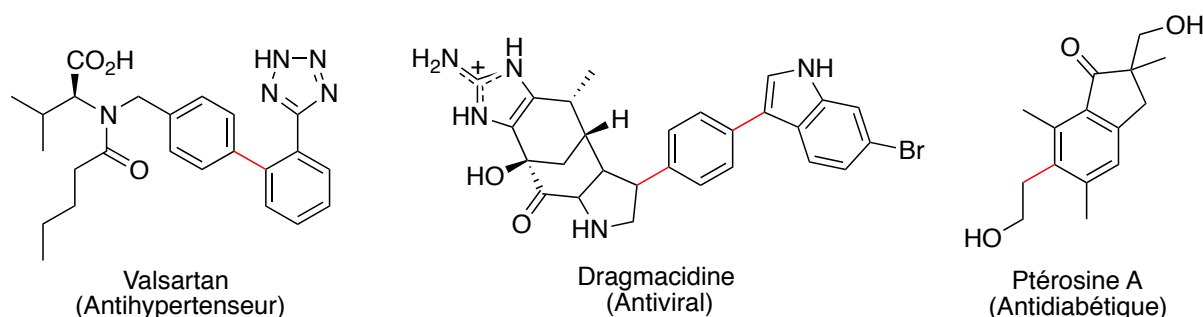


Figure 30. Exemples de molécules biologiquement actives synthétisées par couplage de Suzuki-Miyaura. Les liaisons rouges indiquent les liaisons obtenues par couplage de Suzuki-Miyaura⁹¹⁻⁹³.

Le fait que cette réaction soit une des plus répandues de la littérature en matière de couplage organométallique n'est pas anodin. Celle-ci présente de nombreux avantages : (i) les conditions opératoires requises sont douces, (ii) de nombreux acides boroniques sont disponibles commercialement, (iii) les sous-produits secondaires peuvent être éliminés facilement ce qui représente un avantage pour le développement industriel⁹⁴, (iv) les acides boroniques sont relativement stables, inertes vis-à-vis de l'eau et de l'oxygène, (v) la réaction est tolérante par rapport à un grand nombre de groupes fonctionnels, (vi) les acides boroniques sont moins toxiques et plus respectueux de l'environnement que les organostanniques⁹⁰.

D'un point de vue mécanistique, le cycle catalytique de la réaction de Suzuki-Miyaura est analogue aux autres réactions de couplages catalysées par le palladium. Dans un premier temps, la dissociation de deux ligands L du catalyseur introduit dans la réaction conduit à la formation de l'espèce réactive **A**. Le complexe de palladium (II) (**B**), un métalloïde, est généré *in situ* par addition oxydante d'un dérivé halogéné sur le catalyseur alors à l'état d'oxydation 0 (**A**). Dans un deuxième temps, un échange entre l'atome d'halogène (X) de l'espèce (**B**) et l'anion de la base utilisée est effectué par une étape de métathèse pour conduire à l'intermédiaire (**C**). Dans un troisième temps, une étape de transmétallation, c'est à dire un échange de ligands entre le complexe (**C**) et la base est réalisée pour obtenir le dérivé (**D**). Pour finir, une dernière étape dite d'élimination réductrice, conduit au couplage des deux entités R_1 et R_2 et à la régénération du complexe de palladium activé (**A**)^{88,95} (Figure 31).

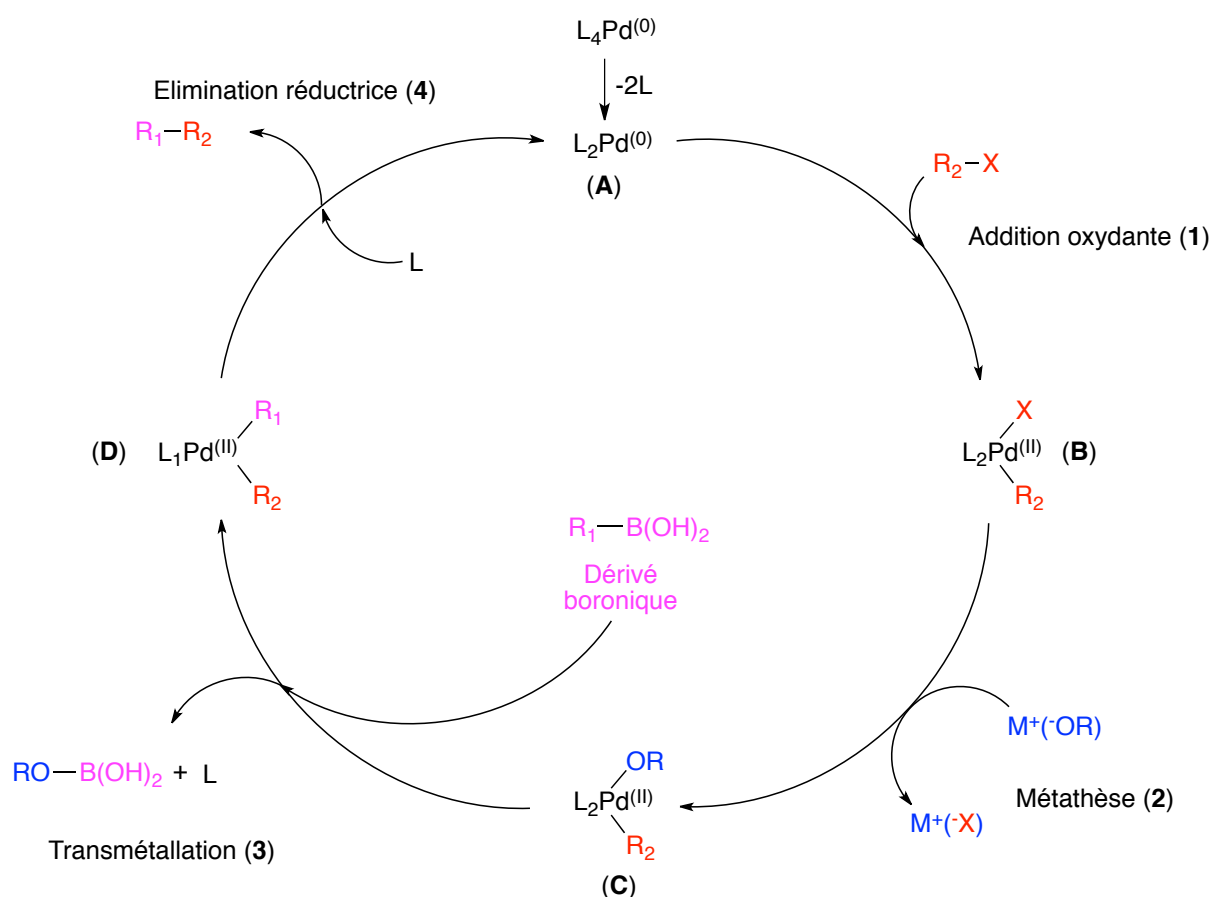


Figure 31. Cycle catalytique général pour le couplage de Suzuki-Miyaura.

5.3. Synthèse d'une famille de molécules dérivée du thiophène

Nous avons vu à la Figure 27 que la structure générale des composés obtenus après l'étape de modélisation comportait un cycle benzénique substitué en différentes positions par des groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes et un hétérocycle. La disponibilité, d'un point de vue commercial, de divers acides boroniques (**56-62**) ainsi que de plusieurs analogues thiophéniques (**52-54**), ont permis le développement de ces molécules par réaction de couplage catalysée au palladium de type Suzuki-Miyaura⁹⁶⁻⁹⁹ (Figure 32).

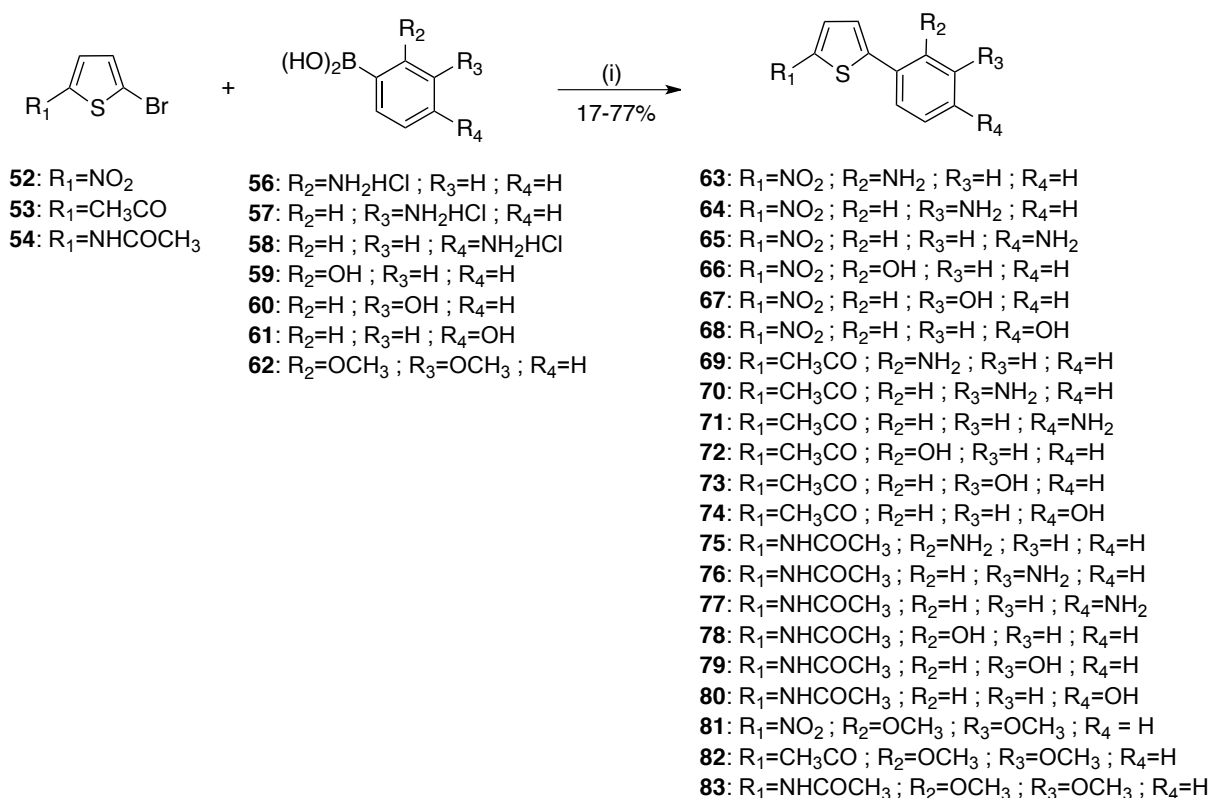


Figure 32. Synthèse des dérivés thiophéniques par couplage de Suzuki-Miyaura. Réactifs et conditions opératoires: (i) Pd(PPh₃)₄ ou PdCl₂(PPh₃)₂, Na₂CO₃ ou K₂CO₃ ou Cs₂CO₃, Toluène/EtOH ou 1,4-dioxane/H₂O ou DMF/H₂O ou DMF, 70-90°C.

De plus, le dérivé 2-acétamido-5-bromothiophène (**54**) est facilement accessible en deux étapes¹⁰⁰. Dans un premier temps, une réaction de condensation du composé **53** en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'acétate de sodium conduit à l'obtention des deux oximes (*E*)-**55** (54%) et (*Z*)-**55** (45%). Dans un deuxième temps, l'oxime (*E*)-**55** est engagée

dans un réarrangement de Beckmann, ce qui permet de convertir la fonction oxime en une fonction acétamide. Le composé **54** est obtenu avec un rendement de 88% (Figure 33).

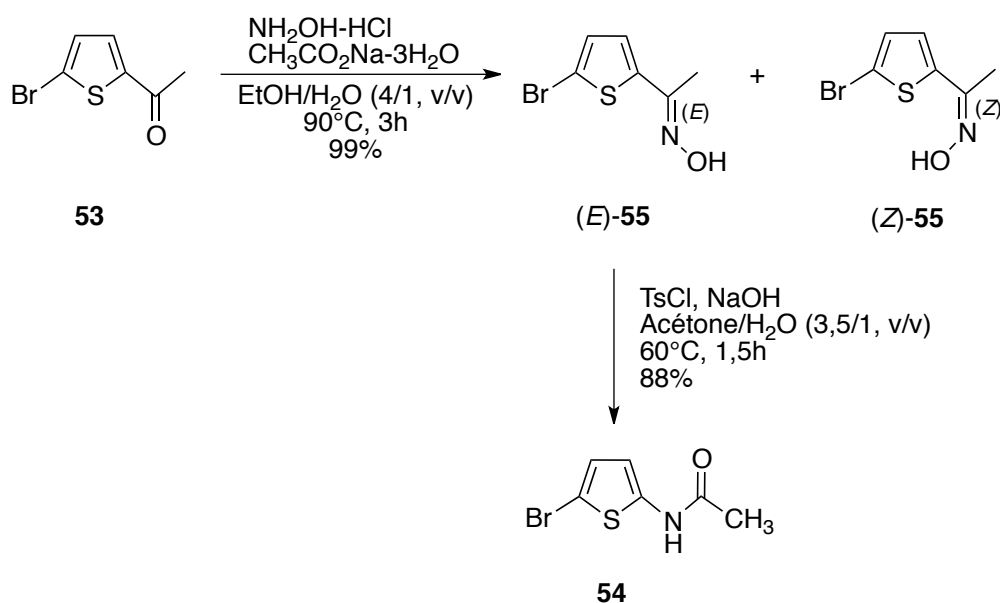


Figure 33. Synthèse du composé 54 par réarrangement de Beckmann.

La séparation des deux isomères **(E)-55** et **(Z)-55** par colonne chromatographique est nécessaire pour l'obtention de l'acétamide **54**. En effet, lorsque l'oxime existe sous deux formes diastéréoisomériques *Z* et *E*, le groupe qui migre de façon préférentielle est celui situé en position anti du groupement OH (Figure 34).

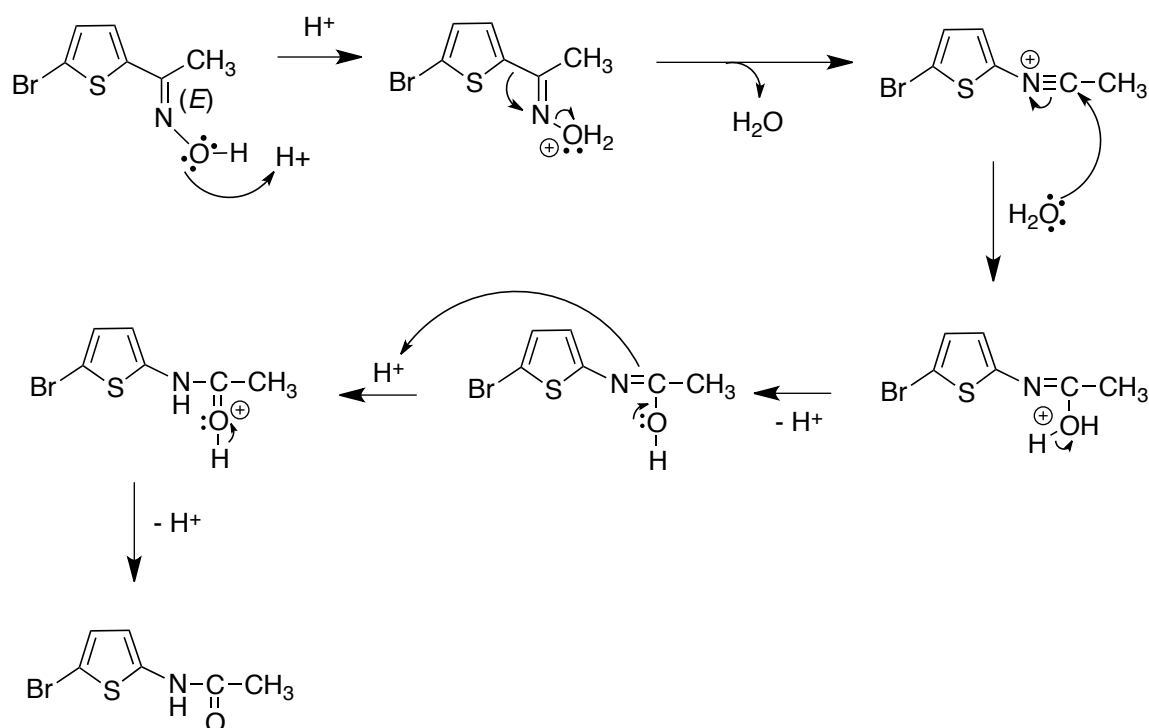
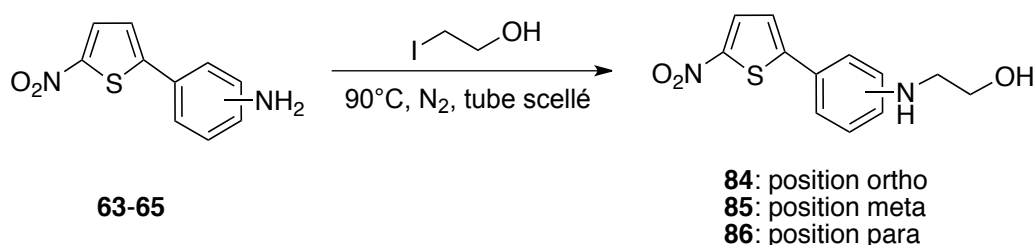


Figure 34. Mécanisme de la condensation de Beckmann.

Par ailleurs, les composés **63-65** ont été engagés en réaction en présence de 2-iodoéthanol (large excès) à 90°C sous atmosphère inerte dans des tubes scellés, pour conduire aux dérivés *N*-substitués avec un rendement modéré¹⁰¹ (31% à 42%). Dans cette réaction, le 2-iodoéthanol a un double rôle : il est à la fois le réactif et le solvant de la réaction. Pour réduire la quantité importante de réactif (dix équivalents) et limiter la formation du produit *N,N*-dialkylé (formation inévitable engendré par l'augmentation de la nucléophilie de l'atome d'azote après la première alkylation), l'utilisation de solvant comme le DMF ou le toluène a été envisagée. Dans la pratique, le choix du DMF était plutôt intéressant car un faible volume (0,2 mL) permettait de solubiliser les réactifs de départ. Cependant, les rendements étaient plutôt faibles et on observait l'apparition de plusieurs impuretés après réaction (entrée 5 et 7). Ensuite, l'utilisation d'une faible quantité de toluène permettait de solubiliser le réactif de départ mais le rendement était assez limité même au bout de 24h (entrée 2 et 3). De plus, lorsqu'un excès de toluène était employé, la réaction n'était pas réalisable (entrée 4) (Figure 35).



Entrée	Molécule de départ	Nbr. éq. de 2-iodoéthanol	Solvant	Volume (solvant)	Temps de réaction	Rdt	% (63) après réaction
1	63	1	DMF	0,2 mL	16h	32%	19%
2	65	4,5	DMF	0,2 mL	18h	21%	/
3	63	0,66	Toluène	1 mL	14h	7%	88%
4	63	0,66	Toluène	1 mL	24h	30%	40%
5	63	0,66	Toluène	4 mL	6h	0%	100%
6	63	10	/	/	3h	37%	/
7	64	10	/	/	3h	42%	/
8	65	10	/	/	3h	31%	/

Figure 35. Résultats des différents essais pour la réaction de substitution en présence de 2-iodoéthanol.

6. Évaluations pharmacologiques des composés dérivés du thiophène

6.1. Inhibitions multiples d'histidine kinases

Ce travail a été réalisé par nos collaborateurs les Dr. Hendrick Szurmant et Dr. Christopher Zschiedrich, respectivement chercheur et post-doctorant à « The Scripps research institute ».

Dans un premier temps, les dérivés **63** à **86** ont été évalués pour leur capacité à inhiber l'autophosphorylation des histidine kinases. Pour ce faire, les domaines de liaisons à l'ATP (Bergerat fold) de deux histidine kinases WalK de *Bacillus subtilis* ont été utilisés : WalK²⁰⁴⁻⁶¹² et WalK²⁷²⁻⁶¹². Le premier possède un domaine HAMP supplémentaire ayant comme fonction la régulation du signal, comme la phosphorylation chez l'histidine kinase. Celui-ci est présent chez les **H**istidine kinases, les **A**dényl-cyclase, les protéines de chimiotaxie liant un groupe **M**éthyl et chez les **P**hosphatases.

Les tests ont été effectués avec une concentration équimolaire (1mM) des dérivés du thiophène et de l'ATP. Ceux-ci ont montré une inhibition importante sur l'activité des histidine kinases pour huit d'entre eux : **65**, **66**, **67**, **70**, **71**, **73**, **81**, **86** (Figure 36). Ces huit

composés ont été considérés comme particulièrement attractifs et feront l'objet d'une évaluation biologique plus importante.

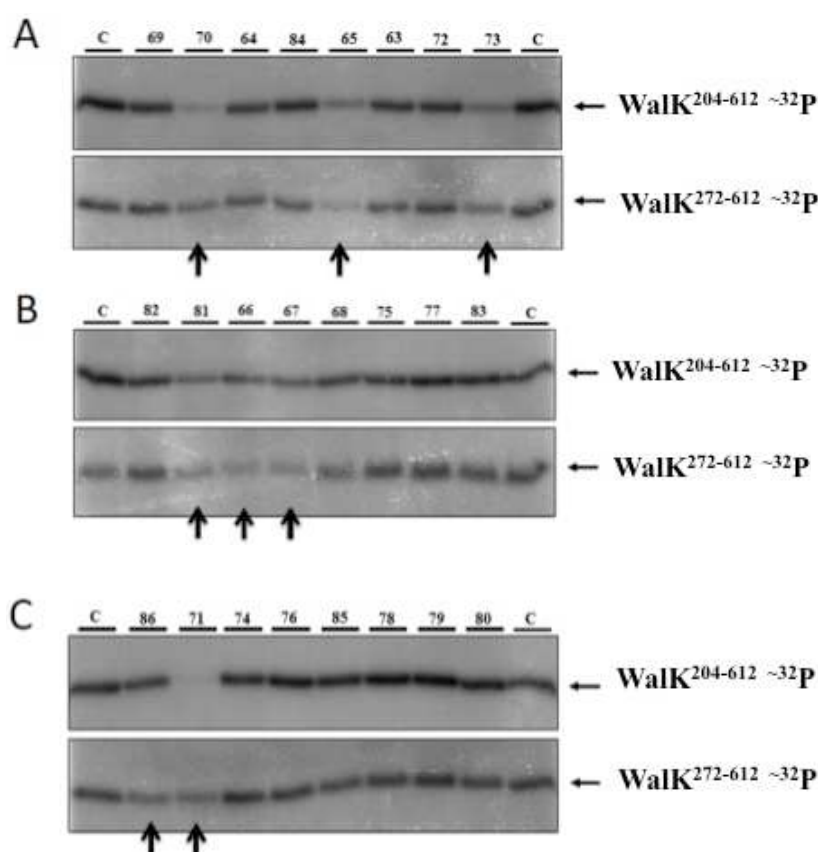


Figure 36. Évaluation de la capacité d'inhibition des dérivés du thiophène sur WalK.

Comme nous l'avons dit précédemment, une caractéristique souhaitable pour le développement des inhibiteurs est de cibler de manière spécifique et simultanée plusieurs histidine kinases d'un organisme. En effet, une inhibition multiple permettrait de diminuer l'apparition des résistances et de développer un composé antibactérien à large spectre. Ainsi, l'activité inhibitrice des huit composés cités précédemment a été évaluée également sur d'autres histidine kinases de *Bacillus subtilis* : PhoR (impliquée dans la régulation du phosphate) et ResE (impliquée dans la détection de la limitation d'oxygène et de nitrate chez les bactéries). Un exemple d'inhibition multiple est présenté à la Figure 37 pour le composé 67.

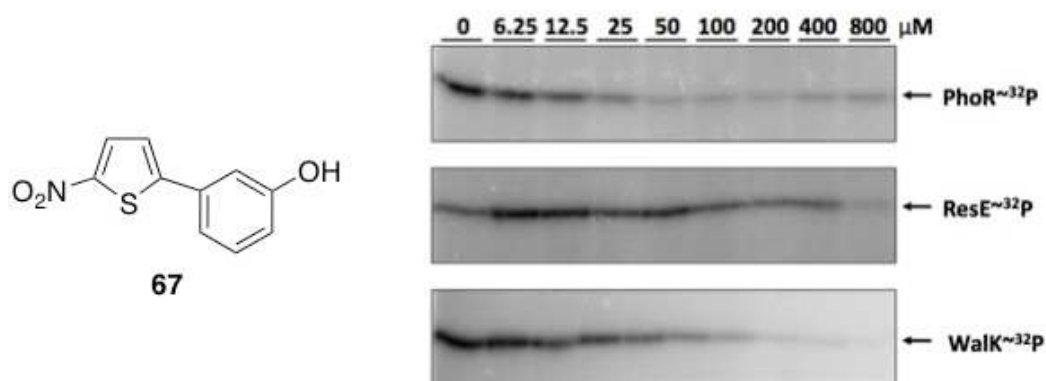


Figure 37. Tests d'inhibitions multiples pour le composé 67.

6.2. Une inhibition spécifique aux histidine kinases

À ce stade, l'inhibition multiple d'histidine kinases est confirmée. Cependant, il n'est pas impossible que les huit composés présentent une inhibition enzymatique non spécifique. En d'autres termes, il serait possible d'observer une activité contre les sérine (Ser), thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr) kinases, des protéines essentielles dans tous les domaines de la vie. Ainsi, un test d'inhibition a été réalisé sur une sérine/thréonine kinase bactérienne. Pendant longtemps, il était courant de retrouver dans des publications que les Ser/Thr/Tyr kinases (STYK) étaient exclusivement retrouvées chez les eucaryotes. Cependant, des voies de signalisation dépendantes de ces kinases là ont été découvertes chez les procaryotes. De plus, même si l'organisation et l'architecture des domaines chez la plupart des STYKs bactériennes sont assez différentes de leurs homologues eucaryotes, il apparaît que cette famille de protéines kinases présente une homologie de séquence au niveau de leurs domaines catalytiques¹⁰². De ce fait, la détermination des CI_{50} a été effectuée sur la sérine/thréonine kinase IreK (*Escherichia faecalis*). Les résultats ont montré une absence d'inhibition à une concentration supérieure à 800 μM des composés testés (Figure 38).

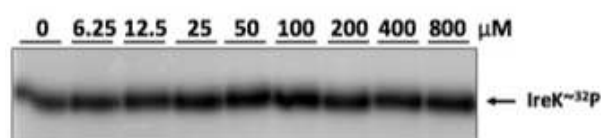


Figure 38. Test d'inhibition sur IreK avec le composé 67.

La conception des molécules repose sur les similitudes et différences de la superfamille GHKL. Plus précisément, la structure des dérivés du thiophène a été établie avec comme

point de départ un inhibiteur de l'ADN gyrase connu. Il n'est donc pas impossible d'observer une activité seulement sur les histidine kinases mais aussi sur l'ADN gyrase. Comme précédemment, les huit composés ont été évalués comme inhibiteur de l'ADN gyrase (*Escherichia coli*) avec comme référence la ciprofloxacine, un antibiotique connu comme inhibiteur de cette cible biologique. Les huit composés ont montré une très faible activité, voir l'absence d'activité à une concentration de 800 μM (Tableau 3).

Composé	WalK (μM)	PhoR (μM)	ResE (μM)	IreK (μM)	ADN gyrase (μM)
65	181,1	21,37	52,28	>800	>400
66	196,9	122,6	124,3	>800	>400
67	52,81	13,11	89,36	>800	>800
70	145,6	46,18	20,3	>800	>800
71	121,3	33,39	40,38	>800	>800
73	78,37	44,02	32,85	>800	>400
81	134,4	1,63	102,3	>800	>800
86	80,11	11,39	243,9	>800	>400

Tableau 3. Résumé des valeurs de CI_{50} obtenues contre les différentes cibles biologiques.

En résumé, les huit composés montrent une affinité importante pour les histidine kinases. Cependant, il n'est pas à exclure qu'une partie des composés pourrait montrer une certaine activité contre les protéines gyrases de certains organismes.

6.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Les données obtenues précédemment concernant l'inhibition des histidine kinases in vitro, nous ont confirmé le fait que plusieurs protéines pouvaient être ciblées de manière simultanée. De plus, le système à deux composants WalK/WalR est essentiel pour les bactéries car il est impliqué dans le métabolisme de la paroi cellulaire. Ainsi, nous avons voulu corréler les résultats d'inhibition obtenus sur les histidine kinases avec une potentielle activité antibactérienne.

Cette évaluation a été réalisée par la méthode Kirby-Bauer, basée sur la diffusion de substances antibactériennes imprégnées sur des disques en papier sur une surface de gélose. Dans un premier temps, des disques contenant 100 μg de chacun des huit dérivés ont été mis en contact sur une gélose contenant une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la

méthicilline (TCH1516 USA300). Après incubation, une inhibition nette de la croissance bactérienne a été observée pour deux des huit composés : le **66** et le **67**. Cependant, le même phénomène n'est pas observé avec les six autres dérivés (Figure 39).

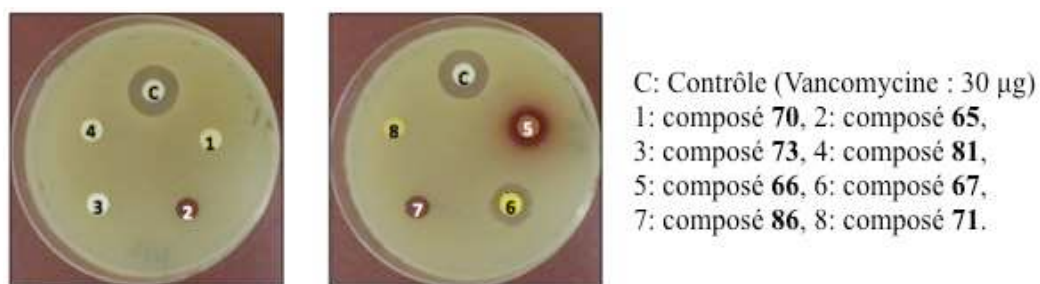


Figure 39. Résultats de la méthode de Kirby-Bauer pour la détermination d'une potentielle activité antibactérienne des composés 70, 65, 73, 81, 66, 67, 86 et 71.

Par la suite, le même test a été réalisé avec une diminution de la concentration des composés **66** et **67** pour déterminer si cette inhibition de croissance est significative ou non. Pour les deux molécules, le diamètre du cercle est inchangé entre 100 µg et 20 µg. De plus, une très légère inhibition est aperçue à 4 µg pour le dérivé **67** (Figure 40).

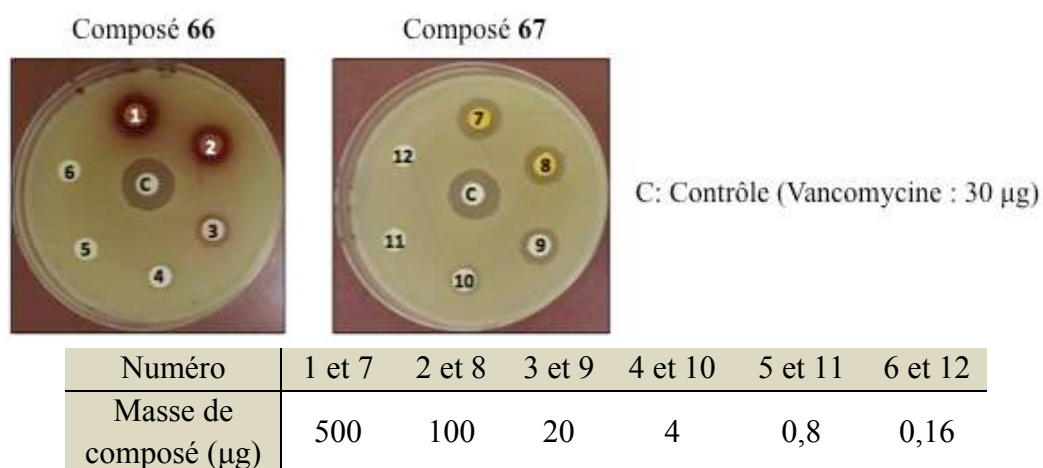


Figure 40. Résultats de la méthode de Kirby-Bauer pour la détermination d'une réponse dose-dépendance des composés 66 et 67 contre une souche de *S. aureus* résistant à la méthicilline.

À la vue de ces résultats plus que prometteurs, une quantification plus importante de l'activité antibactérienne des composés **66** et **67** a été réalisée sur un panel de neuf bactéries pathogènes chez l'humain. Les valeurs de CMI, définies comme la concentration à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée et les valeurs de CMB (concentration minimale

bactéricide), définies comme la concentration à laquelle au moins 99,99% des pathogènes sont tués, sont résumées dans le Tableau 4.

Souche bactérienne	Composé 66		Composé 67	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>B. subtilis</i> (G+)	7	10	7	16
<i>S. aureus</i> (G+)	16	32	32	>32
<i>B. anthracis</i> (G+)	7	16	7	>32
<i>S. pyogenes</i> (G+)	10	32	16	32
<i>S. agalactiae</i> (G+)	16	>32	32	>32
<i>L. monocytogenes</i> (G+)	10	>64	32	>64
<i>E. faecalis</i> (G+)	32	>64	>64	>64
<i>S. enterica</i> (G-)	32	32	32	32
<i>E. coli</i> (G-)	32	32	32	32

Tableau 4. Valeurs de CMI et CMB pour les composés 66 et 67 sur des bactéries à gram-positif et à gram-négatif indiquées en µg/mL.

Il apparaît clairement que les deux composés **66** et **67** présentent une activité contre des bactéries à gram-négatif et à gram-positif. En revanche, *Escherichia faecalis* semble être la souche bactérienne la moins sensible. De plus, même si les deux molécules montrent une activité assez similaire, le composé **66** fait preuve d'une inhibition légèrement plus importante que son homologue.

En quelques mots, sur les vingt-quatre molécules synthétisées, huit ont montré une activité inhibitrice intéressante sur histidine kinase. Par ailleurs, les dérivés **66** et **67** se distinguent nettement avec une activité antibactérienne importante contre de nombreux agents pathogènes.

6.4. Détermination du caractère bactéricide des composés **66** et **67**

L'évaluation du caractère bactéricide ou bactériostatique des dérivés **66** et **67** a été entreprise par le Pr. Jean-Philippe Lavigne et par le Dr. Catherine Dunyach-Rémy, tous deux bactériologistes au CHU de Nîmes.

Une expérience a été menée sur une souche de *Bacillus subtilis* (JH 462) en l'absence et en présence des composés étudiés. Cette étude est réalisée par une mesure de la densité optique à 600nm avec un contrôle effectué en présence du chloramphénicol (bactériostatique) et de la

vancomycine (bactéricide). On observe que le composé **66** a un comportement semblable à celui de la vancomycine sur la durée de l'expérience, confirmant une lyse des cellules bactériennes lente. Par ailleurs, le dérivé **67** montre une activité lytique plus rapide que la vancomycine ou que le composé **66** (Figure 41).

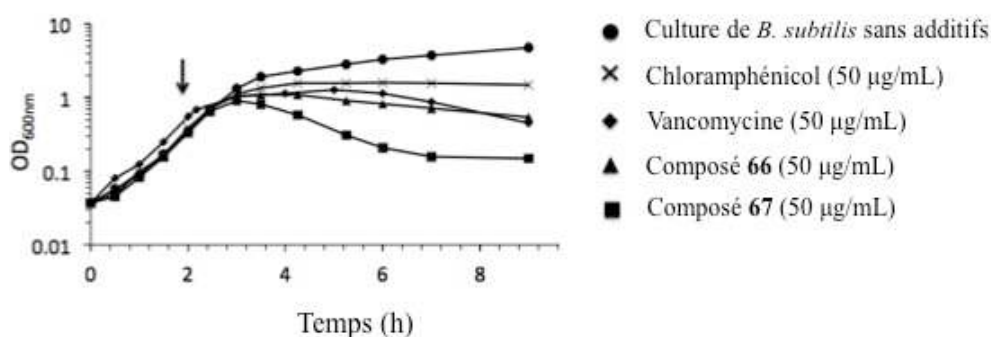


Figure 41. Détermination du caractère bactéricide des composés 66 et 67. La flèche noire indique le moment où l'introduction des différentes substances bactériennes est effectuée.

6.5. Évaluation de l'activité hémolytique

Un travail de fond a été entrepris sur les inhibiteurs d'histidine kinases publiés dans la littérature pour comprendre les différentes stratégies au niveau de leur conception mais aussi pour voir les potentiels effets indésirables engendrés par ceux-ci. Par le passé, plusieurs molécules ont montré une activité hémolytique importante, ce qui a eu pour effet de stopper net le développement de ces molécules. Or, il n'est pas à exclure que l'effet bactéricide observé précédemment provienne en réalité d'une activité hémolytique de la part de nos composés.

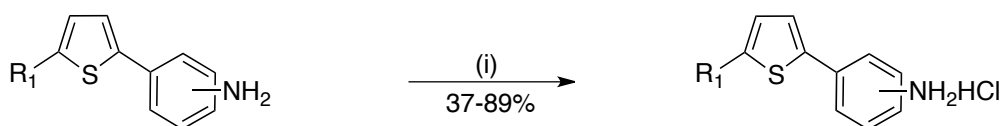
Des globules rouges de moutons ont été exposés à des concentrations importantes (>1mM) des vingt-quatre molécules synthétisées (**63** à **86**) et aucune hémolyse n'a été observée. Cela démontre que nos dérivés ne sont pas hémolytiques et que l'activité antibactérienne n'est pas engendrée par ce phénomène.

6.6. Évaluation de composés plus solubles

L'ingestion orale est la voie la plus courante et la plus couramment employée pour l'administration de molécules thérapeutiques car celle-ci présente de nombreux avantages :

une facilité d'administration, une plus grande assiduité pour le patient et des contraintes stériles moins importantes. Cependant, la faible solubilité dans les milieux aqueux est un problème majeur dans le développement et dans la formulation de nouvelles molécules. En effet, ce problème nécessite généralement des doses élevées pour atteindre des concentrations plasmatiques thérapeutiques importantes. De plus, on estime que plus de 40% des nouvelles entités chimiques développées par les industries pharmaceutiques sont pratiquement insolubles dans l'eau. Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes pour l'augmentation de la biodisponibilité des molécules constitue un challenge important pour la recherche médicale^{103,104}.

Ces problèmes de solubilité ont été observés sur nos molécules dérivées du thiophène par nos collaborateurs biologistes. La formation de sels des fonctions acides ou basiques est la méthode la plus utilisée pour pallier ces problèmes. Ainsi, la synthèse de chlorhydrates a été réalisée au laboratoire par deux méthodes. Dans un premier temps, une solution concentrée d'acide chlorhydrique (37%) est ajoutée au goutte à goutte sur nos composés aminés. Cela conduit à la précipitation du sel d'ammonium quaternaire et à son isolement par filtration. Cependant, pour obtenir le dérivé **88** cette technique s'est montrée inefficace. De ce fait, de l'acide chlorhydrique gazeux a été formé par addition lente d'une solution concentrée d'acide sulfurique (99%) sur du chlorure de sodium. Par la suite, celui-ci a été canulé dans le mélange réactionnel comportant l'amine **64** en solution dans le THF, conduisant là aussi à son isolation par filtration. Au total, neuf des vingt-quatre molécules obtenues précédemment ont pu être synthétisées sous forme de chlorhydrates avec un rendement compris entre 37 et 89% (Figure 42).



63: $R_1=NO_2$; $R_2=NH_2$; $R_3=H$; $R_4=H$
64: $R_1=NO_2$; $R_2=H$; $R_3=NH_2$; $R_4=H$
65: $R_1=NO_2$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2$
69: $R_1=CH_3CO$; $R_2=NH_2$; $R_3=H$; $R_4=H$
70: $R_1=CH_3CO$; $R_2=H$; $R_3=NH_2$; $R_4=H$
71: $R_1=CH_3CO$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2$
75: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=NH_2$; $R_3=H$; $R_4=H$
76: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=H$; $R_3=NH_2$; $R_4=H$
77: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2$

87: $R_1=NO_2$; $R_2=NH_2HCl$; $R_3=H$; $R_4=H$
88: $R_1=NO_2$; $R_2=H$; $R_3=NH_2HCl$; $R_4=H$
89: $R_1=NO_2$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2HCl$
90: $R_1=CH_3CO$; $R_2=NH_2HCl$; $R_3=H$; $R_4=H$
91: $R_1=CH_3CO$; $R_2=H$; $R_3=NH_2HCl$; $R_4=H$
92: $R_1=CH_3CO$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2HCl$
93: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=NH_2HCl$; $R_3=H$; $R_4=H$
94: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=H$; $R_3=NH_2HCl$; $R_4=H$
95: $R_1=NHCOCH_3$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=NH_2HCl$

Figure 42. Synthèse de chlorhydrides. Réactifs et conditions opératoires: (i) $HCl_{(aq)}$ (12M), THF, 0°C ou $HCl_{(g)}$.

Le manque de solubilité observé aurait pu avoir une influence sur les données biologiques obtenues précédemment et en particulier sur l'activité antibactérienne de certains dérivés. Les dérivés **89**, **91** et **92**, sous forme de chlorhydrides, présentent une nette augmentation de leur solubilité dans les milieux aqueux. Cependant, aucune activité antimicrobienne n'a été observée par la méthode de Kirby-Bauer. D'autre part, l'activité inhibitrice de ces trois chlorhydrides a été évaluée contre l'histidine kinase PhoR. Il est également apparu dans ce cas que les chlorhydrides sont de moins bons inhibiteurs que leurs homologues moins solubles. Ce manque d'activité peut-être en partie expliqué par le fait que la fonction amine est normalement primordiale pour l'établissement de liaisons hydrogènes avec le résidu conservé Asp533, normalement impliqué dans la liaison à l'ATP.

6.7. Évaluation des composés de la série du thiophène (**63** à **86**) en tant qu'adjuvant

L'évaluation des composés de la série du thiophène (**63** à **86**) en tant qu'adjuvant a été réalisée par le Pr. Jean-Philippe Lavigne et par le Dr. Catherine Dunyach-Rémy.

Le rôle des systèmes à deux composants ne se limite pas à la capacité d'adaptation des bactéries (pression osmotique ou intégrité cellulaire) ou à la régulation du métabolisme de celles-ci (respiration). Plusieurs études ont rapporté qu'ils étaient impliqués dans les phénomènes de résistance développés par les bactéries. De ce fait, il est envisageable de penser que nos composés pourraient présenter une activité d'adjuvant d'antibiotiques en

ciblant ces systèmes à deux composants. En d'autres termes, l'activité de nos molécules pourrait moduler les résistances développées par plusieurs souches bactériennes, les rendant à nouveau sensibles à l'antibiotique concerné.

Tous les composés (**63** à **86**) ont été évalués en tant qu'adjuvant en association avec plusieurs antibiotiques, présents à une concentration sublétales de 25 µg/mL. Cette activité a été seulement observée avec l'utilisation du composé **66** sur deux souches bactériennes quelque soit le mécanisme de résistance impliqué. D'une part, sur une souche d'*Escherichia coli* (ARS 108) productrice de β-lactamases à spectre large, la CMI obtenue avec la céfotaxime seule est supérieure à 16 µg/mL et après l'addition du composé **66** comme adjuvant, celle-ci chute à une valeur inférieure à 0,03 µg/mL. D'autre part, pour *Staphylococcus aureus* (C1P15) résistant à la pénicilline et pour *Staphylococcus aureus* (C1BP13) résistant à la méthicilline, le même résultat est obtenu (Tableau 5).

Souches bactériennes	CMI (µg/mL) [avec 50 µg/mL de composé 66]					
	Mécanisme de résistance	Amoxicilline	Céfotaxime	Ofloxacine	Cloxacilline	Pénicilline G
<i>E. coli</i>						
ATCC25922	-	4	0.125	0.06	-	-
G28	β-lactamase	>16 [0.03]	>16 [0.03]	-	-	-
ARS108	BLSE	>16 [0.03]	>16 [0.03]	-	-	-
G02	R FQ	-	-	>8 [<0.015]	-	-
<i>S. aureus</i>						
ATCC29213	-	-	-	-	1	0.5
C1P15	Pénicillinase	-	-	-	1	>8 [<0.015]
C1BP13	SARM	-	-	-	>8 [<0.015]	>8 [<0.015]

Tableau 5. Évaluation de la susceptibilité de plusieurs antibiotiques sur diverses souches bactériennes en présence ou en absence du composé 66. BLSE : β-lactamase à spectre élargi, R FQ : résistance aux fluoroquinolones, SARM : *S. aureus* résistant à la méthicilline.

Les résultats biologiques nous confirment que le composé **66**, lorsqu'il est utilisé seul présente une potentielle activité bactéricide. De plus, celui-ci peut être combiné à un antibiotique présent à une concentration sublétales, en tant qu'adjuvant sur diverses souches bactériennes.

Ce travail a conduit à une publication : Boibessot, T., Zschiedrich, C.P., Lebeau, A., Bénimélis, D., Dunyach, C., Lavigne, J-P., Szurmant, H., Benfodda, Z., Meffre, P. The

rational design, synthesis and antimicrobial properties of thiophene derivatives that inhibit bacterial histidine kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2016**, 59, 8830-8847.

7. Impact et devenir des résidus pharmaceutiques dans l'environnement

7.1. Contexte général

Le développement de l'industrie pharmaceutique a permis d'augmenter l'espérance de vie des hommes dans les pays développés, ainsi que dans les régions du monde les plus pauvres comme l'Afrique. En 2016, l'OMS a publié un communiqué de presse pour annoncer que celle-ci avait augmenté de près de cinq ans avec l'apparition de traitements contre le paludisme et le VIH notamment¹⁰⁵. De ce fait, les produits pharmaceutiques constituent une richesse inestimable pour la population mondiale. Cependant, pendant de nombreuses années, le développement ainsi que l'utilisation de nouvelles molécules à visée thérapeutique va provoquer une pollution importante de l'environnement. Au début des années 1980, ce problème va engendrer une prise de conscience de la part de plusieurs industriels. À titre d'exemple, pour la synthèse d'un kilogramme de phloroglucinol (Spasfon®), un antalgique du tube digestif encore utilisé de nos jours, la quantité de déchets générés avoisinait les quarante kilogrammes : $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, NH_4Cl , FeCl_2 , KHSO_4 ¹⁰⁶ (Figure 43). Par conséquent, diverses mesures vont être prises pour réduire les déchets, comme l'utilisation d'une chimie plus verte (solvant moins toxique, développement de nouvelles voies de synthèses limitant le gaspillage intensif).

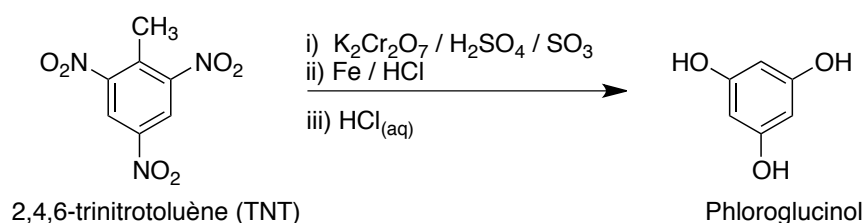


Figure 43. Synthèse du phloroglucinol.

Néanmoins, depuis la fin des années 1990 et le développement de nouvelles méthodes analytiques, un nouveau type de pollution va être mis en avant. Si le nombre de déchets provenant de la synthèse des molécules pharmaceutiques a conduit à l'élaboration de mesures

drastiques pour limiter leur production, il n'en est pas de même pour le devenir de leurs principes actifs dans l'environnement¹⁰⁷.

7.2. Facteurs de contamination environnementale

Il n'est pas étonnant de voir les pays industrialisés occuper les premières places du classement en tant que plus gros consommateurs de médicaments (usages vétérinaire et humain). Ceux-ci représentent près de 80% de la consommation mondiale avec comme quatuor de tête : les États-Unis, le Japon, l'Allemagne et la France¹⁰⁸. De plus, il est peu probable que cette consommation de produits pharmaceutiques diminue dans les années à venir, en raison d'une population toujours plus consommatrice au fur et à mesure qu'elle vieillit. Or, la métabolisation des molécules biologiquement actives n'est pas la même pour toutes et il est courant qu'une fraction non métabolisée soit excrétée par la voie urinaire ou par les fèces. Par exemple, après un traitement à base de tétracycline (ATB), plus de 70% de la forme active du composé est sécrétée et libérée dans l'environnement¹⁰⁹. Ainsi, même dans le cadre d'une bonne utilisation, ces molécules pharmaceutiques se retrouvent en grande partie dans l'environnement. Cependant, il n'est pas à exclure que dans certains cas, le manque de prise de conscience des humains se manifeste par le rejet de médicaments dans les toilettes ou encore dans les déchets ménagers¹⁰⁷.

D'autres sources de contamination, caractérisées plutôt comme des sources ponctuelles, ont été détectées aux abords des industries pharmaceutiques. Une étude menée par D. G. J. Larsson et ses collaborateurs s'est focalisée sur les effluents d'une usine de traitement des eaux usées située à Patancheru en Inde. La particularité de ce site est qu'il ne regroupe pas moins de quatre-vingt-dix fabricants majeurs de médicaments génériques. Ainsi, la détection de niveaux extrêmement élevés d'antibiotiques à spectre large (ciprofloxacine présent à plus de 28 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), soulève le fait qu'une libération potentielle de composés pharmaceutiques biologiquement actifs est facilitée dans différentes régions du monde¹¹⁰.

Dans les établissements de soins, la consommation moyenne d'antibiotiques d'un patient hospitalisé est d'environ dix fois supérieure à la consommation d'un patient en ville. Ainsi, on estime que la concentration des effluents hospitaliers est potentiellement plus importante que dans les effluents domestiques. La quantité de rejets hospitaliers a été mesurée dans l'effluent

principal d'un hôpital parisien à différentes périodes de l'année et a montré la présence de divers antibiotiques¹¹¹ (Tableau 6).

Molécule	Concentration minimale détectée	Concentration maximale détectée
Sulfaméthoxazole	1,8 µg.L ⁻¹	12,2 µg.L ⁻¹
Triméthoprim	0,8 µg.L ⁻¹	21,4 µg.L ⁻¹
Vancomycine	1,6 µg.L ⁻¹	37,3 µg.L ⁻¹
Ofloxacin	1,0 µg.L ⁻¹	2,0 µg.L ⁻¹

Tableau 6. Gamme de concentration de quelques antibiotiques retrouvés dans l'effluent principal d'un hôpital parisien à différentes périodes de l'année.

Par ailleurs, la surconsommation d'antibiotiques dans les élevages industriels d'animaux est récurrente et dans certains cas assez élevée. Ainsi, il n'est pas étonnant de voir ces dérivés pharmaceutiques disséminés dans l'environnement lors de l'épandage des lisiers ou du purin sur les sols agricoles. Pour les élevages industriels piscicoles, les antibiotiques sont mélangés à la nourriture et répartis dans les eaux douces ou les eaux marines. Néanmoins, il est plus que probable, qu'une quantité non négligeable des aliments ne soit pas consommée par les poissons et que celle-ci se retrouve rejetée dans l'environnement. De ce fait, les molécules peuvent s'accumuler dans les sédiments ou être transportées sur de longues distances et être ingérées par d'autres poissons¹⁰⁸.

7.3. Le traitement des eaux usées

Nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de la population terrestre combinée à une espérance de vie en constante augmentation a conduit à une demande et une consommation toujours plus importante de molécules à visée thérapeutique. Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver des résidus pharmaceutiques dans l'environnement. Pour pallier ce problème, des progrès ont été réalisés pour le développement de nouvelles technologies ayant pour but de traiter les eaux usées (industrielles ou quotidiennes). Le traitement des eaux usées est ainsi réalisé par diverses étapes^{112,113}:

- le prétraitement consiste à éliminer les éléments les plus grossiers (sable, graviers, graisses).

- le traitement primaire est basé sur le principe de la décantation. Ce principe, plus ou moins efficace suivant les conditions de mise en œuvre (procédés physico-chimiques par exemple), permet de séparer les éléments liquides et solides sous l'effet de la pesanteur.

- un traitement secondaire utilise des procédés biologiques et permet la dégradation de matière organique sous l'action de bactéries.

- dans certains cas, un traitement tertiaire (chloration, ozonation, ultraviolet) est obligatoire pour conduire à la dégradation des molécules les plus résistantes.

Au cours du traitement des eaux dans les STEP (Stations d'épuration des eaux usées), le devenir des résidus issus de produits pharmaceutiques dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques : la température, le pH, leur polarité, leur biodégradabilité, la concentration en biomasse et la présence ou non d'oxygène¹¹⁴. Ainsi, il n'est pas rare de voir une efficacité assez différente suivant le type de molécule étudiée. Une étude menée en 2011 par une équipe de chercheurs de Corée du Sud a comparé le rendement d'élimination de vingt produits pharmaceutiques (antibiotiques, analgésiques, antihypertenseurs, hormones...), dans cinq usines de traitement des eaux usées. Dans le traitement primaire (physico-chimique), l'élimination des dérivés pharmaceutiques présente un rendement assez faible de 28%. Par la suite, l'utilisation de processus biologiques lors d'un traitement secondaire permet de diminuer de manière plus importante la proportion des molécules. Néanmoins, nous remarquons que l'efficacité d'élimination des dérivés pharmaceutiques est inégale selon les molécules¹¹⁵ (Tableau 7).

Famille de molécule	Molécule	Concentration moyenne de l'influent (ng.L ⁻¹)	Concentration moyenne de l'effluent (ng.L ⁻¹)	Efficacité d'élimination (%)
Antibiotique	Sulfaméthazine	132	114	13,1
	Sulfaméthoxazole	120	57	51,9
	Triméthoprim	205	63	69,0
Antihypertenseur	Aténolol	7801	2772	64,5
	Métoprolol	4	3	23,0
Analgésique	Paracétamol	7460	10	99,9
	Ibuprofène	2265	40	98,2
Hormone	Oestrone	47	6	87,1
	Oestril	4	0	100%

Tableau 7. Concentration de dérivés pharmaceutiques en entrée et en sortie de STEP.

7.4. Les effets secondaires liés à cette contamination environnementale

Lorsque l'on s'intéresse aux risques liés à la présence de molécules dans l'environnement, il convient de prendre en compte deux paramètres essentiels : l'exposition, c'est à dire la concentration et la fréquence de la molécule dans le milieu étudié et l'effet toxique potentiel sur les organismes étudiés. Cependant, plusieurs limites à ce modèle sont à prendre en compte. Dans un premier temps, la persistance de molécules dans l'environnement dépend de leur biodégradabilité et de leur bioaccumulation. Dans un deuxième temps, compte tenu du nombre de dérivés pharmaceutiques présents sur le marché il peut être fastidieux de mettre en place des essais standardisés. Dans un troisième temps, l'effet synergique de plusieurs molécules ne peut pas être exclu au vu des concentrations retrouvées dans l'environnement¹¹⁶. Nous l'avons vu précédemment, dans la majeure partie des cas, les concentrations perçues des dérivés pharmaceutiques sont assez faibles et se retrouvent à des teneurs de quelques microgrammes par litre. C'est pourquoi, il est généralement difficile dans ces cas là, de déceler les risques émergents. Généralement, s'il n'y a pas un accident sur une population humaine ou animale importante, le degré de surveillance est assez faible¹¹⁷.

Entre les années 1990 et 2000, une étude a mis en évidence que le déclin des populations de vautours au Pakistan (Asie) était dû à une exposition trop importante au diclofénac (Figure 44). Cet anti-inflammatoire était largement utilisé dans cette région du monde pour traiter le bétail contre la douleur et la fièvre. Ainsi, en se nourrissant de ces carcasses d'animaux, les vautours accumulèrent une dose relativement importante de diclofénac et furent dans la majeure partie décimés¹¹⁸.

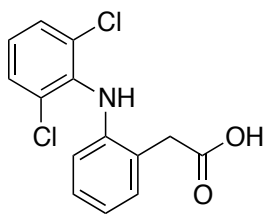


Figure 44. Structure du diclofénac.

Le 17 α -éthynylestradiol est un des composés retrouvé dans de nombreuses pilules contraceptives et de nombreuses études se sont intéressées à son impact sur l'environnement (Figure 45). Il a été montré que sa présence, même à des concentrations extrêmement faibles, affectait de manière importante le développement sexuel des poissons. En effet, cette

féminisation a été confirmée par la production par les poissons mâles d'une protéine (vitellus), synthétisée généralement par les vertébrés féminins durant le développement embryonnaire¹¹⁹.

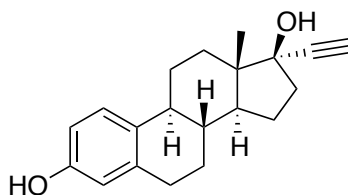


Figure 45. Structure du 17α-éthynylestradiol.

Par définition, l'antibiotique idéal doit être toxique pour les bactéries et être inoffensif pour les humains ou les animaux. Cependant, cette affirmation s'apparente plutôt à une utopie qu'à un fait avéré. En effet, l'effet toxique le plus préoccupant à ce jour est la sélection de souches résistantes due à la présence de résidus d'antibiotiques. La pression de sélection orchestrée par les bactéries conduit à l'apparition de mécanismes de résistance, engendrés par l'utilisation d'une dose sub létale d'antibiotique dans la plupart des cas. De ce fait, des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques ont été retrouvées dans des écosystèmes dépourvus d'antibiotiques. Cependant, une condition primordiale pour le transfert direct de résistance est que les bactéries, ainsi que le matériel génétique doivent être stables dans le nouvel environnement. On peut donc se poser la question de savoir si tous les paramètres adéquats sont réunis pour que le transfert de gènes puisse avoir lieu. Par conséquent, les informations concernant l'importance et l'impact de la présence d'antibiotiques dans l'environnement ne permettent pas d'évaluer de façon claire et précise les risques engendrés pour l'homme ou pour les écosystèmes^{120,121}.

7.5. La biodégradabilité des molécules

7.5.1. Définition

La persistance de plusieurs familles de molécules biologiquement actives (antibiotiques, anticancéreux, hormones, anti-inflammatoires...) dans l'environnement constitue un enjeu important pour la préservation des micro-organismes impliqués dans la dégradation de matières organiques. Le devenir d'un dérivé pharmaceutique dans un environnement défini

(sol, cours d'eau) dépend de divers paramètres : ses propriétés physico-chimiques (solubilité dans l'eau, son caractère lipophile), les facteurs environnementaux (température, présence ou absence de soleil (rayonnement UV)), le pH et la présence de micro-organismes (bactéries, champignons, algues) permettant de biodégrader ces molécules¹²².

La biodégradation au sens large est définie comme étant une conversion catalysée par des enzymes d'une molécule mère en une autre appelée métabolite, possédant en principe une meilleure solubilité dans un milieu aqueux. D'un point de vue chimique, celle-ci se traduit par une simplification croissante de la structure principale d'un composé organique conduisant à l'obtention de métabolites de plus faible poids moléculaire¹²³.

On distingue deux types de biodégradation¹²⁴:

- une dégradation primaire correspondant à la modification simple des composés parents (ex : perte d'une fonction) permettant de perdre son activité biologique.
- une dégradation ultime définie par la transformation complète de la molécule par les micro-organismes conduisant à la production de composés inorganiques simples (CO_2 , H_2O , CH_4 , NH_3).

7.5.2. Principe des tests de biodégradabilité

La biodégradabilité d'une molécule permet d'évaluer sa persistance dans l'environnement et constitue une caractéristique importante pour les dérivés pharmaceutiques. Par conséquent, des essais de biodégradation ont été entrepris ces dernières années pour déterminer et surtout évaluer les risques environnementaux engendrés. Une collaboration a été mise en place avec l'équipe du Pr. Klaus Kümmerer basée à l'Université de Leuphana (Allemagne), spécialisée dans la chimie durable et sur les relations étroites qui existent entre l'environnement et les composés organiques, pour évaluer la biodégradabilité de nos molécules.

Le test en bouteille fermée, appelé Closed Bottle Test¹²⁵ (OCDE 301D), est une méthode de base pour étudier la biodégradabilité d'un composé organique. Celui-ci consiste à mesurer la demande biochimique en oxygène (DBO), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes lorsqu'ils métabolisent une substance d'essai. Le principe de la méthode consiste à ensemencer une solution de la substance à analyser ($2\text{-}5\text{ mg.L}^{-1}$) dans un milieu minéral (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , CaCl_2 , MgSO_4 , FeCl_3) avec une population relativement faible de micro-organismes variés (effluent de STEPs). Par la suite,

les solutions sont conservées dans des flacons fermés, totalement remplis, à température constante et à l'abri de la lumière. De ce fait, la substance à analyser constitue la seule source de carbone présente dans le milieu. La dégradation aérobie des molécules est déterminée sur une durée de vingt-huit jours, par la consommation biologique d'oxygène mesurée grâce à un capteur d'oxygène optique.

À ce jour, les premières analyses ont été effectuées sur sept molécules (Figure 46). Cependant, nos collaborateurs en ont conclu qu'aucune ne présentait un caractère biodégradable. Le meilleur pourcentage de biodégradabilité a été obtenu avec la molécule **94** (pourcentage de biodégradation : 4,8%). Les autres molécules sont en cours d'analyses et aucun résultat ne nous a été communiqué.

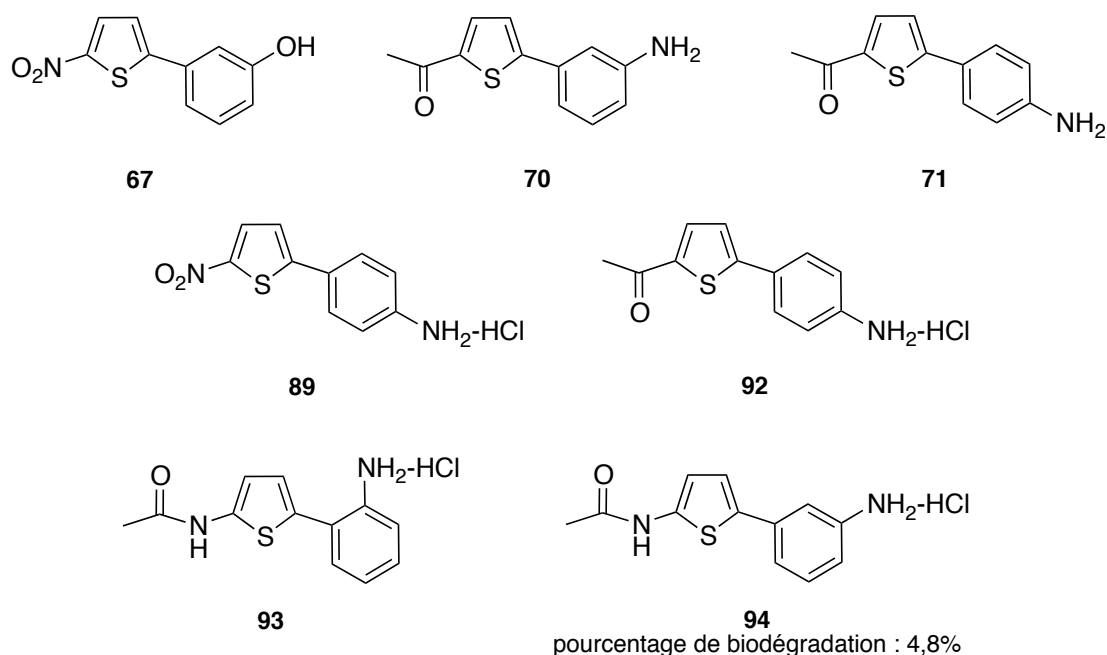


Figure 46. Structure des sept molécules étudiées pour leur caractère biodégradable.

Une étude menée par la même équipe s'est intéressée à évaluer la biodégradabilité de dix-huit antibiotiques (β -lactames, tétracyclines, quinolones, glycopeptides...), avec cette méthode des tests en bouteilles fermées. Sur tous les antibiotiques étudiés, aucun ne s'est montré facilement biodégradable et seule la benzylpénicilline montrait un pourcentage de biodégradation de 27% en l'espace de vingt-huit jours¹²⁶.

7.5.3. Production de nouvelles molécules biodégradables

Avec la découverte de cette pollution environnementale, de nouvelles législations ont vu le jour visant à prévenir celle-ci. Cependant, la constante amélioration des instruments d'analyse a permis de mettre en évidence que ceux-ci étaient toujours omniprésents, même à de très faibles concentrations (ng.L^{-1}). En se basant sur les principes de la chimie verte, le concept de biodégradabilité devrait être pris en compte pour la conception de nouvelles molécules résultant d'une prise de conscience du cycle de vie complet des produits pharmaceutiques¹²⁷.

Par ailleurs, certaines fonctions chimiques sont connues pour avoir un caractère plus respectueux que d'autres, d'un point de vue environnemental. Ainsi, ces diverses connaissances pourraient être exploitées de manière positive pour diminuer l'impact sur l'environnement d'un composé pharmaceutique tout en conservant ses propriétés médicales (Tableau 8).

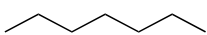
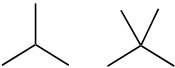
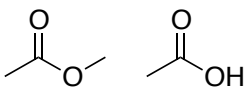
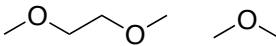
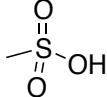
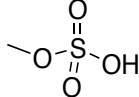
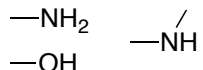
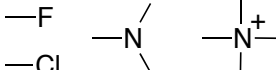
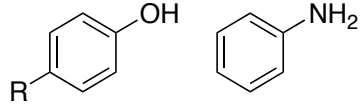
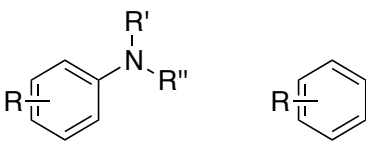
Fonctions préférables	Fonctions moins préférables
	
	
	
	
	

Tableau 8. Différentes fonctions chimiques et leur impact environnemental.

Il est possible d'illustrer ce propos avec le cas de deux anticancéreux : l'ifosfamide et la glufosfamide (Figure 47). Le premier n'est pas du tout biodégradable, alors que le deuxième, grâce à l'apport d'un sucre dans sa structure, présente une nette amélioration au niveau de la biodégradabilité. De plus, les effets secondaires sont considérablement réduits pour le glufosfamide qui présente une meilleure absorption dans l'intestin¹²⁷.

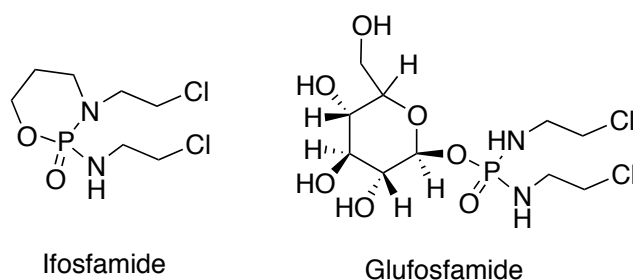


Figure 47. Structure de l'ifosfamide et du glufosfamide.

Pour conclure, les médicaments sont une richesse inestimable pour la population mondiale car ceux-ci apportent une contribution majeure à l'amélioration de la qualité de vie. Cependant, une contamination environnementale a été détectée dans les années 1970 et celle-ci n'est toujours pas enrayée. De ce fait, la conception de nouveaux composés pharmaceutiques biodégradables est envisageable, permettant ainsi la diminution de potentiels risques pour l'environnement et pour les hommes.

8. Conclusion et perspectives de recherche

Notre approche rationnelle a consisté à développer une série de vingt-quatre potentiels inhibiteurs d'une histidine kinase essentielle pour les bactéries (WalK), en se basant sur les points communs et les différences du site de liaison à l'ATP chez les membres de la superfamille GHKL. Cette démarche novatrice a permis de définir un chef de file : le composé **66**, présentant une inhibition sélective de trois histidine kinases (Tableau 5), n'affectant pas les sérine, thréonine, tyrosine kinases et ne montrant pas d'activité hémolytique. De plus, celui-ci a montré qu'il pouvait être utilisé en tant qu'adjuvant, permettant de restaurer la sensibilité de plusieurs souches bactériennes à des antibiotiques auxquels elles étaient résistantes auparavant.

Par la suite, afin d'améliorer l'activité biologique du composé **66**, de nombreuses hypothèses peuvent être envisagées :

- un premier axe de recherche pourrait s'orienter autour de l'hétérocycle et du cycle benzénique. Ce type de structures a été privilégié pour son accessibilité d'un point de vue chimique et économique. Ainsi, la modification successive de l'un ou de l'autre tout en conservant les substituants nitro et alcool, pourrait nous orienter vers la meilleure combinaison possible (Figure 48).

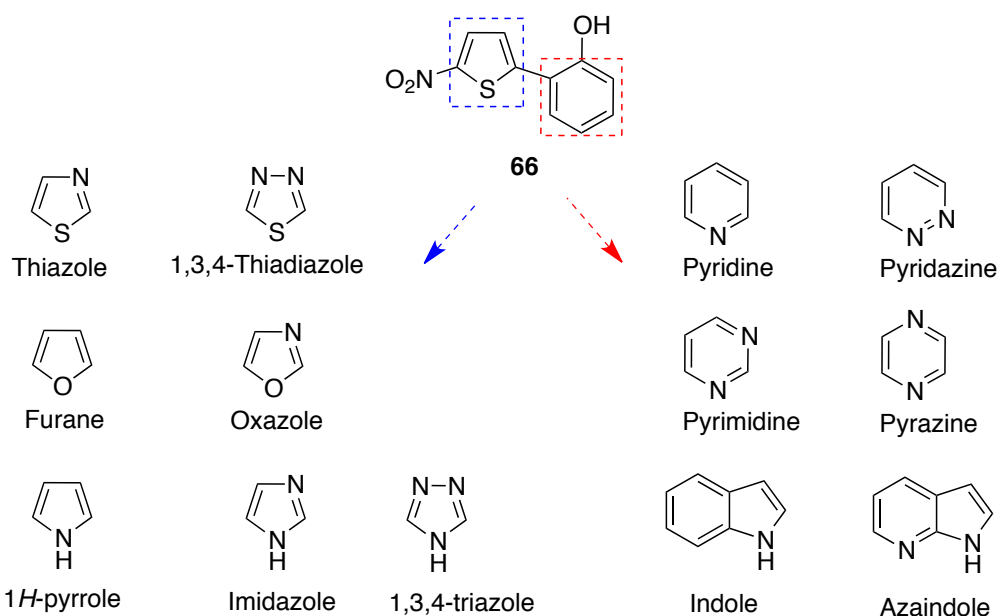


Figure 48. Modifications possibles du cycle thiophénique et du cycle benzénique du composé 66 pour la préparation de dérivés originaux.

- une autre approche réside dans la substitution du cycle phénol par divers substituants. Précédemment, nous avons vu que les composés **66** et **67** présentaient de loin les meilleures activités biologiques. Ainsi, l'incorporation d'un motif catéchol est envisageable pour espérer obtenir un effet synergique des substituants en positions ortho et méta (Figure 49).

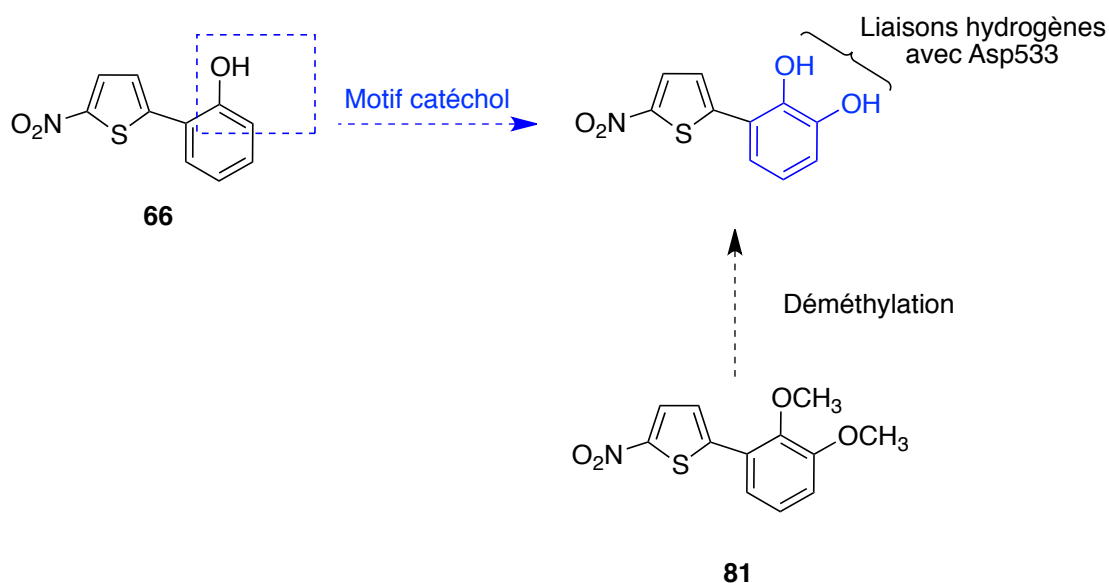


Figure 49. Possibilité d'incorporation d'un motif catéchol.

Pour obtenir ce dérivé polysubstitué, diverses tentatives de déméthylation du composé **81** ont été envisagées mais celles-ci se sont soldées par un échec^{128,129} (Tableau 9). Par la suite, l'utilisation d'autres réactifs comme l'éthanethiolate de sodium ou encore l'acide bromhydrique sera envisagée pour espérer conduire au produit désiré¹³⁰.

Entrée	Réactifs	Qualité du réactifs	Solvant de la réaction	T (°C)
1	BBr ₃	99%	CH ₂ Cl ₂ anhydre	-78°C
2	BBr ₃	1M dans le CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ anhydre	-12°C
3	BBr ₃	1M dans le CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ anhydre	-78°C

Tableau 9. Conditions opératoires pour la tentative de déméthylation du composé 81.

- dans une dernière approche, la modification de l'espaceur chimique entre le cycle thiophénique et le dérivé benzénique pourrait présenter un intérêt. La poche de liaison de l'ATP chez les histidine kinases s'apparente à une boucle flexible. Ainsi, l'augmentation de la distance entre les deux cycles aromatiques augmenterait le degré de liberté de la molécule et permettrait à l'inhibiteur de présenter une meilleure affinité pour le site actif de l'histidine kinase (Figure 50).

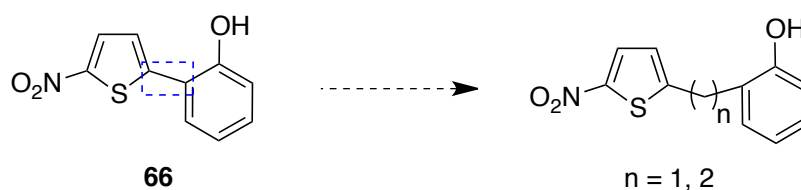


Figure 50. Modification de la taille de l'espaceur entre le cycle thiophénique et le cycle benzénique du composé 66.

Partie expérimentale

Généralités

** Purification des solvants :*

- Le THF et l'éther diéthylique sont distillés sur sodium et benzophénone sous atmosphère d'azote.
- Le dichlorométhane est distillé sur pentoxyde de phosphore sous atmosphère d'azote.
- Le toluène est distillé sur hydruure de calcium sous atmosphère d'azote.
- Les solvants distillés sont conservés sous atmosphère d'azote et stockés sur tamis moléculaire (3Å).
- L'éther de pétrole utilisé a un point d'ébullition compris entre 40 et 60°C.

** Chromatographie :*

- Les réactions sont suivies par chromatographie sur couches minces (CCM). Les plaques d'aluminium sont recouvertes de gel de silice de type Merck 60F₂₅₄ (0,20 mm d'épaisseur). Les plaques CCM sont révélées par une solution de ninhydrine (0,3g de ninhydrine dans un mélange butanol/acide acétique : 97/3, v/v).
- Les purifications par chromatographie flash sont réalisées sur un appareil de type : Grace Reveleris X2. Les colonnes utilisées sont prépacktées avec de la silice 20 µm ou 40 µm.
- Les purifications par colonnes ouvertes sont réalisées sur gel de silice 40-63 µm.
- Les chromatographies liquides à haute performance (HPLC) ont été réalisées sur un appareil de type Waters Alliance 2795 avec les conditions suivantes : colonne Thermo Hypersil C18 (3 µm, 50 mm L x 2.1 mm ID) ; température de colonne : 20°C ; débit : 0,2 mL/min ; détecteur à barrettes de diode : 210-400 nm ; la phase mobile est un gradient constitué d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), chacune contenant 0,1% acide trifluoroacétique).

Temps (minutes)	Débit (mL/minute)	% (Solvant A)	% (Solvant B)
0	0,2	100	0
20	0,2	20	80
25	0,2	20	80
26	0,2	0	100
30	0,2	100	0
35	0,2	100	0

- Les chromatographies liquides ultra performance (UPLC) ont été réalisées par le laboratoire de Mesures Physiques de l'Université de Montpellier (ex-UM2), sur un appareil de type Waters Acquity H-Class avec les conditions suivantes : colonne Waters Acquity BEH C18 (1.7 μ m, 50 mm x 2.1 mm) ; température de colonne : 25°C ; débit : 0,5 mL/min ; détecteur à barrettes de diode : TUV – 214nm ; la phase mobile est un gradient constitué d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), chacune contenant 0,1% acide formique.

Temps (minutes)	Débit (mL/minute)	% (Solvant A)	% (Solvant B)
0	0,5	100	0
3	0,5	0	100
3,5	0,5	0	100
3,6	0,5	100	0
5	0,5	100	0

** Mesures physiques :*

- Les points de fusion (non corrigés) sont déterminés en tube capillaire sur un appareil Stuart Scientific SMP10.
- Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un appareil JASCO P-2000 à une longueur d'onde de 589 nm et à une température fixe de 20°C.

- Les mesures d'excès énantiomériques et les ratios diastéréoisomériques ont été réalisées par l'équipe Chirosciences de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille. Les analyses ont été effectuées par chromatographies (HPLC) chirales sur un appareil Agilent 1260 Infinity unit. Les colonnes utilisées (250 mm x 4,6 mm) sont: Lux-Cellulose-2 (Phenomenex) ; Lux-Cellulose-4 (Phenomenex) ; Chiralpak IC (Chiral Technologies Europe) ; Chiralpak AZ-H (Chiral Technologies Europe).
- Les analyses élémentaires et HRMS ont été réalisées par le laboratoire de Mesures Physiques de l'Université de Montpellier (ex-UM2).

** Méthodes spectrométriques :*

- Les spectres RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Avance 300 (300 MHz). Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en parties par million (ppm) par rapport au TMS avec le pic du solvant non deutéré en RMN ^1H (7,26 ppm pour le CHCl_3 et 2,50 ppm pour le DMSO) et avec le pic du solvant deutéré en RMN ^{13}C (77,16 ppm pour le CDCl_3 et 39,52 pour le $\text{DMSO}-d_6$) comme référence interne. Les constantes de couplages (J) sont exprimées en hertz (Hz).

- La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes :

s = singulet	br s = singulet élargi	d = doublet
t = triplet	q = quadruplet	m = massif peu résolu
dd = doublet de doublet	td = doublet de triplet	ddd = doublet de doublet dédoublé

- Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un appareil JASCO FT/IR-410. Les nombres d'ondes ($\bar{\nu}$) sont exprimés en cm^{-1} . Seuls les pics significatifs sont référencés.

Description des méthodes générales utilisées

Méthode A : Couplage de Suzuki-Miyaura

À une solution de thiophène (2,30 mmol) et d'acide boronique (2,30 mmol) dans un mélange toluène/éthanol (16 mL ; 2,3/1 ; v/v) sont ajoutés du $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (5 mol%) et 4,5 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2M.

Le mélange réactionnel est placé à 90°C pendant 16h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 60 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode B : Couplage de Suzuki-Miyaura

À une solution de thiophène (2,90 mmol) et d'acide boronique (2,90 mmol) dans un mélange 1,4-dioxane/eau (22 mL ; 1/1 ; v/v) sont ajoutés du $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (5 mol%) et du carbonate de potassium (11,60 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 80°C pendant 6h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 60 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide.

Méthode C : Couplage de Suzuki-Miyaura

À une solution de **54** (1,82 mmol) et d'acide boronique (3,64 mmol) dans le diméthylformamide (14 mL) sont ajoutés du $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10 mol%) et 3,7 mL d'une solution de carbonate de potassium à 2M.

Le mélange réactionnel est placé à 70°C pendant 1h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 60 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec

de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (8*40 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode D : Couplage de Suzuki-Miyaura

À une solution de **54** (4,54 mmol) et d'acide boronique (9,08 mmol) dans le diméthylformamide (34 mL) sont ajoutés du PdCl₂(PPh₃)₂ (10 mol%) et du carbonate de césium (18,20 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 80°C pendant 3h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 80 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*80 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (12*50 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode E : N-Alkylation du synthon aniline

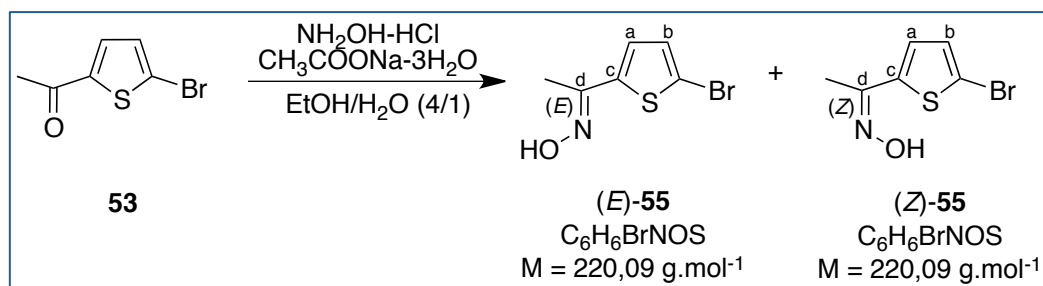
Dans un tube scellé, une solution de **63-65** (2,72 mmol) et de 2-iodoéthanol (27,2 mmol) est portée à 90°C pendant 3h sous atmosphère d'azote. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (2M, 3*30 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (3*30 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrée et concentrée sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode F : Synthèse de chlorhydrates

À une solution de **63, 65, 70, 71, 75, 76** ou **77** (2,11 mmol) dans 10 mL de THF à 0°C est ajouté 10 mL d'acide chlorhydrique concentré (37%, c = 12 mol.L⁻¹) au goutte à goutte. La formation du chlorhydrate est observée dès les premières gouttes. À la fin de l'addition, la solution est laissée sous agitation pendant 20 minutes à 0°C. Après retour à température

ambiante, le mélange réactionnel est filtré sur fritté de porosité 4. Le solide obtenu est lavé avec du pentane froid (-20°C , $3 \times 20 \text{ mL}$).

(E) et (Z)-1-(5-bromothiophèn-2-yl)éthanone oxime ((E)-55 et (Z)-55)



À une solution de 2-acétyl-5-bromothiophène (4,00 g ; 19,5 mmol) et de chlorhydrate d'hydroxylamine (1,63 g ; 23,4 mmol) dans un mélange éthanol/eau (55 mL ; 4/1 ; v/v), est ajouté de l'acétate de sodium trihydraté (3,18 g ; 23,4 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 90°C pendant 3h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par colonne ouverte de silice (40-63 μm) en éluant par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (98/2) pour obtenir l'isomère (E)-55. Par la suite, l'utilisation d'un éluant plus polaire : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (80/20) permet d'isoler l'isomère (Z)-55.

(E)-55 :

Solide blanc

$R_f = 0,35$ (dichlorométhane)

Rendement = 54%

Mp: 134-136°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,12 (s, 3H, CH_3) ; 7,16 (d, 1H, H_a , $J = 4,0$ Hz) ; 7,18 (d, 1H, H_b , $J = 4,0$ Hz) ; 11,34 (s, 1H, N-OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 11,2 (CH_3) ; 112,4 (C-Br) ; 126,9 (CH_a) ; 130,6 (CH_b) ; 142,6 (C_c) ; 149,3 (C_d).

IR (cm^{-1}): 3233 (ν_{OH}), 1428 ($\nu_{\text{C=N}}$), 781 ($\nu_{\text{C-Br}}$)

(Z)-55 :

Solide blanc

$R_f = 0,06$ (dichlorométhane)

Rendement = 45%

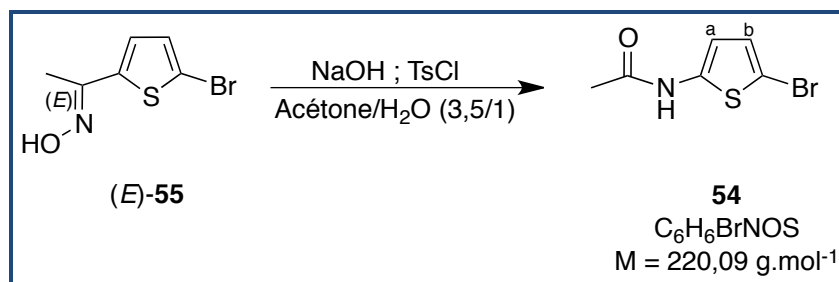
Mp: 175-177°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,23 (s, 3H, CH_3) ; 7,27 (d, 1H, H_a , $J = 4,1$ Hz) ; 7,31 (d, 1H, H_b , $J = 4,1$ Hz) ; 11,89 (s, 1H, N-OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 18,4 (CH_3) ; 117,4 (C-Br) ; 128,6 (CH_a) ; 129,1 (CH_b) ; 133,1 (C_c) ; 144,9 (C_d).

IR (cm^{-1}): 1411 ($\bar{\nu}_{\text{C=N}}$), 791 ($\bar{\nu}_{\text{C-Br}}$) (Le spectre IR ne montre pas de bande d'absorption pour la fonction -OH en accord avec la littérature¹³¹).

2-(*N*-acétyl)-5-bromothiophène (**54**)



À une solution de (*E*)-**55** (2,33 g ; 10,6 mmol) et de chlorure de tosyle (2,23 g ; 11,7 mmol) dans un mélange acétone/eau (54 mL ; 3,5/1 ; v/v) à 0°C, est ajouté de l'hydroxyde de sodium (0,47 g ; 11,7 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 60°C pendant 1,5h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est solubilisé dans 150 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau (3*40 mL), une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (3*40 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (3*40 mL), séchée sur sulfate de magnésium anhydre, filtrée et concentrée sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide gris clair

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 6/4)

Rendement = 88%

Mp: 135-137°C

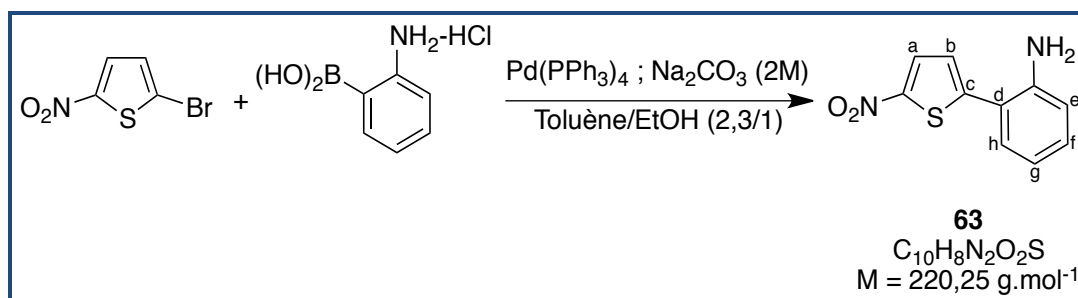
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,06 (s, 3H, CH_3) ; 6,41 (d, 1H, H_a , $J = 4,1\text{Hz}$) ; 6,94 (d, 1H, H_b , $J = 4,1\text{Hz}$) ; 11,40 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,2 (CH_3) ; 102,4 (C-Br) ; 109,8 (CH_a) ; 126,6 (CH_b) ; 140,4 (C-N) ; 166,7 (CO).

IR (cm^{-1}): 3242, 3202 (ν_{NH}), 1562 ($\nu_{\text{C=O}}$), 781 ($\nu_{\text{C-Br}}$).

2-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (63)

Selon la méthode A :



Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide rouge

$R_f = 0,30$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 30%

Mp: 101-103°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 5,47 (s, 2H, NH_2) ; 6,68 (t, 1H, H_e , $J = 7,5\text{Hz}$) ; 6,86 (d, 1H, H_g , $J = 8,1\text{Hz}$) ; 7,16 (t, 1H, H_f , $J = 7,7\text{Hz}$) ; 7,33 (d, 1H, H_h , $J = 7,7\text{Hz}$) ; 7,42 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 8,15 (d, 1H, H_b , $J = 4,4\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 116,5 (C_d) ; 117,1 (CH_e) ; 117,4 (CH_g) ; 125,7 (CH_b) ; 130,0 (CH_f) ; 130,8 (CH_h) ; 130,9 (CH_a) ; 146,4 ($C-NH_2$) ; 148,5 (C_c) ; 150,7 ($C-NO_2$).

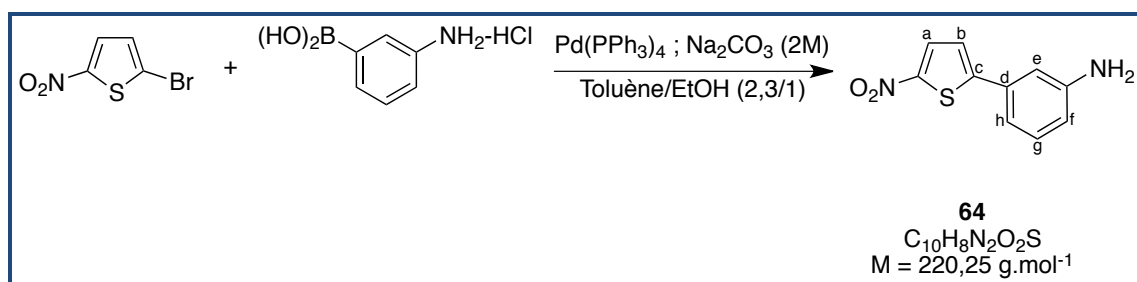
IR (cm^{-1}): 3434, 3356 (ν_{NH_2}).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{10}H_9N_2O_2S$, 221,0385 ; trouvée, 221,0384.

HPLC : $t_R = 14,84 \text{ min}$; pureté : 100%.

3-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (64)

Selon la méthode A :



Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide orange

$R_f = 0,24$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 60%

Mp: $127-129^{\circ}\text{C}$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 5,40 (s, 2H, NH_2) ; 6,65-6,69 (m, 1H, H_f) ; 6,93-6,96 (m, 2H, H_e et H_h) ; 7,11-7,16 (m, 1H, H_g) ; 7,49 (d, 1H, H_b , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 8,12 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 110,8 (CH_e) ; 113,7 (CH_h) ; 116,0 (CH_f) ; 123,2 (CH_b) ; 130,1 (CH_g) ; 131,4 (CH_a) ; 132,0 (C_d) ; 148,6 (C_c) ; 149,6 (C-NH_2) ; 152,9 (C-NO_2).

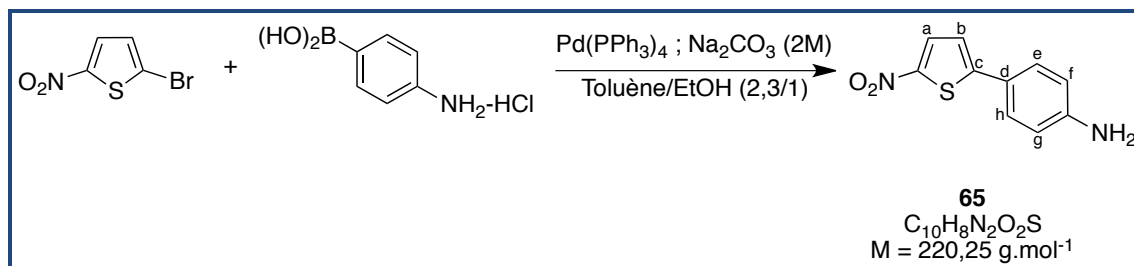
IR (cm^{-1}): 3439, 3342 (ν_{NH_2}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 221,0385 ; trouvée, 221,0384.

HPLC : $t_R = 11,34 \text{ min}$; pureté : 97%.

4-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (65)

Selon la méthode A :



Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide rouge

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 66%

Mp: 208-210°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 5,92 (s, 2H, NH_2) ; 6,62 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 7,36 (d, 1H, H_b , $J = 4,5\text{Hz}$) ; 7,52 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 8,06 (d, 1H, H_a , $J = 4,5\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 113,9 (CH_g et CH_f) ; 118,5 (C_d) ; 120,3 (CH_b) ; 127,8 (CH_h et CH_e) ; 132,1 (CH_a) ; 145,8 (C_c) ; 151,6 ($C-NH_2$) ; 154,9 ($C-NO_2$).

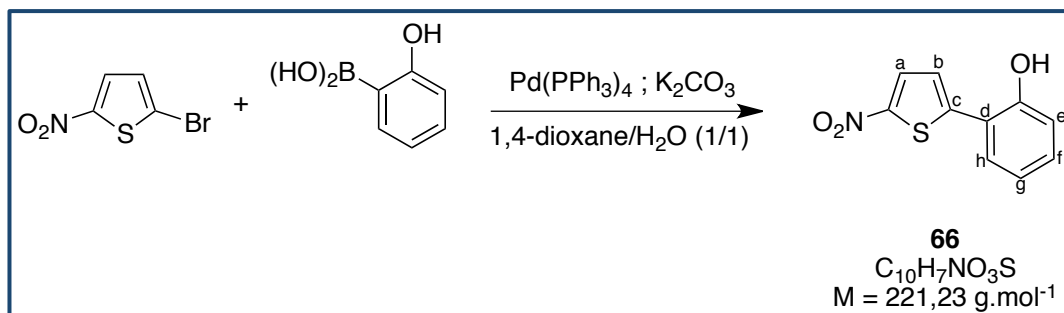
IR (cm^{-1}): 3464, 3371 (ν_{NH_2}).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{10}H_9N_2O_2S$, 221,0385 ; trouvée, 221,0386.

HPLC : $t_R = 12,20 \text{ min}$; pureté : 96%.

2-(5-nitrothiophèn-2-yl)phénol (66)

Selon la méthode B :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange CH_2Cl_2 /cyclohexane. Le produit désiré est solubilisé dans le dichlorométhane (100 mL). La phase organique est lavée avec une solution de soude (6M, 5*30 mL). Les phases aqueuses sont regroupées, mises sous agitation à 0°C et acidifiées par ajout au goutte à goutte d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (4M), jusqu'à obtenir un pH d'environ 2-3. La phase aqueuse acidifiée est extraite au dichlorométhane (4*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (1*50 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (1*50 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide.

Solide orange

$R_f = 0,20$ (CH_2Cl_2)

Rendement = 42%

Mp: 176-178°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 6,95 (t, 1H, H_e , $J = 7,6\text{Hz}$) ; 7,04 (d, 1H, H_g , $J = 8,0\text{Hz}$) ; 7,28-7,33 (m, 1H, H_f) ; 7,77 (d, 1H, H_b , $J = 4,6\text{Hz}$) ; 7,95 (dd, 1H, H_h , $J_1 = 8,0\text{Hz}$, $J_2 = 1,1\text{Hz}$) ; 8,12 (d, 1H, H_a , $J = 4,6\text{Hz}$) ; 11,32 (br s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 116,5 (CH_g) ; 118,4 (C_d) ; 119,9 (CH_e) ; 123,3 (CH_b) ; 127,5 (CH_h) ; 129,5 (CH_a) ; 131,2 (CH_f) ; 147,3 (C_c) ; 149,4 (C-NO_2) ; 154,5 (C-OH).

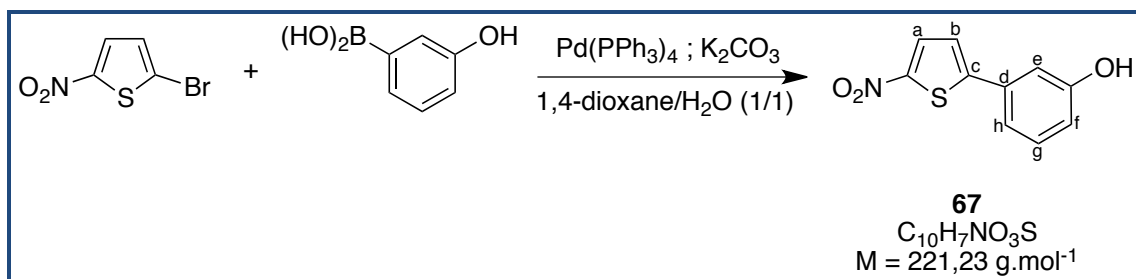
IR (cm^{-1}): 3433 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$, 222,0225 ; trouvée, 222,0226.

UPLC : $t_R = 2,68 \text{ min}$; pureté : 98%.

3-(5-nitrothiophèn-2-yl)phénol (67)

Selon la méthode B :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange CH_2Cl_2 /cyclohexane. Le produit désiré est solubilisé dans le dichlorométhane (100 mL). La phase organique est lavée avec une solution de soude (6M, 5*30 mL). Les phases aqueuses sont regroupées, mises sous agitation à 0°C et acidifiées par ajout au goutte à goutte d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (4M), jusqu'à obtenir un pH d'environ 2-3. La phase aqueuse acidifiée est extraite au dichlorométhane (4*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (1*50 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (1*50 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide.

Solide marron

$R_f = 0,15$ (CH_2Cl_2)

Rendement = 42%

Mp: 182-184°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 6,88-6,91 (m, 1H, H_f) ; 7,14-7,16 (m, 1H, H_e) ; 7,23-7,33 (m, 2H, H_g et H_h) ; 7,60 (d, 1H, H_b , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 8,15 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 9,89 (br s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 112,7 (CH_e) ; 117,1 (CH_h) ; 117,5 (CH_f) ; 123,9 (CH_b) ; 130,7 (CH_g) ; 131,4 (CH_a) ; 132,7 (C_d) ; 149,1 (C_c) ; 151,7 (C- NO_2) ; 158,2 (C-OH).

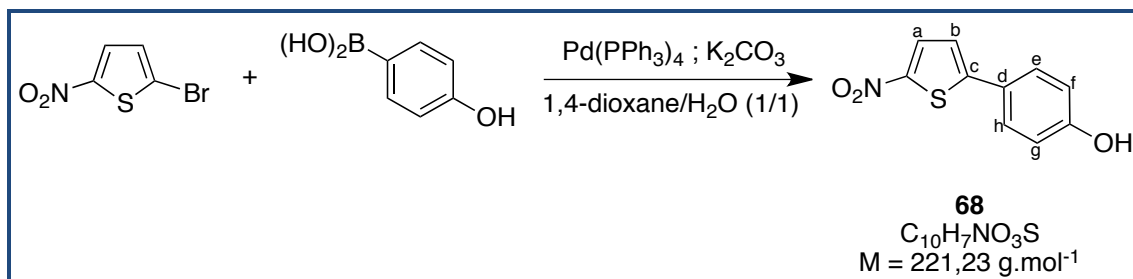
IR (cm^{-1}): 3414 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{10}H_8NO_3S$, 222,0225 ; trouvée, 222,0223.

UPLC : $t_R = 2,63$ min ; pureté : 98%.

4-(5-nitrothiophèn-2-yl)phénol (68)

Selon la méthode A :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange CH_2Cl_2 /cyclohexane. Le produit désiré est solubilisé dans le dichlorométhane (100 mL). La phase organique est lavée avec une solution de soude (6M, 5*30 mL). Les phases aqueuses sont regroupées, mises sous agitation à 0°C et acidifiées par ajout au goutte à goutte d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (4M), jusqu'à obtenir un pH d'environ 2-3. La phase aqueuse acidifiée est extraite au dichlorométhane (4*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (1*50 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (1*50 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide.

Solide rouge

$R_f = 0,34$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 51%

Mp: 235-237°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 6,87 (d, 2H, H_f et H_g , $J = 8,7\text{Hz}$) ; 7,49 (d, 1H, H_b , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 7,68 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,7\text{Hz}$) ; 8,11 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 10,19 (br s, 1H, OH).
 RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 116,3 (CH_f et CH_g) ; 122,1 (CH_b) ; 122,5 (C_d) ; 128,1 (CH_h et CH_e) ; 131,7 (CH_a) ; 147,6 (C_c) ; 152,9 ($C-NO_2$) ; 159,8 ($C-OH$).

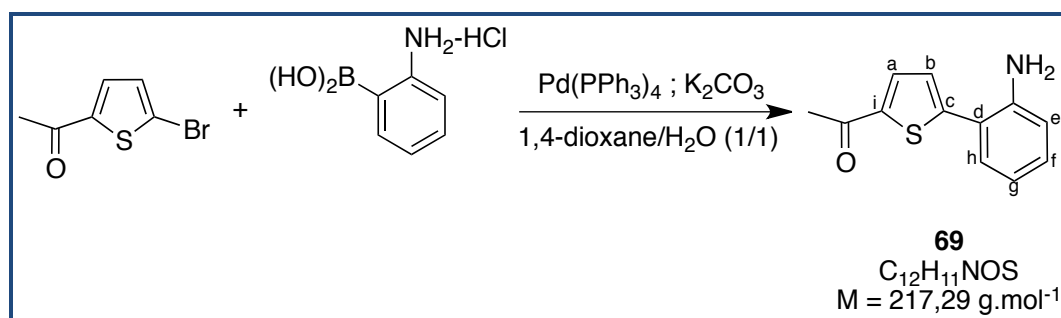
IR (cm^{-1}): 3342 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{10}H_8NO_3S$, 222,0225 ; trouvée, 222,0221.

UPLC : $t_R = 2,60 \text{ min}$; pureté : 99%.

1-(5-(2-aminophényl)thiophène-2-yl)éthanone (69)

Selon la méthode A :



Solide jaune

$R_f = 0,41$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 56%

Mp: 127-129°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,54 (s, 3H, CH_3) ; 5,27 (s, 2H, NH_2) ; 6,64 (td, 1H, H_e , $J_1 = 7,7\text{Hz}$, $J_2 = 1,1\text{Hz}$) ; 6,82 (dd, 1H, H_g , $J_1 = 8,1\text{Hz}$, $J_2 = 0,9\text{Hz}$) ; 7,08-7,13 (m, 1H, H_f), 7.23 (dd, 1H, H_h , $J_1 = 7,7\text{Hz}$, $J_2 = 1,4\text{Hz}$) ; 7,38 (d, 1H, H_b , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 7,93 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,4 (CH_3) ; 116,3 (CH_g) ; 116,9 (CH_e) ; 117,3 (C_d) ; 126,6 (CH_b) ; 129,8 (CH_h) ; 130,0 (CH_f) ; 134,7 (CH_a) ; 142,0 (C_c) ; 145,7 (C- NH_2) ; 150,2 (C_i) ; 190,5 (CO).

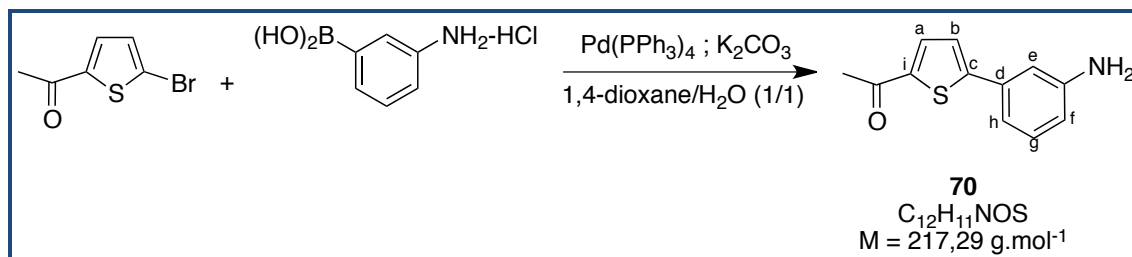
IR (cm^{-1}): 3401, 3333 (ν_{NH_2}), 1633 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NOS$, 218,0640 ; trouvée, 218,0632.

HPLC : $t_R = 2,50 \text{ min}$; pureté : 100%.

1-(5-(3-aminophényl)thiophène-2-yl)éthanone (70)

Selon la méthode A :



Solide jaune pâle

$R_f = 0,30$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 77%

Mp: 155-157°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,52 (s, 3H, CH_3) ; 5,31 (s, 2H, NH_2) ; 6,59 (d, 1H, H_f , $J = 7,2 \text{ Hz}$) ; 6,88-6,91 (m, 2H, H_e et H_h) ; 7,09 (t, 1H, H_g , $J = 7,7 \text{ Hz}$) ; 7,46 (d, 1H, H_b , $J = 4,0 \text{ Hz}$) ; 7,90 (d, 1H, H_a , $J = 4,0 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,3 (CH_3) ; 110,9 (CH_e) ; 113,5 (CH_f) ; 114,9 (CH_h) ; 124,2 (CH_b) ; 129,8 (CH_g) ; 133,2 (C_d) ; 135,1 (CH_a) ; 142,0 (C_c) ; 149,4 ($C-NH_2$) ; 152,7 (C_i) ; 190,5 (CO).

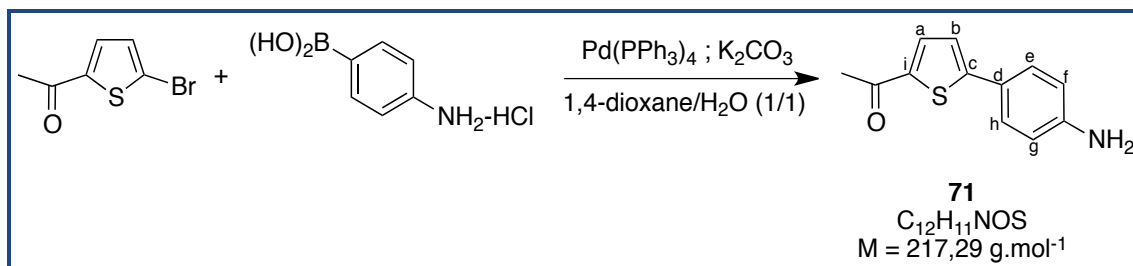
IR (cm^{-1}): 3372, 3218 (ν_{NH_2}), 1642 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NOS$, 218,0640 ; trouvée, 218,0641.

HPLC : $t_R = 9,97 \text{ min}$; pureté : 97%.

1-(5-(4-aminophényl)thiophène-2-yl)éthanone (71)

Selon la méthode A :



Solide jaune foncé

$R_f = 0,25$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 41%

Mp: 174-176°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,48 (s, 3H, CH_3) ; 5,62 (s, 2H, NH_2) ; 6,60 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 7,33 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,44 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 7,83 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,1 (CH_3) ; 113,9 (CH_g et CH_f) ; 120,1 (C_d) ; 121,5 (CH_b) ; 127,2 (CH_h et CH_e) ; 135,5 (CH_a) ; 139,7 (C_c) ; 150,3 (C_i) ; 153,9 ($C-NH_2$) ; 190,0 (CO).

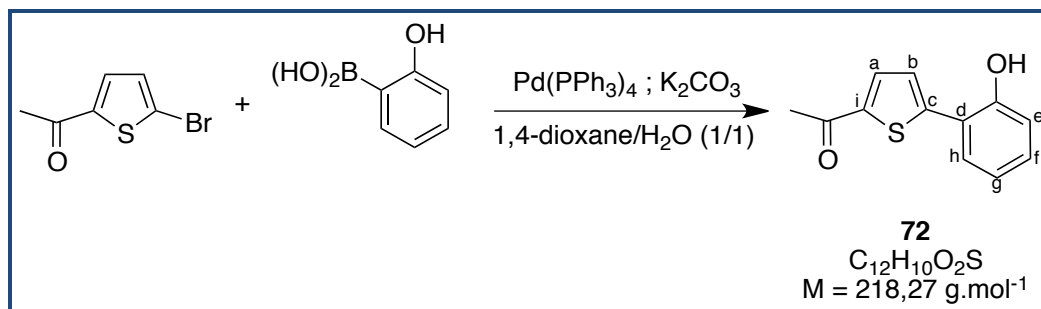
IR (cm^{-1}): 3327, 3234 (ν_{NH_2}), 1626 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NOS$, 218,0640 ; trouvée, 218,0640.

HPLC : $t_R = 10,18 \text{ min}$; pureté : 97%.

1-(5-(2-hydroxyphényl)thiophèn-2-yl)éthanone (72)

Selon la méthode B :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP. Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide beige

R_f = 0,50 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 65%

Mp: 211-213°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 2,52 (s, 3H, CH₃) ; 6,90 (t, 1H, H_e, *J* = 7,5Hz) ; 6,99 (d, 1H, H_g, *J* = 7,9Hz) ; 7,19-7,25 (m, 1H, H_f) ; 7,71 (d, 1H, H_b, *J* = 4,1Hz) ; 7,77 (dd, 1H, H_h, *J*₁ = 7,8Hz, *J*₂ = 1,2Hz) ; 7,88 (d, 1H, H_a, *J* = 4,1Hz) ; 10,66 (br s, 1H, OH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 26,5 (CH₃) ; 116,5 (CH_e) ; 119,5 (C_d) ; 119,6 (CH_g) ; 125,4 (CH_b) ; 127,9 (CH_h) ; 130,0 (CH_f) ; 133,6 (CH_a) ; 142,2 (C_c) ; 147,7 (C_i) ; 154,2 (C-OH) ; 190,9 (CO).

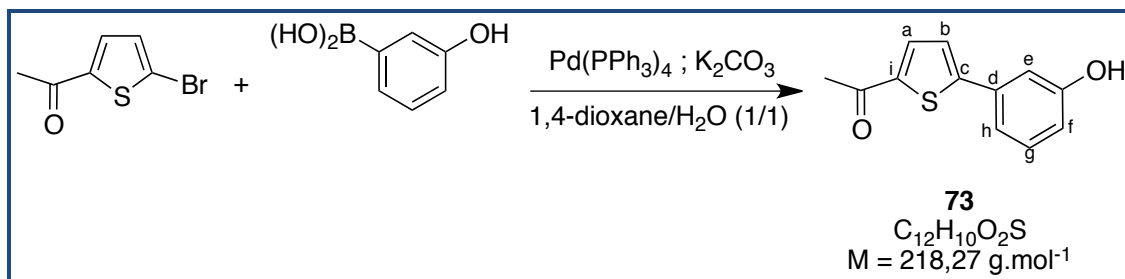
IR (cm⁻¹): 3168 (ν_{OH}), 1614 (ν_{C=O}).

HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₂H₁₁O₂S, 219,0480 ; trouvée, 219,0480.

UPLC : t_R = 2,45 min ; pureté : 99%.

1-(5-(3-hydroxyphényl)thiophèn-2-yl)éthanone (73)

Selon la méthode B :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP. Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide jaune pâle

$R_f = 0,50$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 50%

Mp: $172-174^{\circ}\text{C}$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,53 (s, 3H, CH_3) ; 6,80-6,83 (m, 1H) ; 7,11 (t, 1H, $J = 2,0\text{Hz}$) ; 7,18-7,29 (m, 2H) ; 7,56 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,92 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 9,75 (br s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,4 (CH_3) ; 112,6 (CH_e) ; 116,3 (CH_f) ; 116,9 (CH_h) ; 124,9 (CH_b) ; 130,4 (CH_g) ; 133,9 (C_d) ; 135,1 (CH_a) ; 142,5 (C_c) ; 151,6 (C_i) ; 158,0 (C-OH) ; 190,6 (CO).

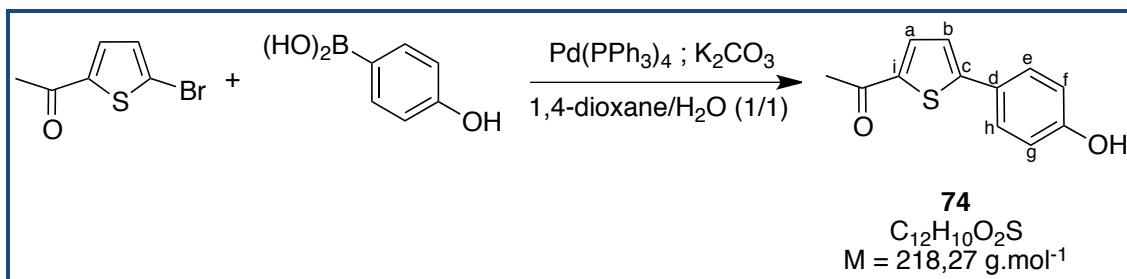
IR (cm^{-1}): 3251 (ν_{OH}), 1619 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{S}$, 219,0480 ; trouvée, 219,0479.

HPLC : $t_R = 13,51 \text{ min}$; pureté : 100%.

1-(5-(4-hydroxyphényl)thiophèn-2-yl)éthanone (74)

Selon la méthode B :



Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP. Le produit désiré est solubilisé dans une petite quantité d'acétate d'éthyle et 150 mL de pentane froid (-20°C) sont ajoutés à la solution. La solution est filtrée sur fritté (porosité 3) et le solide est lavé avec 20 mL de pentane froid (-20°C).

Solide jaune foncé

$R_f = 0,35$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 40%

Mp: $211\text{-}213^{\circ}\text{C}$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,50 (s, 3H, CH_3) ; 6,83 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 7,44 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,59 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 7,87 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 9,93 (br s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,2 (CH_3) ; 116,0 (CH_g et CH_f) ; 123,1 (CH_b) ; 123,8 (C_d) ; 127,6 (CH_h et CH_e) ; 135,3 (CH_a) ; 141,1 (C_c) ; 152,4 (C_i) ; 158,6 (C-OH) ; 190,3 (CO).

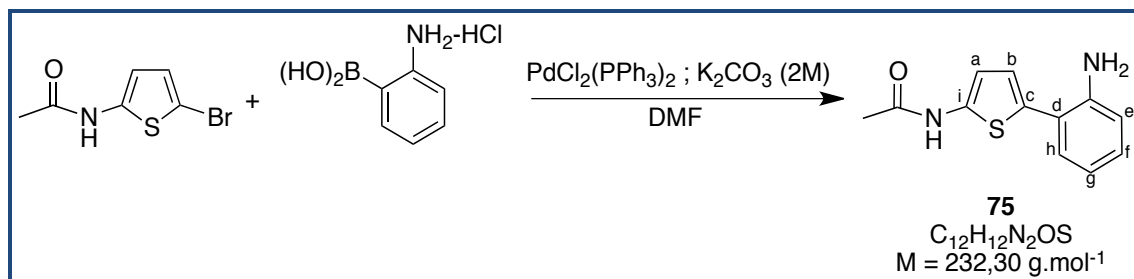
IR (cm^{-1}): 3117 (ν_{OH}), 1600 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{S}$, 219,0480 ; trouvée, 219,0481.

HPLC : $t_R = 13,12 \text{ min}$; pureté : 96%.

***N*-(5-(2-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (75)**

Selon la méthode C :



Solide marron

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 6/4)

Rendement = 52%

Mp: 157-159°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,07 (s, 3H, CH_3) ; 4,98 (s, 2H, NH_2) ; 6,56-6,59 (m, 1H, H_e) ; 6,62 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,75 (dd, 1H, H_g , $J_1 = 8,0\text{Hz}$, $J_2 = 1,0\text{Hz}$) ; 6,94-6,96 (d, 1H, H_b , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,97-7,02 (m, 1H, H_f) ; 7,10 (dd, 1H, H_h , $J_1 = 7,6\text{Hz}$, $J_2 = 1,4\text{Hz}$) ; 11,13 (br s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 110,8 (CH_a) ; 115,6 (CH_g) ; 116,7 (CH_e) ; 118,8 (C_d) ; 122,1 (CH_b) ; 128,0 (CH_f) ; 129,6 (CH_h) ; 131,2 (C_c) ; 139,0 (C_i) ; 145,4 (C-NH_2) ; 166,2 (CO).

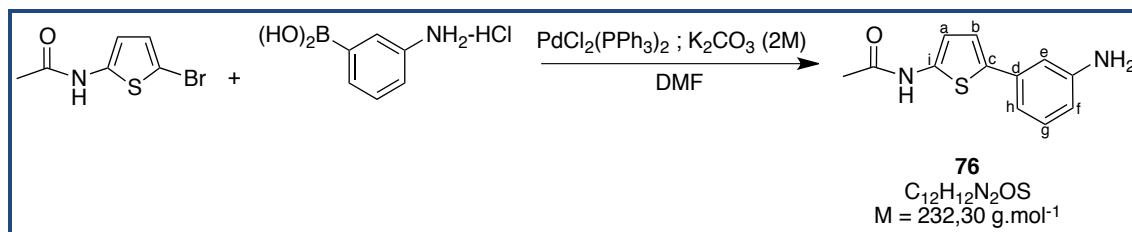
IR (cm^{-1}): 3462, 3370 (ν_{NH_2}), 3234 (ν_{NH}), 1570 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}$, 233,0749 ; trouvée, 233,0745.

HPLC : $t_R = 9,58 \text{ min}$; pureté : 99%.

N-(5-(3-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (76)

Selon la méthode C :



Solide blanc

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7/3)

Rendement = 23%

Mp: 220-222°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,07 (s, 3H, CH_3) ; 5,12 (s, 2H, NH_2) ; 6,42 (dd, 1H, H_f , $J_1 = 7,9\text{Hz}$, $J_2 = 1,1\text{Hz}$) ; 6,57 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,71-6,76 (m, 2H, H_h et H_e) ; 6,99 (m, 1H, H_g , $J = 7,8\text{Hz}$) ; 7,05 (d, 1H, H_b , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 11,14 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 110,0 (CH_e) ; 111,1 (CH_a) ; 112,4 (CH_h) ; 112,5 (CH_f) ; 119,6 (CH_b) ; 129,4 (CH_g) ; 134,1 (C_d) ; 134,8 (C_c) ; 138,9 (C_i) ; 149,1 (C- NH_2), 166,2 (CO).

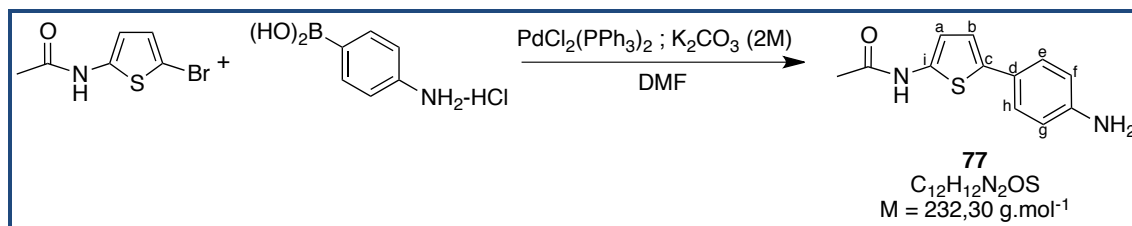
IR (cm^{-1}): 3469, 3372 (ν_{NH_2}), 3274 (ν_{NH}), 1562 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{13}N_2OS$, 233,0749 ; trouvée, 233,0749.

HPLC : $t_R = 9,23 \text{ min}$; pureté : 99%.

***N*-(5-(4-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (77)**

Selon la méthode C :



Solide beige

$R_f = 0,15$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7/3)

Rendement = 66%

Mp: 169-171°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,05 (s, 3H, CH₃) ; 5,57 (s, 2H, NH₂) ; 6,52 (d, 1H, H_a, $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,60 (d, 2H, H_g et H_f, $J = 8,5\text{Hz}$) ; 6,90 (d, 1H, H_b, $J = 3,9\text{Hz}$) ; 7,24 (d, 2H, H_h et H_e, $J = 8,5\text{Hz}$) ; 11,04 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH₃) ; 111,2 (CH_a) ; 114,7 (CH_g et CH_f) ; 117,3 (CH_b) ; 122,9 (C_d) ; 125,6 (CH_h et CH_e) ; 134,7 (C_c) ; 137,3 (C_i) ; 146,8 (C-NH₂) ; 166,0 (CO).

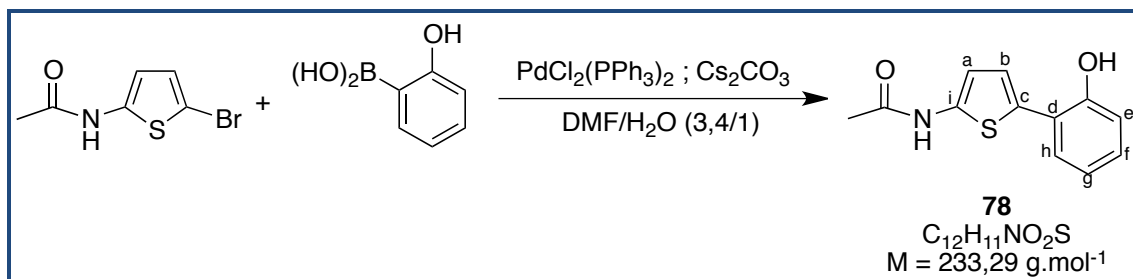
IR (cm⁻¹): 3388, 3321 (ν_{NH_2}), 3181 (ν_{NH}), 1581 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour C₁₂H₁₃N₂OS, 233,0749 ; trouvée, 233,0754.

HPLC : $t_R = 8,07 \text{ min}$; pureté : 100%.

***N*-(5-(2-hydroxyphényl)thiophèn-2-yl)acétamide (78)**

Selon la méthode D :



Solide beige

$R_f = 0,45$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 8/2)

Rendement = 35%

Mp: 205-207°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,06 (s, 3H, CH_3) ; 6,60 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 6,78-6,83 (m, 1H, H_e) ; 6,90 (dd, 1H, H_g , $J_1 = 8,1\text{Hz}$, $J_2 = 1,1\text{Hz}$) ; 7,01-7,06 (m, 1H, H_f) ; 7,31 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,52 (dd, 1H, H_h , $J_1 = 7,8\text{Hz}$, $J_2 = 1,6\text{Hz}$) ; 9,99 (br s, 1H, OH) ; 11,04 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,6 (CH_3) ; 110,4 (CH_a) ; 116,1 (CH_g) ; 119,4 (CH_e) ; 121,3 (C_d) ; 121,7 (CH_b) ; 126,9 (CH_h) ; 127,2 (CH_f) ; 129,9 (C_c) ; 140,0 (C_i) ; 153,0 (C-OH) ; 166,1 (CO).

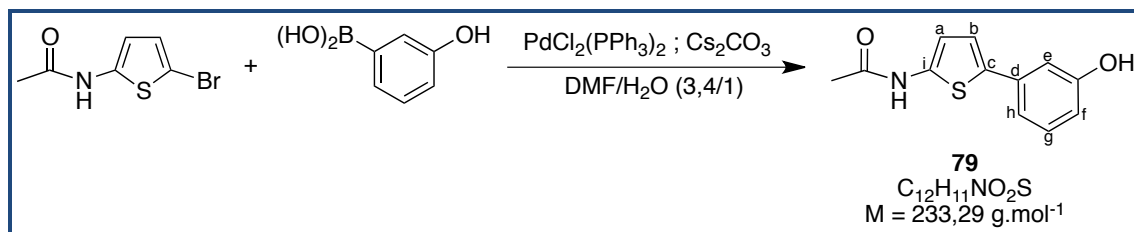
IR (cm^{-1}): 3073 (ν_{OH}), 1563 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NO_2S$, 234,0589 ; trouvée, 234,0588.

HPLC : $t_R = 11,89 \text{ min}$; pureté : 100%.

***N*-(5-(3-hydroxyphényl)thiophène-2-yl)acétamide (79)**

Selon la méthode D :



Solide beige

$R_f = 0,35$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 8/2)

Rendement = 73%

Mp: 144-146°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,07 (s, 3H, CH_3) ; 6,58 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,63 (dd, 1H, H_f , $J_1 = 7,7\text{Hz}$, $J_2 = 2,0\text{Hz}$) ; 6,94 (t, 1H, H_e , $J = 1,9\text{Hz}$) ; 6,99 (d, 1H, H_h , $J = 8,0\text{Hz}$) ; 7,12-7,18 (m, 2H, H_b et H_g) ; 9,46 (br s, 1H, OH) ; 11,20 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 112,2 (CH_a et CH_e) ; 113,7 (CH_f) ; 115,5 (CH_h) ; 120,3 (CH_b) ; 130,0 (CH_g) ; 133,1 (C_d) ; 135,6 (C_c) ; 139,4 (C_i) ; 157,8 (C-OH) ; 166,3 (CO).

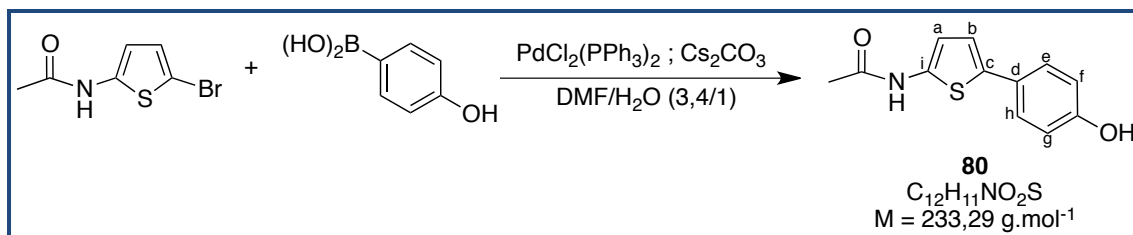
IR (cm^{-1}): 3248 (ν_{OH}), 1576 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NO_2S$, 234,0589 ; trouvée, 234,0590.

HPLC : $t_R = 11,45 \text{ min}$; pureté : 100%.

***N*-(5-(4-hydroxyphényl)thiophèn-2-yl)acétamide (80)**

Selon la méthode D :



Solide violet

$R_f = 0,50$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 9/1)

Rendement = 67%

Mp: 207-209°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,06 (s, 3H, CH_3) ; 6,54 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 6,76 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 6,99 (d, 1H, H_b , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 7,35 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 9,49 (br s, 1H, OH) ; 11,09 (br s, 1H, NH).

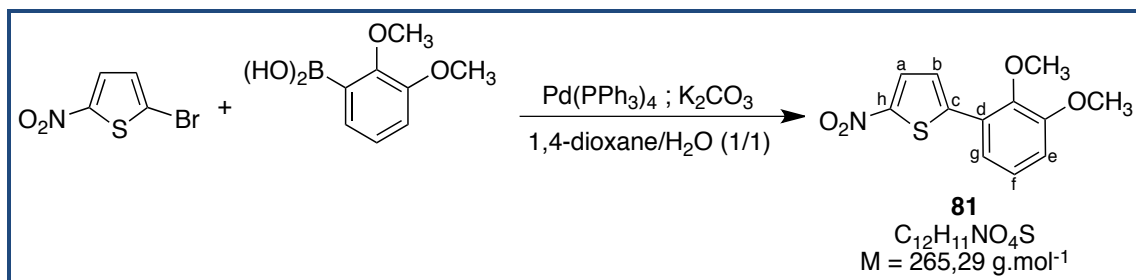
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 111,2 (CH_a) ; 115,8 (CH_g et CH_f) ; 118,5 (CH_b) ; 125,5 (C_d) ; 126,0 (CH_h et CH_e) ; 133,8 (C_c) ; 138,1 (C_i) ; 156,5 (C-OH) ; 166,1 (CO).

IR (cm^{-1}): 3266 (ν_{OH}), 1574 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{12}NO_2S$, 234,0589 ; trouvée, 234,0589.

HPLC : $t_R = 10,81 \text{ min}$; pureté : 100%.

2-(2,3-diméthoxyphényl)-5-nitrothiophène (81)



À une solution de 2-bromo-5-nitrothiophène (5,49 mmol) et d'acide 2,3-diméthoxyphénylboronique (5,49 mmol) dans un mélange 1,4-dioxane/eau (46 mL ; 1/1 ; v/v), sont ajoutés du $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (5 mol%) et du carbonate de potassium (22 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 80°C pendant 6h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 80 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*80 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange CH_2Cl_2 /Cyclohexane.

Solide jaune

$R_f = 0,40$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 54%

Mp: 126-128°C

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): 3,88 (s, 3H, OCH_3) ; 3,89 (s, 3H, OCH_3) ; 7,15-7,24 (m, 2H, H_f et H_e) ; 7,61 (dd, 1H, H_g , $J_1 = 7,2\text{Hz}$, $J_2 = 2,3\text{Hz}$) ; 7,80 (d, 1H, H_b , $J = 4,6\text{Hz}$) ; 8,14 (d, 1H, H_a , $J = 4,6\text{Hz}$).

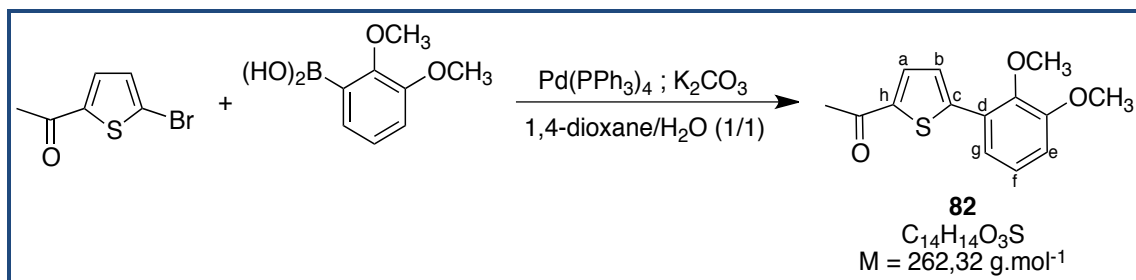
RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): 56,0 (OCH_3) ; 59,9 (OCH_3) ; 114,3 (CH_e) ; 118,8 (CH_g) ; 124,7 (C_d) ; 124,8 (CH_f) ; 125,0 (CH_b) ; 129,6 (CH_a) ; 145,3 (C-O) ; 145,4 (C-O) ; 150,5 (C_c) ; 152,8 (C- NO_2).

IR (cm^{-1}): 1258 ($\nu_{\text{C-O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{S}$, 266,0487 ; trouvée, 266,0486.

UPLC : $t_R = 3,03 \text{ min}$; pureté : 100%.

1-(5-(2,3-diméthoxyphényl)thiophèn-2-yl)éthanone (82)



À une solution de 2-acétyl-5-bromothiophène (5,49 mmol) et d'acide 2,3-diméthoxyphénylboronique (5,49 mmol) dans un mélange 1,4-dioxane/eau (46 mL ; 1/1 ; v/v), sont ajoutés du Pd(PPh₃)₄ (5 mol%) et du carbonate de potassium (22 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 80°C pendant 16h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 80 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*80 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide jaune pâle

R_f = 0,31 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 17%

Mp: 122-124°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 2,54 (s, 3H, CH₃) ; 3,79 (s, 3H, OCH₃) ; 3,86 (s, 3H, OCH₃) ; 7,08-7,19 (m, 2H, H_f et H_e) ; 7,46 (dd, 1H, H_g, J₁ = 7,8Hz, J₂ = 1,6Hz) ; 7,71 (d, 1H, H_b, J = 4,1Hz) ; 7,91 (d, 1H, H_a, J = 4,1Hz).

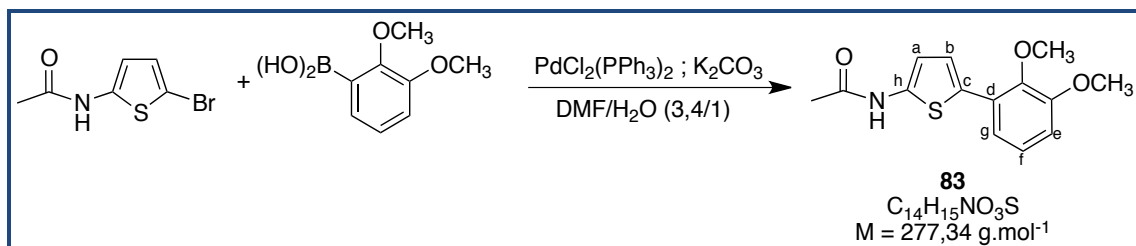
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 26,6 (CH₃) ; 55,9 (OCH₃) ; 59,8 (OCH₃) ; 113,3 (CH_e) ; 119,3 (CH_g) ; 124,6 (CH_f) ; 126,1 (C_d) ; 126,6 (CH_b) ; 133,5 (CH_a) ; 143,5 (C_c) ; 145,3 (C-O) ; 145,8 (C-O) ; 153,1 (C_h) ; 191,1 (CO).

IR (cm⁻¹): 1644 (ν_{C=O}), 1259 (ν_{C-O}).

HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₄H₁₅O₃S, 263,0742 ; trouvée, 263,0741.

UPLC : t_R = 2,78 min ; pureté : 100%.

***N*-(5-(2,3-diméthoxyphényl)thiophène-2-yl)acétamide (83)**



À une solution de 2-acétamido-5-bromothiophène (1,59 mmol) et d'acide 2,3-diméthoxyphénylboronique (3,18 mmol) dans un mélange DMF/eau (15 mL ; 3,4/1 ; v/v), sont ajoutés du PdCl₂(PPh₃)₂ (10 mol%) et du carbonate de potassium (6,36 mmol).

Le mélange réactionnel est placé à 80°C pendant 3h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur célite. Le filtrat est dilué avec 80 mL d'eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (4*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (6*40 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide beige

R_f = 0,30 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 6/4)

Rendement = 45%

Mp: 124-126°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 2,07 (s, 3H, CH₃) ; 3,71 (s, 3H, OCH₃) ; 3,83 (s, 3H, OCH₃) ; 6,62 (d, 1H, H_a, *J* = 4,0Hz) ; 6,91 (dd, 1H, H_e, *J*₁ = 8,1Hz, *J*₂ = 1,1Hz) ; 7,06 (t, 1H, H_f, *J* = 8,1Hz) ; 7,25 (dd, 1H, H_g, *J*₁ = 8,0Hz, *J*₂ = 1,3Hz) ; 7,31 (d, 1H, H_b, *J* = 4,0Hz) ; 11,12 (br s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 22,6 (CH₃) ; 55,8 (OCH₃) ; 59,6 (OCH₃) ; 110,4 (CH_a) ; 110,7 (CH_e) ; 118,5 (CH_g) ; 122,7 (CH_b) ; 124,4 (CH_f) ; 127,9 (C-O) ; 128,1 (C-O) ; 141,5 (C_d) ; 144,2 (C_c) ; 153,2 (CH) ; 166,2 (CO).

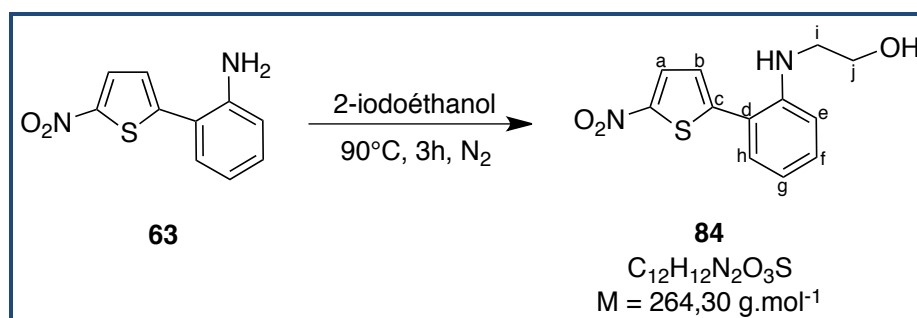
IR (cm⁻¹): 3211 (ν_{NH}), 1569 (ν_{C=O}), 1302 (ν_{C-O}).

HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₄H₁₆NO₃S, 278,0851 ; trouvée, 278,0849.

UPLC : t_R = 13,91 min ; pureté : 100%.

2-((2-(5-nitrothiophèn-2-yl)phényl)amino)éthanol (84)

Selon la méthode E :



Solide rouge

$R_f = 0,25$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 6/4)

Rendement = 37%

Mp: 91-93°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 3,16 (q, 2H, H_i , $J = 5,8\text{Hz}$) ; 3,59 (q, 2H, H_j , $J = 5,5\text{Hz}$) ; 4,79 (t, 1H, OH, $J = 5,3\text{Hz}$) ; 5,32 (t, 1H, NH, $J = 5,5\text{Hz}$) ; 6,73 (t, 1H, H_e , $J_1 = 7,4\text{Hz}$) ; 6,82 (d, 1H, H_g , $J = 8,1\text{Hz}$) ; 7,26-7,33 (m, 2H, H_h et H_f) ; 7,42 (d, 1H, H_b , $J = 4,3\text{Hz}$) ; 8,18 (d, 1H, H_a , $J = 4,3\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 45,7 (CH_i) ; 59,1 (C H_j) ; 112,1 (CH_g) ; 117,0 (CH_e) ; 117,4 (C_d) ; 126,3 (CH_b) ; 130,6 (CH_h) ; 130,8 (CH_a) ; 131,3 (CH_f) ; 146,1 (C-NH) ; 149,0 (C_c) ; 150,0 (C- NO_2).

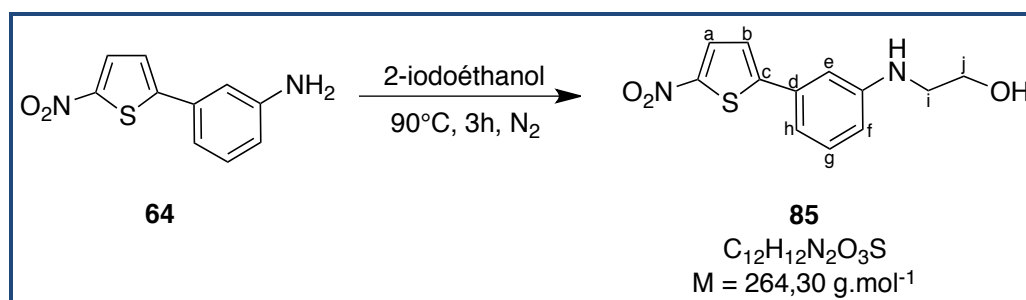
IR (cm^{-1}): 3214 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 265,0647 ; trouvée, 265,0645.

UPLC : $t_R = 2,67 \text{ min}$; pureté : 97%.

2-((3-(5-nitrothiophèn-2-yl)phényl)amino)éthanol (85)

Selon la méthode E :



Solide rouge

$R_f = 0,50$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7/3)

Rendement = 42%

Mp: 103-105°C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 3,16 (q, 2H, H_i , $J = 5,7\text{Hz}$) ; 3,58 (q, 2H, H_j , $J = 5,7\text{Hz}$) ; 4,72 (t, 1H, OH, $J = 5,4\text{Hz}$) ; 5,86 (t, 1H, NH, $J = 5,3\text{Hz}$) ; 6,71 (d, 1H, H_f , $J = 8,7\text{Hz}$) ; 6,95-6,97 (m, 2H, H_e et H_h) ; 7,18 (t, 1H, H_g , $J = 7,9\text{Hz}$) ; 7,55 (d, 1H, H_b , $J = 4,3\text{Hz}$) ; 8,13 (d, 1H, H_a , $J = 4,3\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 45,3 (CH_i) ; 59,6 (CH_j) ; 108,8 (CH_e) ; 113,5 (CH_g) ; 114,3 (CH_f) ; 123,4 (CH_h) ; 130,0 (CH_b) ; 131,3 (CH_a) ; 132,0 (C_d) ; 148,7 (C_c) ; 149,7 (C-N) ; 153,0 (C- NO_2).

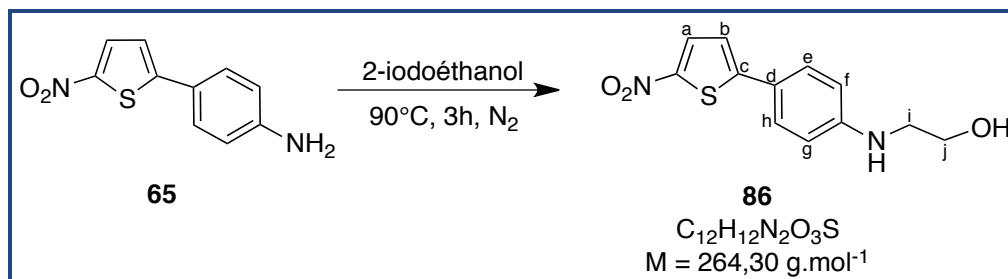
IR (cm^{-1}): 3274, 3113 (ν_{NH}), 3179 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 265,0647 ; trouvée, 265,0648.

HPLC : $t_R = 12,48 \text{ min}$; pureté : 98%.

2-((4-(5-nitrothiophèn-2-yl)phényl)amino)éthanol (86)

Selon la méthode E :



Solide rouge foncé

R_f = 0,35 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 31%

Mp: 164-166°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 3,17 (q, 2H, H_i, *J* = 5,8Hz) ; 3,56 (q, 2H, H_j, *J* = 5,8Hz) ; 4,77 (t, 1H, OH, *J* = 5,4Hz) ; 6,47 (t, 1H, NH, *J* = 5,6Hz) ; 6,66 (d, 2H, H_g et H_f, *J* = 8,8Hz) ; 7,38 (d, 1H, H_b, *J* = 4,5Hz) ; 7,57 (d, 2H, H_h et H_e, *J* = 8,7Hz) ; 8,06 (d, 1H, H_a, *J* = 4,5Hz).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 45,1 (CH_i) ; 59,5 (CH_j) ; 112,1 (CH_g et CH_f) ; 118,4 (C_d) ; 120,4 (CH_b) ; 127,7 (CH_h et CH_e) ; 132,1 (CH_a) ; 145,7 (C_c) ; 151,2 (C-N) ; 154,8 (C-NO₂).

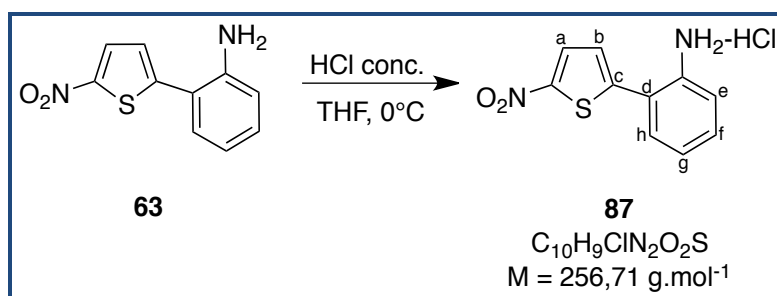
IR (cm⁻¹): 3310 (ν_{OH}).

HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₂H₁₃N₂O₃S, 265,0647 ; trouvée, 265,0644.

HPLC : t_R = 13,70 min ; pureté : 99%.

Chlorhydrate de 2-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (87)

Selon la méthode F :



Solide rouge pâle

Rendement = 37%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 6,79 (br s, 3H, NH_3^+) ; 7,00 (t, 1H, H_f , $J = 7,5\text{Hz}$) ; 7,16-7,19 (m, 1H, H_h) ; 7,34 (t, 1H, H_g , $J = 8,3\text{Hz}$) ; 7,45 (dd, 1H, H_e , $J = 7,7\text{Hz}$, $J = 1,3\text{Hz}$) ; 7,55 (d, 1H, H_b , $J = 4,3\text{Hz}$) ; 8,18 (d, 1H, H_a , $J = 4,3\text{Hz}$).

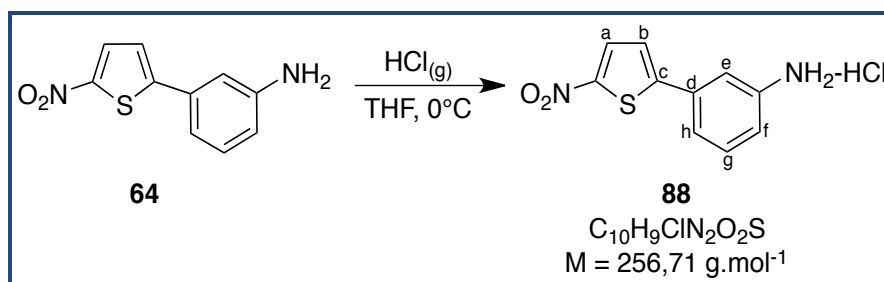
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 121,0 (CH_e) ; 121,4 (C_d) ; 122,9 (CH_g) ; 127,1 (CH_b) ; 130,7 (CH_h) ; 130,8 (CH_a) ; 131,0 (CH_f) ; 138,4 (C_c) ; 148,2 (C-N) ; 149,8 (C- NO_2).

IR (cm^{-1}): 2797 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 221,0385 ; trouvée, 221,0386.

HPLC : $t_R = 14,04 \text{ min}$; pureté : 100%.

Chlorhydrate de 3-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (**88**)



De l'acide chlorhydrique gazeux est formé par addition au goutte à goutte d'une solution concentrée d'acide sulfurique (97%, 15 mL) sur du chlorure de sodium (40 g). Le gaz est canulé dans une solution de **64** (0,522 g ; 2,37 mmol) dans 10 mL de THF à 0°C pendant 20 minutes. Le solide obtenu est filtré sur fritté (porosité 4) et lavé avec du pentane froid (-20°C, 3*20 mL).

Solide vert

Rendement = 89%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 7,36 (dd, 1H, H_g , $J = 8,0\text{Hz}$, $J = 1,1\text{Hz}$) ; 7,54 (t, 1H, H_h , $J = 7,9\text{Hz}$) ; 7,64-7,73 (m, 3H, H_b , H_e et H_f) ; 8,18 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 9,09 (br s, 3H, NH_3^+).
 RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 118,9 (CH_f) ; 123,2 (CH_e) ; 123,5 (CH_h) ; 124,6 (CH_b) ; 130,8 (CH_g) ; 131,3 (CH_a) ; 132,6 (C_d) ; 136,4 (C_c) ; 149,7 (C-N), 150,1 (C- NO_2).

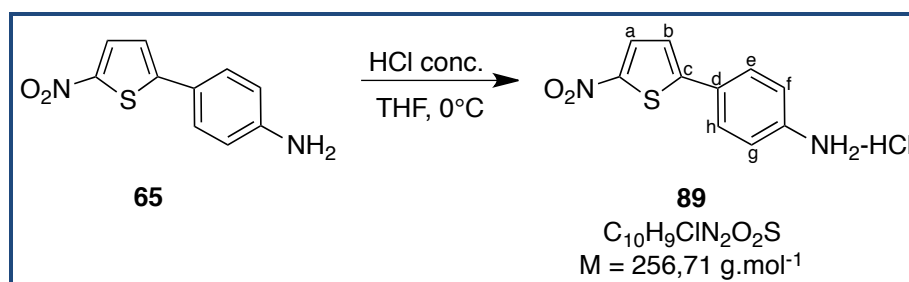
IR (cm^{-1}): 2816 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 221,0385 ; trouvée, 221,0385.

HPLC : $t_R = 14,67 \text{ min}$; pureté : 100%.

Chlorhydrate de 4-(5-nitrothiophèn-2-yl)aniline (89)

Selon la méthode F :



Solide marron

Rendement = 59%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 7,11 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 7,54 (d, 1H, H_b , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 7,76 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,6\text{Hz}$) ; 8,12 (d, 1H, H_a , $J = 4,4\text{Hz}$) ; 8,54 (br s, 3H, NH_3^+).

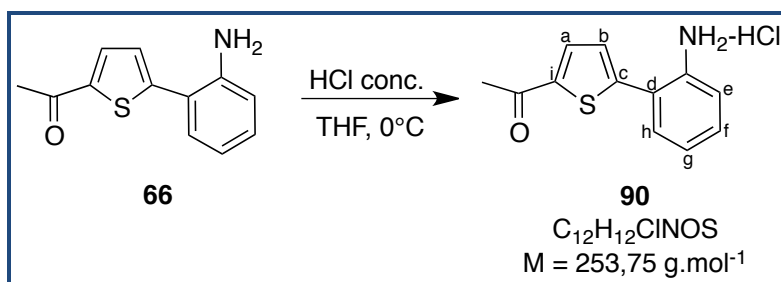
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 120,5 (CH_g et CH_f) ; 123,1 (CH_b) ; 126,4 (C_d) ; 127,7 (CH_h et CH_e) ; 131,6 (CH_a) ; 140,4 (C_c) ; 148,3 (C-N) ; 151,8 (C- NO_2).

IR (cm^{-1}): 2808 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 221,0385 ; trouvée, 221,0384.

HPLC : $t_R = 14,51 \text{ min}$; pureté : 97%.

Chlorhydrate de 1-(5-(2-aminophényl)thiophène-2-yl)éthanone (**90**)



À une solution de **69** (0,393 g ; 1,81 mmol) dans 8 mL de THF à 0°C est ajouté 18 mL d'acide chlorhydrique concentré (37%, $c = 12 \text{ mol.L}^{-1}$) au goutte à goutte. La solution est laissée sous agitation à 0°C pendant 20 minutes. 25 mL d'éther diéthylique sont ajoutés et le mélange réactionnel est concentré sous vide. Cette opération est répétée 10 fois.

Solide marron

Rendement = 96%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,56 (s, 3H, CH_3) ; 7,17 (m, 1H, H_f) ; 7,33-7,42 (m, 2H, H_g et H_h) ; 7,47 (d, 1H, H_e , $J = 7,5\text{Hz}$) ; 7,62 (d, 1H, H_b , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 8,00 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 8,27 (br s, 3H, NH_3^+).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,5 (CH_3) ; 122,9 (C_d) ; 125,5 (CH_e) ; 125,9 (CH_b) ; 128,9 (CH_g) ; 130,2 (CH_f) ; 131,1 (CH_h) ; 133,4 (C_c) ; 134,7 (CH_a) ; 144,2 (C_i) ; 146,7 (C-N) ; 190,8 (CO).

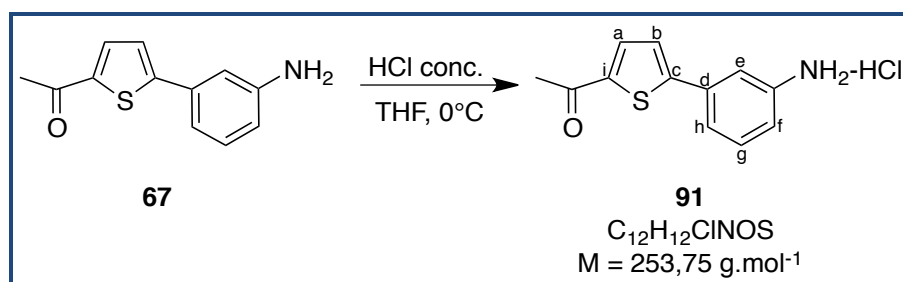
IR (cm^{-1}): 2714 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1623 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NOS}$, 218,0640 ; trouvée, 218,0641.

HPLC : $t_R = 13,52 \text{ min}$; pureté : 96%.

Chlorhydrate de 1-(5-(3-aminophényl)thiophèn-2-yl)éthanone (91)

Selon la méthode F :



Solide jaune pâle

Rendement = 35%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,55 (s, 3H, CH_3) ; 7,29 (d, 1H, H_g , $J = 8,0\text{Hz}$) ; 7,51 (t, 1H, H_h , $J = 7,9\text{Hz}$) ; 7,62-7,69 (m, 3H, H_b , H_f , H_e) ; 7,97 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; le signal de la fonction ammonium NH_3^+ n'est pas visible.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,4 (CH_3) ; 119,0 (CH_e) ; 122,4 (CH_f) ; 123,5 (CH_h) ; 125,7 (CH_b) ; 130,7 (CH_g) ; 133,9 (C_d) ; 135,2 (CH_a) ; 135,8 (C_c) ; 143,3 (C_i) ; 145,0 (C-N) ; 190,8 (CO).

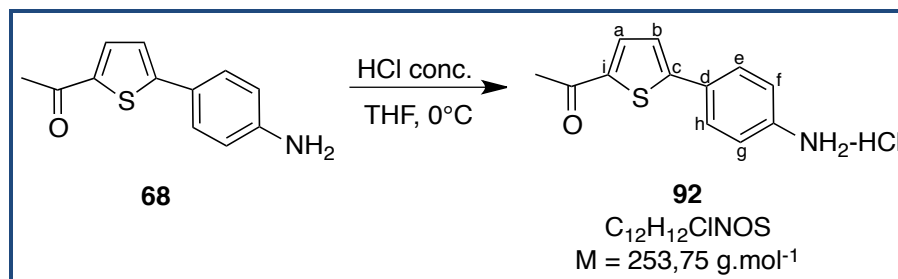
IR (cm^{-1}): 2779 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1618 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NOS}$, 218,0640 ; trouvée, 218,0641.

HPLC : $t_R = 12,97 \text{ min}$; pureté : 99%.

Chlorhydrate de 1-(5-(4-aminophényl)thiophèn-2-yl)éthanone (92)

Selon la méthode F :



Solide marron pâle

Rendement = 39%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,53 (s, 3H, CH_3) ; 7,31 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 7,60 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,80 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 7,94 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 8,93 (br s, 3H, NH_3^+).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 26,3 (CH_3) ; 122,1 (CH_g et CH_f) ; 124,9 (CH_b) ; 127,2 (CH_h et CH_e) ; 129,9 (C_d) ; 135,2 (CH_a) ; 136,1 (C_c) ; 142,6 (C_i) ; 150,6 (C-N) ; 190,5 (CO).

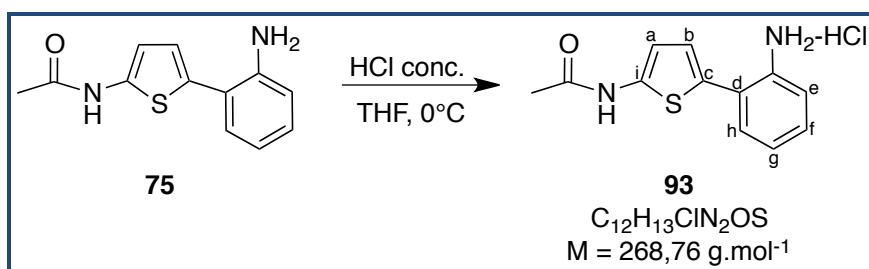
IR (cm^{-1}): 2883 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1653 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NOS}$, 218,0640 ; trouvée, 218,0640.

HPLC : $t_R = 12,67 \text{ min}$; pureté : 98%.

Chlorhydrate de *N*-(5-(2-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (93)

Selon la méthode F :



Solide blanc

Rendement = 49%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,10 (s, 3H, CH_3) ; 6,72 (d, 1H, H_a , $J = 3,9\text{Hz}$) ; 7,33-7,40 (m, 3H, H_b , H_f , H_h) ; 7,44-7,52 (m, 2H, H_e , H_g) ; 9,32 (br s, 3H, NH_3^+) ; 11,56 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,4 (CH_3) ; 111,2 (CH_e) ; 123,5 (CH_a) ; 124,8 (CH_f) ; 127,1 (CH_b) ; 127,5 (C_c et C_d) ; 128,1 (CH_h) ; 130,5 (CH_g) ; 131,1 (C_i) ; 141,2 (C-N) ; 166,5 (CO).

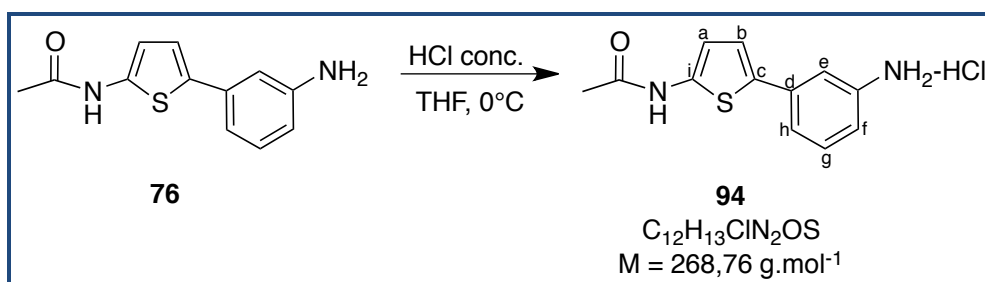
IR (cm^{-1}): 2803 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1571 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}$, 233,0749 ; trouvée, 233,0752.

HPLC : $t_R = 11,70 \text{ min}$; pureté : 100%.

Chlorhydrate de *N*-(5-(3-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (94)

Selon la méthode F :



Solide rose

Rendement = 46%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,10 (s, 3H, CH_3) ; 6,66 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,16 (d, 1H, H_g , $J = 7,8\text{Hz}$) ; 7,27 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,41-7,48 (m, 2H, H_e , H_h) ; 7,56 (d, 1H, H_f , $J = 7,8\text{Hz}$) ; 11,47 (s, 1H) ; le signal de la fonction ammonium NH_3^+ n'est pas visible.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 111,5 (CH_e) ; 118,1 (CH_f) ; 120,2 (CH_a) ; 121,6 (CH_b) ; 122,9 (CH_g) ; 130,3 (CH_h) ; 131,4 (C_d) ; 134,1 (C_c) ; 135,8 (C_i) ; 140,4 (C-N) ; 166,5 (CO).

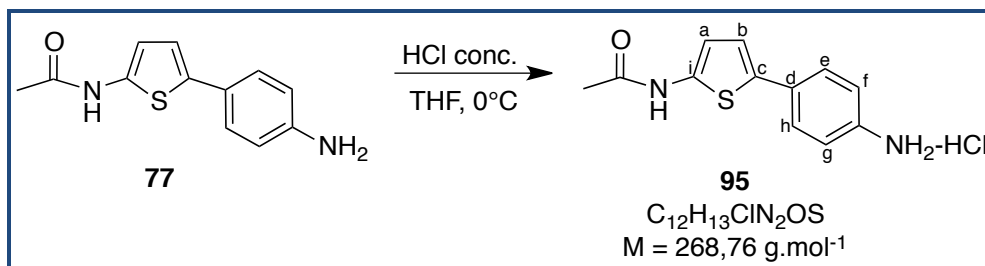
IR (cm^{-1}): 2865 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1571 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}$, 233,0749 ; trouvée, 233,0751.

HPLC : $t_R = 11,28 \text{ min}$; pureté : 100%.

Chlorhydrate de *N*-(5-(4-aminophényl)thiophène-2-yl)acétamide (95)

Selon la méthode F :



Solide beige

Rendement = 51%

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): 2,09 (s, 3H, CH_3) ; 6,65 (d, 1H, H_a , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,27 (d, 1H, H_b , $J = 4,0\text{Hz}$) ; 7,36 (d, 2H, H_h et H_e , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 7,66 (d, 2H, H_g et H_f , $J = 8,5\text{Hz}$) ; 10,29 (br s, 3H, NH_3^+) ; 11,48 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): 22,5 (CH_3) ; 116,5 (CH_a) ; 121,4 (CH_b) ; 123,7 (CH_g et CH_f) ; 125,5 (CH_h et CH_e) ; 130,3 (C_d) ; 131,6 (C_c) ; 134,1 (C_i) ; 140,2 (C-N) ; 166,4 (CO).

IR (cm^{-1}): 2816 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$), 1564 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}$, 233,0749 ; trouvée, 233,0747.

HPLC : $t_R = 10,77 \text{ min}$; pureté : 97%.

CHAPITRE 2 - Synthèse d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse du peptidoglycane

1. La paroi bactérienne

1.1. Généralités

Pour la grande majorité des bactéries, la paroi bactérienne a un rôle crucial d'un point de vue de leur survie mais aussi de leur développement. Celle-ci est responsable de la forme de la bactérie mais lui assure aussi un maintien de l'intégrité structurale. Cette barrière représente une protection contre les agressions physico-chimiques (changement du pH, de la température...). La paroi des bactéries est une structure rigide, permettant de résister à une forte pression osmotique interne (5 à 25 atmosphères). De plus, celle-ci présente des propriétés élastiques, ce qui lui permet de résister aux variations géométriques dues par exemple, à une force osmotique s'exerçant de l'intérieur vers l'extérieur.

Chez la plupart des bactéries, le peptidoglycane (muréine dans certaines publications ou dans certains ouvrages) est le constituant principal de la paroi bactérienne. Cette macromolécule, formée de liaisons covalentes est située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane est un hétéropolymère complexe, formé par la polymérisation linéaire d'unités disaccharidiques : *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) reliées entre elles par des liaisons osidiques β -1,4. Les molécules d'acide *N*-acétylmuramiques sont substituées par des chaînes latérales peptidiques (pentapeptide) au niveau du groupement lactyl. Celles-ci ont généralement la composition suivante : L-Ala-D-Glu-méso-DAP(ou L-Lys)-D-Ala-D-Ala (Figure 51)¹³².

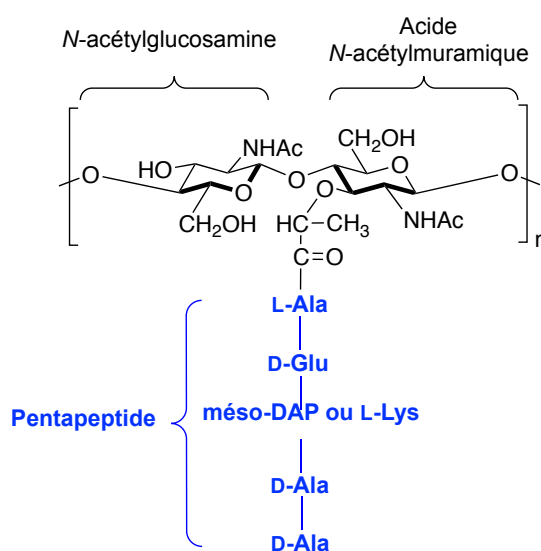


Figure 51. Structure du monomère du peptidoglycane.

1.2. La voie de biosynthèse du peptidoglycane

La voie de biosynthèse du peptidoglycane peut se scinder en trois parties différentes¹³³ (Figure 52). La première partie comprend six étapes, permettant la synthèse et la formation des précurseurs nucléotidiques. Dans une deuxième partie, les précurseurs lipidiques sont synthétisés au niveau de la membrane cytoplasmique. Pour finir, la troisième partie concerne la polymérisation du monomère qui a lieu sur la partie extérieure de la membrane cytoplasmique.

1.2.1. La synthèse des précurseurs nucléotidiques

Les six premières étapes de la voie de biosynthèse du peptidoglycane se déroulent dans le cytoplasme et sont catalysées par les enzymes MurA-MurF. Ces étapes successives permettent l'obtention de l'entité : UDP-*N*-acétylmuramique pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide). Dans un premier temps, MurA (transférase) et MurB (réductase) catalysent la formation de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique. Dans un second temps, l'action des quatre enzymes MurC-MurF (ligases ATP-dépendante) permet la formation du pentapeptide.

1.2.2. La synthèse des précurseurs des intermédiaires lipidiques

Par la suite, les réactions se déroulent au niveau de la membrane cytoplasmique. La première réaction catalyse (MraY) l'amarrage de la chaîne peptidique de l'UDP-MurNAc-pentapeptide au niveau de l'undécaprenyl phosphate (référéncé aussi par bactoprénol), un transporteur transmembranaire, résultant en la génération d'un intermédiaire appelé aussi lipide I. D'une part, l'addition de l'unité *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) est catalysée par la transférase MurG pour conduire à l'intermédiaire lipidique II. D'autre part, cet intermédiaire lipidique est transféré à travers la membrane cytoplasmique. En 2011, T. Mohammadi et ses collaborateurs démontraient pour la première fois que le transport de ce précurseur à travers la membrane cytoplasmique nécessitait l'intervention de la protéine FtsW, une flippase essentielle à cette étape chez la bactérie *Escherichia coli*¹³⁴.

1.2.3. La polymérisation du peptidoglycane

L'unité monomérique du peptidoglycane (intermédiaire lipidique II) est ainsi située sur la partie externe de la membrane cytoplasmique. La polymérisation des précurseurs du peptidoglycane est réalisée par deux réactions successives : une étape de transglycosylation (multiplication des monomères) et une étape de transpeptidation (liaison peptidique entre deux acides aminés). Les deux enzymes participant à ces réactions (transglycolase et transpeptidase) sont communément appelées les protéines de liaisons aux pénicillines (PLP). Ainsi, cette dénomination fut mise en place par l'action irréversible des antibiotiques de la famille des pénicillines sur la transpeptidase.

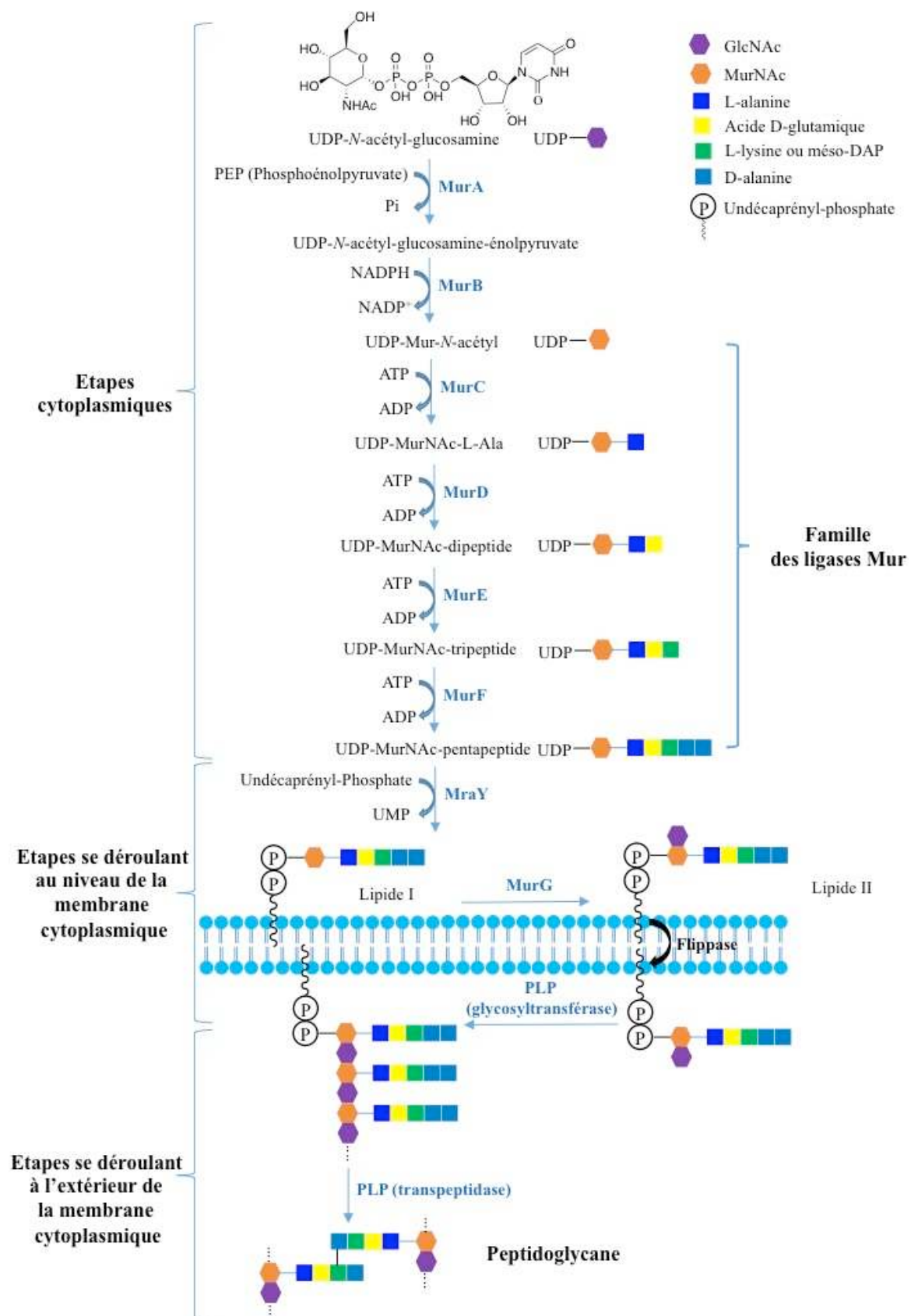


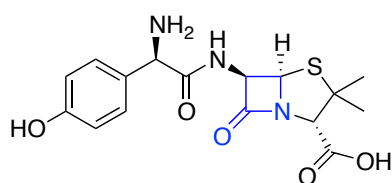
Figure 52. Voie de biosynthèse du peptidoglycane.

1.3. Les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne

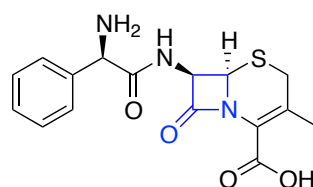
Avec la découverte de la pénicilline en 1929, la voie de biosynthèse du peptidoglycane a été la première cible biologique des antibiotiques et chaque protéine intervenant dans la catalyse des différentes étapes est identifiée. Cependant, malgré le potentiel de développement de nouvelles molécules biologiquement actives, toutes les protéines connues ne font pas l'objet d'un antibiotique ou même d'une molécule applicable à un développement clinique¹³⁵. En opposition à cela, les antibiotiques interagissant avec l'intégrité de la paroi bactérienne sont les molécules les plus utilisées dans l'usage médical et vétérinaire, comme les β -lactames, les glycopeptides, les antibiotiques de types peptidiques ou encore les dérivés d'acide phosphonique¹³⁶. Cette réalité s'explique en partie par le fait que la majeure partie des nouveaux antibiotiques mis sur le marché appartiennent à la même famille et présentent un mécanisme d'action identique.

1.3.1. Les antibiotiques de la famille des β -lactames

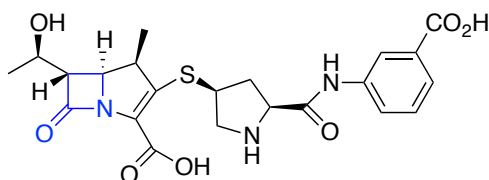
Depuis près de 80 ans, la découverte de la pénicilline par Sir. Alexander Fleming, constitue toujours une des innovations thérapeutiques les plus remarquables dans le domaine de la chimie médicinale. Les antibiotiques de la famille des β -lactames sont regroupés en quatre sous-familles : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames (Figure 53). La caractéristique structurale commune à ces antibiotiques est le cycle à 4 chaînons (cycle β -lactame) siège de l'activité antibactérienne¹³⁷.



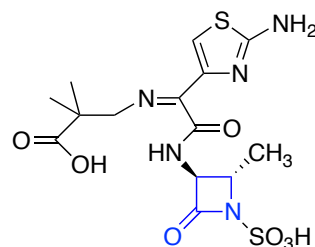
Amoxicilline
(ATB de la famille des pénicillines)



Céfalexine
(ATB de la famille des céphalosporine de première génération)



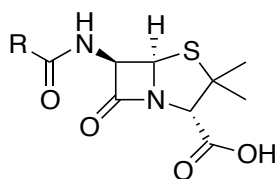
Ertapéném
(ATB de la famille des carbapénèmes)



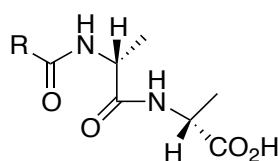
Aztréonam
(ATB de la famille des monobactames)

Figure 53. Antibiotiques de la famille des β -lactames. Le cycle β -lactame est en bleu.

L'activité biologique de ces antibiotiques est conférée par un mécanisme d'action semblable. Celui-ci se déroule au niveau des dernières étapes de la biosynthèse du peptidoglycane et se traduit par l'inhibition des PLP (protéines liant les pénicillines). L'inhibition est caractérisée par la liaison des antibiotiques au dipeptide D-Ala-D-Ala dans l'architecture d'allongement du peptidoglycane, impliquant l'arrêt de la voie de biosynthèse du peptidoglycane¹³⁸ (Figure 54).



Pénicilline



D-Ala-D-Ala

Figure 54. Structure générale des pénicillines et du dipeptide D-Ala-D-Ala.

La résistance aux β -lactames est matérialisée par trois mécanismes principaux¹³⁹ :

- la production de β -lactamases est le mécanisme le plus commun chez les bactéries à gram-négatif. L'action de ces enzymes conduit à l'ouverture du cycle β -lactame, rendant inactif l'antibiotique^{140,141}.
- chez les bactéries à gram-positif, le mécanisme le plus souvent rencontré est la modification des PLP réduisant considérablement l'affinité de l'antibiotique pour leurs cibles¹⁴².

- la réduction de la perméabilité de la membrane (changement de la structure des porines) ou l'activité des pompes à efflux qui tend à diminuer la concentration de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule¹⁴³.

1.3.2. Les antibiotiques ciblant l'intermédiaire lipide II

L'intermédiaire lipidique II (Lipide II, Figure 52) est un intermédiaire principal dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane, synthétisé à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. En conséquence, il représente le « talon d'Achille » des bactéries et constitue une cible privilégiée pour bon nombre d'antibiotiques : les glycopeptides et les lantibiotiques¹⁴⁴.

La vancomycine est un antibiotique naturel de la famille des glycopeptides, utilisée en dernier recours contre des bactéries à gram-positif¹⁴⁵ (SARM, streptocoques). La vancomycine a été introduite en 1958 sur le marché pharmaceutique et est produite par *Amycolatopsis orientalis*, une bactérie à gram-positif (Figure 55).

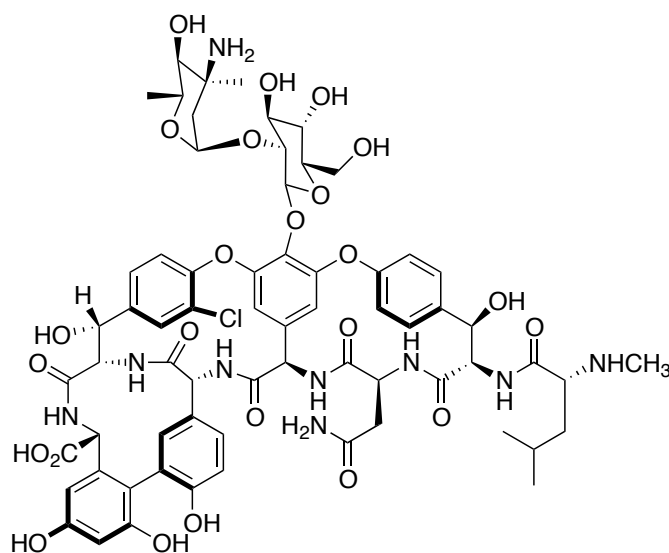


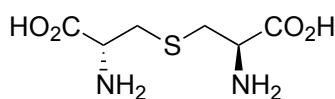
Figure 55. Structure de la vancomycine.

Les antibiotiques de cette famille agissent sur l'étape de transglycosylation, catalysée par une PLP glycosyltransférase. Cependant, à l'inverse des autres antibiotiques, les glycopeptides n'interagissent pas avec le site actif de l'enzyme mais avec le substrat de celle-ci. La vancomycine se lie au niveau du dipeptide terminal D-Ala-D-Ala (position 4 et 5 de la chaîne peptidique) du peptidoglycane naissant, par l'intermédiaire de cinq liaisons hydrogènes.

Ainsi, le substrat naturel étant modifié, son incorporation est impossible au niveau de la paroi bactérienne.

À cause de son utilisation intensive, une multiplication de la résistance a été avérée chez plusieurs souches bactériennes, en particulier chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline. Un des mécanismes de résistance a été expliqué par la présence d'une paroi bactérienne plus épaisse. Ainsi, l'antibiotique se retrouve pris au piège entre les couches de peptidoglycanes avant d'atteindre le peptidoglycane naissant¹⁴⁶. Le deuxième mécanisme de résistance le plus souvent rencontré est caractérisé par la modification de la structure du dipeptide terminal. La modification se manifeste par l'apparition d'une liaison ester à la place de la liaison amide et résulte en la perte d'une liaison hydrogène. Ainsi, la perte d'affinité (par un facteur 1000) pour la paire ATB-peptide résulte en l'apparition de mécanisme de résistance¹⁴⁵.

Les lantibiotiques appartiennent à la famille des bactériocines, c'est-à-dire des peptides de l'ordre de 20 à 60 acides aminés synthétisés par certaines bactéries. Ce sont des molécules polycycliques comprenant un acide aminé de type thioéther (lanthionine) (Figure 56).



Lanthionine

Figure 56. Structure de la lanthionine.

Actuellement, cette famille d'antibiotiques est divisée en deux groupes¹⁴⁷. Cette disparité se caractérise de la manière suivante¹⁴⁸ :

- une différence de taille entre les peptides : les lantibiotiques de type A ont une structure contenant plus de 34 acides aminés, alors que les lantibiotiques de type B possèdent entre 19 et 34 résidus.
- les lantibiotiques de type A ont une configuration plus allongée ce qui les rend plus flexibles alors que ceux de type B ont une structure plus globulaire.
- de par leur structure différente, ces peptides n'ont pas le même mécanisme d'action¹⁴⁹. Dans le premier cas, les lantibiotiques de type A interfèrent avec l'intégrité de la membrane et forment des pores ce qui conduit à la dissipation de petites molécules essentielles (acides aminés). Cet effet provoque l'arrêt des voies de biosynthèses cellulaires.

Dans le deuxième cas, les lantibiotiques de type B agissent sur le constituant lipide II et bloquent son activité.

En 1947, la Nisine a été le premier antibiotique isolé de *Lactococcus lactis*, une bactérie lactique¹⁵⁰. Il est utilisé pour la biopréservation de denrées alimentaires telles que le fromage ou la vinaigrette afin d'empêcher la détérioration microbienne¹⁵¹. La mersacidine, quant à elle, a montré une activité prometteuse contre des pathogènes à gram-positif chez la souris¹⁵² (Figure 57).

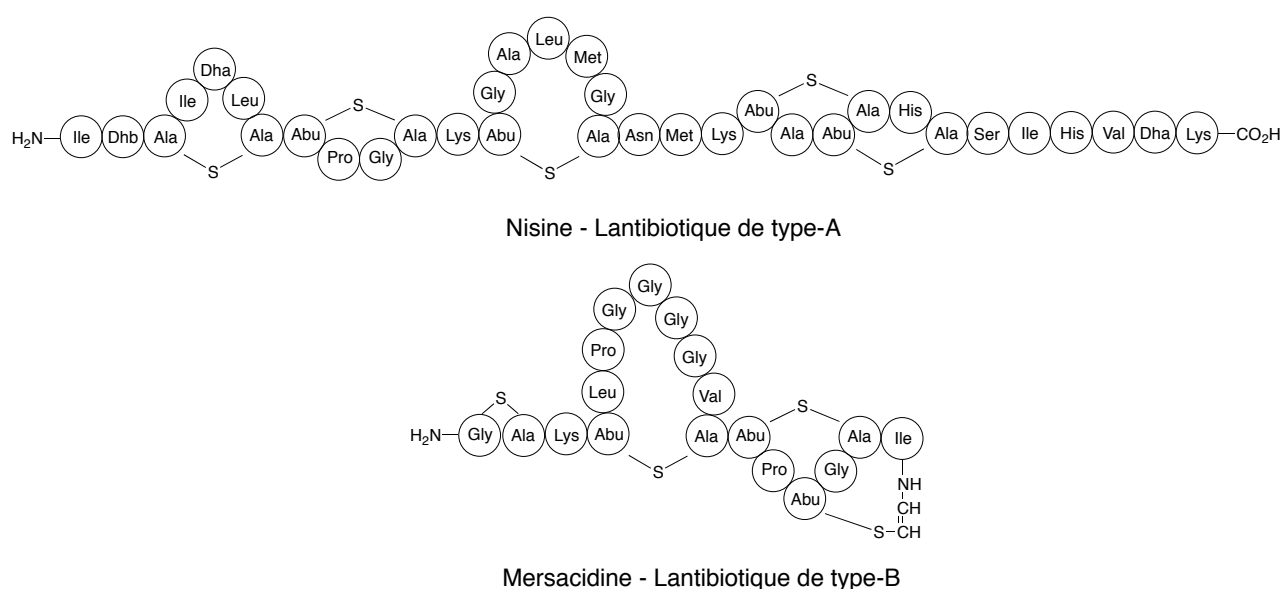


Figure 57. Structures de la Nisine et de la Mersacidine. Dha: Didéhydroaniline, Dhb: Didehydrobutyrine, Ala-S-Ala: Lanthionine, Ala-S-Abu: β -méthyllanthionine.

1.3.3. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des molécules caractérisées par la liaison d'un lipide à un peptide. La daptomycine, un antibiotique d'origine naturelle, est produit par fermentation de *Streptomyces roseosporus*¹⁵³. Ce lipopeptide cyclique (Figure 58) a un effet bactéricide contre les bactéries à gram-positif (entérocoques résistants à la vancomycine et SARM).

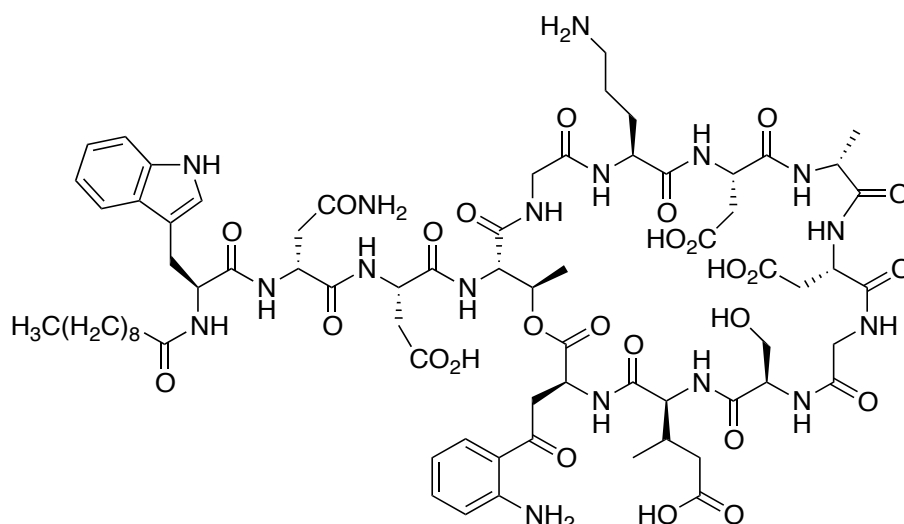


Figure 58. Structure de la daptomycine

Dans un premier temps, les recherches menées insistaient sur le fait que la cible de cet antibiotique était la voie de biosynthèse du peptidoglycane¹⁵⁴. Plus récemment, des études ont montré que le mécanisme d'action de la daptomycine impliquait la liaison aux membranes bactériennes des cellules en cours de croissance (Figure 59), entraînant une rapide dépolarisation de la membrane (différence de potentiel entre le milieu externe et le milieu interne d'une cellule). Ainsi, la résultante de cette dépolarisation se manifeste par la perturbation de la synthèse de la paroi bactérienne entraînant la mort des bactéries^{155,156}.

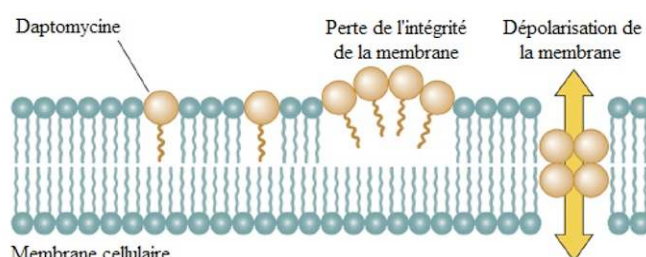


Figure 59. Mécanisme d'action de la daptomycine.

En 2010, une étude de la résistance à la daptomycine sur plusieurs cas cliniques a été décrite. Il apparaissait que les souches résistantes (entérocoques et staphylocoques) étaient rarement rencontrées¹⁵⁷. Les perturbations conduisant à un mécanisme de résistance résultent le plus souvent d'une réduction de l'affinité entre la daptomycine et la surface de liaison de celle-ci¹⁵⁸.

1.3.4. Les analogues d'acides aminés

La fosfomycine est un antibiotique naturel de type acide phosphonique et fait l'objet d'un développement plus détaillé dans le paragraphe 1.4 (page 133). Le deuxième antibiotique avec une structure dérivée d'acide aminé est la D-cyclosérine. C'est un analogue cyclique de l'acide aminé D-sérine amide¹⁵⁹, de faible poids moléculaire comme la fosfomycine (Figure 60).

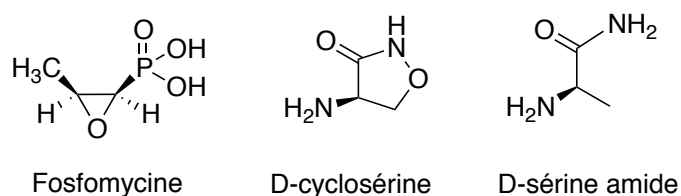


Figure 60. Structure de la fosfomycine et analogie structurale entre la D-cyclosérine et l'acide aminé D-sérine amide.

La D-cyclosérine inhibe l'activité de l'alanine racémase (Alr), une enzyme PLP-dépendante responsable de la conversion de la L-alanine et D-alanine. De plus, cet antibiotique présente une activité contre la ligase D-Alanine-D-Alanine (Ddl) (ATP dépendante), permettant la formation du dipeptide D-Ala-D-Ala^{160,161}. Ces deux enzymes sont essentielles dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane car elles permettent la formation du pentapeptide (Figure 61).

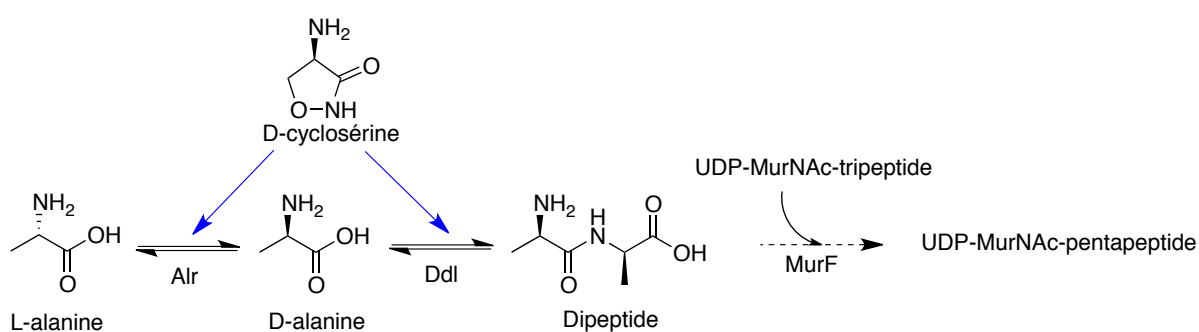


Figure 61. Mécanisme d'action de la D-cyclosérine.

1.4. Une cible attractive pour le développement de nouveaux agents antibactériens : le cas de la fosfomycine

1.4.1. Généralités

La fosfomycine (appelée aussi phosphonomycine), découverte en 1969 est un antibiotique naturel de type bactéricide¹⁶² (Figure 62). Il a été extrait d'un bouillon de fermentation de diverses souches de *Streptomyces* (*S. fradiae*, *S. wedmorensis* and *S. viridochromogenes*), des bactéries gram-positif filamenteuses¹⁶³.

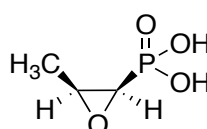
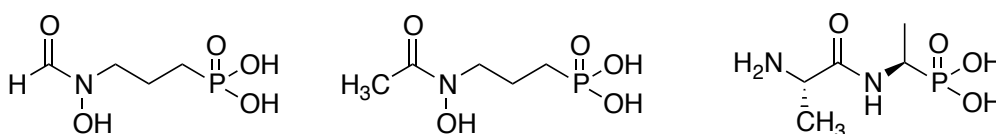


Figure 62. Structure de la fosfomycine.

Cet antibiotique, de faible poids moléculaire et optiquement actif, possède un cycle époxyde et un groupement phosphonate. Dans la littérature, plusieurs équipes de recherche relatent que la fosfomycine est le seul antibiotique de type acide phosphonique accepté sur le marché par les agences de réglementation à travers le monde¹⁶⁴. Cependant, trois molécules analogues ont été développées, présentant une activité antibactérienne prometteuse. Il s'agit de la fosmidomycine, de son homologue FR900098 et l'alafosfaline (Figure 63)¹⁶⁵.



Fosmidomycine

FR900098

Alafosfaline

Figure 63. Structures des analogues de la fosfomycine.

La fosmidomycine et son homologue *N*-acétylé sont deux antibiotiques naturels produits respectivement par, *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces rubellomurinus*¹⁶⁶. La fosmidomycine est actuellement en essais cliniques de phase IIb mais celle-ci a montré certaines limites quant à un potentiel usage thérapeutique. En effet, chez les enfants, l'utilisation de la fosmidomycine (en combinaison avec d'autres antibiotiques) a confirmé une

élimination trop rapide dans le plasma sanguin. Enfin, ces deux molécules ont une très faible perméabilité contre de nombreux agents pathogènes, comme *Toxoplasma gondii* et *Mycobacterium tuberculosis*, les rendant inefficaces^{167,168}.

L'alafosfaline, un antibiotique synthétique produit par le laboratoire Roche dans les années 70, a montré un large spectre d'activité et une faible toxicité sur les animaux¹⁶⁹. Cependant, son développement a été stoppé à cause d'une évolution trop rapide de bactéries résistantes. De plus, l'hydrolyse de la molécule par des peptidases a été observée, conduisant à une molécule biologiquement inactive avant d'atteindre sa cible, limitant ainsi son utilisation chez les humains et les animaux pour le traitement des infections urinaires^{170,171}.

1.4.2. Mécanisme d'action

La fosfomycine interfère avec la synthèse de la paroi bactérienne chez les bactéries à gram-positif et gram-négatif. L'antibiotique agit sur la première étape de la voie de biosynthèse du peptidoglycane en interférant avec l'enzyme MurA (UDP-*N*-Acétylglucosamine énoypyruvyle transférase). En l'absence de fosfomycine (Figure 64, Schéma A), la ligase MurA catalyse l'addition du phosphoénolpyruvate (PEP) sur l'entité UDP-*N*-Acétylglucosamine en libérant un groupement phosphate. Cette étape permet la formation de précurseurs du peptidoglycane et ainsi la croissance des bactéries¹⁶². Lors de l'utilisation de la fosfomycine (Figure 64, Schéma B), l'antibiotique joue le rôle d'analogue du substrat naturel de MurA, c'est-à-dire du PEP, et bloque l'activité de MurA. L'action de la fosfomycine empêche la formation du peptidoglycane et conduit à la mort des cellules bactériennes¹⁷².

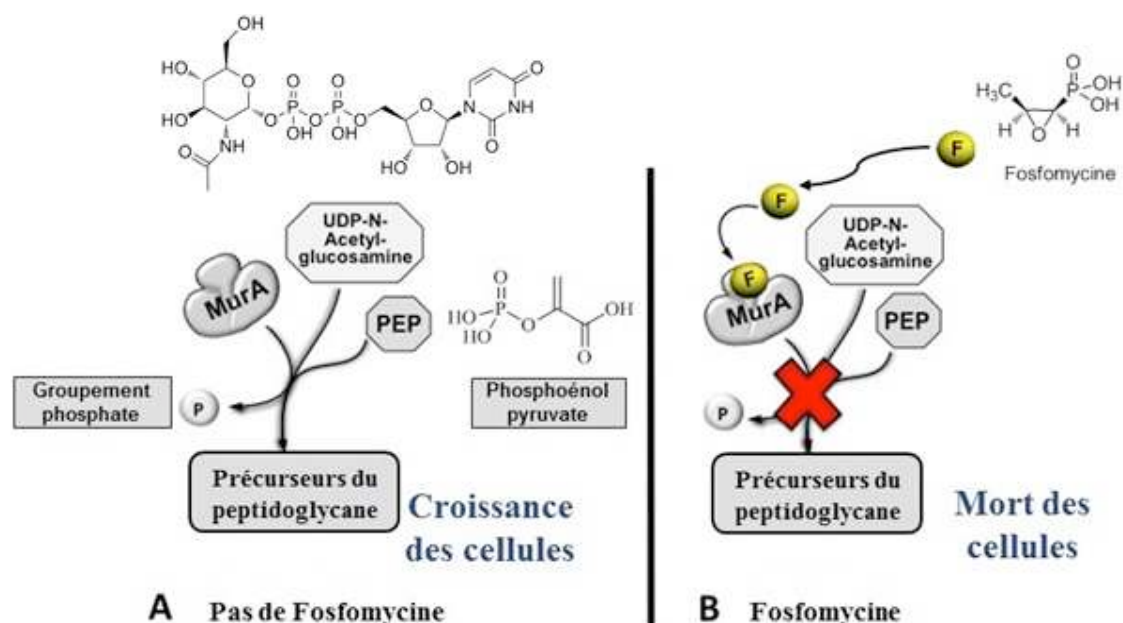


Figure 64. Schéma d'inhibition de l'enzyme MurA par la fosfomycine.

D'un point de vue mécanistique, l'inhibition de l'enzyme MurA par la fosfomycine est due à la formation d'une liaison covalente entre l'inhibiteur et un résidu cystéine (Cys155) du site actif par ouverture de l'époxyde (Figure 65). Cela conduit à l'obtention d'un adduit stabilisé en partie grâce aux liaisons hydrogènes entre le groupement phosphate de la fosfomycine et les chaînes polypeptidiques du site actif¹⁷².

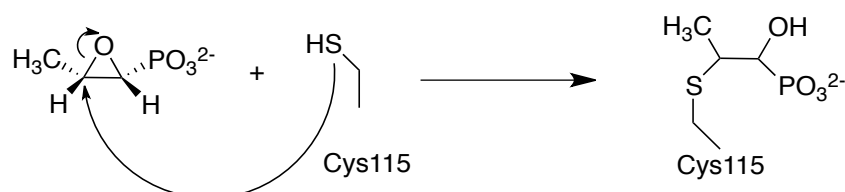


Figure 65. Inactivation de MurA par la fosfomycine.

1.4.3. Activités biologiques

La fosfomycine est un antibiotique de type bactéricide à spectre large, c'est-à-dire qu'il agit à la fois sur des bactéries à gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) et des bactéries à gram-négatif comme *Escherichia coli*.

La fosfomycine, sous forme orale, est principalement utilisée dans le traitement des infections urinaires sans complication (cystites, urétrites), particulièrement lorsqu'elles sont provoquées par *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*. Son activité réside dans le fait que la fosfomycine n'est pas métabolisée par l'organisme et est excrétée à plus de 80% en 12 heures par voie urinaire. Cela fait de cet antibiotique une arme de choix dans le traitement des infections urinaires¹⁶⁵.

1.4.4. Mécanismes de résistance à la fosfomycine

On dénombre trois principaux mécanismes de résistance à la fosfomycine¹⁷² :

- la réduction de la perméabilité des membranes : chez *Escherichia coli*, la pénétration de la fosfomycine à l'intérieur de la bactérie se fait par le biais de deux systèmes de transport d'éléments nutritifs impliquant le transporteur glycérol-3-phosphate et le transporteur hexose-6-phosphate¹⁷³. La résistance à la fosfomycine est due à une modification du système biologique régulant l'activité des systèmes mentionnés précédemment, produisant une diminution de l'absorption de l'antibiotique.

- modification de la cible : la modification d'un résidu au niveau du site de liaison de la fosfomycine est un mécanisme de résistance assez rare chez les bactéries. Chez *Escherichia coli*, cette mutation se traduit par la substitution du résidu essentiel Cys115 par un résidu Asp^{174,175}.

- modification de l'antibiotique : plusieurs enzymes possèdent la capacité d'altérer la structure de la fosfomycine, se traduisant généralement par l'ouverture du cycle oxirane. Trois mécanismes principaux sont décrits chez des bactéries pathogènes avec l'addition de différentes substances : le glutathion, la L-cystéine et de l'eau sur le carbone portant le groupement phosphate¹⁷⁶ (Figure 66).

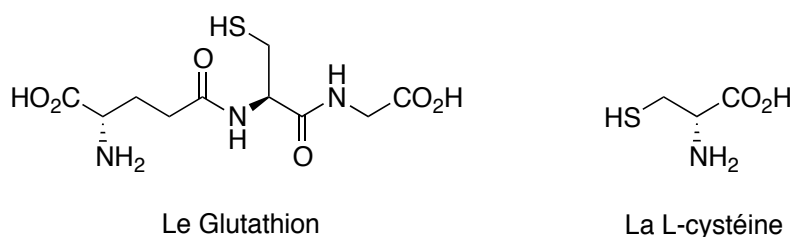


Figure 66. Structures du glutathion et la L-cystéine.

Après la découverte de la fosfomycine en 1969, MurA a été présentée comme une cible attractive et validée pour le développement de nouveaux agents antibactériens. Plusieurs inhibiteurs *in vitro* ont été rapportés dans la littérature¹⁷⁷ mais malheureusement, aucun ne cible spécifiquement MurA au niveau des cellules bactériennes¹⁷⁸.

2. Les cibles biologiques visées par notre équipe

2.1. La diaminopimélate épimérase DapF

2.1.1. Généralités et fonctionnement

La diaminopimélate épimérase DapF est l'unique membre de la famille des racémasas à ne pas être PLP dépendantes^{179,180}. Le phosphate de pyridoxal est le dérivé biologiquement actif de la vitamine B6 participe à la catalyse de réactions chimiques impliquant des acides aminés : transaminations, α - et β -décarboxylations, β - et γ -éliminations, racémisations¹⁸¹ (Figure 67).

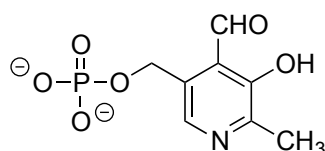


Figure 67. Structure du phosphate de pyridoxal.

En plus d'être PLP-indépendante, DapF n'a pas besoin d'ions métalliques ni d'autres cofacteurs pour fonctionner. Une étude menée par Wiseman et Nichols¹⁸² a montré qu'il n'y avait aucune perte d'activité de l'épimérase en présence d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), un ligand hexadente complexant les ions métalliques comme Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} . De plus, les auteurs relatent qu'aucune inhibition n'a été observée avec une concentration élevée (10 mM) de 1,10-phénantroline, un ligand bidentate, formant des complexes stables avec le fer (Figure 68).

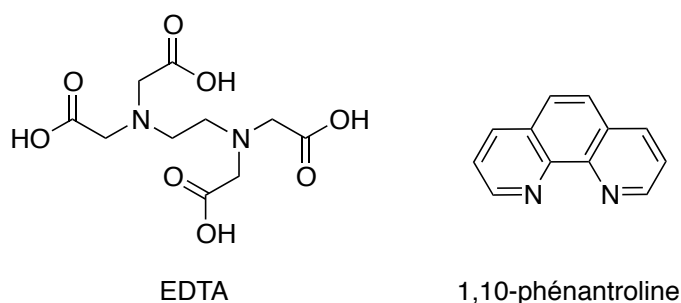


Figure 68. Structures de l'EDTA et de la 1,10-phénantroline.

L'activité de DapF se traduit par l'inversion d'un centre asymétrique du LL-DAP pour conduire au *méso*-DAP (*méso*-A₂pm dans certaines publications) (Figure 69)¹⁸³. Le *méso*-DAP est l'un des précurseurs fondamentaux dans la formation de la paroi cellulaire et plus particulièrement dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane.

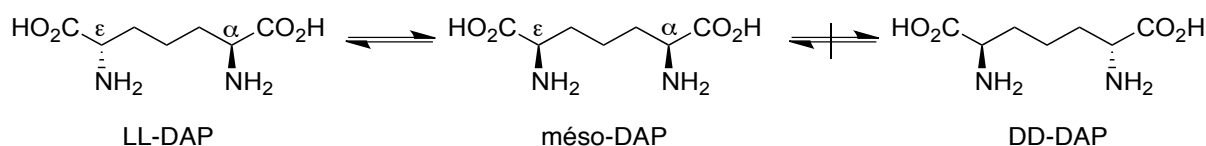


Figure 69. Épimérisation du LL-DAP.

L'épimérase DapF fonctionne comme d'autres racémases : la proline, la glutamate et l'aspartate racémases. Cependant, comparé aux autres enzymes, le substrat naturel de DapF est un diaminodiacide (LL-DAP). Il y a donc une discrimination faite au niveau des deux carbones asymétriques, confirmée par le fait que le DD-DAP n'est pas un substrat de l'enzyme¹⁸⁴. Des études de modélisation moléculaire¹⁸⁵ ont confirmé que la configuration L du carbone distal (carbone ε : non réactif), était indispensable pour la reconnaissance du substrat puisqu'il y a formation d'un réseau d'interactions spécifiques et importantes avec les résidus du site actif. L'activité de l'épimérase DapF, est basée sur un mécanisme « two-base », dans lequel deux bases (résidus cystéines) agissent de façon coordonnée. Le premier résidu cystéine (Cys73), sous forme thiolate, agit comme une base pour déprotoner le carbone à épimériser. Ensuite, le deuxième résidu (Cys217) agit comme un acide, sous forme thiol, pour reprotoner l'intermédiaire plan sur la face opposée (Figure 70)¹⁸⁶.

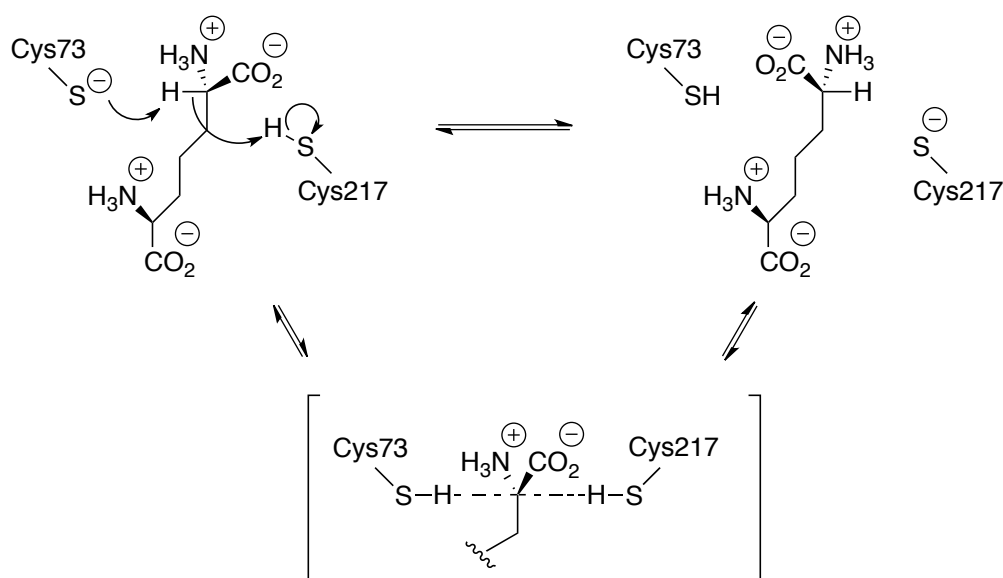


Figure 70. Mécanisme de l'épimérase DapF.

Cependant, le pKa du proton en α est d'environ 21 pour la forme totalement protonée et d'environ 29 pour la forme zwitterionique. Ainsi, l'implication d'une base telle que la cystéine, avec un pKa d'environ 8-10 est surprenante. En 2006, B. Pillai et ses collaborateurs¹⁸⁷ ont identifié plusieurs facteurs pouvant expliquer ce phénomène:

- les interactions électrostatiques au niveau du site actif conduisent à un alignement idéal pour arriver à l'état de transition.

- l'environnement électrostatique au niveau du carboxylate du Ca disperse probablement la charge négative beaucoup plus efficacement que la protonation ne le fait, permettant ainsi une baisse du pKa.

- l'inclusion du substrat au niveau du site actif a pour effet d'exclure l'eau, permettant ainsi de placer le ligand dans une cavité anhydre, ce qui conduit à l'augmentation de la basicité de la fonction thiolate.

- au niveau du site actif, le substrat réalise de nombreuses liaisons hydrogènes permettant ainsi une stabilisation de celui-ci. Cela a pour effet de minimiser au maximum les mouvements moléculaires du ligand, ce qui évite toute interférence lors de l'épimérisation.

Ainsi, ces différentes études sont un bon point de départ pour le développement de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'épimérase DapF.

2.1.2. Les inhibiteurs de l'épimérase DapF connus de la littérature

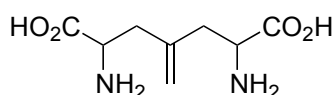
Pendant près d'une vingtaine d'années, plusieurs équipes de recherche vont imaginer, synthétiser plusieurs analogues de l'acide diaminopimélique (DAP) et les tester en tant que potentiels inhibiteurs de DapF¹⁸⁸. À ce jour et à notre connaissance, aucune molécule n'est présente sur le marché ou même en phase de tests cliniques^{180,189}.

En 1986, J. M. Girodeau et ses collaborateurs¹⁹⁰ ont synthétisé une série de diaminodiacides vinyliques, comme potentiels inhibiteurs irréversibles de DapF. La conception de ces molécules était basée sur deux critères :

- l'augmentation de la rigidité de la molécule pour faire apparaître une meilleure affinité pour l'enzyme.

- induire un mécanisme original d'inhibition dû à la présence de cette insaturation.

Le composé **96**, sous forme de 3 stéréoisomères, présente une faible activité inhibitrice avec un K_i de 0,95 mM¹⁹¹ (Figure 71).



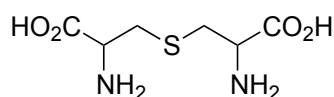
96

$K_i = 0,95 \text{ mM}$

(DapF *Escherichia coli*)

Figure 71. Structure du composé 96.

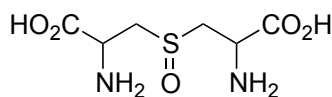
D'autres composés possédant des modifications au niveau de la chaîne latérale ont été développés par la même équipe de recherche¹⁹¹. Des dérivés soufrés de l'acide diaminopimélique ont été envisagés. L'augmentation du degré d'oxydation de la fonction thioéther fait diminuer l'activité des composés (Figure 72).



97

$K_i = 0,18 \text{ mM}$

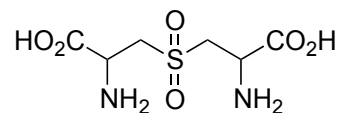
(DapF *Escherichia coli*)



98

$K_i = 11 \text{ mM}$

(DapF *Escherichia coli*)



99

$K_i = 21 \text{ mM}$

(DapF *Escherichia coli*)

Figure 72. Structures des composés 97-99.

Au vu des faibles résultats obtenus avec la modification de la chaîne latérale, l'équipe de Vederas¹⁹¹ a entrepris des modifications au niveau d'une des deux fonctions amines. Le composé *N*-hydroxylé **100** (mélange d'isomères) est un inhibiteur compétitif de DapF, alors que l'hydrazine **101** présente une faible activité (Figure 73). D'après les auteurs, une élimination d'eau se produit au niveau de la fonction *N*-hydroxylée, en formant l'imine **102**, conduisant à une réaction réversible avec une base du site actif de l'enzyme.

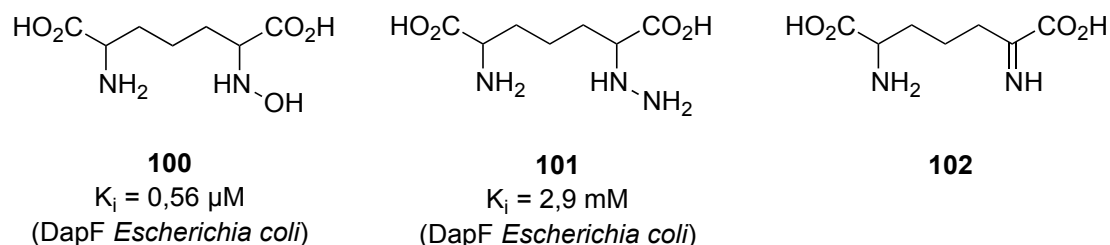


Figure 73. Structures des composés 100-102.

En 1988, R. J. Baumann et ses collègues¹⁹² ont décrit la synthèse du 3-chloro-DAP **103**, sous forme racémique (Figure 74). Le mécanisme d'inhibition de cette molécule est probablement dû à une élimination d'acide chlorhydrique formant l'énamine **104**. Par la suite, l'élimination d'une fonction amine conduit à la formation de l'imine cyclique **105**.

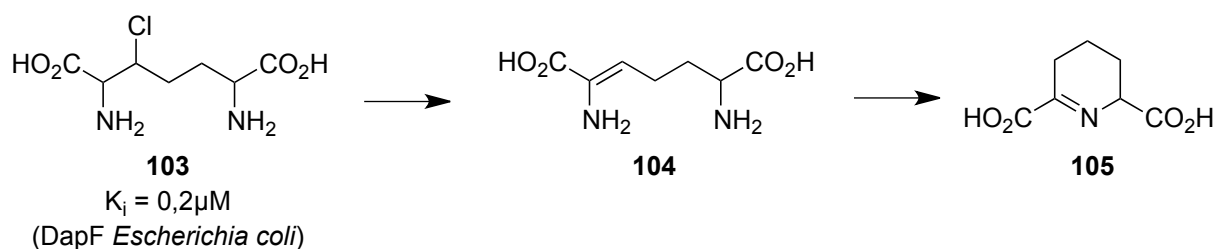


Figure 74. Structures des composés 103-105.

Au début des années 1990, une étude menée par F. Gerhart et ses collaborateurs¹⁹³ va confirmer la présence d'un résidu cystéine (Cys73) dans le site actif de l'épimérase^{180,194}. Le résidu cystéine va se lier de manière irréversible à l'inhibiteur **106** (Azi-DAP) conduisant à l'ouverture du cycle aziridine (Figure 75).

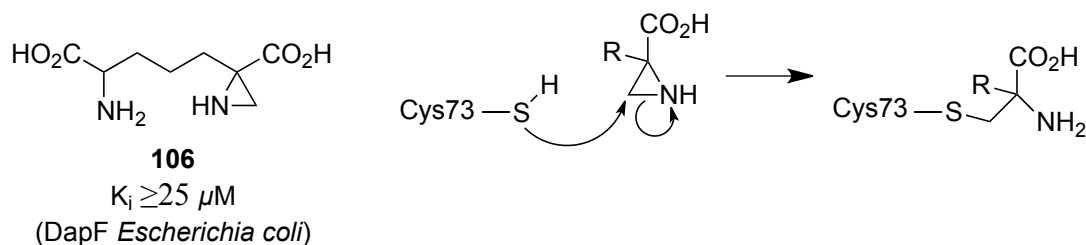


Figure 75. Structure et mécanisme d'inhibition de l'Azi-DAP 106.

Dans le même laps de temps, M. H. Gelb et ses collaborateurs¹⁹⁵ vont synthétiser des analogues fluorés en position β de la fonction acide carboxylique sous forme énantiomériquement pure (Figure 76), possédant une configuration fixe sur le carbone en position 6. Les quatre diastéréoisomères présentent une bonne activité inhibitrice avec une CI_{50} compris entre 4 et 25 μM . D'un point de vue mécanistique, l'élimination de HF est catalysée par l'épimérase conduisant au même composé **104** décrit par Baumann (Figure 74).

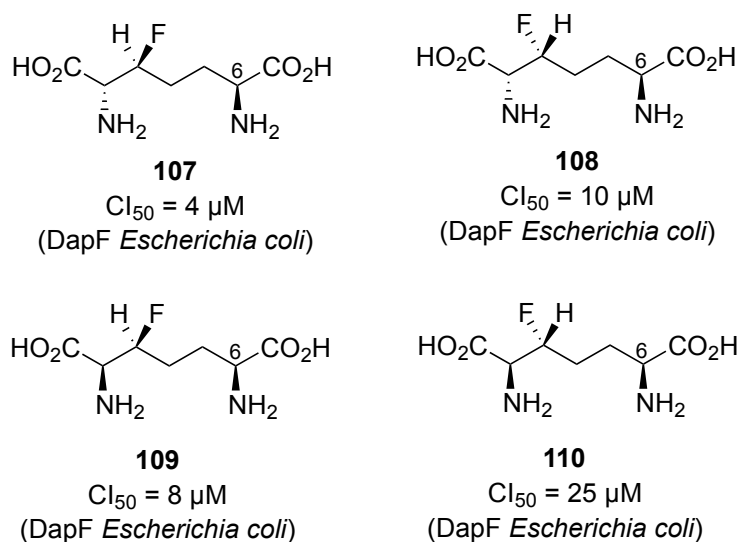


Figure 76. Structures des composés 107-110.

Le terme de bioisostère a été introduit la première fois par Friedman¹⁹⁶. Ce concept est basé sur le remplacement d'un atome ou groupe d'atomes, dans le but de modifier l'activité biologique ou donner une réactivité différente à ce composé. La définition de ce principe a été exemplifiée par Burger¹⁹⁷ qui définit la notion de bioisostérie par : « Les bioisostères sont des composés ou groupes qui possèdent des volumes et des surfaces moléculaires quasi égaux, qui présentent une distribution électronique et des propriétés physiques similaires, telle que l'hydrophobie ».

Une autre stratégie pour le développement d'inhibiteurs analogues du DAP a été développée par Y. Song et *al.*¹⁹⁸. Leurs travaux reposent sur la synthèse de bioisostères du DAP comportant une fonction acide phosphonique (Figure 77). Dans certains cas, ce changement de groupement a été couronné de succès¹⁹⁹. Cependant, pour les quatre phosphonates analogues du DAP, l'activité biologique sur DapF est très faible.

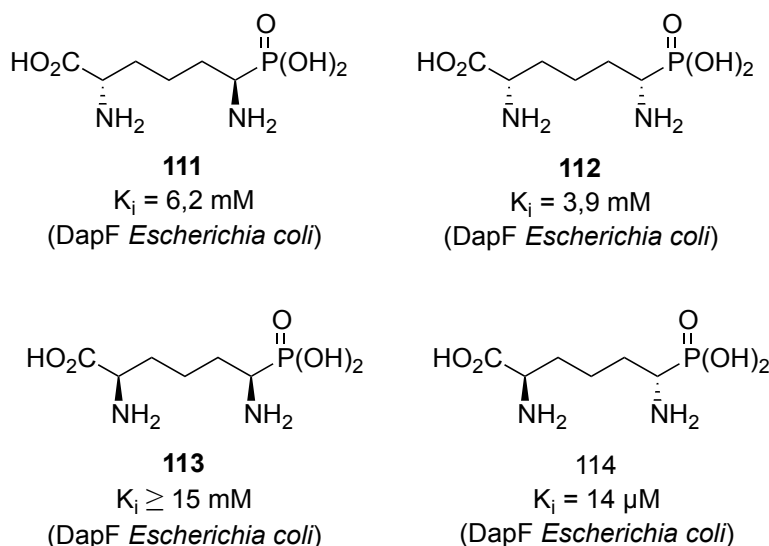


Figure 77. Structures des composés 111-114.

En 1994, S. D. Abbott et ses collaborateurs²⁰⁰ se sont inspirés de travaux décrivant une série d'inhibiteurs hétérocycliques biologiquement actifs sur la proline racémase pour développer des produits similaires. Néanmoins, aucun de ces composés ne montre une activité intéressante sur DapF due, selon les auteurs, à une exigence conformationnelle trop importante du cycle à cinq chaînons ou à une impossibilité de la part des substituants d'être dans une conformation appropriée au niveau du site actif (Figure 78).

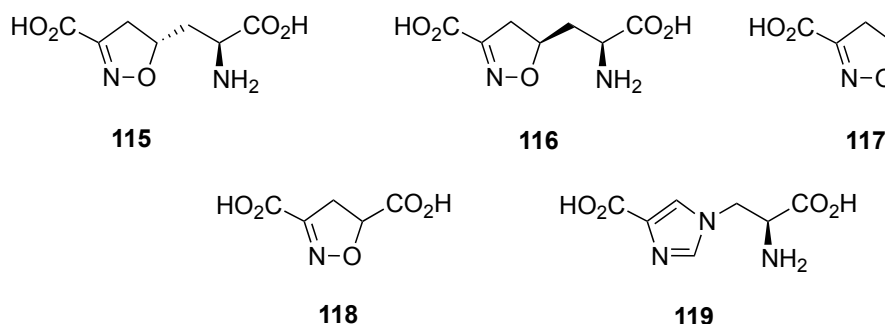


Figure 78. Structures des composés 115-119.

R. M. Williams et ses collaborateurs²⁰¹ ont développé de nouveaux analogues contraints, par l'incorporation d'un motif cyclopropane dans la chaîne latérale, par couplage entre un dérivé phosphonate et un dérivé aldéhydique, suivie d'une réaction de Emmons-Horner-Wadsworth. Par la suite, une réaction en présence de lithium et d'ammoniac (Li/NH₃) conduit à la formation du cycle cyclopropane. Les deux composés (2*S*,3*S*,6*S*)-**120** et (2*R*,3*R*,6*S*)-**120** obtenus après déprotection des fonctions amines et acides carboxyliques présentent une faible activité sur DapF (Figure 79).

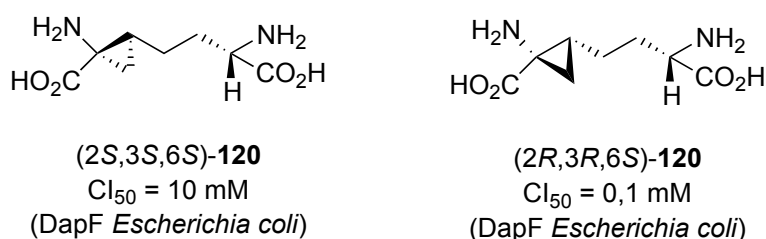


Figure 79. Structures des deux isomères du composé 120.

En 2000 et 2005, le groupe de recherche dirigé par Vederas a développé deux séries d'inhibiteurs de DapF^{202,203}. Dans une première stratégie, les auteurs ont développé des molécules semblables aux substrats naturels de trois enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane : DHDP réductase, DAP déhydrogénase et DAP épimérase (Figure 80). Cependant, sur la dernière cible, la molécule **121** ne présente pas d'activité et l'amide vinylique **122** n'est que faiblement actif.

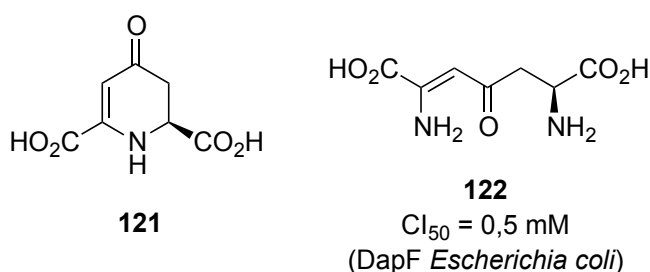


Figure 80. Structures des composés 121 et 122.

La deuxième stratégie mise en place repose sur la synthèse de nouvelles aziridines (Figure 81), basée sur les travaux de Gerhart¹⁹³ présentés précédemment (Figure 75). Les essais préliminaires de diffraction aux rayons X ont montré que les deux diastéréoisomères **123** et **124** étaient liés de manière covalente au résidu Cys73 et Cys217 du site actif de DapF

(*Haemophilus influenza*). Ainsi, ce mécanisme d'inhibition est en accord avec le mécanisme « two-base » proposé pour l'enzyme DapF.

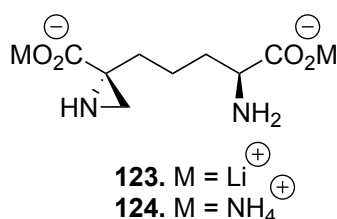


Figure 81. Structures des composés 123 et 124.

Une étude, développée en 2002 par R. J. Cox et deux collaborateurs²⁰⁴ s'est intéressée là aussi aux travaux de Gerhart¹⁹³ (Figure 75) en développant un analogue comportant un époxyde à la place de l'aziridine (Figure 82). Les auteurs affirment que l'époxyde **125** inhibe DapF mais du fait de la faible stabilité de ce composé, la structure cristalline n'a pas pu être obtenue.

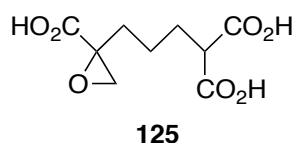


Figure 82. Structures du composé 125.

Depuis près de 10 ans, aucune nouvelle structure analogue du DAP ou autres n'a été publiée. Cela laisse la voie assez libre pour les équipes de recherche travaillant sur cette enzyme. Cependant, même au vu des maigres résultats reportés sur le développement d'analogues du DAP comme inhibiteurs potentiels de DapF, cette stratégie thérapeutique reste cohérente.

2.2. La famille des ligases Mur

2.2.1. Généralités

La biosynthèse du peptidoglycane est un processus multi-étapes complexe (Figure 83). La famille des ligases Mur (MurC, MurD, MurE et MurF), appelées aussi enzymes cytoplasmiques ATP-dépendante, catalyse la formation d'une courte chaîne peptidique (5 résidus d'acides aminés) au niveau du groupe carboxyle du précurseur nucléotidique UDP-MurNAc (UDP-*N*-acétyl-acide muramique)¹³³.

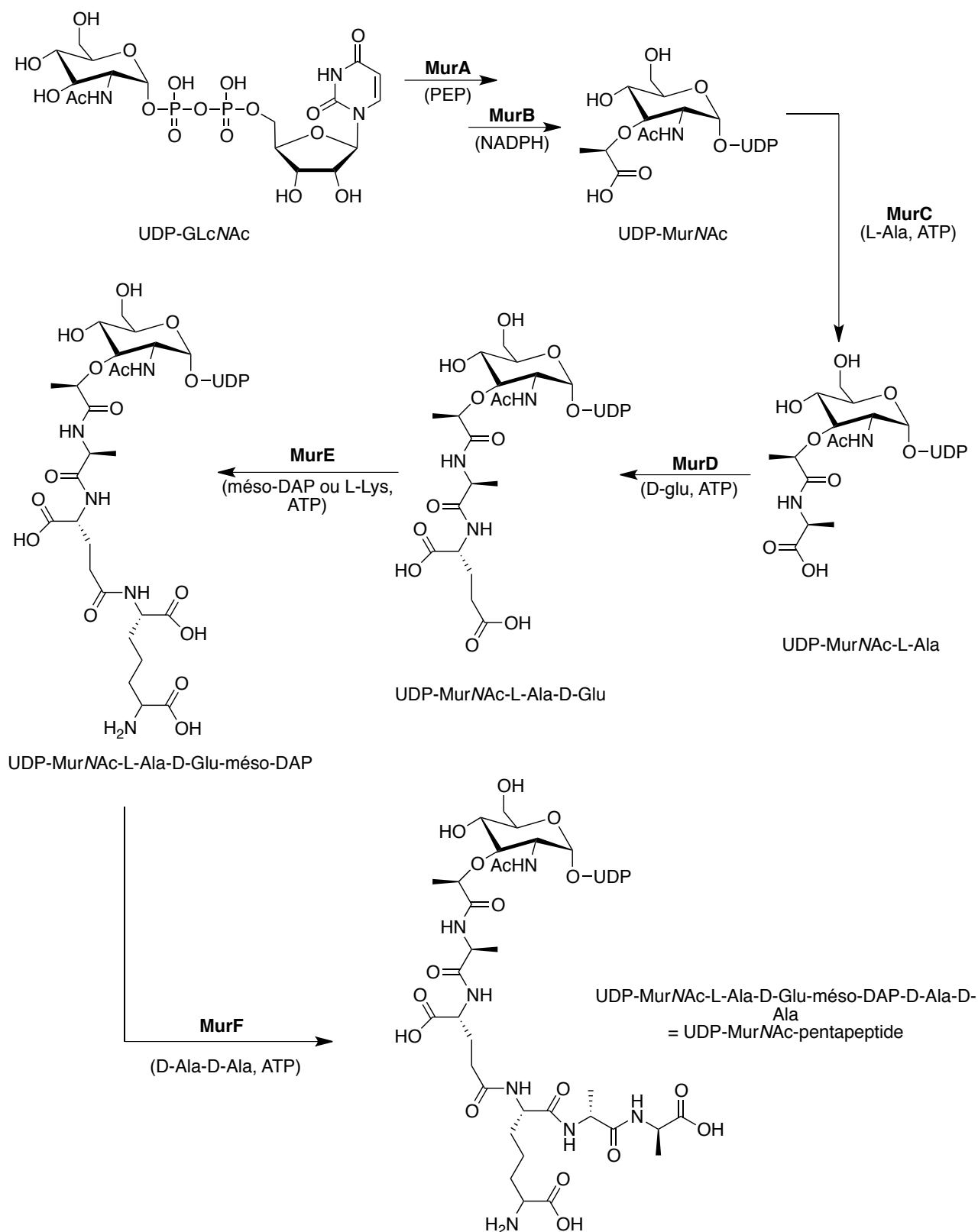


Figure 83. Étapes cytoplasmiques de la biosynthèse du peptidoglycane catalysées par les enzymes Mur²⁰⁵.

Les additions stéréospécifiques conduites par ces enzymes conduisent à l'ajout d'une molécule de L-alanine à l'acide muramique (catalysé par MurC) et de l'acide D-glutamique (catalysé par MurD). Le troisième acide aminé ajouté (catalysé par MurE) diffère suivant la bactérie. Chez les bactéries à gram-positif, celui-ci est d'ordinaire une molécule de L-lysine. Alors que chez les bactéries à gram-négatif (mycobactéries ou bacilles), une molécule d'acide diaminopimélique est présente. À ce stade, l'intermédiaire formé est communément appelé UDP-*N*-acétyl-muramoyl-tripeptide (UDP-MurNAc-tripeptide). Enfin, un dimère de D-alanine, formé en amont par action de deux enzymes sur la L-alanine, est incorporé et conduit à l'intermédiaire peptidique final : UDP-*N*-Acétyl-muramoyl-pentapeptide^{132,206}.

2.2.2. Fonctionnement et similitudes

Plusieurs études ont été menées depuis une vingtaine d'années pour comprendre le mode de fonctionnement des enzymes Mur et permettre le développement rationnel d'inhibiteurs. Ainsi, quatre caractéristiques communes caractérisent la famille des ligases Mur ATP-dépendante²⁰⁷ :

i - les quatre enzymes (MurC à MurF) fonctionnent de la même façon. Dans un premier temps, l'activation du groupe carboxylate de la chaîne peptidique est réalisée par transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP, conduisant à l'intermédiaire phosphonique **B**^{208,209}. Dans un second temps, l'intermédiaire tétraédrique **C** est formé par attaque nucléophile d'une fonction amine sur le groupement carbonyle. Cet intermédiaire tétraédrique finit par se dissocier pour conduire à la formation d'une liaison amide ou peptidique et d'un phosphate inorganique (Figure 84)²¹⁰.

Lors de la première étape, c'est-à-dire pendant la formation de l'intermédiaire acyl-phosphate **B**, deux cations Mg^{2+} sont présents et forment des liaisons avec les charges négatives du substrat et les groupements phosphates de l'ATP, chargés eux-aussi négativement. L'intervention des deux cations facilite la liaison du substrat et la phosphorylation du groupe carboxylate de ce dernier. Le premier cation Mg^{2+} est situé entre les groupements β et γ -phosphate de l'ATP alors que le deuxième est situé entre l'ADP et le substrat^{211,212}.

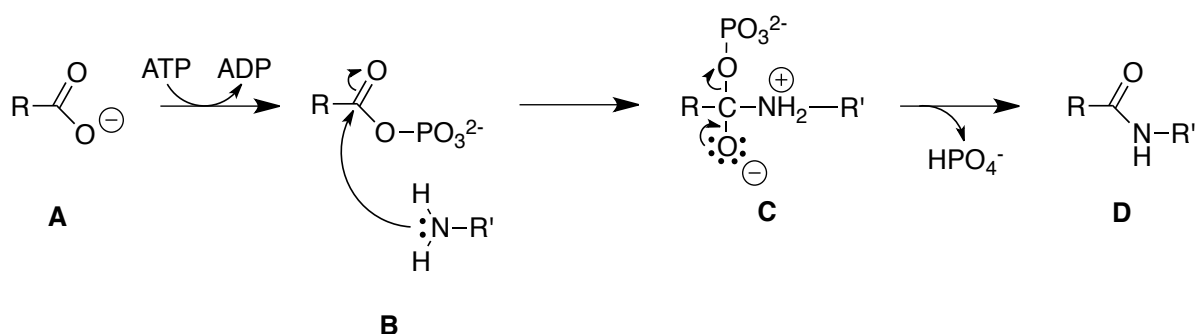


Figure 84. Mécanisme de fonctionnement des ligases MurC à MurF.

ii - l'alignement et la comparaison de plusieurs structures des ligases Mur ont révélé la présence de sept résidus invariants ainsi qu'une séquence consensus (séquence correspondant à un motif retrouvé dans plusieurs protéines exerçant la même fonction) pour le site de liaison de l'ATP²¹³.

iii - ces enzymes existent sous deux formes^{207,214} : une forme ouverte (en l'absence de substrat) et une forme fermée lorsque le complexe est entièrement formé (liaisons de l'ATP et du précurseur UDP). Pour former un site actif, la structure sous forme ouverte doit subir des réarrangements importants lors de la liaison du substrat. Une rotation des domaines C-terminal et N-terminal en direction du domaine central est entreprise pour mener à la formation de la forme fermée. À ce stade, l'ATP est idéalement orientée, permettant la formation d'un intermédiaire phosphate. Pour finir, l'acide aminé (ou dipeptide pour MurF) peut alors réaliser une attaque nucléophile résultant en la stabilisation de l'intermédiaire formé et l'accélération de la catalyse.

iv - les ligases Mur partagent une architecture tridimensionnelle semblable. Chaque ligase est composée de trois domaines distincts (Figure 85)²¹⁵ : le domaine N-terminal est impliqué dans la liaison de la chaîne peptidique du précurseur UDP, le domaine central est impliqué dans la liaison de l'ATP et le domaine C-terminal est impliqué dans la liaison de l'acide aminé correspondant ou dans la liaison du dipeptide (MurF).

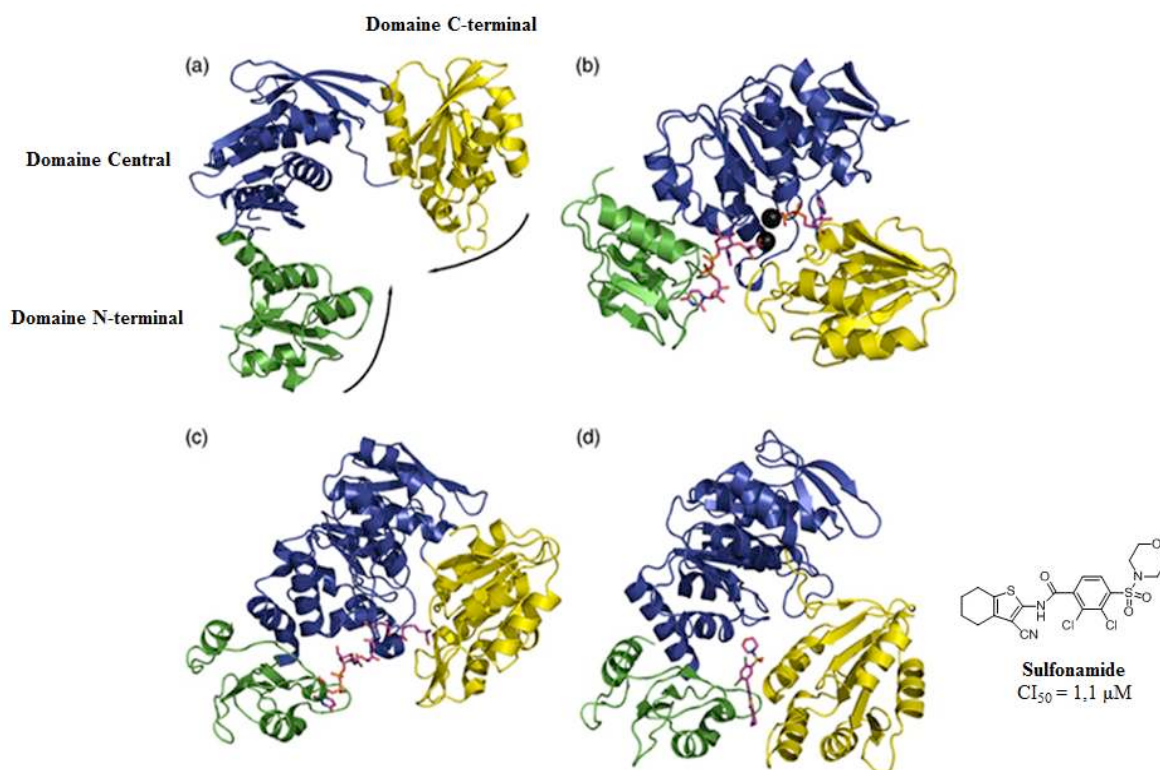


Figure 85. Structures 3D des Mur ligases²⁰⁷. (a) MurC (*Haemophilus influenzae*) sous sa forme ouverte. Les flèches noires représentent le mouvement des deux domaines N-terminal et C-terminal. (b) MurD (*Escherichia coli*) sous sa forme fermée, en complexe avec l'UDP-MurNAc-L-Ala, l'ADP et un cation Mg^{2+} . (c) MurE (*Escherichia coli*) sous sa forme fermée, en complexe avec l'UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mésoDAP. (d) MurF (*Streptococcus pneumoniae*) sous sa forme fermée, en complexe avec un inhibiteur de type sulfonamide.

2.2.3. Le cas particulier : MurE

Lors des étapes cytoplasmiques, l'ajout du troisième acide aminé au niveau de la chaîne peptidique est réalisé par MurE. Pour les ligases spécifiques du méso-DAP, un résidu arginine (Arg^{416}) est commun à toutes les structures. Celui-ci réalise des liaisons hydrogènes avec le groupement carboxylate du carbone distal du méso-DAP (Figure 86). Pour les enzymes spécifiques de la L-lysine, l'arginine est remplacée par une alanine (Ala^{416}) ou une asparagine (Asn^{416}). Ce changement d'acide aminé pourrait expliquer en grande partie cette différence de sélectivité²¹⁶.

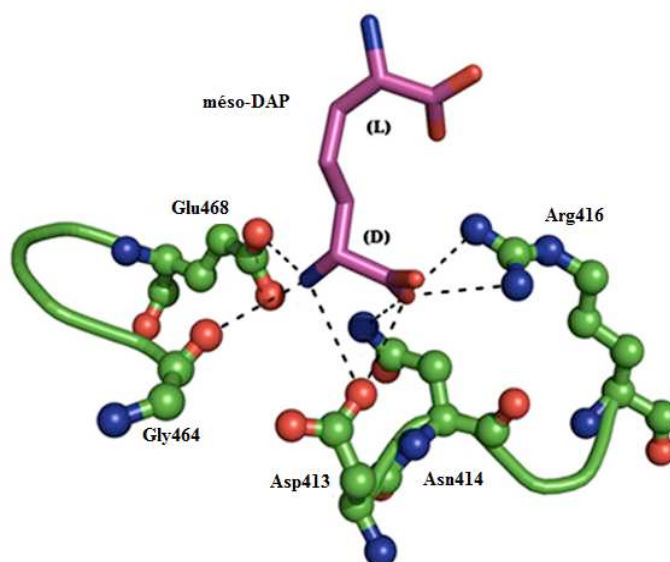


Figure 86. Interactions entre le carbone distal du *méso*-DAP et MurE (*Escherichia coli*)²⁰⁷.

2.2.4. Les inhibiteurs de la ligase MurE

La famille des ligases Mur (MurC, MurD, MurE et MurF) catalyse les quatre dernières étapes cytoplasmiques de la formation du précurseur UDP-NAc-pentapeptide. Un nombre important d'inhibiteurs ciblant ces enzymes de manière spécifique a été rapporté dans la littérature, malheureusement, aucun ne présente les caractéristiques attendues pour un futur développement. En effet, dans beaucoup de cas, l'activité inhibitrice présentée n'est pas en corrélation avec les valeurs obtenues pour l'activité antibactérienne¹⁷⁷. Les inhibiteurs de la ligase MurE peuvent être séparés en trois catégories, selon leur origine (naturelle ou synthétique) mais aussi en fonction de leur structure.

2.2.4.1. Les inhibiteurs analogues de l'acide diaminopimélique

Les molécules présentant une structure analogue à l'acide diaminopimélique ont été les premiers inhibiteurs à être publiés dans la littérature. Dans les années 2000, Assche et ses collaborateurs vont développer plusieurs séries d'inhibiteurs basées sur ce principe. En 1991, la synthèse de dérivés mono- et di-phosphoniques ainsi que des homologues *N*-alkyles seront synthétisés mais ne présenteront pas d'activité inhibitrice sur MurE, ni une quelconque activité antibactérienne contre des bactéries à gram-positif et gram-négatif (Figure 87)²¹⁷.

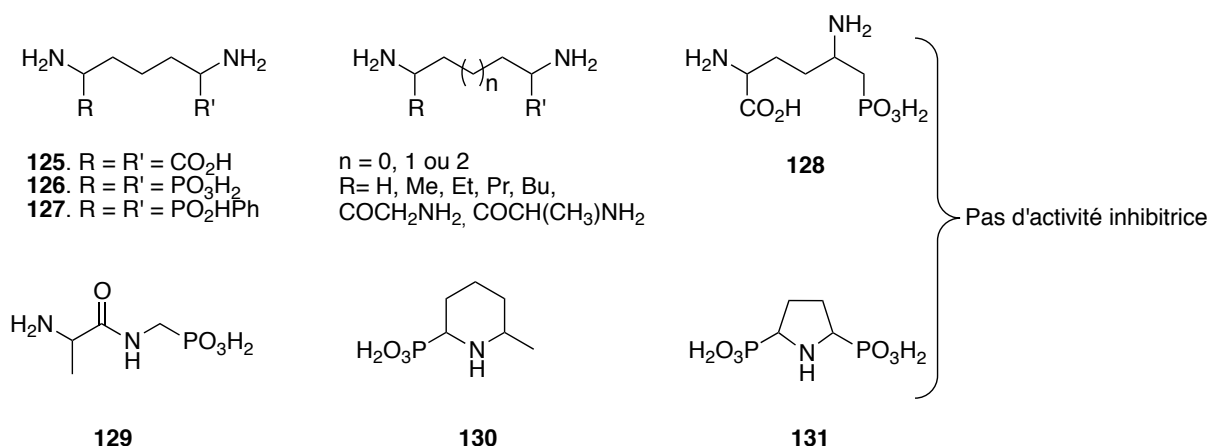


Figure 87. Molécules analogues du DAP ne présentant pas d'activité biologique.

Cinq années après ces maigres résultats (30 molécules développées sans activité), des tests d'inhibitions vont être entrepris sur des dérivés présentant déjà une activité biologique sur des cibles similaires (DapF et l'enzyme décarboxylase LysA). Deux molécules **110** et **132** ont été décrites avec une inhibition modérée de la ligase MurE ainsi qu'une faible activité antibactérienne²¹⁸ (Figure 88).

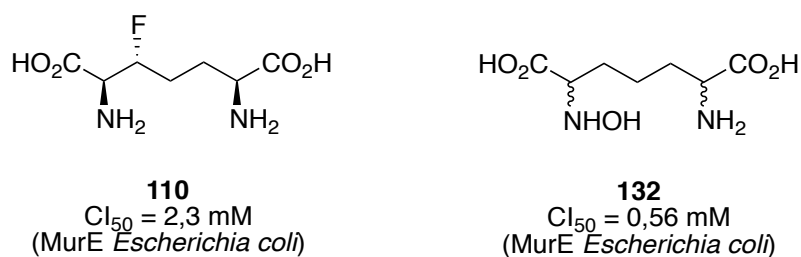


Figure 88. Structures des molécules 110 et 132.

Pour finir, des dérivés peptidiques²¹⁹ ont été synthétisés, montrant là aussi une faible activité inhibitrice (Figure 89). Les tests d'activité antibactérienne réalisés sur les molécules **133** et **134** ont donné des résultats négatifs.

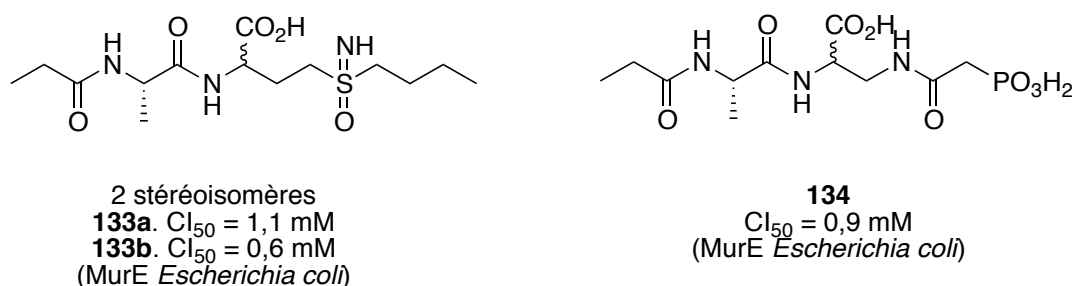


Figure 89. Structures des molécules 133 et 134.

2.2.4.2. Les inhibiteurs analogues de l'état de transition

La deuxième stratégie pour la conception d'inhibiteurs de la ligase MurE a été basée sur l'intermédiaire tétraédrique formé au cours des réactions catalysées par les enzymes de la famille des ligases Mur. D'autres équipes quant à elles, se sont focalisées sur le produit de la réaction formé par MurD (substrat de MurE).

Dans un premier temps, des analogues de l'état de transition tétraédrique de MurE ont été imaginés, synthétisés et évalués contre la ligase MurE (Figure 90). En 1998, Zeng et ses collaborateurs²²⁰ ont développé deux analogues de type phosphinate **135** et **136**, avec des CI_{50} de 1,1 μ M et de 0,7 μ M. La perte du fragment UDP au profit d'un groupement phosphonate résulte en une activité plus faible. En 2011, l'équipe de Zivec²²¹ va se baser sur une approche peptidomimétique et obtenir une série de molécules faiblement actives. Le meilleur taux d'inhibition sera de 63% à une concentration de 2 mM pour la molécule **137**.

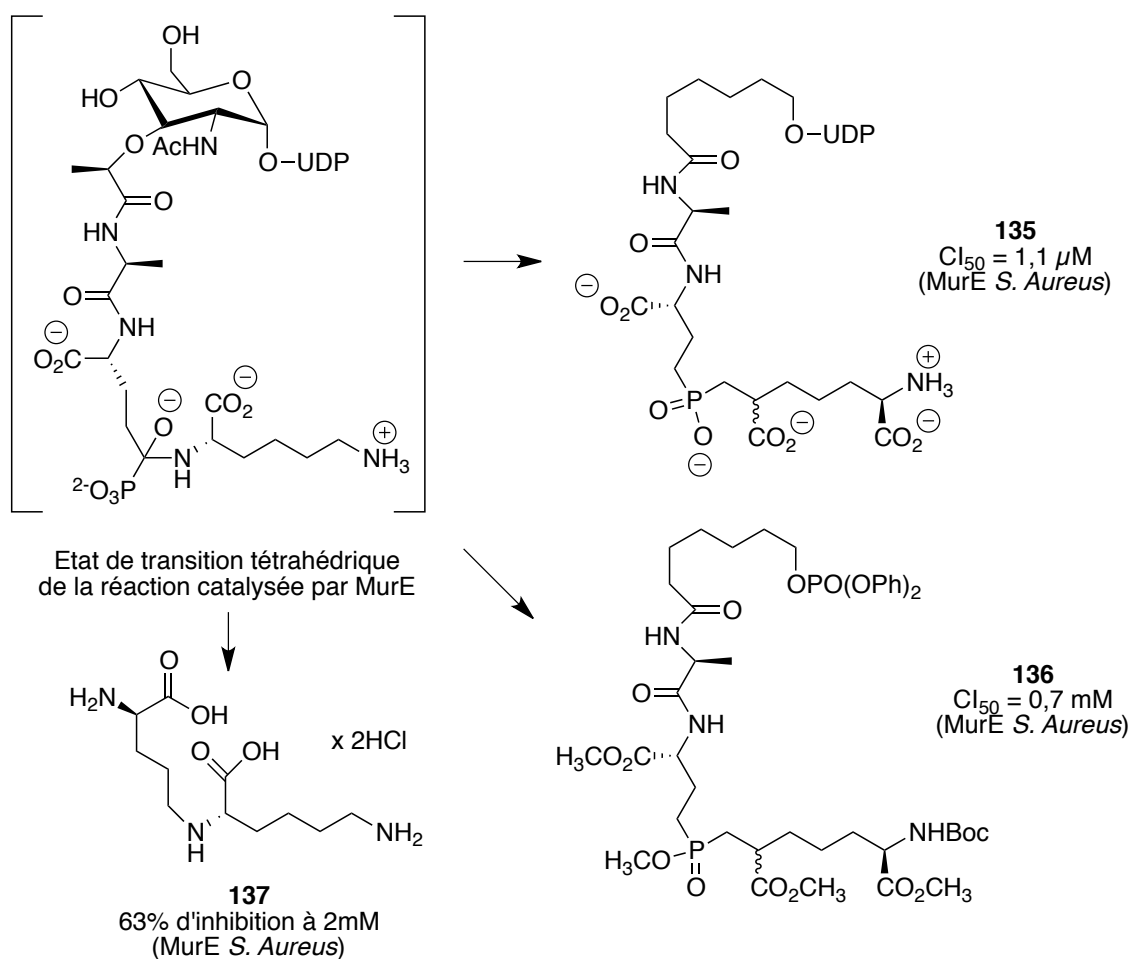


Figure 90. Structures des molécules 135-137.

Toujours dans l'optique de mimer l'état de transition, d'autres équipes vont développer de nouvelles molécules sans toutefois obtenir des résultats concluants. Les composés **138** et **141** développés respectivement par Humljan²²² et Sova²²³, présentent des bonnes activités inhibitrices sur MurD (181µM et 6µM) mais aucune donnée concernant une potentielle activité antibactérienne n'est référencée. Quant aux structures **139** et **140**, l'activité biologique est assez faible avec une CI_{50} de l'ordre de 500 à 1000µM^{224,225} (Figure 91).

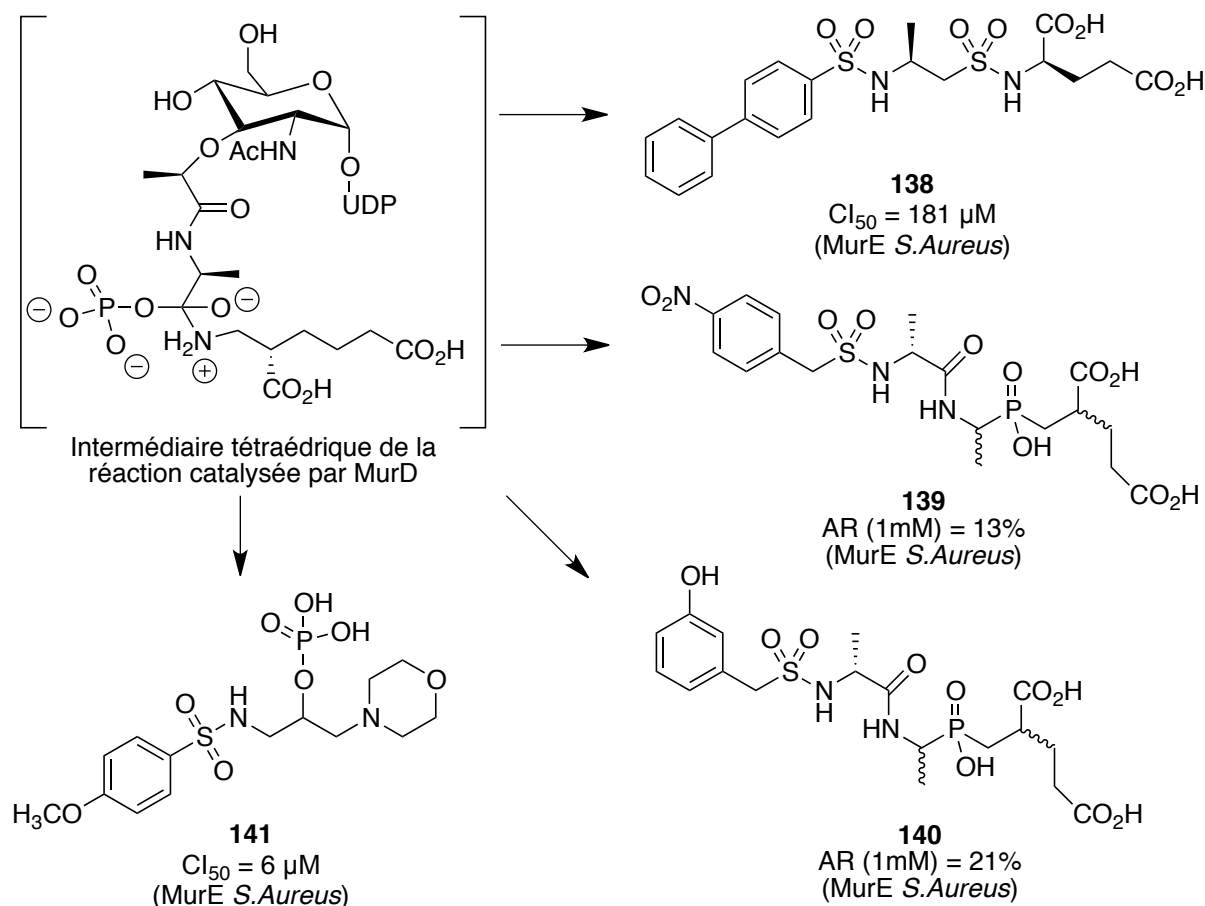


Figure 91. Structures des molécules 138-141.

2.2.4.3. Les inhibiteurs obtenus par modélisation moléculaire

Au cours des dernières décennies, les progrès rapides de l'informatique combinés à ceux de la biologie moléculaire et de la biochimie, ont permis l'émergence de nouvelles techniques permettant d'obtenir de façon rationnelle de nouveaux chefs de file²²⁶. Aujourd'hui, les techniques de « drug design » sont référencées en deux concepts :

- la structure de la protéine cible ou du site actif de celle-ci est connue : la reconnaissance de ligands connus et/ou nouveaux peut être entreprise.

- la cartographie en 3D de la cible n'est pas connue : une analyse comparative des molécules biologiquement actives et inactives est entreprise pour permettre de déterminer une potentielle complémentarité entre le substrat et le ligand.

Ainsi, ces nouvelles méthodes assistées par ordinateur ont joué un rôle majeur dans la découverte de petites molécules biologiquement actives²²⁷. L'obtention des structures cristallographiques des enzymes Mur, a permis à trois équipes de recherche le développement d'un nombre important d'inhibiteurs provenant de méthodes de criblage.

En 2007, Mansour et ses collaborateurs²²⁸ ont synthétisé des dérivés de l'acide tétronique (en bleu) substitué en position 5 par un groupement naphthyle et en position 3 par différents groupements aromatiques. L'activité biologique des composés a été évaluée sur un panel de 9 enzymes Mur. Les molécules **142** et **143** présentent des CI_{50} sur MurE (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) comprises entre 13 et 65 μM , conjuguées à une activité antibactérienne de 1 à 8 $\mu g.mL^{-1}$ (Figure 92).

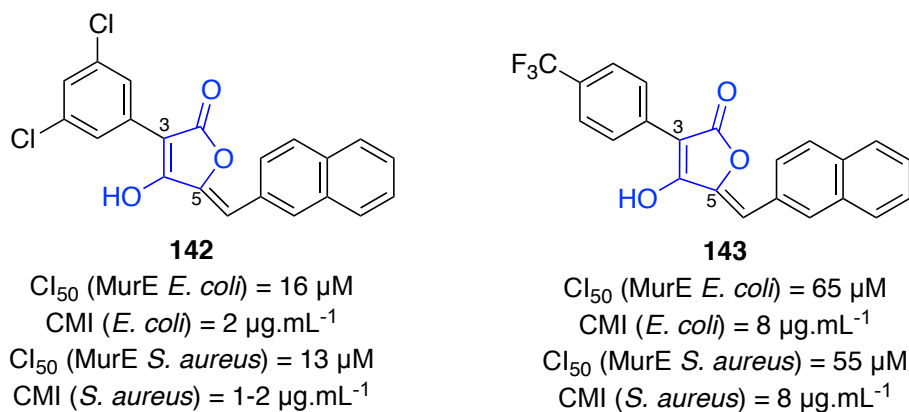


Figure 92. Structures des molécules 142 et 143.

En 2009, Mašić et ses collaborateurs²²⁹ vont publier une série d'inhibiteurs énantiomériquement purs, comportant un résidu acide glutamique. Une activité résiduelle importante sur la ligase MurE sera observée à une concentration de 250 μM (Figure 93).

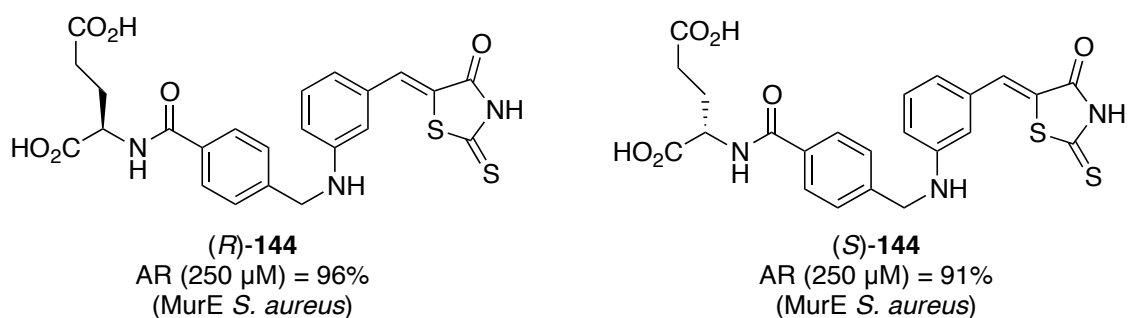


Figure 93. Structures des deux énantiomères du composé 144.

En 2012, une approche de modélisation moléculaire a été entreprise pour déterminer les optimisations structurales à apporter (Figure 94) :

- la modification du linker entre les deux cycles benzéniques
- la modification de la fonction thione par une cétone.

Ainsi, la simple modification de la position du linker a permis d'augmenter de façon importante l'inhibition sur MurE et d'obtenir une activité antibactérienne sur différentes souches de bactéries²³⁰.

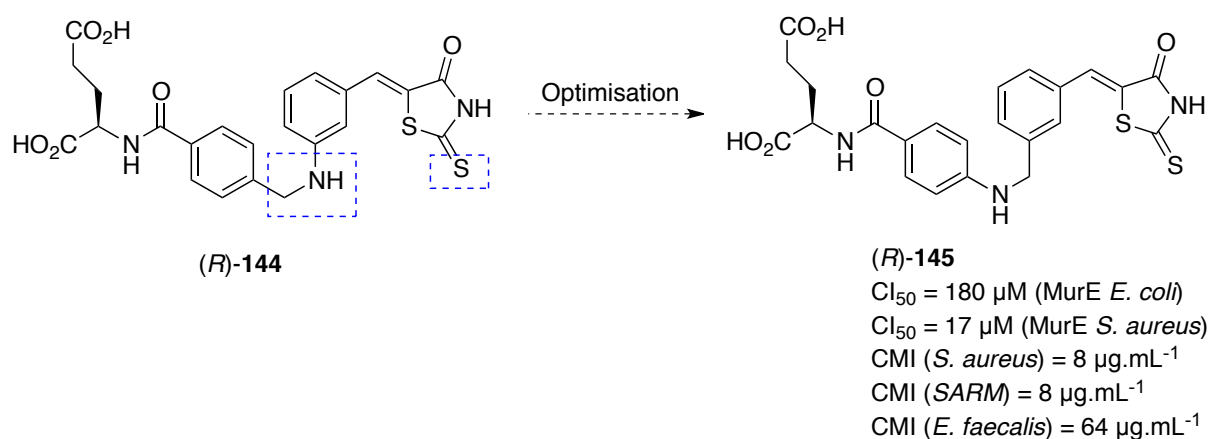


Figure 94. Modifications structurales du composé (R)-144.

Parallèlement à ces recherches, la même équipe a développé d'autres inhibiteurs, comportant pour la plupart un cycle rhodanine (en bleu). Ce motif présente plusieurs avantages : il est considéré comme un groupement mimétique au groupement phosphate et plusieurs molécules possédant ce motif ont été rapportées comme antibactériennes. En 2009, des molécules à base d'acide isophtalique (en rouge) et de cycle rhodanine ont montré une activité intéressante sur MurE avec des CI_{50} compris entre 32 et 104 μ M²³¹ (Figure 95).

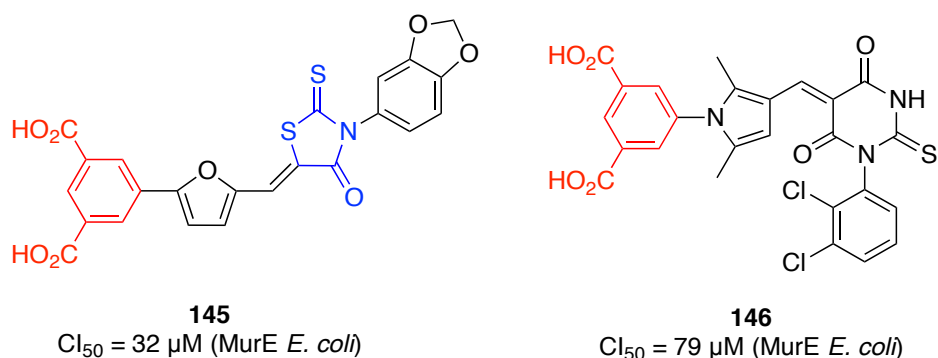


Figure 95. Structures des molécules 145 et 146.

Au vu des résultats, des modifications successives ont été entreprises pour augmenter l'affinité de ces molécules avec la ligase MurE²³². Ainsi, les modifications de l'acide isophthalique et du cycle pyrimidine n'ont pas eu de nette influence sur l'activité inhibitrice (Figure 96).

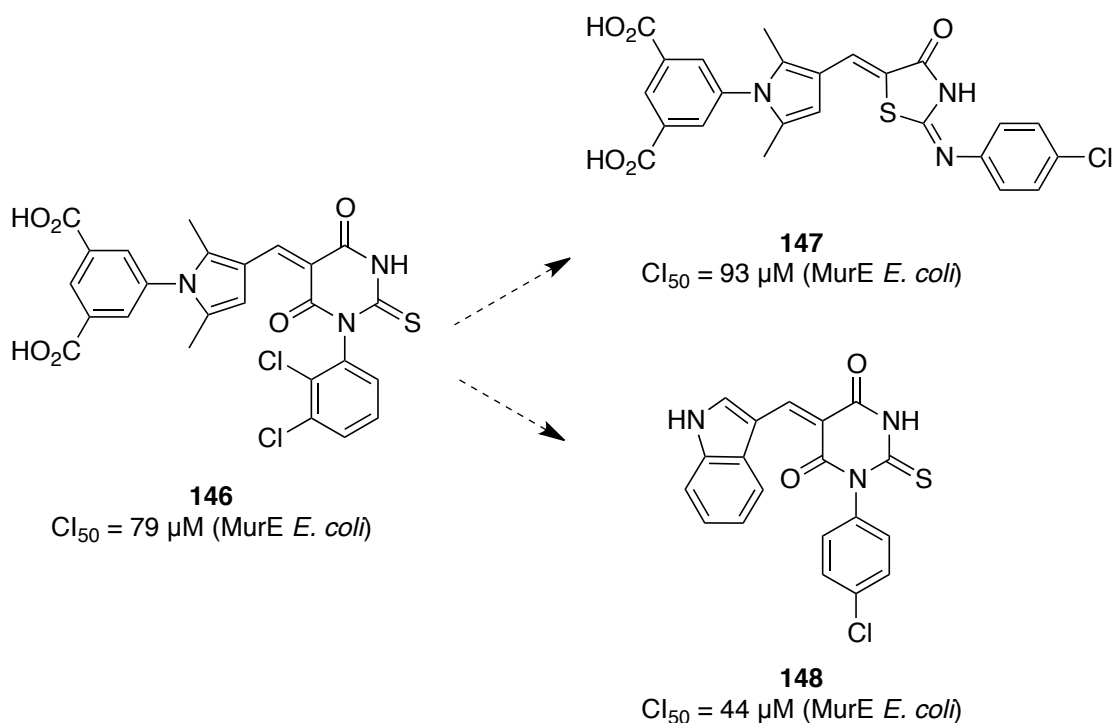


Figure 96. Structures des molécules 147 et 148.

Des modifications similaires ont été réalisées sur la molécule **145** (Figure 97). Les résultats obtenus montrent un meilleur taux d'inhibition avec un substituant nitro en para du cycle benzénique lié au cycle rhodanine et seulement une fonction acide, là aussi en para du cycle furane²³³.

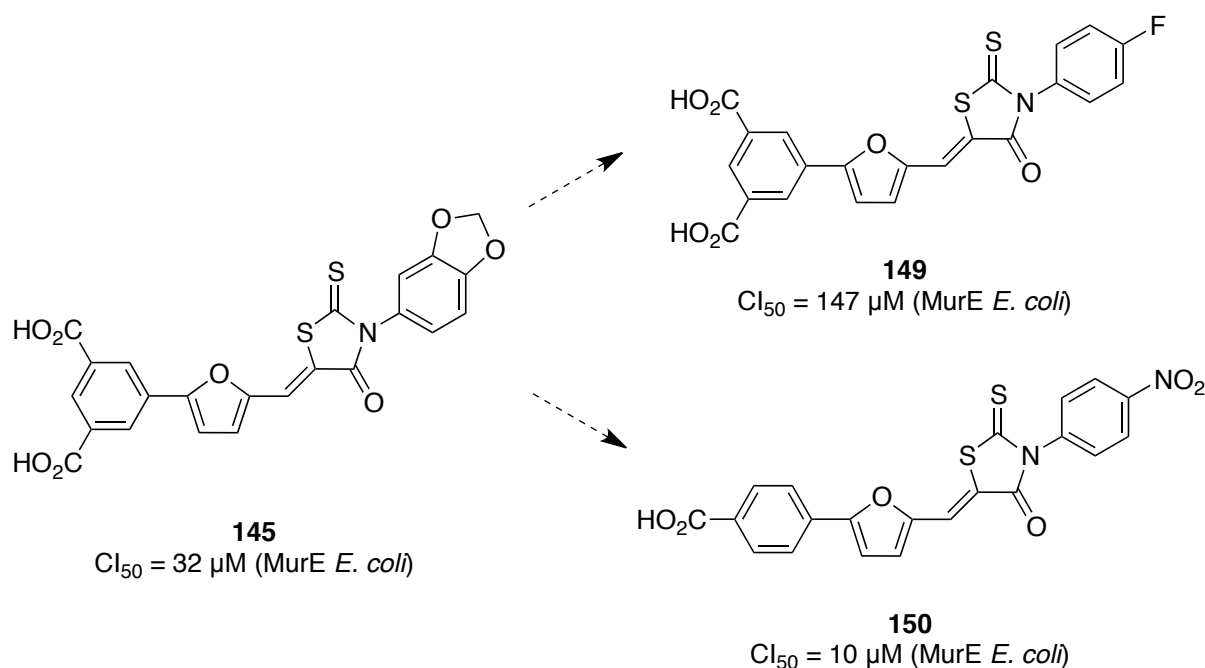


Figure 97. Structures des molécules 149 et 150.

En 2010, une série de molécules possédant une structure simplifiée à base de thiazolidine a été rapportée comme inhibiteurs de plusieurs ligases²³⁴. La substitution multiple du cycle benzénique par des fonctions phénols est justifiée par la possibilité de réaliser de multiples liaisons hydrogènes dans le site de liaison à l'ATP (Figure 98). Cependant, les valeurs de Cl₅₀ ne sont pas en accord avec les CMI mesurées.

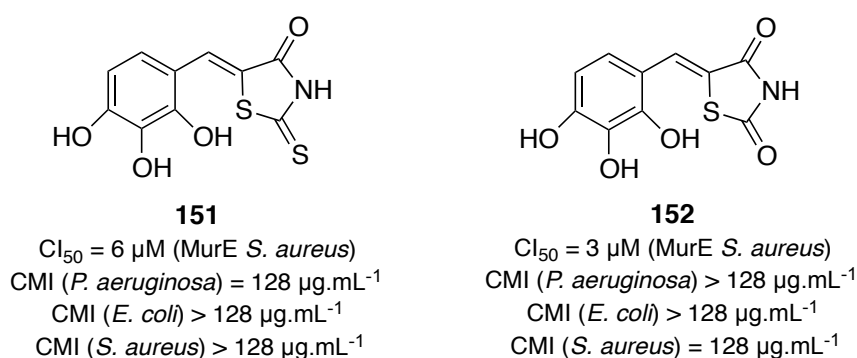
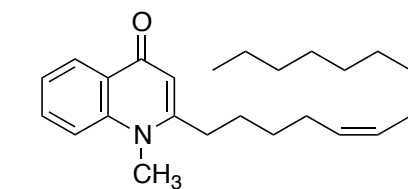


Figure 98. Structures des molécules 151 et 152.

La troisième équipe qui a développé des inhibiteurs de MurE par une approche de « drug design » est celle de Bhakta. Ces molécules comportent toutes un motif commun : *N*-méthyl-2-alcényl-4-quinolone. Le noyau quinolone a toujours suscité beaucoup d'intérêt dans l'industrie pharmaceutique. Cette structure, commune à toutes les fluoroquinolones, a connu

un essor considérable au début des années 1960 avec le développement d'une des plus importantes familles d'antibiotiques présente sur le marché²³⁵. Initialement isolées d'une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise (*Evodia rutaecarpa*)²³⁶, des équipes se sont intéressées à leur développement par voie chimique. En 2010, plusieurs molécules sont rapportées avec ce motif comme inhibiteurs de la ligase MurE²³⁷ comme la molécule **153** avec une CI_{50} de 95 μ M (Figure 99).



153

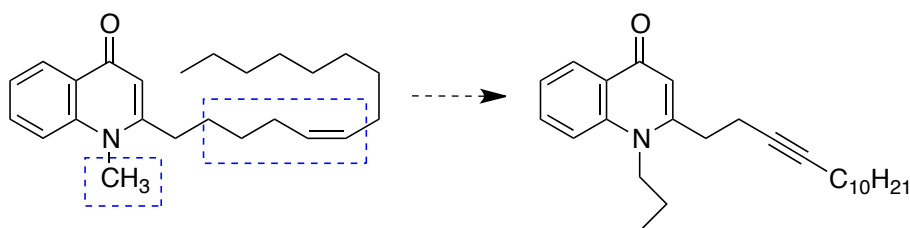
CI_{50} = 95 $\pm$ 9 μ M (MurE *S. aureus*)

CMI (*M. tuberculosis*) = 10 mg.L⁻¹

CMI (*S. aureus*) = 0,5-1 mg.L⁻¹

Figure 99. Structure de la molécule 153.

En 2012, des modifications structurales ont été entreprises afin de déterminer l'influence de chaque groupement. Au niveau de la chaîne alkyle, la double liaison a laissé place à une triple liaison. De plus, des variations du substituant *N*-alkyl ont été envisagées (Figure 100). Cependant, l'activité inhibitrice sur MurE ainsi que la CMI n'ont pas été améliorées²³⁸.



153

154

CI_{50} = 200 μ M (MurE *S. aureus*)

CMI (*S. aureus*) = 2-128 mg.L⁻¹

CMI (*M. smegmatis*) = 1 mg.L⁻¹

CMI (*M. fortuitum*) = 1 mg.L⁻¹

Figure 100. Modifications de la structure du composé 153.

La 3^{ème} contribution de cette équipe s'oriente sur le développement d'analogues de la (*S*)-leucoxine, une molécule isolée d'une plante colombienne (*Rhodostemonodaphne*

crenaticupula Madriñan) ayant montré une inhibition de la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*. Une approche biomimétique a été entreprise pour obtenir des structures avec un motif tétrahydroisoquinoline substitué en position 1. De plus, des dérivés sous forme racémique ont été développés. Les résultats obtenus montrent une corrélation plutôt intéressante entre les valeurs de CI_{50} et les CMI obtenues²³⁹ (Figure 101).

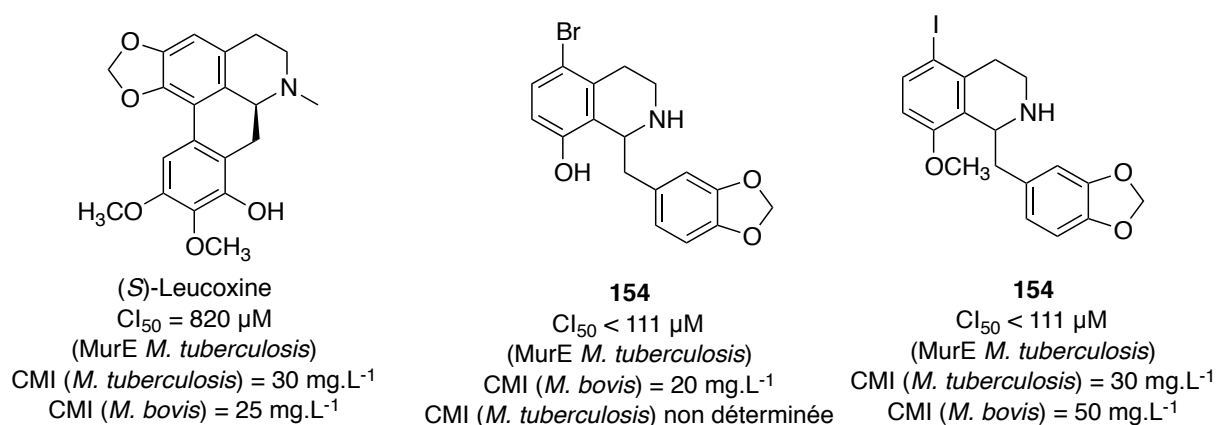


Figure 101. Structures de la (S)-Leucoxine et des molécules 154 et 155.

2.2.4.4. Les inhibiteurs d'origine naturelle

Les produits naturels sont une source cruciale pour le développement de molécules biologiquement actives, permettant d'obtenir une source d'entités moléculaires d'une grande diversité²⁴⁰.

L'équipe de Bhakta, précédemment citée, a été la seule à publier des inhibiteurs de la ligase MurE d'origines naturelles. En 2010, les recherches se sont orientées vers l'isolement de 7 produits naturels provenant de plantes colombiennes²⁴¹. Les molécules présentant la meilleure activité inhibitrice sur MurE (*Mycobacterium tuberculosis*) possèdent un noyau aporphine (en bleu). La 3-méthoxynordomesticine **155**, ainsi que sa forme chlorhydrate **156**, ont montré des valeurs de CI_{50} comprises entre 57 et 67 μM (Figure 102).

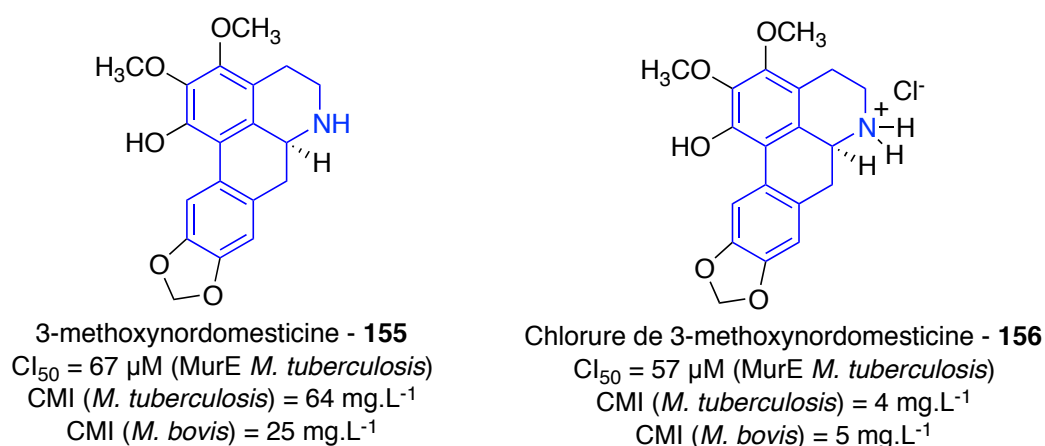


Figure 102. Structures des molécules 155 et 156.

En 2012, l'hypercalin B et l'hyperenone A ont été isolées par extraction des parties aériennes (tige, feuilles, bourgeons et fleurs) d'un arbuste nain de la famille des hypericums (*Hypericum acmosepalum*)²⁴². L'hypercalin B, ne montre pas d'activité inhibitrice sur MurE, tandis que l'hyperenone A présente une activité modérée avec une CI_{50} de 320 μM (Figure 103).

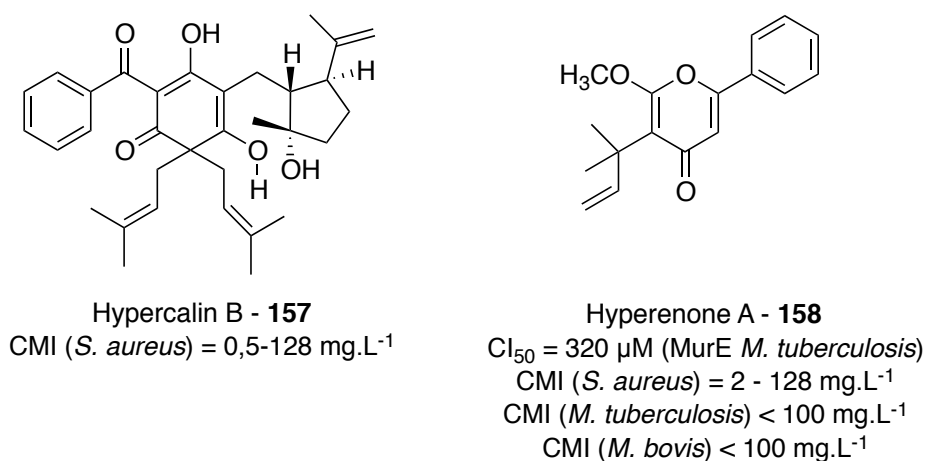
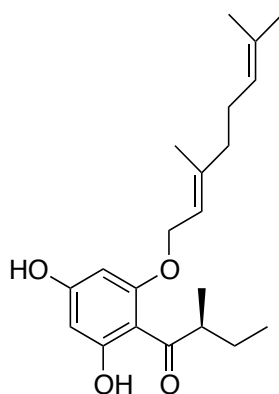


Figure 103. Structures des molécules 157 et 158.

En 2013, l'équipe de Bhakta s'est à nouveau intéressée à l'étude des plantes de type hypericum (*Hypericum olympicum*), avec l'isolement du composé **159**²⁴³. Ce composé ne présente pas d'activité antibactérienne contre les souches à gram-négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*). Cependant, sur des bactéries à gram-positif, celui-ci a montré une activité très intéressante contre la plupart des staphylocoques et des entérocoques ($CMI = 2-8 \text{ mg.L}^{-1}$), corrélée avec une activité inhibitrice sur MurE (*M. tuberculosis*) de 75 μM (Figure 104).



159

$CI_{50} = 75 \mu M$ (MurE *M. tuberculosis*)

CMI (*M. bovis*) = 60 mg.L⁻¹

Figure 104. Structure de la molécule 159.

À ce jour, malgré le nombre important d'inhibiteurs (naturels ou synthétiques) rapportés dans la littérature, aucune molécule n'a fait l'état d'un développement en tant qu'agent antibactérien. Ce phénomène est en partie expliqué par le manque de corrélation entre l'activité inhibitrice et l'activité antibactérienne relevé pour plusieurs molécules. Récemment, plusieurs structures ont été décrites et présentées comme prometteuses pour le développement de nouveaux inhibiteurs plus actifs.

3. Stratégie thérapeutique envisagée

3.1. Contexte géopolitique et biologique

En 2015, le sous-directeur général de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), Keiji Fukuda, affirmait que le monde risquait de sombrer dans une ère « post-antibiotiques »²⁴⁴. Celui-ci s'insurgeait des ravages que pouvaient causer ces phénomènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, la recherche de nouveaux composés antibactériens est devenue l'un des plus gros challenges pour les membres de la communauté médicale.

Depuis la découverte des antibiotiques, la voie de biosynthèse du peptidoglycane représente la cible biologique la plus commune pour l'action des antibiotiques présents sur le marché. Ce mécanisme biochimique complexe, nécessite l'implication d'une vingtaine d'enzymes qui agissent probablement de façon concertée et dynamique¹³³. La majeure partie des

antibiotiques cliniquement utilisés, tels que les β -lactames (pénicillines...) et les glycopeptides (vancomycine...), ciblent généralement les dernières étapes de cette cascade biologique.

En septembre 2006, un groupe d'experts internationaux du milieu académique et industriel a présenté une déclaration de consensus sur les stratégies à adopter pour lutter contre les infections à gram-négatif²⁴⁵. La réflexion commune s'est ainsi orientée vers le besoin crucial de nouveaux agents thérapeutiques possédant un mode d'action original. Ainsi, on pourrait éviter les problèmes que rencontrent les antibiotiques actuellement sur le marché, comme par exemple, l'apparition de résistance croisée due à la grande similitude des structures des molécules. De plus, le développement rapide de souches résistantes devrait être évité.

De ce fait, mon deuxième projet de recherche s'est orienté vers le développement de nouveaux inhibiteurs de l'épimérase DapF et de la ligase MurE. Ces enzymes cytoplasmiques constituent d'excellentes cibles thérapeutiques pour plusieurs raisons^{133,246} :

- elles sont essentielles pour la survie des bactéries.
- elles sont présentes chez les bactéries à gram-positif et à gram-négatif, ce qui pourrait conduire à un antibiotique à spectre large.
- elles n'ont pas d'homologues chez les mammifères.

Pour terminer, le développement d'un inhibiteur actif sur plusieurs ligases Mur n'est pas à exclure. En effet, la conservation de plusieurs résidus d'acides aminés au niveau du site de liaison du substrat, combiné au même mécanisme catalytique sont des raisons de penser qu'une molécule pourrait être active sur cette famille d'enzymes.

3.2. Stratégie mise en place

Nous avons pu le voir précédemment, le développement d'inhibiteurs des enzymes cytoplasmiques DapF et Mur a été réalisé par quatre approches différentes : le développement d'analogues du substrat naturel de l'enzyme ou de l'état de transition, par des méthodes de criblages virtuels et par l'extraction de substances naturelles¹⁷⁷.

La stratégie mise en place au laboratoire a été de mimer le substrat naturel de l'épimérase DapF (LL-DAP) et de la ligase MurE (*méso*-DAP) par la conception d'analogues stériquement contraints (Figure 105 et 106). Cette stratégie est basée sur les résultats probants de l'action de la fosfomycine sur l'enzyme MurA. La fosfomycine joue le rôle de mime du

phosphoénolpyruvate et bloque l'action de l'enzyme, ce qui se traduit par une activité bactéricide.

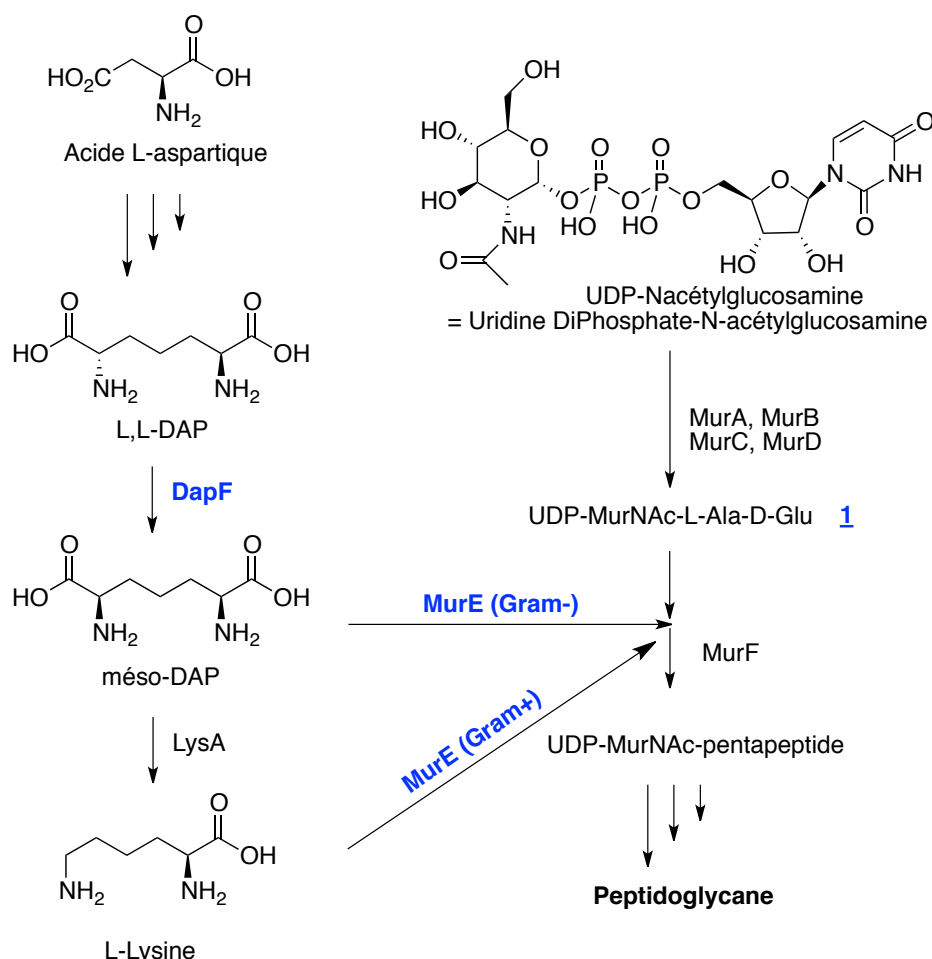


Figure 105. L,L-DAP et méso-DAP : les substrats naturels de DapF et MurE.

Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur des structures présentant une contrainte conformationnelle induite par l'incorporation de diverses insaturations au niveau de la chaîne latérale des substrats : cycle triazole et triple liaison. Dans un deuxième temps, sur la majeure partie des molécules développées, la conservation des fonctions acides et amines a été réalisée pour augmenter la similarité des composés (Figure 106).

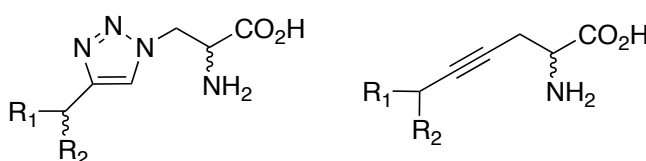


Figure 106. Structures générales d'analogues au méso-DAP stériquement contraints

4. Synthèse des molécules possédant un triazole

4.1. La chimie click

4.1.1. Historique de la réaction

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen est une méthode de choix pour la synthèse d'hétérocycles à cinq chaînons. Dans la majeure partie des cas, deux réactifs s'unissent pour former un composé cyclique avec la création de deux nouvelles liaisons σ (Figure 107)²⁴⁷. Généralement, les deux entités qui entrent en jeu sont un dipolarophile (alcène, alcyne, nitrile) et un composé 1,3-dipolaire (azoture, diazo-alcane)²⁴⁸.

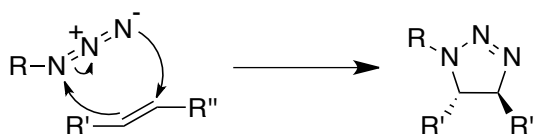


Figure 107. Mécanisme de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

La première cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne a été publiée par Michael en 1893²⁴⁹. À cette époque, la réaction était effectuée à des températures relativement élevées (125°C) et conduisait à un mélange d'isomères : 1,4-triazole et 1,5-triazole (Figure 108)²⁵⁰.

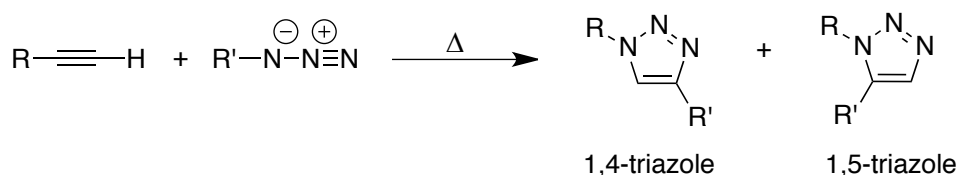


Figure 108. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen à température élevée.

Pour contrôler la régiosélectivité de cette réaction, plusieurs études ont été menées avec un succès plutôt variable²⁵¹. En 2002, l'équipe de Meldal s'intéressait à la synthèse de peptidotriazoles supportée sur phase solide²⁵². Pour la première fois, une équipe trouvait un système catalytique permettant d'obtenir une régiosélectivité indéniable (1,4-triazole) à température ambiante. L'utilisation du cuivre (I) permettait une conversion presque totale (>95%) et une pureté comprise entre 75% et 95% pour une vingtaine de produits. De plus, les auteurs confirmaient l'importance du cuivre à l'état d'oxydation +I et la non faisabilité de la



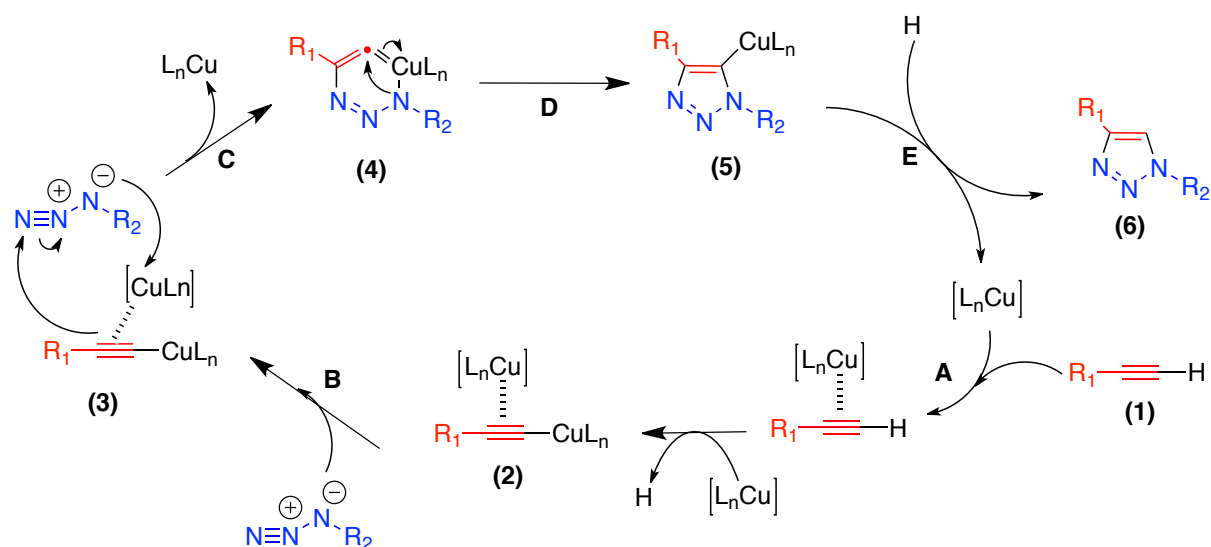


Figure 111. Mécanisme de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre (I).

Celui-ci est composé de cinq étapes :

- étape A : La 1^{ère} étape consiste en la coordination du cuivre (I) à l'alcyne (1) conduisant à la formation du complexe Cu-alcynure (2) (Figure 112). D'après des calculs de DFT, cette étape a montré un caractère légèrement endothermique dans l'acétonitrile (0,6 Kcal/mol). Cependant, lorsque l'eau est utilisée, la formation du complexe (2) est exothermique (11,7 Kcal/mol). Cette différence de valeur confirme que la réaction s'effectue beaucoup plus rapidement dans une solution aqueuse et qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de bases azotées.

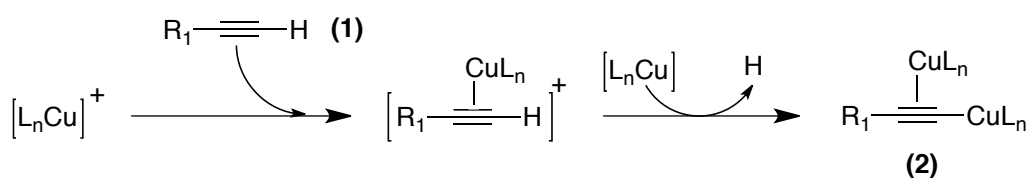


Figure 112. Formation du complexe Cu-acétilure (2).

- étape B : Cette étape consiste en la substitution d'un ligand de l'atome de cuivre par liaison avec l'azote proximal de l'azoture pour conduire à (3).
- étape C : Par la suite, l'azote distal de l'azoture attaque le C-2 de l'alcynure pour conduire à la formation d'un métallacycle à 6 chaînons (4).
- étape D : La contraction du métallacycle (4) conduit au dérivé cuivre-triazolyle (5).

- étape E : La rupture de la liaison cuprate (C-Cu) est réalisée par captation d'un électrophile (H^+), ce qui permet la formation du 1,4-triazole désiré et régénère le catalyseur. Cette étape a été confirmée par réaction quantitative en présence de D_2O .

En 2007, les travaux menés par Straub²⁵⁵ et son équipe ont permis de confirmer une partie du mécanisme avec l'isolation d'un complexe Cu(I)-triazolyle (**5**).

4.1.3. Sélectivité 1,4 versus 1,5

Par opposition aux découvertes conjointes de Sharpless et Meldal permettant la formation sélective des triazoles disubstitués en position 1 et 4 grâce à l'utilisation du cuivre (+I), un manque important d'informations était constaté pour la formation régiosélective des 1,2,3-triazoles 1,5-disubstitués et 1,4,5-trisubstitués. Ainsi, il fallut attendre l'année 2005 pour voir que l'utilisation de certains complexes du ruthénium conduisait à une synthèse sélective de ces dérivés²⁵⁶ (Figure 113).

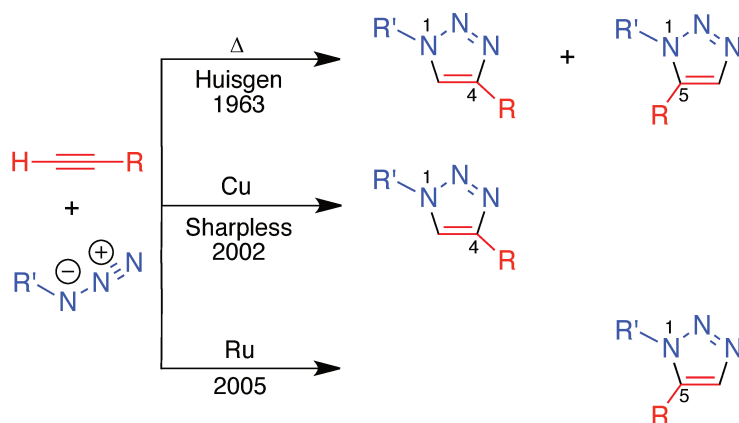
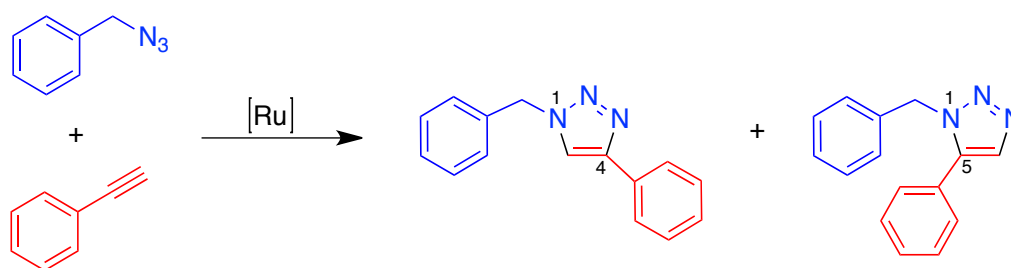


Figure 113. Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture.

Zhang et ses collaborateurs²⁵⁷ se sont intéressés à ce type de catalyseur car les réactions catalytiques impliquant la formation d'un complexe ruthénium-acétylure ont été largement décrites dans la littérature²⁵⁸. Cependant, plusieurs tentatives se sont montrées infructueuses et les meilleurs résultats ont été obtenus avec ce dérivé : $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ (Figure 114).



Catalyseur	% de conversion en 1,4-triazole	% de conversion en 1,5-triazole
$\text{Ru}(\text{OAc})_2(\text{PPh}_3)_2$	100%	0%
$\text{CpRuCl}(\text{PPh}_3)_2$	15%	85%
$\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$	0%	100%

Figure 114. Exemples de réactions de cycloadditions catalysées par des complexes du ruthénium.

Par la suite, un des aspects les plus intéressants au niveau de ce système catalytique est la formation de triazoles 1,4,5-trisubstitués. En effet, avant l'utilisation de cette catalyse au ruthénium, les triazoles entièrement substitués n'étaient accessibles qu'à partir de réactions de cycloadditions réalisées à haute température, conduisant à un manque de régiosélectivité et un faible rendement²⁵⁹. Cette régiosélectivité et la formation de triazoles trisubstitués s'expliquent en partie par le mécanisme de cette réaction. En premier lieu, la substitution des deux ligands L du catalyseur par l'alcyne et l'azoture conduit au complexe (1). Contrairement à ce qu'on a pu voir avec le cuivre, le ruthénium réalise une liaison π avec l'alcyne et favorise l'addition du carbone terminal (le plus électrophile) de ce dernier sur l'azote terminal de l'azoture. D'une part, un couplage oxydatif est réalisé entre l'alcyne et l'azoture pour fournir l'intermédiaire (2). D'autre part, cet intermédiaire métallocyclique subit une élimination réductrice ce qui permet d'obtenir le cycle triazole substitué en position 1,5. Enfin, la rupture de liaison Ru-N régénère le catalyseur²⁵⁹ (Figure 115).

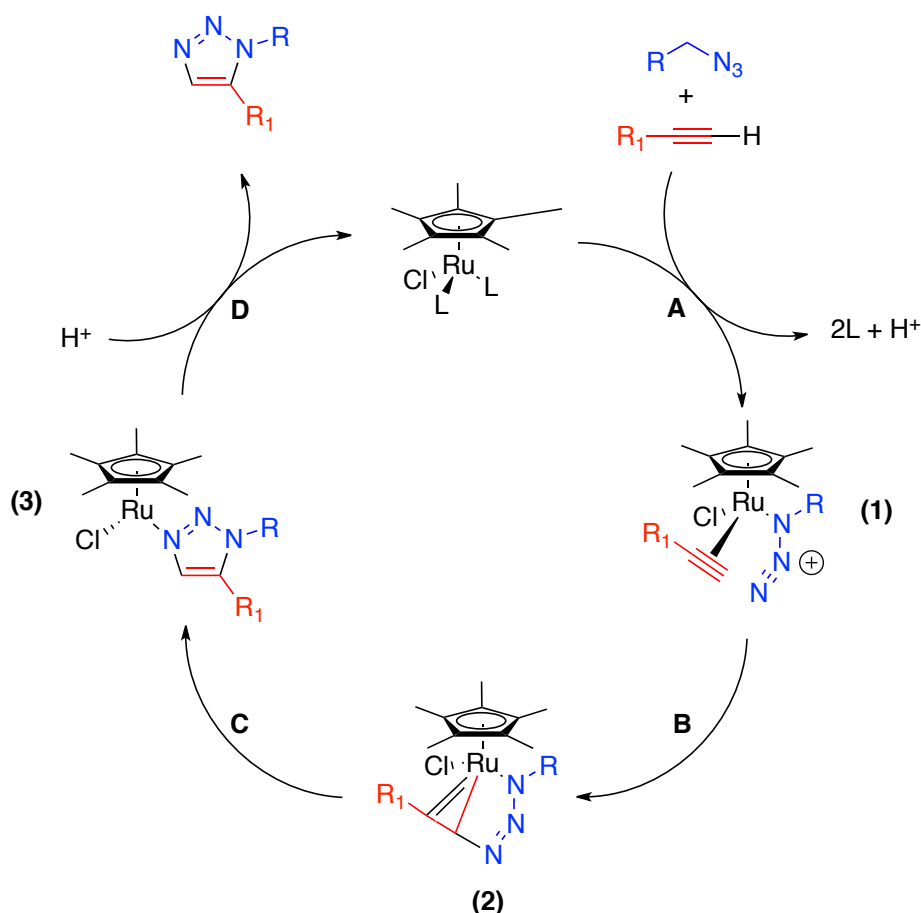


Figure 115. Intermédiaires clés dans la réaction de cycloaddition catalysée par le ruthénium.

4.1.4. Principes de base et évolution

Le développement de nouvelles stratégies de synthèse permettant d'obtenir rapidement des séries de molécules, sans difficultés de purification et avec des rendements élevés constitue un challenge de tous les jours pour les chimistes organiciens. C'est pourquoi, Sharpless, introduit en 2001 le concept de « click chemistry ». Par définition, la chimie click est un groupe de réactions modulables, permettant de travailler sur des quantités importantes de réactifs, donnant de très bons rendements, produisant seulement des sous-produits que l'on peut éliminer par une simple filtration et qui sont stéréospécifiques²⁶⁰. Cette nouvelle conception de la chimie fut présentée pour la première fois en 1999 au 217^{ème} congrès annuel de l'American Chemical Society (ACS)²⁶¹. De plus, pour Sharpless, plusieurs classes de transformations chimiques peuvent être considérées comme des réactions de chimie click : les cycloadditions d'espèces insaturées (1,3-dipolaire ou réaction de Diels-Alder), les

substitutions nucléophiles (ouvertures d'hétérocycles électrophiles), la chimie des groupements carbonyles (non aldol) pour la formation d'oximes par exemple et les réactions d'additions sur des liaisons multiples carbone-carbone (époxydation...).

Cependant, depuis le début des années 90, un type de réaction a largement surpassé les autres. Les cycloadditions 1,3-dipolaire catalysées par du cuivre (I) entre un azoture et un alcyne terminal sont considérées comme une des plus belles représentations de la chimie click. Ce type de réaction a permis le développement des 1*H*-1,2,3-triazoles et a fait de la chimie click une arme incontournable pour le développement de nouveaux composés. Une étude bibliographique a confirmé l'engouement planétaire pour ce phénomène. Une recherche sur SciFinder[®], révélait au 31 décembre 2007 un total de 788 publications (articles, revues, brevets...) contenant les mots clés suivants : « click chemistry » ou « click reaction ». Entre 1999 et 2003, une dizaine d'articles seulement étaient référencés. En revanche, en 2007, près de quatre cents ouvrages ont été publiés²⁶¹. Par la suite, une deuxième évaluation méthodologique a été réalisée pour déterminer le nombre de molécules contenant un cycle 1*H*-1,2,3-triazole présentes dans la littérature. En appliquant un filtre sur la période 2008-2011, il apparaissait un chiffre édifiant de 1580 composés²⁶².

Cette étude bibliographique prouve que le principe de catalyse par le cuivre n'est pas juste un nouvel outil à la disposition du chimiste, mais constitue bien une révolution pour le monde de la recherche médicale, biologique, des nanoparticules et des polymères²⁶¹.

4.1.5. Molécules biologiquement actives

Les triazoles représentent une classe de composés largement utilisés dans le développement de nouvelles thérapies. Depuis les travaux de Meldal et Sharpless sur la catalyse régiosélective des cycloadditions 1,3-dipolaires, les membres de la recherche académique et privée se sont intéressés aux propriétés biologiques des 1*H*-1,2,3-triazoles. Nous l'avons vu précédemment, depuis 2007, le développement de nouveaux triazoles substitués en position 1 et 4 n'a cessé de croître de manière exponentielle. En conséquence, plusieurs bibliothèques de composés ont montré diverses activités biologiques intéressantes : anticancéreux, antifongiques, antituberculeux, antibactériens, inhibiteurs de la protéase HIV-1²⁶³.

Depuis quelques années, trois molécules aux propriétés antibactériennes ou en tant qu'adjuvant d'antibiotique ont fait leur apparition sur le marché pharmaceutique (Figure

116)^{262,264}. Le tazobactam est un puissant inhibiteur de β -lactamases qui possède une structure de type : pénicilline-sulfone. Cet adjuvant est utilisé en combinaison avec la pipéracilline et permet de restaurer l'activité de cette uréidopénicilline contre plusieurs bactéries à gram-négatif^{265,266}. La céfatrizine est un antibiotique de la famille des céphalosporines de seconde génération qui présente une activité antibiotique contre des bactéries à gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) et à gram-négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*)²⁶⁷. Pour finir, la troisième molécule présente sur le marché est un anticancéreux. Le carboxyamidotriazole est utilisé dans le traitement des patients atteints d'un cancer de stade III (prolifération des tumeurs au niveau des ganglions lymphatiques et des tissus avoisinants)²⁶⁸.

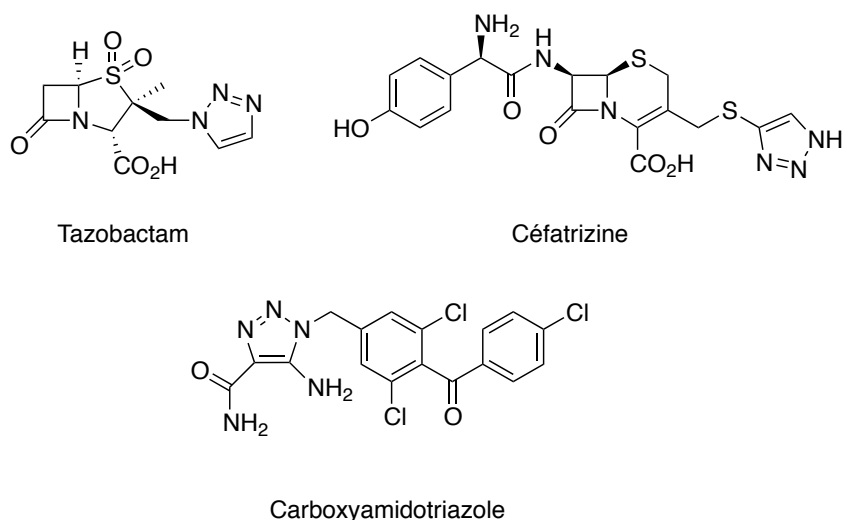


Figure 116. Structures des 1*H*-1,2,3-triazoles aux propriétés antibactériennes ou en tant qu'adjuvant d'antibiotique présents sur le marché pharmaceutique.

4.2. Intérêts du cycle 1,2,3-triazole

4.2.1. Propriétés physico-chimiques

Nous avons pu le voir dans cette première partie, les cycles 1*H*-1,2,3-triazoles présentent un potentiel inestimable pour le développement de nouvelles molécules en chimie médicinale. Cette considération est en partie basée sur les propriétés physico-chimiques de ces hétérocycles^{269,270} :

- les 1,2,3-triazoles possèdent un caractère aromatique et peuvent réaliser des interactions hydrophobes de types « π -stacking ».

- ils ont la capacité à réaliser des liaisons hydrogènes ce qui augmente leur solubilité²⁷¹.
- ils sont très stables en conditions basiques et acides, en présence d'oxydants et de réducteurs ce qui confirme une stabilisation aromatique importante²⁷².
- la présence d'un cycle triazole dans les molécules permet d'augmenter leur stabilité métabolique²⁷³.
- le cycle triazole est un bioisostère de la fonction amide^{269,270} (Figure 117).

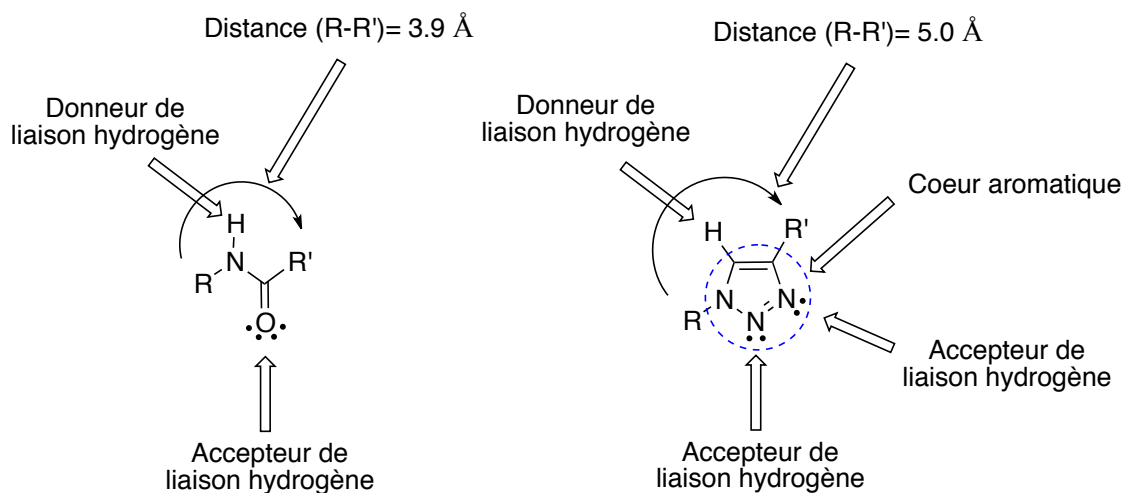


Figure 117. Caractère bioisostère et résumé des potentielles interactions réalisables par le cycle 1,2,3-triazole.

4.2.2. Composés d'intérêts biologiques comportant un cycle 1,2,3-triazole

Le resvératrol est un polyphénol de la famille des stilbènes présent dans certains fruits comme le raisin ou la mûre (Figure 118). Les premiers travaux réalisés sur cette molécule portaient sur le système cardiovasculaire. Il est coutume de dire que la consommation d'un verre de vin rouge par jour permet de diminuer les risques de maladies cardio-vasculaires. Ce fameux « paradoxe français » est parti d'une étude réalisée par des français, qui malgré un régime alimentaire aussi riche en lipides que les américains, présentaient un taux beaucoup plus faible de décès par maladie cardio-vasculaire²⁷⁴. Par la suite, différentes études ont montré que le resvératrol présentait diverses activités thérapeutiques. Cependant, la multitude d'actions biologiques limitait son développement.

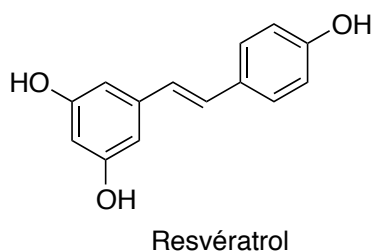


Figure 118. Structure du resvératrol

En 2006, l'équipe de Genazzani développa une série d'analogues au resvératrol, en remplaçant la double liaison par un cycle triazole. Elle confirmait qu'une partie des molécules présentaient des activités biologiques similaires (Figure 119)²⁷⁵. Cette étude démontre le potentiel d'un remplacement isostérique d'une double liaison par un cycle triazole.

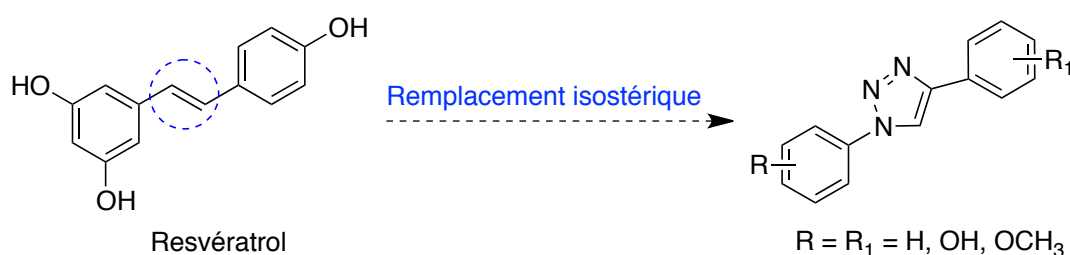


Figure 119. Structures des dérivés du resvératrol.

Parallèlement à ces découvertes, les acides aminés naturels porteurs d'une chaîne latérale insaturée sont des molécules qui représentent une source importante de synthons, pour le développement de nouvelles entités plus complexes possédant un centre chiral. De plus, certains se sont montrés particulièrement intéressants pour leurs activités biologiques, comme les acides aminés de types α -allylglycines. En 1985, la L-allylglycine fut isolée d'un champignon japonais : *Amanita pseudophorphyria*²⁷⁶ et a montré une activité antibactérienne sur *Escherichia coli*²⁷⁷. Le composé **76**, un dérivé alkylé au niveau de la fonction allylique, a été isolé d'un marronnier californien (*Aesculus californica*^{278,279}) et a présenté des propriétés antibiotiques²⁸⁰ (Figure 120).

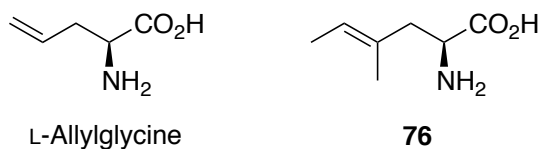


Figure 120. Structures de deux acides aminés allyliques aux propriétés antibactériennes.

Ainsi, ces considérations physico-chimiques et biologiques nous ont permis d'imaginer diverses structures analogues au *méso*-DAP, à la L-lysine et à la L-allylglycine avec l'incorporation d'un cycle triazole (Figure 121).

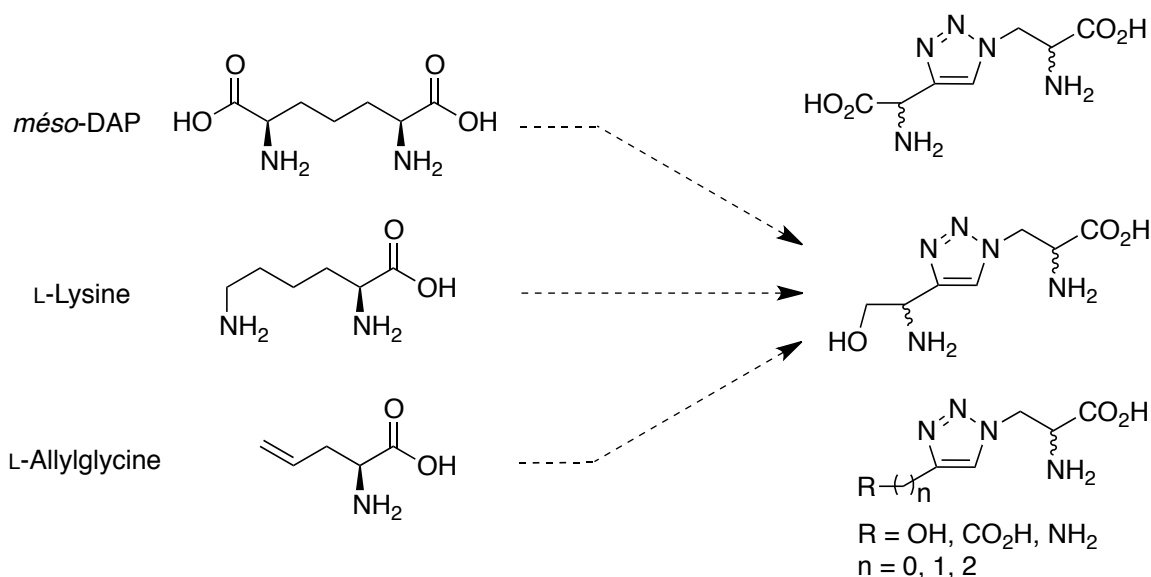


Figure 121. Structures des analogues au *méso*-DAP, à la L-lysine et à la L-allylglycine.

4.2.3. Structures des divers composés envisagés

La première partie de ces travaux de synthèse a consisté en la préparation de deux types de dérivés comportant un cycle triazole. Dans un premier temps, la synthèse de dérivés monosubstitués en position 4 par des fonctions alcools, amines ou acides carboxyliques a été envisagée. Dans un deuxième temps, des dérivés polyfonctionnels ont été imaginés avec l'incorporation d'une fonction acide aminé ou aminoalcool en position 4 du cycle triazole. Notre choix s'est ainsi porté sur le développement de diverses structures chimiques, somme toute semblables, mais permettant d'évaluer l'importance des diverses fonctions (amine, alcool, acide carboxylique) par rapport à une potentielle activité biologique.

4.3. Analyse rétrosynthétique

Toutes les structures possèdent un noyau central de type triazole et comportent une fonction acide aminé non protégée en position 1. Pour pouvoir obtenir cet hétérocycle azoté à 5 chaînons, la première idée a été de partir de deux précurseurs possédant les fonctions suivantes : fonction azoture et fonction alcyne vrai. Ces deux précurseurs ont une origine commune : la sérine (configuration L ou D). La formation du cycle triazole serait effectuée par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (Figure 122).

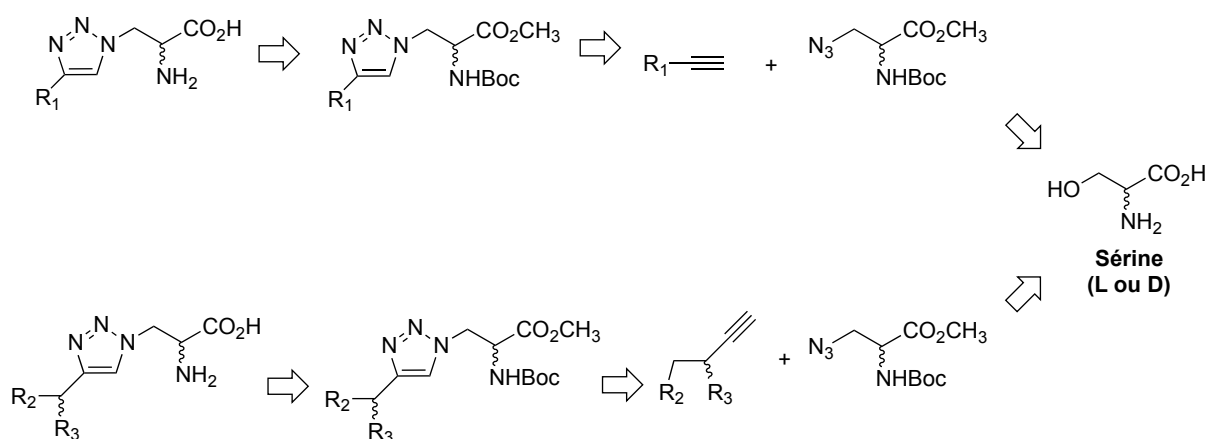
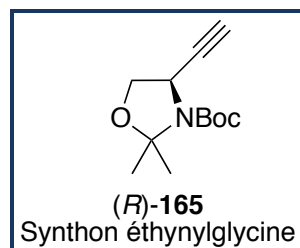


Figure 122. Analyse rétrosynthétique pour la synthèse des dérivés triazolyles.

4.4. Préparation de synthons clés

Pour des soucis de clarté, les synthèses décrites par la suite proviennent toutes de la L-sérine. Les informations générales pour l'obtention des autres stéréoisomères sont décrites en partie expérimentale. Pour mener à bien la synthèse des molécules comportant un cycle triazole, il convient de préparer les intermédiaires clés pour la réaction de cycloaddition : un alcyne vrai (synthon éthynylglycine ou alcynes commerciaux) et l'azoture **168** (dérivé protégé de l'azoture d'alanine).

4.4.1. Synthèse du synthon éthynylglycine **165**



4.4.1.1. Synthèse de l'aldéhyde de Garner **164**

La synthèse débute par la protection de la fonction amine de la L-sérine en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc)₂O et d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium²⁸¹ (Figure 123).

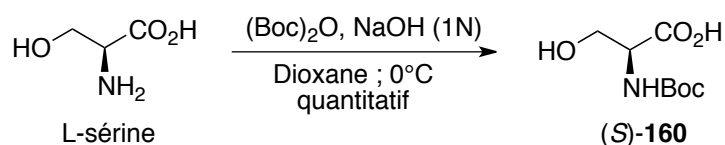


Figure 123. Protection de la fonction amine de la L-sérine

Le rendement de cette réaction est quantitatif, car le produit peut être souillé par la présence de *tert*-butanol (produit au cours de la réaction).

Le composé (S)-**160** est alors directement engagé dans une réaction d'estérification en présence de carbonate de potassium et d'iodométhane (Figure 124). Le produit (S)-**161** est obtenu avec un rendement de 85% sur deux étapes.

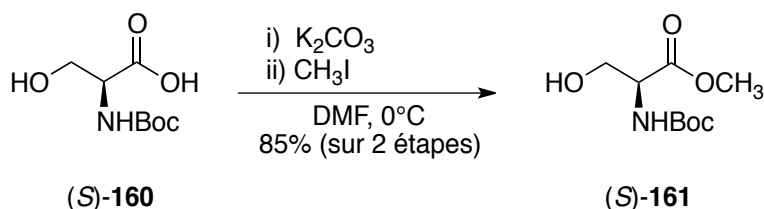


Figure 124. Réaction d'estérification du composé (S)-160.

4.4.1.2. Réaction d'homologation

La préparation d'alcynes terminaux à partir de dérivés carbonylés (aldéhydes ou cétones), est devenue une arme essentielle dans le développement de nouvelles molécules biologiquement actives. Ces nouvelles méthodes de synthèses ont permis une utilisation massive de certaines réactions comme le couplage de Sonogashira ou encore la chimie click²⁸². Deux méthodes sont généralement utilisées pour les réactions d'homologations aldéhyde-alcyne : Seyferth-Gilbert avec le réactif de Bestmann-Ohira et Corey-Fuchs²⁸³ (Figure 128).

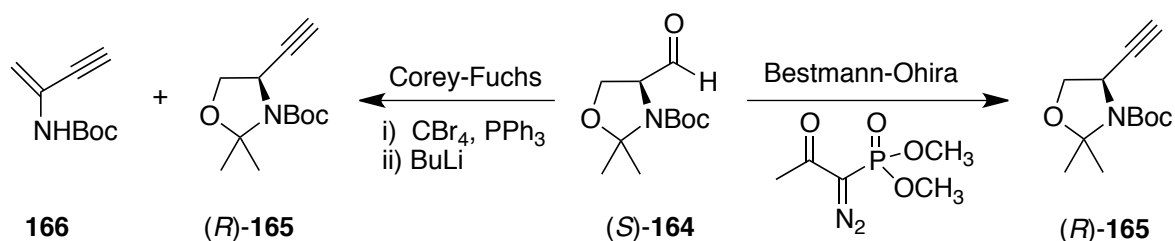


Figure 128. Méthodes d'homologations aldéhyde-alcyne.

Dans notre cas, le proton en α de la fonction aldéhyde présente un caractère relativement acide. Dans les conditions de Corey-Fuchs, l'utilisation de butyllithium (BuLi) peut conduire à l'obtention de l'énamine **166**²⁸³. Les avantages et inconvénients des deux méthodes sont relayés dans le Tableau 10.

Méthodes de synthèse	Avantages	Inconvénients
Seyferth-Gilbert	– La plupart des groupes fonctionnels sont tolérés – Conditions de réactions non drastiques – Réaction hautement énantiosélective – Les molécules possédant des protons relativement acides peuvent être substrats de la réaction.	– Synthèse du réactif de Bestmann-Ohira (une étape supplémentaire) – Réactifs onéreux
Corey-Fuchs	– Réactifs peu onéreux et facilement accessibles	– Température très basse (-78°C), milieu anhydre – Formation de produits secondaires pour les substrats possédant des protons acides

Tableau 10. Avantages et inconvénients des méthodes d'homologation.

Notre choix s'est porté sur la stratégie décrite par Seyferth-Gilbert. Pour obtenir l'alcyne désiré, il est nécessaire de préparer au préalable le réactif de Bestmann-Ohira. Ce diazophosphonate est ainsi obtenu par réaction du 2-oxopropylphosphonate de diméthyle **167** avec l'azoture de 4-acétamidobenzènesulfonyl **168** (Figure 129). L'utilisation de cet azoture présente plusieurs avantages : il est relativement abordable, stable dans le temps, peut être facilement obtenu par synthèse et n'est pas dangereux à manipuler^{284,285}.

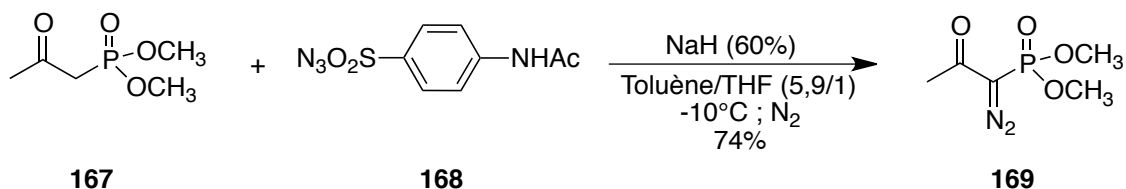


Figure 129. Préparation du réactif de Bestmann-Ohira.

L'utilisation d'une base forte (NaH) permet de déprotoner le 2-oxopropylphosphonate de diméthyle en α du groupement phosphonate. Le dérivé anionique **(a)** réagit alors sur la fonction azoture du dérivé sulfonyl, pour fournir après réarrangement, le réactif de Bestmann-Ohira (Figure 130).

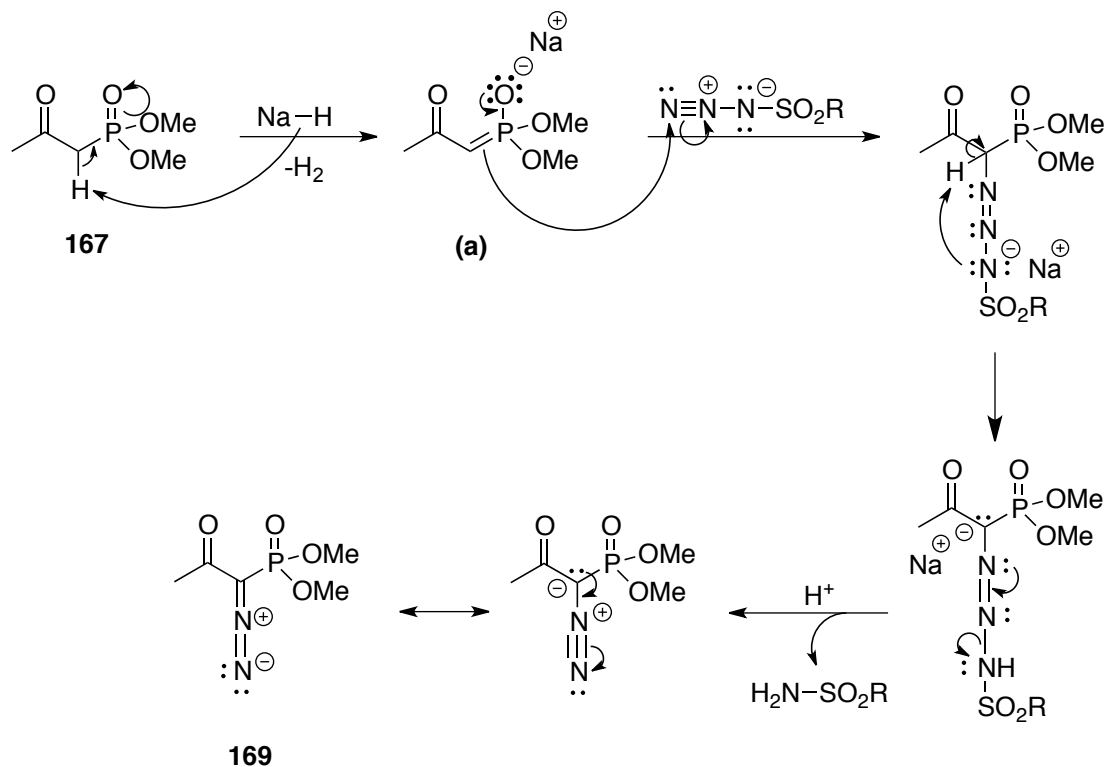


Figure 130. Mécanisme de l'obtention du réactif de Bestmann-Ohira.

Par la suite, le réactif de Bestmann-Ohira est engagé en réaction avec l'aldéhyde de Garner (*S*)-**164**, en présence de carbonate de potassium pour fournir le synthon éthynylglycine (*R*)-**165** avec un rendement de 77%^{286,287} (Figure 131).

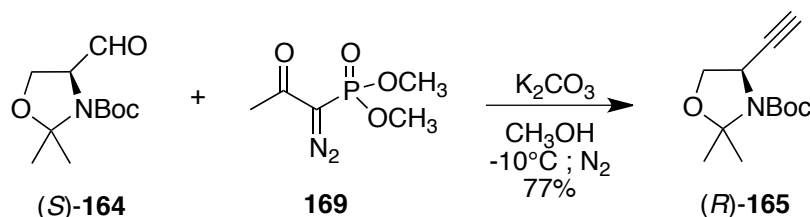


Figure 131. Synthèse du synthon éthynylglycine (*R*)-**165**.

Par action du carbonate de potassium, l'énolate va être déprotonné pour réagir par la suite avec le méthanol alors solvant de la réaction. L'ion méthanolate est formé et réagit sur le carbone du carbonyle du composé **169**. De l'acétate de méthyle est ainsi formé en même temps. L'intermédiaire anionique (**a**) réagit sur l'aldéhyde pour obtenir une molécule de type oxaphosphétane (**b**). Après retour à température ambiante, l'oxaphosphétane subit plusieurs réarrangements pour donner un carbène (**c**). Une migration de type 1,2 fournit l'alcyne²⁸⁸ (Figure 132).

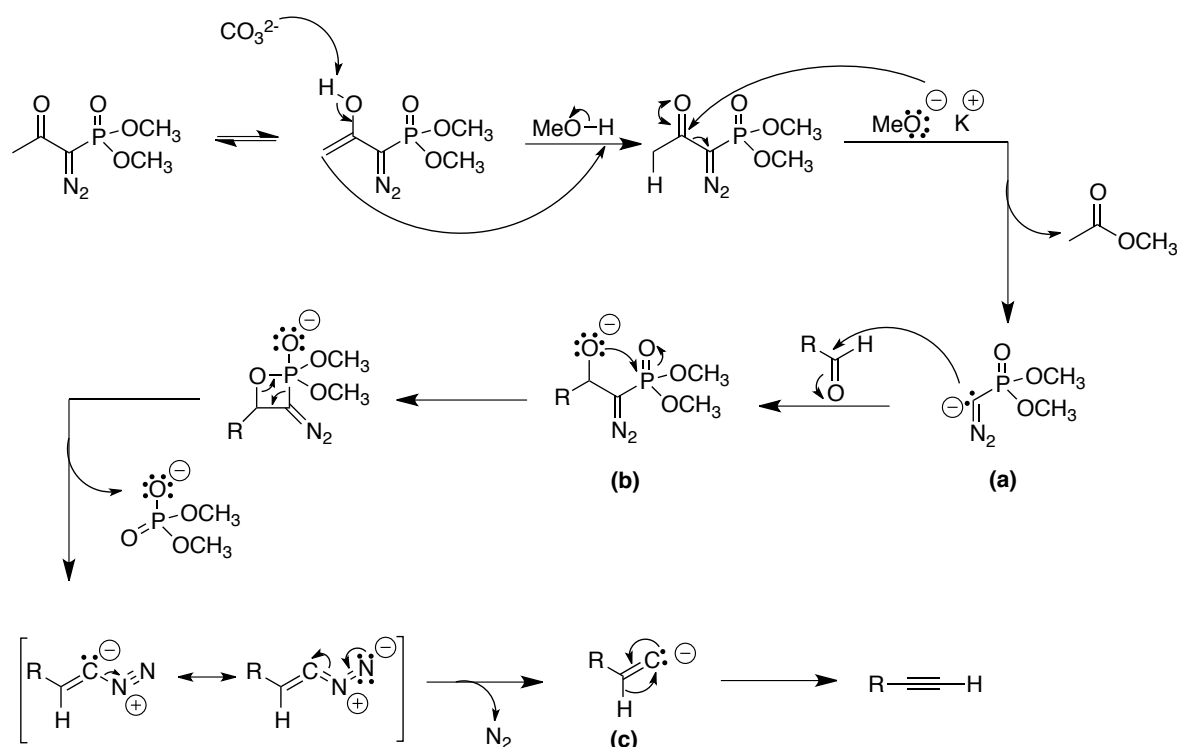
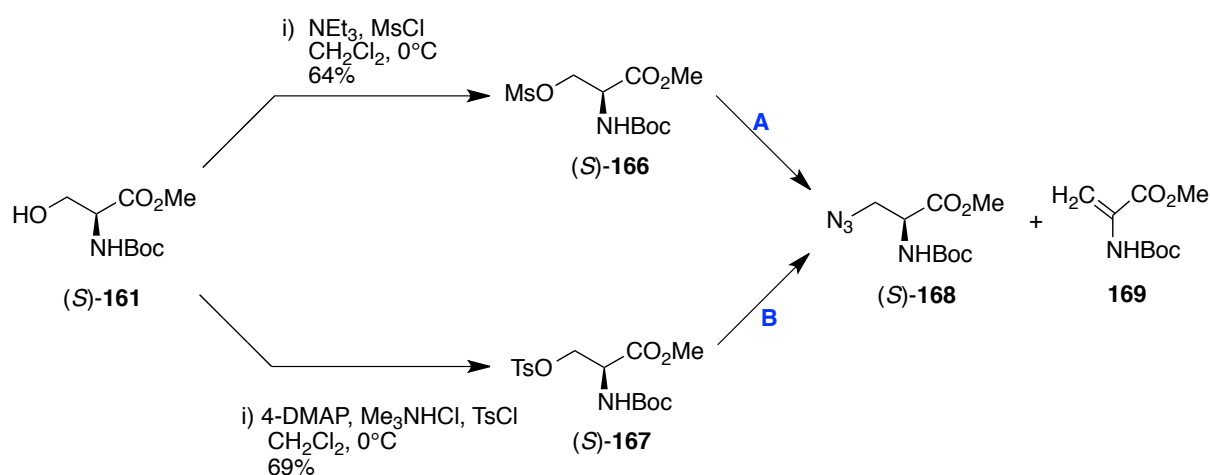


Figure 132. Mécanisme de la réaction de Bestmann-Ohira.

4.4.2. Synthèse de l'azoture **168**

Pour la synthèse de l'azoture, les premières tentatives se sont portées sur une voie de synthèse en deux étapes. Dans un premier temps, la fonction alcool du composé (*S*)-**161** est activée par le chlorure de mésyle²⁸⁹ ou par le chlorure de tosylo²⁹⁰. Les deux composés (*S*)-**166** et (*S*)-**167** sont obtenus avec des rendements de 64% et de 69% respectivement. Par la suite, une réaction de substitution nucléophile (S_N2) est entreprise au moyen d'azoture de sodium, à chaud dans le DMF^{289,291} (Figure 133).



Conditions	T	Temps de réaction	% ((<i>S</i>)- 168)	% (169)	Rdt global sur deux étapes
A	50°C	30 min	25	29	16%
B	70°C	10 min	39	37	27%

Figure 133. Synthèse de l'azoture (*S*)-168** par substitution nucléophile.**

Dans ces conditions, on observe la formation du sous-produit **169** dans des proportions non négligeables. La formation de cette énamine est due à une réaction d'élimination, due à l'acidité du proton en α de l'amino ester. De plus, le caractère bon groupe partant des groupements mésylates et tosylates facilite cette élimination.

À la vue des résultats, une troisième approche a été entreprise pour pallier les faibles rendements obtenus (16% et 27% sur les deux étapes). La formation directe de l'azoture (*S*)-**168** a été réalisée par une réaction de Mitsunobu²⁹² avec un rendement de 41% (Figure 134). Cependant, les analyses RMN montrent un produit impur même après plusieurs étapes de purifications. Le produit d'élimination **169** est observé en CCM mais n'a pas été isolé.

D'autres méthodes ont été présentées dans la littérature pour la synthèse d'azotures dérivés d'acides aminés, mais celles-ci n'ont pas fait l'objet d'études dans ce travail de recherche²⁹³.

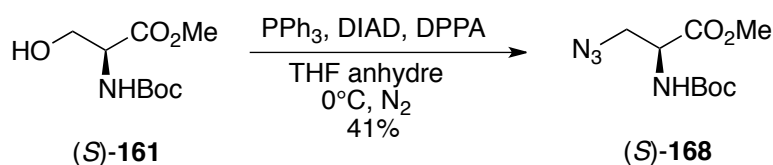


Figure 134. Synthèse de l'azoture (S)-168 par la réaction de Mitsunobu.

4.5. Réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire

4.5.1. Synthèse des triazoles 174, 175, 178 et 179

Le développement des hétérocycles azotés va être réalisé en partant d'alcynes commerciaux : la propargylamine 170, le 1-amino-3-butyne 172, l'alcool propargylique 176 et le but-3-yn-1-ol 177. Une protection préalable des fonctions amines est réalisée, autrement la réaction n'est pas possible^{294,295} (Figure 135). Dans notre cas, le groupement Boc a été choisi car l'azoture synthétisé préalablement (S)-168 possède le même groupement protecteur. Ainsi, une seule étape de déprotection des fonctions amines pourrait être envisagée sur les triazoles obtenus.

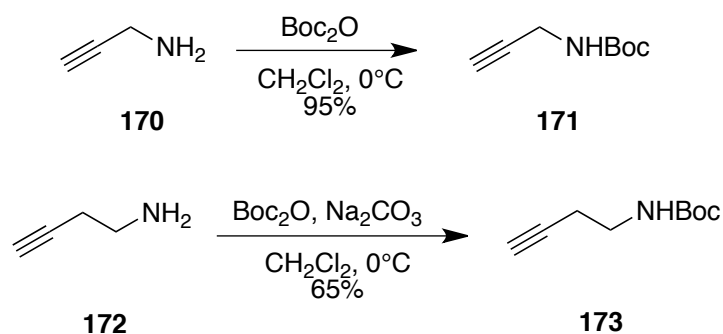


Figure 135. Protections des fonctions amines des alcynes commerciaux 170 et 172.

Les cycloadditions ont été réalisées dans des conditions classiques des cycloadditions 1,3-dipolaires catalysées par le cuivre : sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄·5H₂O), L-ascorbate de sodium, dans un mélange d'eau et de *tert*-butanol en proportion équivalente²⁹⁶ (Figure 136 et 137).

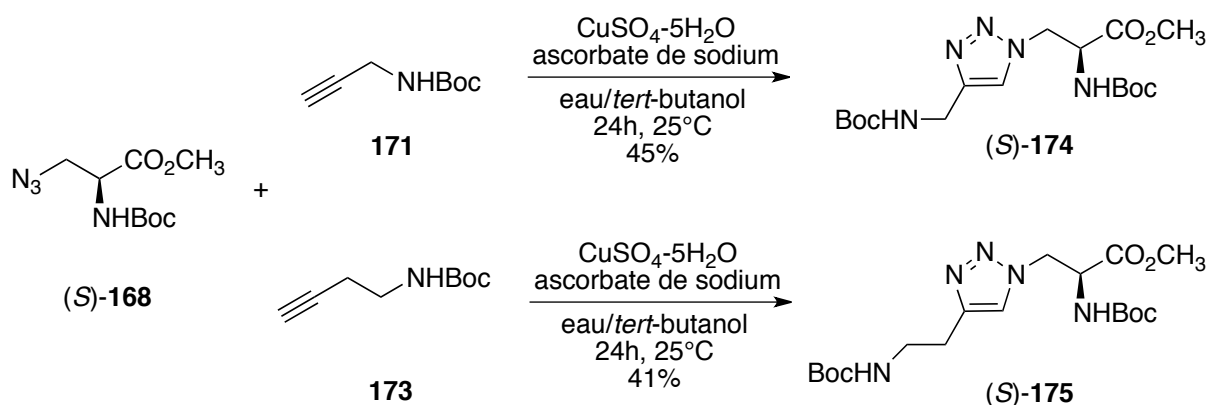


Figure 136. Synthèse des triazoles 174 et 175.

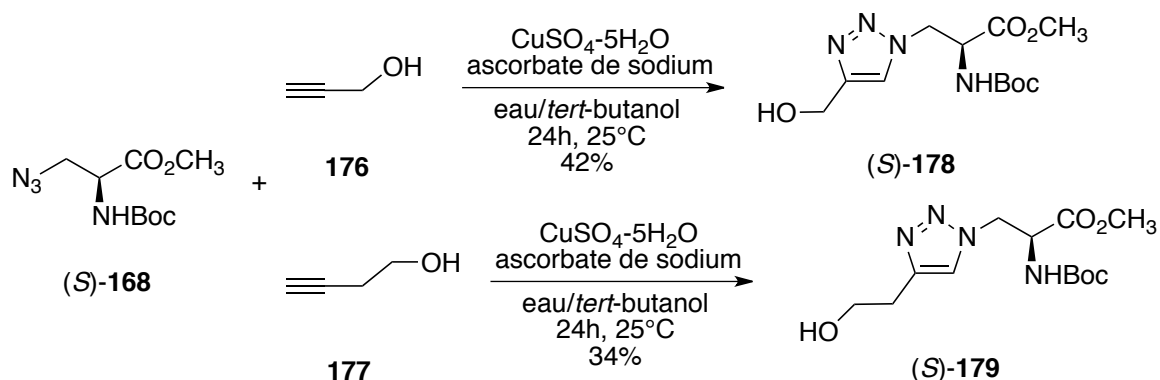


Figure 137. Synthèse des triazoles 178 et 179.

Au total, huit triazoles (configurations *R* et *S*) ont été obtenus avec des rendements modérés (34-45%) avec un excès énantiomérique compris entre 96,3% et 99,2%. Par la suite, des étapes d'oxydations des fonctions alcools, suivies d'étapes de déprotections des fonctions esters et amines seront entreprises (Figure 138).

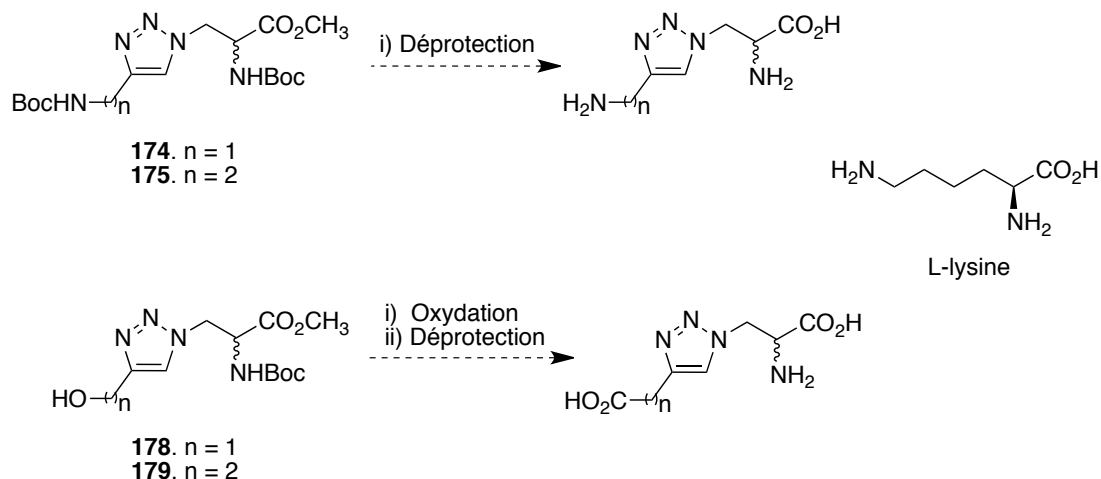


Figure 138. Perspectives de synthèse des triazoles 174, 175, 178 et 179.

4.5.2. Synthèse des triazoles **180** et **181**

4.5.2.1. Synthèse du triazole aminoalcool **181**

Pour obtenir du analogue au *méso*-DAP (diaminodiacide), deux approches ont été envisagées. La première méthode consistait en une réaction de chimie click entre le synthon éthynylglycine (*R*)-**165** et l'azoture (*S*)-**168**. Le triazole (*2S,4R*)-**180** a été obtenu avec un rendement de 64%. Ensuite, le clivage du cycle oxazolidine a été réalisé en présence d'APTS-H₂O²⁹⁷ pour obtenir l'aminoalcool (*1S,2R*)-**181** avec un rendement de 17%. Le composé de départ est récupéré à hauteur de 55% après purification. Pour améliorer ce rendement, une autre tentative a été réalisée en présence de PPTS²⁹⁸ (sel de pyridinium de l'APTS). Cependant, après cinq jours au reflux du méthanol, le résultat ne présentait guère d'améliorations (résultat non présenté). Par la voie A, le composé (*1R,2S*)-**181** est obtenu avec un rendement de 11% seulement en deux étapes.

Au vu des difficultés rencontrées pour obtenir un rendement convenable sur cette étape, il a été envisagé de déprotéger le synthon éthynylglycine avant de réaliser l'étape de chimie click. Pour ce faire, l'alcyne (*R*)-**165** est mis en suspension dans du méthanol et l'on ajoute de l'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté²⁹⁷. On obtient l'alcyne « ouvert » (*R*)-**182** avec un rendement de 48%. Lors de cette étape, 32% du composé de départ est récupéré après purification. Par la suite, l'alcyne (*R*)-**182** est engagé en réaction de cycloaddition pour fournir l'intermédiaire désiré avec un rendement de 57%. Ainsi, par cette deuxième voie de synthèse, l'aminoalcool (*1S,2R*)-**181** est obtenu avec un rendement de 27% en deux étapes (Figure 139).

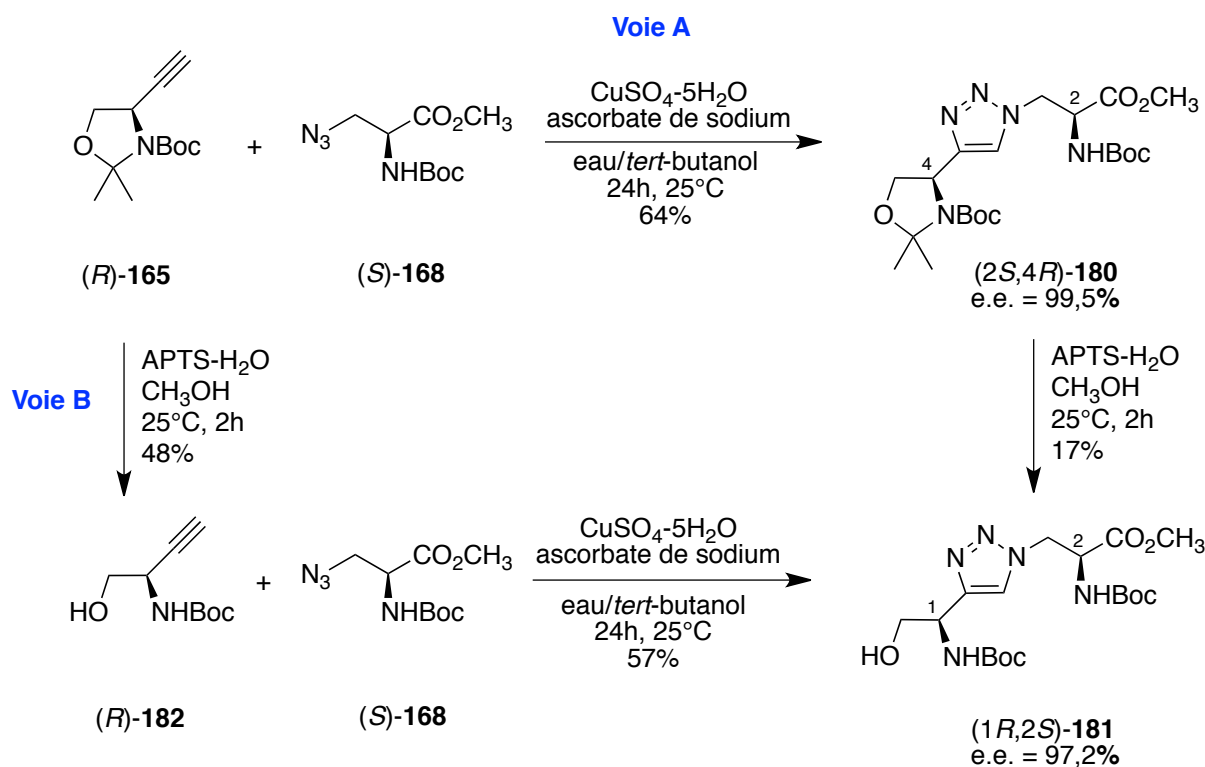


Figure 139. Synthèse du triazole aminoalcool 181.

Par ailleurs, la structure du composé (1*S*,2*S*)-**181** est semblable à celle de la rhizobitoxine, un acide aminé non protéinogène appartenant à la famille des éthers d'énols produit par la bactérie symbiotique *Rhizobium japonicum*²⁹⁹ (Figure 140).

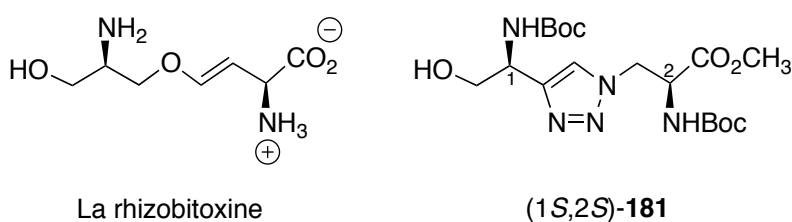


Figure 140. Formules de la rhizobitoxine et du composé (1*S*,2*S*)-181.

La rhizobitoxine est un composé biologiquement actif sur la cystathionine β -lyase, une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la méthionine^{300,301}. La méthionine est un constituant essentiel pour la biosynthèse des protéines puisque toutes les chaînes protéiques commencent par cet acide aminé. De plus, celle-ci est produite exclusivement chez les plantes, les bactéries et les champignons³⁰². De ce fait, cette enzyme constitue un autre axe essentiel pour le développement de nouveaux agents bactériens. Ainsi, après saponification de

la fonction ester et déprotection des fonctions amines du composé (1*S*,2*S*)-**181**, celui-ci pourrait présenter un intérêt pour le développement de nouveaux agents antibactériens³⁰³.

Ce travail a conduit à une publication : Boibessot, T., Bénimélis, D., Benfodda, Z., Meffre, P. Synthesis of a Novel Rhizobitoxine-like Triazole- Containing Amino Acid. *Synlett*, **2016**, 27, 2685-2688.

4.5.2.2. Tentatives d'oxydation de l'aminoalcool **181**

Pour obtenir la molécule désirée, des tentatives d'oxydation ont été réalisées sur l'aminoalcool (1*R*,2*S*)-**181**. Une oxydation directe de la fonction alcool en acide carboxylique a été envisagée selon les conditions de Jones³⁰⁴. Cependant, les conditions se sont montrées trop drastiques, causant la dégradation du composé de départ et aucune trace du produit oxydé (Figure 141).

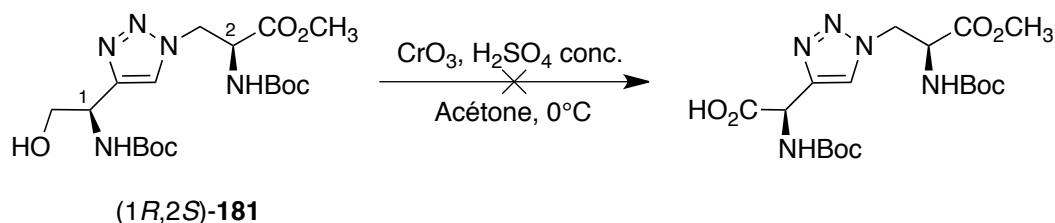


Figure 141. Tentative d'oxydation du triazole (1*R*,2*S*)-**181** par la méthode de Jones.

Ensuite, une oxydation en deux étapes a été entreprise. L'utilisation du réactif de Dess-Martin a permis d'oxyder l'alcool jusqu'au stade de l'aldéhyde (produit non isolé). Après évaporation, le brut réactionnel a été remis en réaction et l'oxydation jusqu'au stade de l'acide carboxylique a été réalisée suivant les conditions d'oxydation de Pinnick²⁹⁸ (Figure 142).

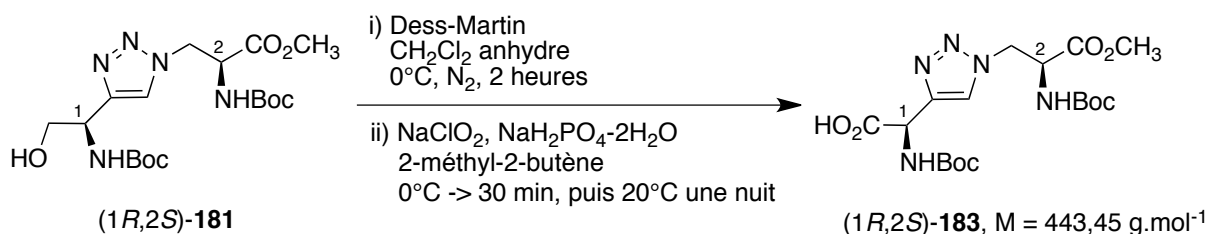


Figure 142. Oxydation du composé (1*R*,2*S*)-**181** par le réactif de Dess-Martin suivie d'une oxydation de Pinnick.

Après traitement du milieu réactionnel, une purification par chromatographie flash a été effectuée (éluant : méthanol/acétate d'éthyle), permettant d'obtenir 40 mg d'un solide blanc impur. Des analyses RMN ^1H et ^{13}C de cet échantillon ont montré la présence de plusieurs groupements caractéristiques de la molécule attendue :

- un cycle triazole induit par le signal de la liaison C-H en position 4 (7,68 ppm en proton et 124,3 ppm en carbone)
- deux groupements Boc par la présence de deux singulets intégrant pour dix-huit protons (1,25 et 1,43 ppm en proton et 28,3 ppm en carbone) et le signal du carbone quaternaire (81 ppm en carbone)
- un groupement CH_3 caractéristique de la fonction ester méthylique (3,76 ppm en proton et 53,3 ppm en carbone)

Par la suite, une analyse UPLC/MS a été réalisée. Celle-ci nous a confirmé la présence d'un fragment correspondant à une masse de 444 ($\text{M}+\text{H}^+$). De plus, une étude plus approfondie du spectre de masse justifiait la perte de deux groupements Boc par l'existence d'un fragment à 244 ($\text{M}-200$).

En conclusion, les différentes analyses semblent confirmer la formation de l'acide (1*R*,2*S*)-**183**. Cependant, la molécule n'a pas pu être isolée pure.

4.5.2.3. Perspectives de synthèse

À notre connaissance, aucune étape d'oxydation d'un aminoalcool triazole jusqu'au stade de l'acide aminé n'a été relayée dans la littérature. Néanmoins, en 2013, l'équipe de W. A. Denny³⁰⁵ a publié l'oxydation d'un alcool primaire lié à un triazole en utilisant une combinaison de trois réactifs : NaClO_2 : chlorite de sodium, TEMPO : N-oxyde de 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine et NaOCl : hypochlorite de sodium (Figure 143).

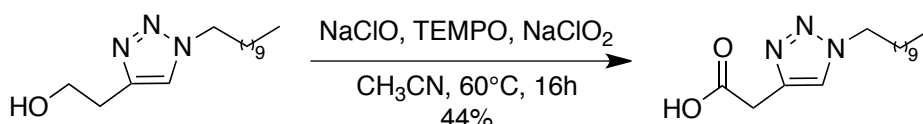


Figure 143. Exemple d'oxydation d'un alcool primaire lié à un triazole.

Cette méthode a été publiée pour la première fois en 1999 par Zhao *et al.*³⁰⁶ et améliorée par la même équipe en 2005³⁰⁷. Les auteurs expliquent qu'il n'y a aucune racémisation ou épimérisation observée sur des substrats avec un centre chiral (Figure 144).

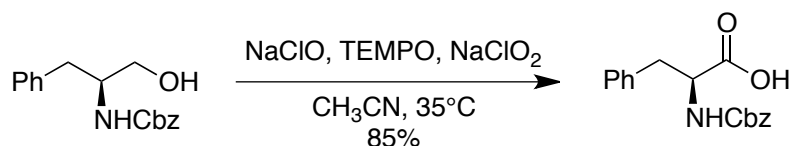


Figure 144. Exemple d'oxydation d'un alcool primaire chiral.

Une autre approche développée par Ermert *et al.* a permis la formation d'acides aminés à partir de l'oxydation des aminoalcools en utilisant le périodate de sodium (NaIO₄) avec un catalyseur au ruthénium³⁰⁸ (Figure 145).

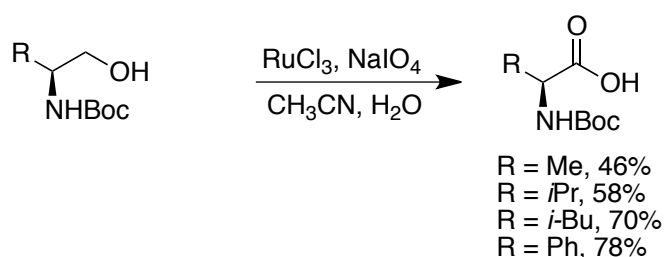


Figure 145. Exemples d'oxydations d'aminoalcools par le périodate de sodium.

Ainsi, ces différentes méthodes feront l'objet d'études dans le cadre de l'oxydation de la molécule (1*R*,2*S*)-**181** pour obtenir l'acide aminé (1*R*,2*S*)-**183**. Par la suite, une fois l'acide aminé obtenu, une étape de saponification suivie d'une étape de déprotection des fonctions amines conduiront au triazole diaminodiacide, analogue du *méso*-DAP (Figure 146).

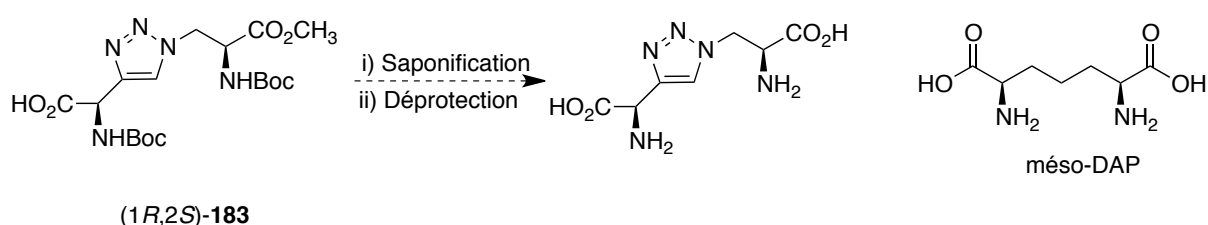


Figure 146. Perspectives de synthèses pour obtenir l'analogue du *méso*-DAP.

4.5.3. Synthèse du triazole tricyclique **186**

Le synthon éthynylglycine (*R*)-**165** est une molécule chirale avec un intérêt important pour les chimistes organiciens. La polyfonctionnalité de ce composé permet la synthèse de composés biologiquement actifs, principalement à base d'acides aminés non naturels³⁰⁹. Ce composé présente trois types de fonctions : une fonction alcyne vraie, une fonction alcool et une fonction amine. La réactivité de la triple liaison a été largement étudiée : couplage de Sonogashira, substitutions nucléophiles, hydrogénation. Cependant, une seule réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire est pour l'instant référencée dans la littérature³¹⁰. Ainsi, l'obtention de nouveaux triazoles à partir du synthon éthynylglycine constitue une nouvelle approche dans le développement de molécules biologiquement actives et énantiomériquement pures.

La synthèse de l'azoture (*S*)-**185** a été réalisée en deux étapes comme décrit précédemment (Figure 147). La fonction alcool est tout d'abord activée sous forme de tosylate au moyen de chlorure de tosyloxy dans la pyridine. Ensuite, le dérivé tosylé est engagé dans une réaction de substitution nucléophile (S_N2) par NaN_3 . L'azoture (*S*)-**185** est obtenu avec un rendement de 68%. Le rôle de la pyridine dans ce cas là est double : c'est le solvant de réaction et elle permet la déprotonation de l'intermédiaire formé entre l'alcool et le groupement tosyloxy.

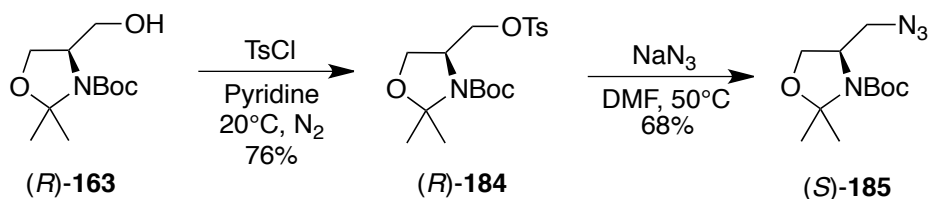


Figure 147. Synthèse de l'azoture (S)-185 par substitution nucléophile.

Par la suite, une étape de cycloaddition entre le synthon éthynylglycine (*R*)-**165** et l'azoture (*R*)-**185** a été entreprise pour conduire à l'obtention de la molécule (4*R*,4'*R*)-**186** avec un rendement de 70%. Les quatre stéréoisomères ont été obtenus avec des rendements compris entre 67% et 70% après purification et présentent un excès énantiomérique compris entre 93% et 99,5% (Figure 148).



The reaction scheme illustrates the synthesis and subsequent reactions of compound **186**. Compound **185** is a 1,2,4-triazole derivative with a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl group at the 1-position and a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl group at the 4-position. It reacts with a 1,3-diol (1,3-bis(hydroxymethyl)-2-methylpropane-2-ol) under Mitsunobu conditions to form the cyclic acetal-protected intermediate **186**. Compound **186** is a bicyclic acetal where the triazole ring is linked to a 1,3-dioxolane ring via a methylene group, and the 1,3-dioxolane ring is further substituted with a tert-butoxycarbonyl (Boc) group and a methyl group. Compound **186** can undergo several transformations:

- Reaction to A:** Compound **186** is converted to compound **A**, which is a 1,2,4-triazole derivative with a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl group at the 1-position and a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl group at the 4-position.
- Reaction to B:** Compound **186** is converted to compound **B**, which is a 1,2,4-triazole derivative with a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl group at the 1-position and a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl group at the 4-position.
- Reaction to C:** Compound **186** is converted to compound **C**, which is a 1,2,4-triazole derivative with a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl group at the 1-position and a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl group at the 4-position.
- Reaction to D:** Compound **186** is converted to compound **D**, which is a 1,2,4-triazole derivative with a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl group at the 1-position and a 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl group at the 4-position.

Figure 149. Perspectives de synthèse des triazoles tricycliques.

190

permis l'obtention de l'acide 2,7-diaminosubérique sous forme protégée, un diaminodiacide avec une chaîne alkyle de 8 carbones³¹¹ (Figure 150).

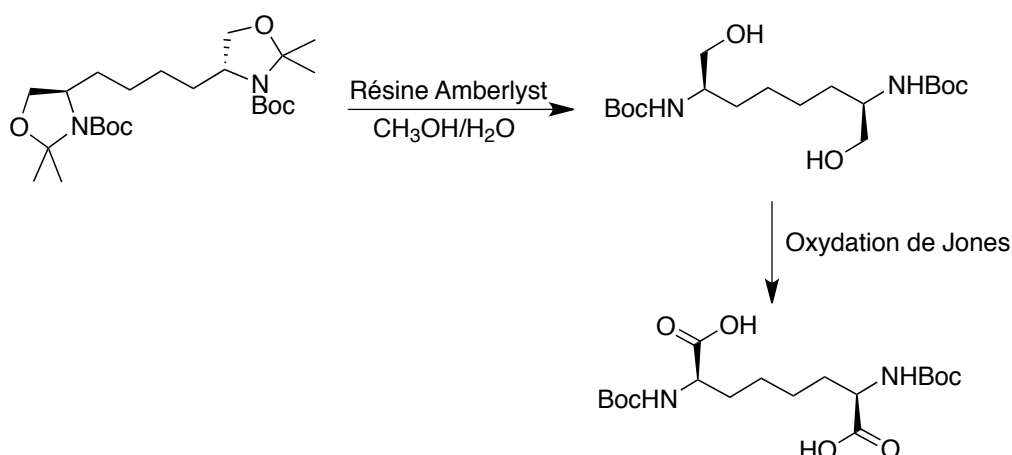


Figure 150. Synthèse de l'acide 2,7-diaminosubérique sous forme protégée.

Dans un deuxième temps, des réactions de clivage sélectif des cycles oxazolidines pourraient être entreprises pour conduire à l'obtention de divers aminoalcools: B, C, D (Figure 149). Par ailleurs, plusieurs molécules possédant un motif 1,2-diamino alcools présentent une activité biologique³¹² comme par exemple la (+)-spisulosine (ES-285), un produit naturel isolé d'un mollusque marin³¹³ (Figure 151). Cet anticancéreux, synthétisé en neuf étapes depuis l'aldéhyde de Garner (*S*)-**164**, était en première phase d'essai clinique en 2009³¹⁴.

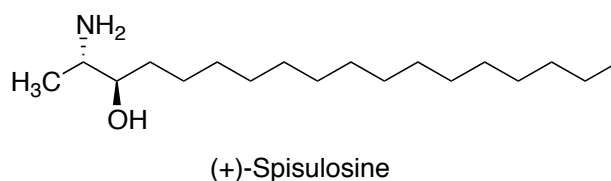


Figure 151. Structure de la (+)-spisulosine.

5. Synthèse des molécules contenant une triple liaison

5.1. Un mécanisme d'action original

La deuxième partie des travaux basés sur la recherche et le développement d'inhibiteurs des enzymes DapF et MurE, s'est portée sur le développement de composés possédant une triple liaison au niveau de la chaîne carbonée. Cette insaturation, du fait de sa réactivité et de sa

position, pourrait conférer un mécanisme d'inhibition original de la part de ces molécules (Figure 152).

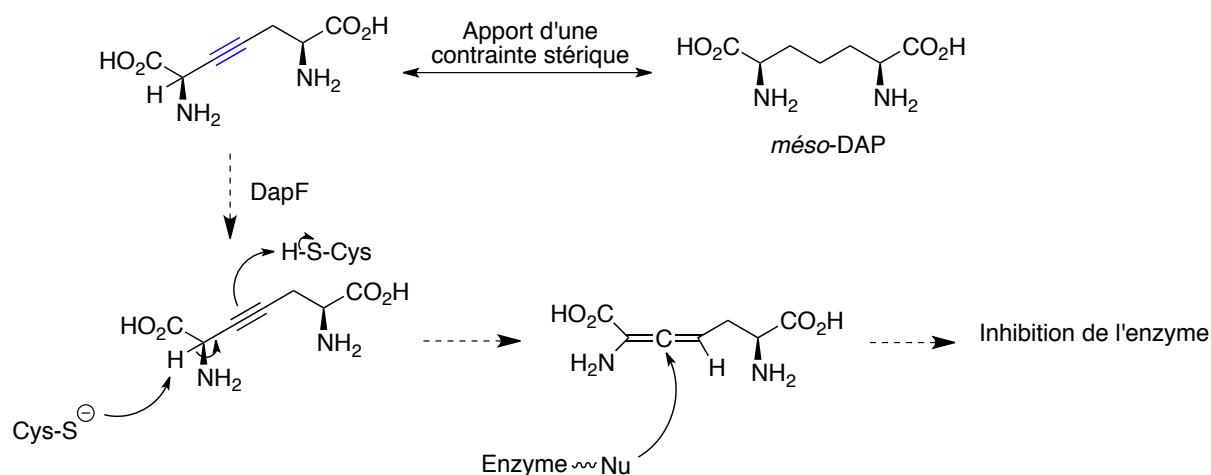


Figure 152. Représentation schématique du mécanisme d'inhibition imaginé pour les dérivés acétyléniques.

Dans cette partie, deux types de molécules seront envisagés: un diaminodiacide et un dérivé aminoalcool (Figure 153).

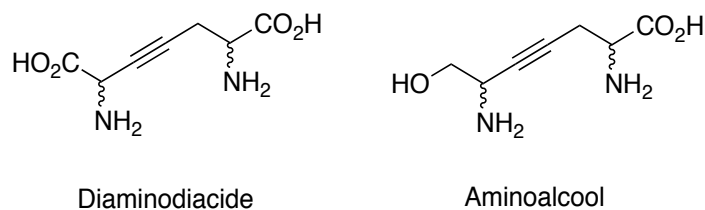


Figure 153. Structures des dérivés acétyléniques.

5.2. Analyse rétrosynthétique

Pour synthétiser ces diverses molécules, nous nous sommes basés sur la rétrosynthèse suivante:

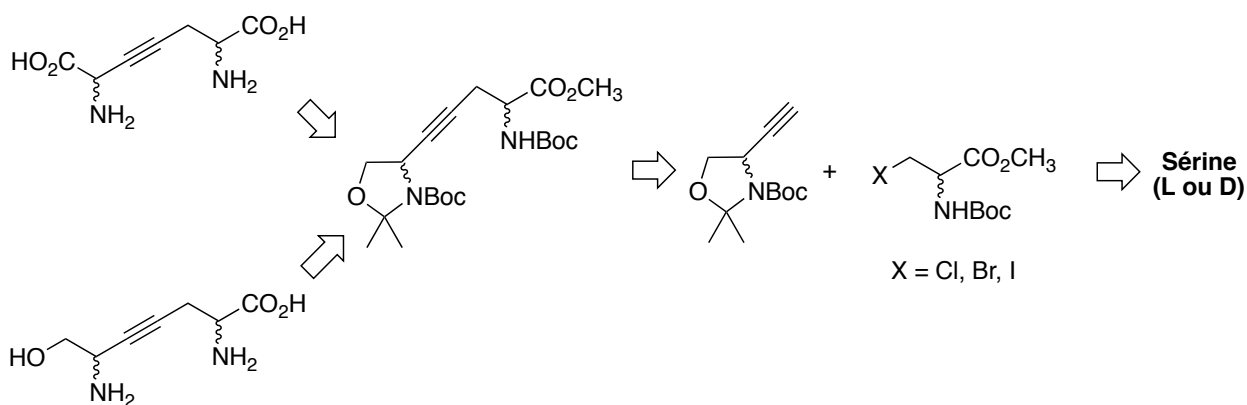


Figure 154. Schéma rétrosynthétique pour l'élaboration des dérivés comportant une triple liaison pour insaturation.

Dans ce schéma, les dérivés halogénés seront obtenus par réactions d'Appel ou de Garreg développées par la suite. La réaction clé pour le développement de ces nouvelles molécules consiste en une substitution nucléophile de l'acétylure sur les dérivés halogénés (Figure 154).

5.3. Synthèses de dérivés halogénés

5.3.1. Synthèse des dérivés chlorés **187** et bromés **188**

La synthèse des dérivés chlorés et bromés est réalisée dans des conditions similaires : au moyen de triphénylphosphine et d'un agent halogénant. Cette réaction, dite réaction d'Appel, permet de convertir efficacement un alcool en halogénure d'alkyle^{315,316}. Dans le premier cas, l'hexachloroéthane sera préféré au tétrachlorure de carbone, car beaucoup moins toxique et plus facile à manipuler. Les dérivés halogénés (*R*)-**187** et (*R*)-**188** sont obtenus avec de très bons rendements : 81% et 79% après purification^{317,318} (Figure 155).

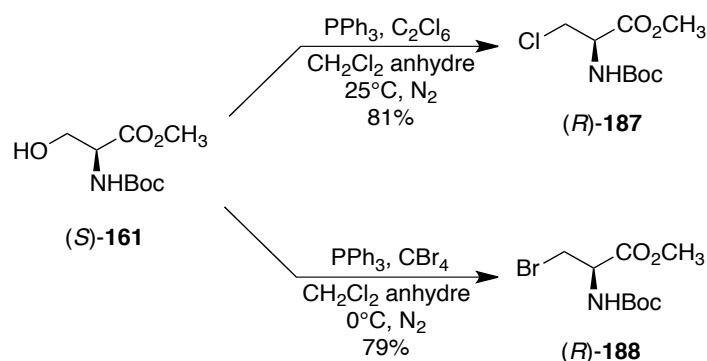


Figure 155. Synthèse des dérivés chlorés **187 et bromés **188** par la réaction d'Appel.**

5.3.2. Synthèse du dérivé iodé **189**

La synthèse du dérivé iodé est réalisée par la réaction de Garegg³¹⁹⁻³²². La différence notable avec les réactions précédentes est la présence d'imidazole. Cette base faible joue deux rôles primordiaux : celui de base et celui de bon groupe partant, une fois la formation du complexe avec la triphénylphosphine achevée. La conversion est réalisée en présence de triphénylphosphine et de diiode dans le dichlorométhane anhydre, pour conduire au dérivé iodé avec un rendement modéré de 45%³²³ (Figure 156).

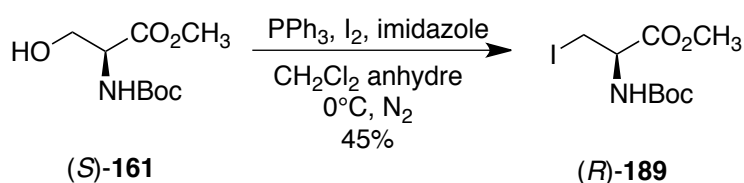


Figure 156. Synthèse du dérivé iodé (*R*)-189 par la réaction de Garegg.

Lors du déroulement de cette étape, le rendement attendu n'était pas à la hauteur de nos attentes (86% dans la littérature³²³). Ainsi, une alternative à la réaction de Garegg a été envisagée. Celle-ci se décline en deux étapes et offre de belles perspectives pour des synthèses à grandes échelles²⁹⁰. En effet, cette réaction est décrite en partant de plus de 26 grammes de (*S*)-161 et les deux produits obtenus sont isolés par simple filtration. La formation du dérivé tosylé (*S*)-167 a été décrite précédemment (Figure 133). Par la suite, celui-ci est mis en suspension dans de l'acétone avec de l'iodure de sodium dans le noir. Cet aspect de la réaction est essentiel pour éviter une photodégradation des ions iodures. Le dérivé iodé est ainsi obtenu avec un rendement de 36% sur deux étapes. Cependant, lors de la réalisation de la dernière étape, la quantité de composé de départ utilisée était assez faible (deux grammes). Ainsi, le rendement de 53% (80-82% dans la littérature²⁹⁰) peut être expliqué par une perte de produit plus importante lors de la filtration (Figure 157).

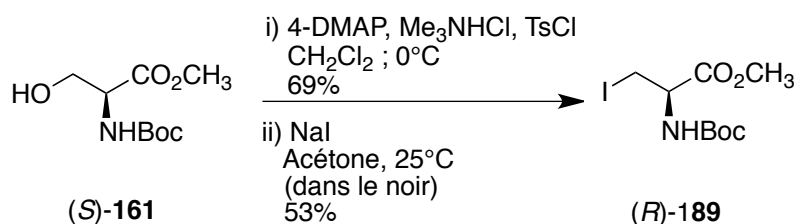


Figure 157. Synthèse du dérivé iodé (*R*)-189 en deux étapes.

5.4. Tentatives de couplage

Cette tentative de couplage va être réalisée entre le synthon éthynylglycine et le dérivé bromé préalablement décrit. Dans des conditions drastiques, la formation de l'alcynure **(a)** est réalisable par action d'une base forte. Par la suite, une substitution nucléophile **(b)** est envisagée par ajout d'un dérivé possédant un bon groupe partant (Figure 158).

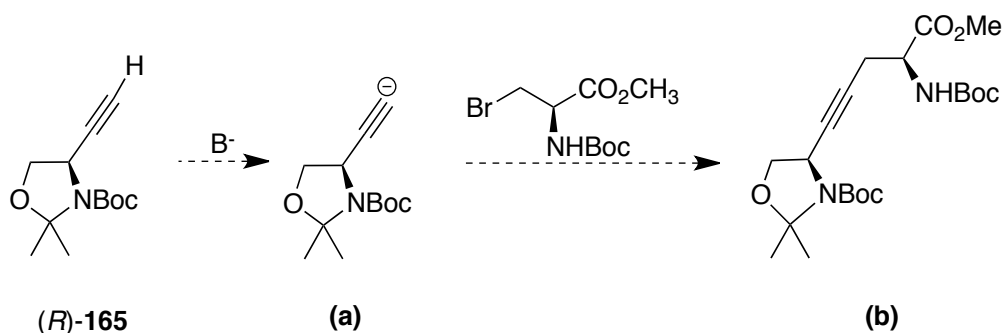


Figure 158. Réaction de couplage envisagée.

Pour cette réaction, deux essais pour la formation de l'alcynure ont été réalisés en utilisant une solution commerciale de butyllithium (1,6 M dans l'hexane) à -78°C dans le THF fraîchement distillé sous atmosphère d'azote. Ensuite, une solution du dérivé halogéné était ajoutée au goutte-à-goutte pour réaliser la réaction de substitution. Cependant, l'action de la base n'a pas permis la formation de l'alcynure. Pour ces deux tentatives, le temps d'attente entre l'ajout des deux réactifs a été modifié. Dans le premier essai, le dérivé bromé a été ajouté 20 minutes après l'ajout de la base. Dans le deuxième essai, les deux réactifs ont été ajoutés coup sur coup. Cependant, aucun changement n'a été observé. Après traitement de la réaction et isolement du brut réactionnel, les analyses ont permis de mettre en évidence la présence majoritaire du produit de dégradation **169** (Figure 159).



Figure 159. Formation du produit de dégradation **169**.

La formation de ce produit de dégradation est assez étonnante. Si la formation de l'alcynure n'a pas été possible dans un premier temps, l'énamine acétylénique **190** aurait dû être présente³⁰⁴ (Figure 160). L'acidité assez importante du proton en α de la fonction carbamate en fait une cible de choix pour une base forte.

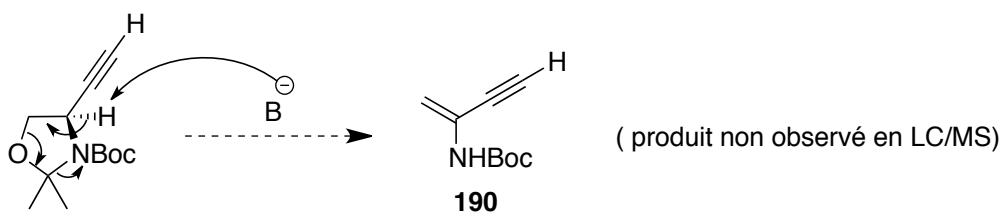


Figure 160. Formation de l'énamine acétylénique 190.

Ainsi, plusieurs conclusions peuvent être déduites de ces résultats. Dans un premier temps, il serait préférable d'utiliser une solution de butyllithium fraîchement préparée au laboratoire. Effectivement, un mauvais stockage ou un mauvais conditionnement pourraient provoquer une hydrolyse partielle du réactif.

Dans un deuxième temps, l'utilisation d'une base plus encombrée pourrait fournir de meilleurs résultats. En effet, le LDA (Diisopropylamidure de lithium) ou encore le *tert*-BuLi (*tert*-Butyllithium) devraient favoriser la formation de l'alcynure, car plus accessible du point de vue de l'encombrement stérique (Figure 161).

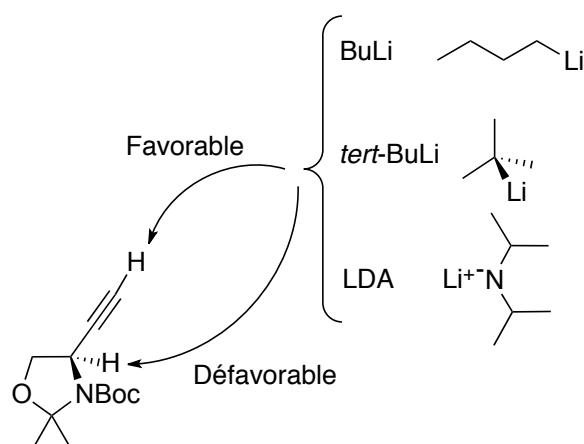


Figure 161. Changement de base pour la formation de l'alcynure.

Dans un troisième temps, le contrôle de la température pourrait être crucial pour le bon déroulement de la manipulation. En 1995, Reginato et ses collaborateurs ont réalisé diverses

substitutions avec le synthon éthynylglycine sur différents électrophiles en utilisant le n-BuLi comme base et avec une plage de température comprise entre -78°C à 20°C³²⁴ (Figure 162).

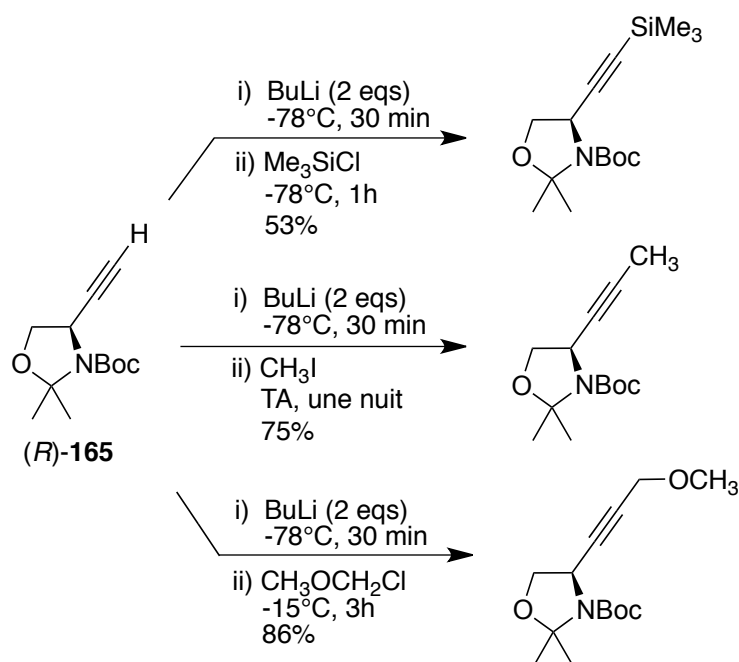


Figure 162. Exemple de réactions de substitutions décrites dans la littérature.

6. Conclusion et perspectives de recherche

Notre approche a consisté en la synthèse d'analogues du *méso*-DAP et de la L-lysine stériquement contraints. Près de vingt intermédiaires ont été développés avec l'incorporation d'un cycle triazole au niveau de la chaîne latérale et les premières tentatives d'oxydation confirment en partie la faisabilité de notre projet. Cependant, plusieurs investigations devront être entreprises pour développer une méthode efficace pour pouvoir réaliser cette étape cruciale (Figure 163).

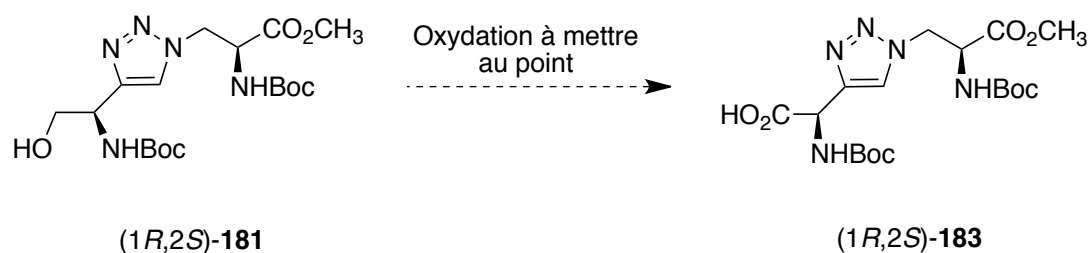


Figure 163. Étape d'oxydation du triazole (1*R*,2*S*)-181 à mettre au point.

Par la suite, le savoir-faire du laboratoire sur la synthèse de dérivés d'acides aminés acétyléniques a pu être mis en évidence avec le développement d'une autre série de molécules. Cependant, les premières tentatives de substitution n'ont pas permis d'atteindre nos objectifs. Plusieurs solutions ont été proposées et seront testées au laboratoire ultérieurement.

Suite de la Partie expérimentale

Description des méthodes générales utilisées

Méthode G : Substitution d'un mésylate - synthèse d'un azoture

À une solution de **166** (1,554g ; 5,23 mmol) dans 35 mL de DMF est ajouté de l'azoture de sodium (0,852g ; 13,1 mmol). La solution est chauffée à 50°C pendant 30 minutes.

Le mélange réactionnel est transféré dans un bécher contenant 100 mL d'eau froide sous agitation. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*60 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (8*80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode H : Substitution d'un tosylate - synthèse d'un azoture

À une solution de **167** (0,518g ; 1,39 mmol) dans 19 mL de DMF est ajouté de l'azoture de sodium (0,285g ; 4,38 mmol). La solution est chauffée à 70°C pendant 10 minutes.

Le mélange réactionnel est transféré dans un bécher contenant 100 mL d'eau froide sous agitation. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (4*80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode I : Réaction de Mitsunobu - synthèse d'un azoture

À une solution de **161** (4,72g ; 21,5 mmol) dans 152 mL de THF anhydre à 0°C sous atmosphère d'azote, sont ajoutés de la triphénylphosphine (6,47g ; 24,5 mmol), du DIAD (5,41 mL ; 27,5 mmol) et du DPPA (5,28 mL ; 24,5 mmol).

Après 1h30 d'agitation à 0°C, la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange CH₂Cl₂/cyclohexane.

Méthode J : Cycloaddition dipolaire 1,3-cuprocatalysée (CuAAC)

À une solution d'azoture (1 mmol) et d'alcyne (1 mmol) dans un mélange eau/*tert*-butanol (8 mL; 1/1 ; v/v), sont ajoutés du L-ascorbate de sodium (0,2 mmol) et du sulfate de cuivre pentahydraté (0,1 mmol). La réaction est placée sous agitation à température ambiante pendant 24h.

Le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est repris avec de l'eau (50 mL) et de l'acétate d'éthyle (50 mL). Les deux phases sont séparées et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées

sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées sous vide. Le résidu brut d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Méthode K : Synthèse d'iodure d'alkyle via la réaction de Mitsunobu

À une solution de triphénylphosphine (1,79g ; 6,8 mmol) et d'imidazole (0,47g ; 6,8 mmol) dans 7 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C sous atmosphère d'azote est ajouté du diiode (1,74g ; 6,8 mmol). Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, une solution de **161** (1,00g ; 4,6 mmol) dans 21 mL de dichlorométhane anhydre est ajoutée au goutte à goutte au mélange réactionnel à 0°C.

Après 1h30 d'agitation à 0°C, 40 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés à la solution. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*40 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par colonne ouverte en éluant par un mélange AcOEt/EdP. Le solide obtenu est lavé rapidement avec 5 mL de pentane (-20°C).

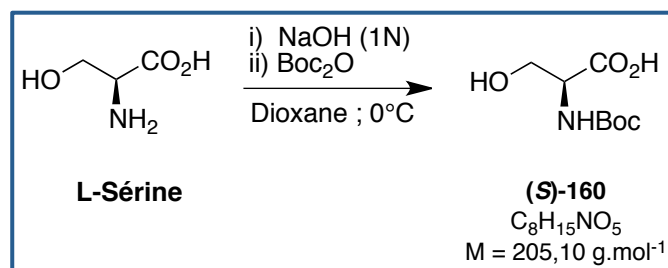
Méthode L : Substitution d'un tosylate - synthèse d'un iodure d'alkyle

À une solution de **167** (2,00g ; 5,36 mmol) dans 16 mL d'acétone est ajouté de l'iodure de sodium (0,96g ; 6,43 mmol).

Après 3 jours sous agitation à température ambiante dans le noir, la solution est filtrée sur fritté de porosité 4. Le solide est lavé avec de l'acétone jusqu'à décoloration complète et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est repris avec 10 mL d'éther diéthylique et 5 mL d'une solution de thiosulfate de sodium (1M). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (1*10 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution de thiosulfate de sodium (5 mL ; 1M) et une solution saturée de chlorure de sodium (5mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite.

Le résidu brut d'évaporation (1,662g) est solubilisé dans 2 mL d'éther de pétrole chaud et on laisse la solution revenir à température ambiante. Après 5 minutes à 0°C, les parois du ballon sont grattées à l'aide d'une spatule pour amorcer la précipitation d'une fine suspension jaune pâle. Après 1h à -20°C, le solide est filtré sur fritté de porosité 4 et lavé avec de l'éther de pétrole (-20°C).

Acide (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoïque ((S)-160)



À une solution de L-sérine (10g ; 94 mmol) dans 188 mL (188 mmol) d'une solution de soude à 1N à 0°C, est ajouté au goutte à goutte 24,63g (113 mmol ; en solution dans 95 mL de 1,4-dioxane) de Boc₂O. Après 30 minutes d'agitation à 0°C, la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 24h. Le lendemain, 10,31g (47 mmol) de Boc₂O sont ajoutés au mélange réactionnel et la solution est agitée pendant 24h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est concentré jusqu'à moitié de son volume original. La solution est placée à 0°C pendant 20 minutes et acidifiée lentement avec une solution d'hydrogénosulfate de potassium (188 mL ; 188 mmol) à 1N pour obtenir un pH voisin de 2. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (4*120 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le produit sera utilisé comme cela pour la suite.

Huile incolore

R_f = 0,72 (butanol/eau/acide acétique : 8/1/1)

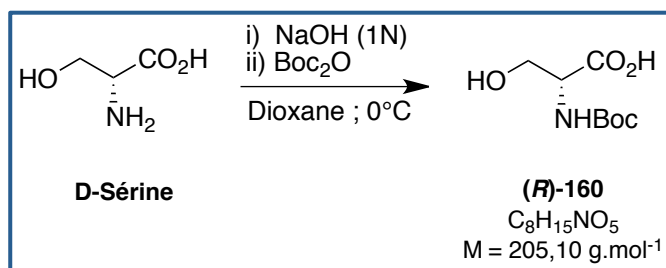
Rendement = Quantitatif

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 3,82-4,07 (m, 2H, CH₂) ; 4,34 (s, 1H, CH) ; 5,85 (d, 1H, *J* = 6,6Hz, NH). (Le proton de la fonction acide n'est pas visible)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4 (C(CH₃)₃) ; 55,7 (CH) ; 63,2 (CH₂) ; 80,7 (C(CH₃)₃) ; 156,4 (NCO₂) ; 174,4 (CO₂H).

IR (cm⁻¹): 1685 (ν_{C=O}) ; 2935, 2977 (ν_{NH2}) ; 3343 (ν_{OH}).

Acide (*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoïque ((*R*)-160)



Le composé **(*R*)-160** est synthétisé de la même façon que le composé **(*S*)-160** en partant de 10g de D-sérine.

Huile incolore

$R_f = 0,72$ (butanol/eau/acide acétique : 8/1/1)

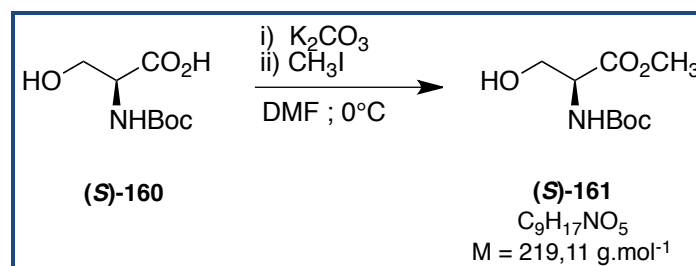
Rendement = Quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,85-4,09 (m, 2H, CH_2) ; 4,37 (s, 1H, CH) ; 5,74 (d, 1H, $J = 6,6\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 55,6 (CH) ; 63,1 (CH_2) ; 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 156,5 (NCO_2) ; 174,0 (CO_2H).

IR (cm^{-1}): 1685 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2935, 2977 (ν_{NH_2}) ; 3343 (ν_{OH}).

(S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoate de méthyle ((S)-161)



À une solution de **(S)-160** (19,86g ; 96,8 mmol) dans 95 mL de DMF à 0°C est ajouté 16,03g (116,2 mmol) de K₂CO₃. Après 20 minutes sous agitation à 0°C, 12,07 mL (193,6 mmol) d’iodométhane sont ajoutés au goutte à goutte. À la fin de l’addition, 60 mL de DMF sont ajoutés. La solution est laissée sous agitation pendant 2h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est filtré sur fritté de porosité 3 et le solide est lavé avec 50 mL d’acétate d’éthyle. Le filtrat est repris avec 120 mL d’eau et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite à l’acétate d’éthyle (4*120 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (12*80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le produit sera utilisé comme cela pour la suite.

Huile incolore

R_f = 0,30 (acétate d’éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 85% (sur 2 étapes)

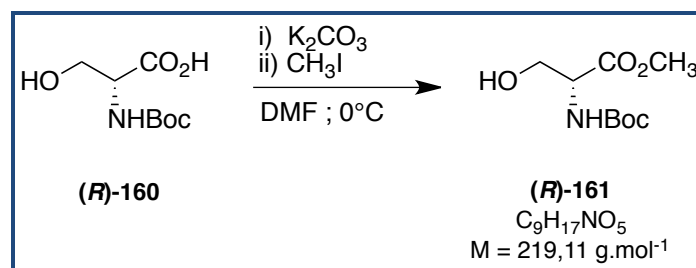
[α]_D²⁰ = -19,9 (MeOH ; c=4,07) ; litt³²⁵. -19,1 (MeOH ; c=4,07)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 2,04 (s, 1H, OH) ; 3,78 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,87-3,99 (m, 2H, CH₂) ; 4,38 (br s, 1H, CH) ; 5,46 (br s, 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4 (C(CH₃)₃) ; 52,8 (OCH₃) ; 55,9 (CH) ; 63,7 (CH₂) ; 80,5 (C(CH₃)₃) ; 155,9 (NCO₂) ; 171,4 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1684 (ν_{C=O}) ; 1738 (ν_{C=O}) ; 3451 (ν_{OH}).

(R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoate de méthyle ((R)-161)



Le composé **(R)-161** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 19,86g (96,8 mmol) de **(R)-160**.

Huile incolore

$R_f = 0,30$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 85% (sur 2 étapes)

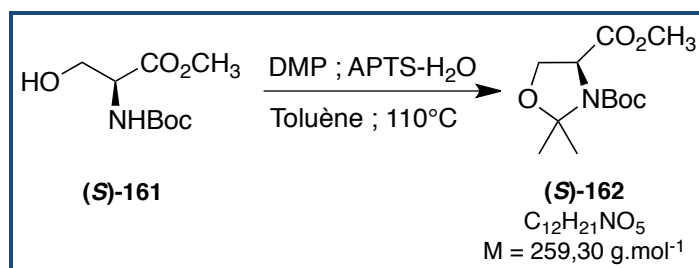
$[\alpha]_D^{20} = +19,9$ (MeOH ; $c=4,07$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,19 (s, 1H, OH) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,87-3,99 (m, 2H, CH_2) ; 4,38 (br s, 1H, CH) ; 5,44 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 52,8 (CO_2CH_3) ; 55,9 (CH) ; 63,7 (CH_2) ; 80,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,9 (NCO_2) ; 171,4 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1738 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 3451 (ν_{OH}).

(S)-2,2-Diméthyloxazolidine-3,4-dicarboxylate de 3-*tert*-butyle et de 4-méthyle ((S)-162)



À une solution de **(S)-161** (17,77g ; 81 mmol) dans 179 mL de toluène sont ajoutés 19,92 mL (162 mmol) de 2,2-diméthoxypropane et 0,22g (1,13 mmol) d'acide *para*-toluènesulfonique monohydrate. Après 24h à reflux, le mélange réactionnel est distillé grâce à un appareil de Dean-Stark jusqu'à récupérer un volume d'environ 10 mL. Après retour à température ambiante, 19,92 mL (162 mmol) de 2,2-diméthoxypropane et 0,22g (1,13 mmol) d'acide *para*-toluènesulfonique sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est à nouveau porté à reflux pendant une journée. Ce processus est répété 3 fois jusqu'à disparition complète du produit de départ par CCM.

Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu est repris avec 150 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (150 mL) et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (4*120 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (80 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par distillation sous pression réduite ($P=0.8$ mmHg, température (tête de colonne) = 76°C , température (bain d'huile) = 137°C).

Huile jaune pâle

$R_f = 0,70$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 59%

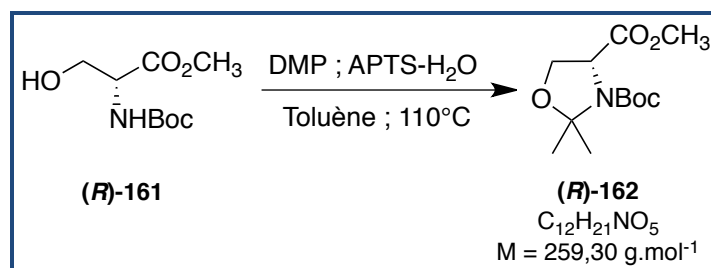
$[\alpha]_D^{20} = -53,6$ (CHCl_3 ; $c=1,29$), litt³²⁵. $-54,4$ (CHCl_3 ; $c=1,07$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,41; 1,49; 1,53; 1,64; 1,67 (5s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 3,76 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,01-4,18 (m, 2H, OCH_2) ; 4,38 et 4,49 (2dd, 1H, CH, $J_1 = 3,0\text{Hz}$, $J_2 = 6,9\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 24,5; 25,1; 25,2; 26,1; 28,37; 28,43 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 52,4; 52,5 (CO_2CH_3) ; 59,28; 59,35 (CH) ; 66,1; 66,4 (CH_2) ; 80,4; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,5; 95,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 151,3 ; 152,2 (NCO_2) ; 171,4; 171,8 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1700 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1757 ($\nu_{\text{C=O}}$).

(R)-2,2-Diméthylloxazolidine-3,4-dicarboxylate de 3-*tert*-butyle et de 4-méthyle ((R)-162)



Le composé **(R)-162** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 17,77g (81 mmol) de **(R)-161**.

Huile jaune pâle

R_f = 0,70 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 59%

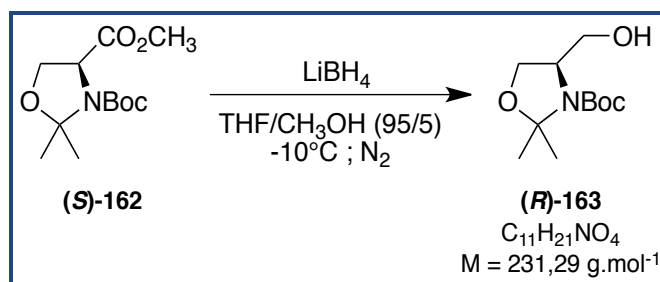
[α]_D²⁰ = +58,6 (CHCl₃ ; c=1,12)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,41; 1,49; 1,53; 1,63; 1,67 (5s, 15H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 3,75 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 4,00-4,18 (m, 2H, OCH₂) ; 4,38 et 4,48 (2dd, 1H, CH, J₁ = 3,0Hz, J₂ = 6,9Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 24,5; 25,1; 25,3; 26,2; 28,4; 28,5 (C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 52,4; 52,6 (CO₂CH₃) ; 59,3; 59,4 (CH) ; 66,1, 66,4 (CH₂) ; 80,5, 81,1 (C(CH₃)₃) ; 94,6, 95,2 (C(CH₃)₂) ; 151,3, 152,3 (NCO₂) ; 171,4, 171,9 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1700 (ν_{C=O}) ; 1757 (ν_{C=O}).

(R)-4-Hydroxyméthyl-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((R)-163)



À une solution de (*S*)-**162** (12,10g ; 47 mmol) dans un mélange THF/MeOH (95/5, v/v) de 215 mL à -10°C sous atmosphère d'azote, est ajouté en 3 portions égales sur une durée de 30 minutes, 2,13g (98 mmol) de borohydrure de lithium. La solution est laissée sous agitation à -10°C pendant 1h30 et 1h30 à température ambiante.

Le mélange réactionnel est placé sous agitation à -10°C et 120 mL d'eau sont ajoutés au goutte à goutte. La solution est filtrée sur fritté de porosité 3 et le solide est lavé avec 50 mL d'éther diéthylique. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*100 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le produit sera utilisé comme cela pour la suite.

Huile incolore

$R_f = 0,25$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 95%

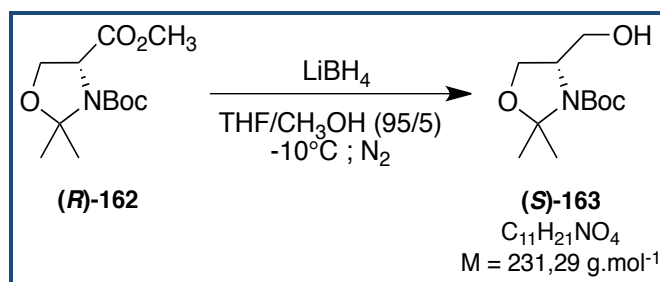
$[\alpha]_D^{20} = -23,2$ (CHCl_3 ; $c=1,29$) ; litt³²⁵. -23,9 (CHCl_3 ; $c=1,00$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45; 1,49; 1,55 (3s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,70 (br s, 1H, OH) ; 3,60-4,11 (m, 5H, CH et 2 CH_2O).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 53,1 (CH) ; 63,9 (CH_2O) ; 64,1 (CH_2O) ; 79,7, 80,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,3, 98,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 155,5, 156,5 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1671 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 3474 (ν_{OH}).

(S)-4-Hydroxyméthyl-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((S)-163)



Le composé (S)-**163** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 12,10g (47 mmol) de (R)-**162**.

Huile incolore

$R_f = 0,25$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 95%

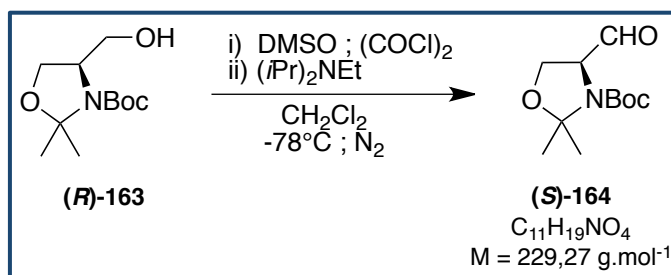
$[\alpha]_D^{20} = +23,9$ (CHCl_3 ; $c=1,04$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45; 1,49; 1,56 (3s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,35 (br s, 1H, OH) ; 3,60-4,11 (m, 5H, CH et $2\text{CH}_2\text{O}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 53,2 (CH) ; 63,9 (CH_2O) ; 64,0 (CH_2O) ; 79,7, 80,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,3, 98,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 155,5, 156,5 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1671 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 3474 (ν_{OH}).

(S)-4 Formyl-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((S)-164)



À une solution de chlorure d'oxalyle (4,67 mL ; 55,2 mmol) dans 95 mL de CH₂Cl₂ à -78 °C sous atmosphère d'azote, sont ajoutés au goutte à goutte 7,24 mL (102 mmol ; en solution dans 16 mL de CH₂Cl₂) de diméthylsulfoxyde. Après 1h sous agitation à -78°C, 9,10g (39,4 mmol ; en solution dans 30 mL de CH₂Cl₂) de (R)-**163** sont ajoutés au goutte à goutte. Après 3h sous agitation à -78°C, 40,41 mL (232 mmol) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés au goutte à goutte. La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit.

Le mélange réactionnel est placé à 0°C et 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (2N) est ajouté au goutte à goutte. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*80 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution d'acide chlorhydrique (40 mL ; 2N), une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (80 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par distillation sous pression réduite (P=0,8 mmHg ; température (tête de colonne) = 65°C ; température (bain d'huile) = 137°C).

Huile jaune pâle

R_f = 0,60 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 64%

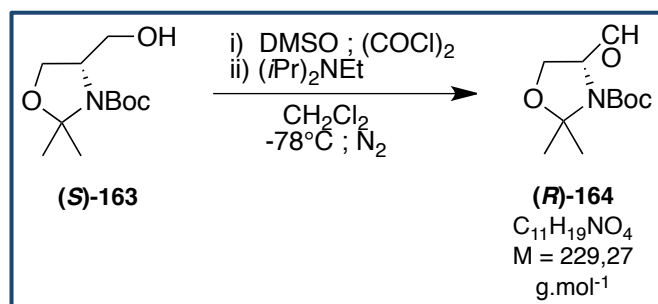
[α]_D²⁰ = -82,3 (CHCl₃ ; c=1,16) ; litt³²⁵. -93,3 (CHCl₃ ; c=1,10)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,43; 1,45; 1,51; 1,56; 1,60; 1,65 (6s, 15H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 4,02-4,35 (m, 3H, CH et CH₂O) ; 9,54; 9,60 (2s, CHO).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 23,9; 24,8; 25,9; 26,8; 28,4 (C(CH₃)₂ et C(CH₃)₃) ; 63,6; 64,1 (CH₂) ; 64,8 (CH) ; 81,2; 81,5 (C(CH₃)₃) ; 94,5; 95,2 (C(CH₃)₂) ; 151,5; 152,8 (NCO₂) ; 199,6 (CHO).

IR (cm⁻¹): 1691 (ν_{C=O}) ; 1737 (ν_{C=O}).

(*R*)-4 Formyl-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((*R*)-164)



Le composé (*R*)-**164** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 9,10g (39,4 mmol) de (*S*)-**163**.

Huile jaune pâle

$R_f = 0,60$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 64%

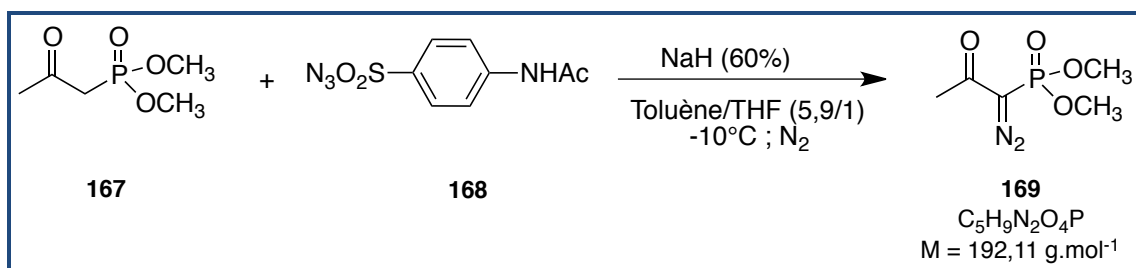
$[\alpha]_D^{20} = 84,6$ (CHCl_3 ; $c=1,12$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,43; 1,45; 1,51; 1,56; 1,60; 1,65 (6s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 4,05-4,35 (m, 3H, CH et CH_2) ; 9,54; 9,60 (2s, CHO).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,9; 24,8; 25,9; 26,8; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 63,6; 64,1 (CH_2) ; 64,8 (CH) ; 81,2; 81,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,5; 95,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 151,5; 152,8 (NCO_2) ; 199,6 (CHO).

IR (cm^{-1}): 1691 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1737 ($\nu_{\text{C=O}}$).

(1-Diazo-2-oxopropyl)phosphonate de diméthyle (169)



À une solution d'hydruure de sodium (2,74g ; 72,2 mmol ; 60% en dispersion dans de l'huile minérale) dans 220 mL de toluène fraîchement distillé à 0°C sous atmosphère d'azote, est ajouté une solution de 2-oxopropylphosphonate de diméthyle **167** (10,50g ; 60,2 mmol ; en solution dans 45 mL de toluène anhydre) au goutte à goutte. Après 1h sous agitation à 0°C , 14,64g (60.2 mmol ; en solution dans 45 mL de tétrahydrofurane anhydre) d'azoture de 4-acétamidobenzènesulfonyl **168** sont ajoutés au goutte à goutte. Après 16h sous agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est filtré sur Célite[®] 545 (16g) et le solide est lavé avec 70 mL de tétrahydrofurane.

Le filtrat est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Huile jaune

$R_f = 0,30$ (acétate d'éthyle)

Rendement = 74%

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 2,26 (s, 3H, CH_3CO) ; 3,84 (d, 6H, $J_{\text{H-P}} = 11,9 \text{ Hz}$, CH_3O).

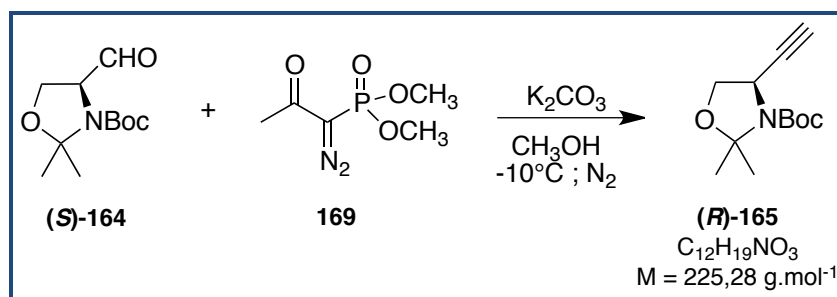
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 26,9 (s, CH_3CO) ; 53,4 (d, $J_{\text{C-P}} = 5,4 \text{ Hz}$, CH_3O) ; 63,2 (d, $J_{\text{C-P}} = 220,3 \text{ Hz}$, CN_2) ; 189,6 (d, $J_{\text{C-P}} = 12,9 \text{ Hz}$, CH_3CO).

IR (cm^{-1}): 1010 (ν_{POCH_3}) ; 1265 ($\nu_{\text{P=O}}$) ; 1654 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2116 ($\nu_{\text{C=N}_2}$).

UPLC : $t_R = 1,58 \text{ min}$; pureté : 98,1%.

Analyse élémentaire : Calculée : $\%(\text{C}) = 31,26\%$; $\%(\text{H}) = 4,72\%$; $\%(\text{N}) = 15,58\%$. Trouvée : $\%(\text{C}) = 31,05\%$; $\%(\text{H}) = 4,69$; $\%(\text{N}) = 14,73$.

(R)-4-Ethynyl-2,2-diméthylloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((R)-165)



À une solution de (S)-**164** (5g ; 22,2 mmol) dans 46 mL de méthanol à -10°C sont ajoutés 6,40g (33,3 mmol) de 1-diazo-2-oxopropylphosphonate de diméthyle **169** préalablement dilués dans 46 mL de méthanol. Après 15 minutes sous agitation à -10°C, 6,14g (44,4 mmol) de K₂CO₃ sont ajoutés en trois portions égales sur une durée de 30 minutes.

Après 2h30 d'agitation à température ambiante, 110 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium sont ajoutés. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther de pétrole (3*100 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Huile incolore

R_f = 0,78 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 77%

[α]_D²⁰ = -95,2 (CHCl₃ ; c=1,24) ; litt³⁰⁴. -96,5 (CHCl₃ ; c=1,23)

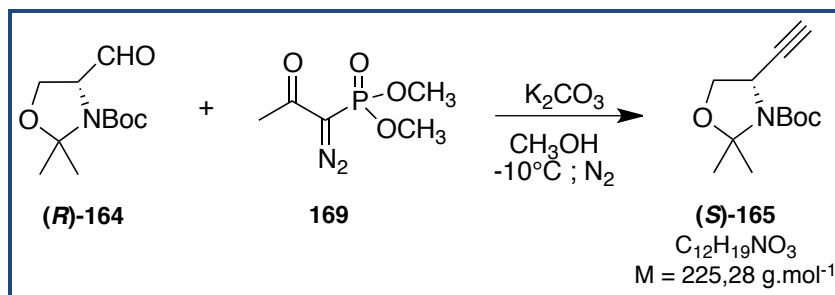
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,49; 1,63 (2s, 15H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 2,27 (br s, 1H, C≡C-H) ; 3,99-4,07 (m, 2H, CH₂O) ; 4,49-4,61 (m, 1H, CH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 24,5; 25,3; 26,0; 27,0; 28,5 (C(CH₃)₂ et C(CH₃)₃) ; 48,5 (CH) ; 68,8 (CH₂) ; 70,2, 70,6 (C≡C-H) ; 80,5, 81,0 (C(CH₃)₃) ; 82,5, 83,0 (C≡C-H) ; 94,2, 94,6 (C(CH₃)₂) ; 151,6, 151,7 (NCO₂).

IR (cm⁻¹): 1697 (ν_{C=O}) ; 3270 (ν_{C≡CH}).

HRMS (ES⁺): [M + Na]⁺ calculée pour C₁₂H₁₉NO₃Na, 248,1263 ; trouvée, 248,1264.

(S)-4-Ethynyl-2,2-diméthylloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((S)-165)



Le composé (S)-**165** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 5g (22,2 mmol) de (R)-**164**.

Huile incolore

R_f = 0,78 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 77%

[α]_D²⁰ = 96,1 (CHCl₃ ; c=1,22)

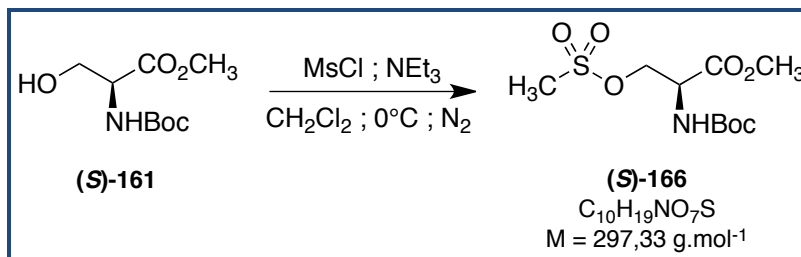
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,49; 1,63 (2s, 15H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 2,27 (br s, 1H, C≡C-H) ; 3,99-4,07 (m, 2H, CH₂O) ; 4,49-4,61 (m, 1H, CH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 24,5; 25,3; 26,0; 27,0; 28,5 (C(CH₃)₂ et C(CH₃)₃) ; 48,5 (CH) ; 68,8 (CH₂) ; 70,2, 70,6 (C≡C-H) ; 80,6, 81,0 (C(CH₃)₃) ; 82,5, 83,0 (C≡C-H) ; 94,2, 94,6 (C(CH₃)₂) ; 151,6, 151,8 (NCO₂).

IR (cm⁻¹): 1697 (ν_{C=O}) ; 3270 (ν_{C≡CH}).

HRMS (ES⁺): [M + Na]⁺ calculée pour C₁₂H₁₉NO₃Na, 248,1263 ; trouvée, 248,1261.

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((méthylsulfonyl)oxy)propanoate de méthyle ((S)-166)



À une solution de (S)-**161** (7,01g ; 319 mmol) dans 160 mL de dichlorométhane anhydre (fraîchement distillé) à 0°C sous atmosphère d'azote sont ajoutés au goutte à goutte de la triéthylamine (8,91 mL ; 640 mmol) et du chlorure de mésyle (3,71 mL ; 480 mmol). La solution est laissée sous agitation à 0°C pendant 30 minutes puis 1h à température ambiante. Le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est repris avec de l'eau (100 mL) et du dichlorométhane (100 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*100 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (10*80 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Huile jaune pâle

$R_f = 0,60$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 64%

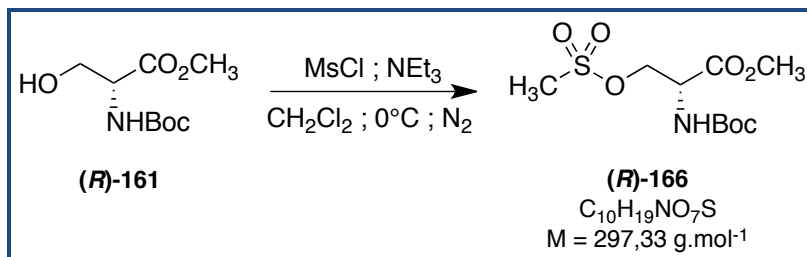
$[\alpha]_D^{20} = +21,4$ (CHCl_3 ; $c=0,98$) ; litt²⁸⁹. $+22$ (CHCl_3 ; $c=0,98$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,02 (s, 3H, CH_3SO_3) ; 3,81 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,51-4,60 (m, 3H, CH et CH_2O) ; 5,39 (d, 1H, $J = 5,5\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 37,6 (CH_3SO_3) ; 53,2 (CH et CO_2CH_3) ; 69,1 (CH_2) ; 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,2 (NCO_2) ; 169,2 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1352 ($\nu_{\text{S=O}}$) ; 1708 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1748 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2978, 2935 (ν_{NH}).

(R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((méthylsulfonyl)oxy)propanoate de méthyle ((R)-166)



Le composé (R)-166 est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 7,01g (319 mmol) de (R)-161.

Huile jaune pâle

$R_f = 0,60$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 64%

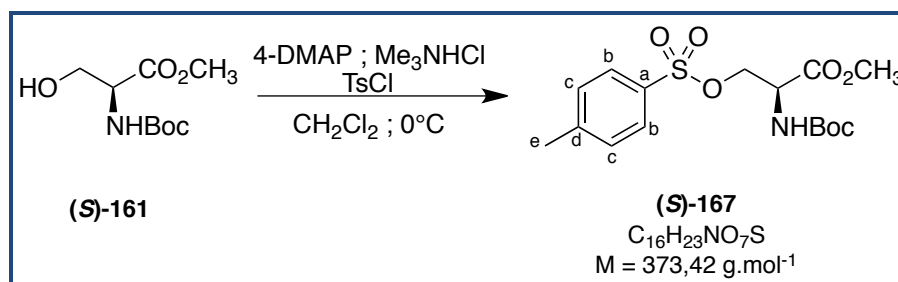
$[\alpha]_D^{20} = -21,3$ (CHCl_3 ; $c=0,94$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,02 (s, 3H, CH_3SO_3) ; 3,81 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,52-4,60 (m, 3H, CH et CH_2O) ; 5,39 (d, 1H, $J = 6,2\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 37,6 (CH_3SO_3) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,3 (CH) ; 69,1 (CH_2) ; 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,2 (NCO_2) ; 169,2 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1352 ($\nu_{\text{S=O}}$) ; 1708 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1748 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2978, 2935 (ν_{NH}).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(tosyloxy)propanoate de méthyle ((S)-167)



À une solution de (S)-**161** (18,31g ; 83,6 mmol) dans 140 mL de dichlorométhane à 0°C sont ajoutés, de la 4-diméthylaminopyridine (0,51g ; 4,18 mmol), du chlorure de triméthylammonium (0,80g ; 8,36 mmol) et du chlorure de tosyle (15,94g ; 83,6 mmol).

Après 2h sous agitation à 0°C, le mélange réactionnel est transféré dans un b cher contenant 140 mL d'un mélange d'eau et d'acide chlorhydrique 2N (1/1 ; v/v)   0°C. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (2*70 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite.

Le brut réactionnel (26,2 g) est solubilisé dans 98 mL d'éther diéthylique chaud, laisser refroidir à température ambiante puis placé à -20°C. Après 5 minutes à -20°C, les parois du ballon sont grattées à l'aide d'une spatule pour amorcer la précipitation d'une fine suspension blanche. Le ballon est laissé à -20°C, et en l'espace de 2h est ajouté de l'éther de pétrole (175 mL au total ; en 5 portions égales). Le ballon est laissé à -20°C pour une nuit. Le solide est filtré sur fritté de porositt  3, lavé avec 50 mL d'éther de pétrole froid.

Solide blanc

$R_f = 0,43$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 69%

Mp : 74-76°C ; litt²⁹⁰. 74-76°C

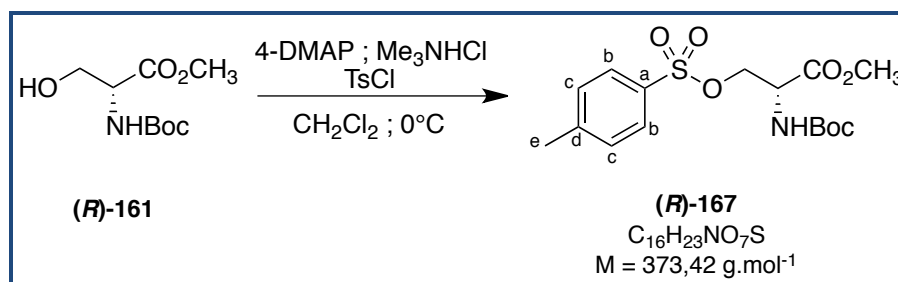
$[\alpha]_D^{20} = +4,0$ (MeOH ; c=2,01) ; litt²⁹⁰. +3 (MeOH ; c=2,00)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 2,45 (s, 3H, H_e) ; 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 4,34 (dd, 2H, $J_1 = 32,4\text{Hz}$, $J_2 = 9,9\text{Hz}$, CH₂O) ; 4,50 (d, 1H, $J = 7,5\text{Hz}$, CH) ; 5,29 (d, 1H, $J = 6,6\text{Hz}$, NH) ; 7,35 (d, 2H, $J = 7,8\text{Hz}$, H_c) ; 7,76 (d, 2H, $J = 7,8\text{Hz}$, H_b).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 21,8 (C_e) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 53,0 (OCH₃) ; 53,1 (CH) ; 69,6 (CH₂) ; 80,7 (C(CH₃)₃) ; 128,1 (C_b) ; 130,1 (C_c) ; 132,5 (C_d) ; 145,3 (C_a) ; 155,1 (NCO₂) ; 169,1 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1702 ($\nu_{C=O}$) ; 1738 ($\nu_{C=O}$) ; 2927, 2982 (ν_{NH}).

(*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(tosyloxy)propanoate de méthyle ((*R*)-167)



Le composé (*R*)-**167** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 18,31g (836 mmol) de (*R*)-**161**.

Solide blanc

$R_f = 0,43$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 69%

Mp : 74-76°C

$[\alpha]_D^{20} = -4,0$ (MeOH ; $c=2,0$)

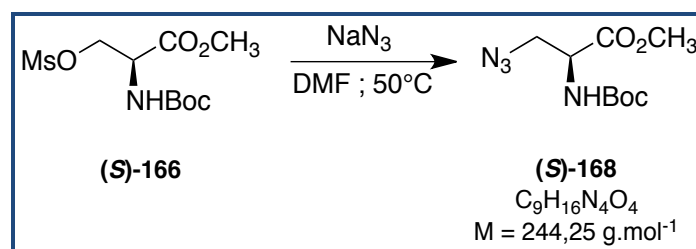
RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz): 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 2,45 (s, 3H, H_e) ; 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 4,33 (dd, 2H, $J_1 = 33,4\text{Hz}$, $J_2 = 10,1\text{Hz}$, CH₂O) ; 4,50 (m, 1H, CH) ; 5,30 (d, 1H, $J = 7,7\text{Hz}$, NH) ; 7,35 (d, 2H, $J = 7,8\text{Hz}$, H_c) ; 7,76 (d, 2H, $J = 7,8\text{Hz}$, H_b).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz): 21,8 (C_e) ; 28,3 (C(CH₃)₃) ; 53,1 (CH et OCH₃) ; 69,6 (CH₂) ; 80,7 (C(CH₃)₃) ; 128,1 (C_b) ; 130,1 (C_c) ; 132,5 (C_d) ; 145,3 (C_a) ; 155,1 (NCO₂) ; 169,1 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1702 ($\nu_{C=O}$) ; 1738 ($\nu_{C=O}$) ; 2927, 2982 (ν_{NH}).

3-Azido-(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate de méthyle ((S)-168)

Selon la méthode G :



Huile incolore

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 25%

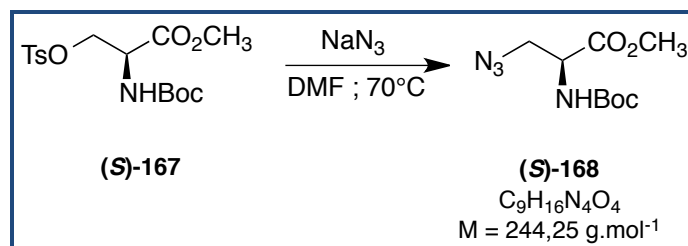
$[\alpha]_D^{20} = +37,06$ (CHCl_3 ; $c=1,10$) ; litt²⁸⁹. $+26$ (CHCl_3 ; $c=0,99$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,72 (d, 2H, $J = 3,6\text{Hz}$, CH_2) ; 3,80 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,47 (m, 1H, CH) ; 5,37 (d, 1H $J = 6,2\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 52,8 (CH_2) ; 53,0 (OCH_3) ; 53,6 (CH) ; 80,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,2 (NCO_2) ; 170,4 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1747 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2102 (ν_{N_3}) ; 2937, 2979 (ν_{NH}).

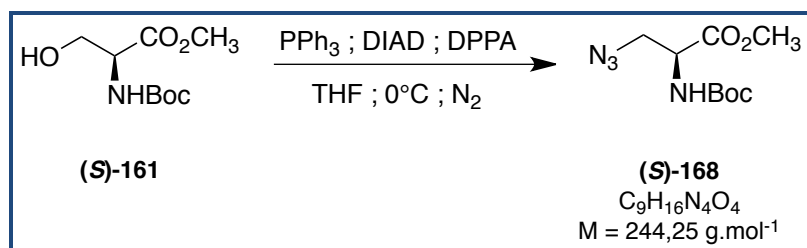
Selon la méthode H :



Rendement = 39%

Les analyses du composé (S)-168 sont en accords avec les données présentées pour la méthode G.

Selon la méthode I :

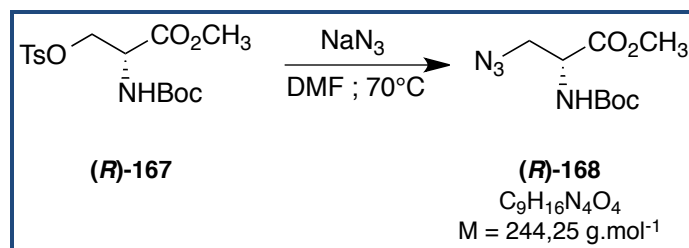


Rendement = 41%

Les analyses du composé **(S)-168** sont en accords avec les données présentées pour la méthode G.

3-Azido-(*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate de méthyle ((*R*)-168)

Selon la méthode H :



Huile incolore

$R_f = 0,20$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 39%

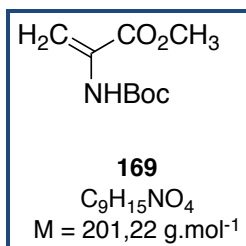
$[\alpha]_D^{20} = -36,35$ (CHCl_3 ; $c=1,04$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,72 (d, 2H, $J = 3,6\text{Hz}$, CH_2) ; 3,80 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,47 (m, 1H, CH) ; 5,37 (d, 1H $J = 6,8\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 52,8 (CH_2) ; 53,0 (OCH_3) ; 53,6 (CH) ; 80,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,2 (NCO_2) ; 170,4 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1747 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2102 (ν_{N_3}) ; 2937, 2979 (ν_{NH}).

2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)acrylate de méthyle (169)



Composé provenant d'une β -élimination lors de la synthèse des molécules (*S*)-**168** et (*R*)-**168** avec les méthodes de synthèses **G** et **H**.

Huile jaune

$R_f = 0,65$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

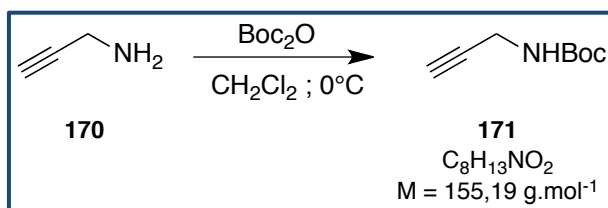
Rendement = 37% (Méthode **G**) ; 29% (Méthode **H**)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 3,83 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 5,72 (d, 1H, $J = 1,4\text{Hz}$, CH_2) ; 6,15 (s, 1H, CH_2) ; 7,01 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4 ($C(CH_3)_3$) ; 53,0 (OCH_3) ; 80,8 ($C(CH_3)_3$) ; 105,3 (CH_2), 131,4 (C), 152,7 (NCO_2), 164,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1714 ($\nu_{C=O}$).

Prop-2-ynecarbamate de *tert*-butyle (171)



À une solution de 3-amino-1-propyne **170** (0,500g ; 9,08 mmol) dans 8 mL de dichlorométhane à 0°C est ajoutée une solution de Boc₂O (2,080g ; 9,53 mmol ; en solution dans 4,5 mL de dichlorométhane) au goutte à goutte.

Après 30 minutes sous agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous vide. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide blanc

R_f = 0,38 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 95%

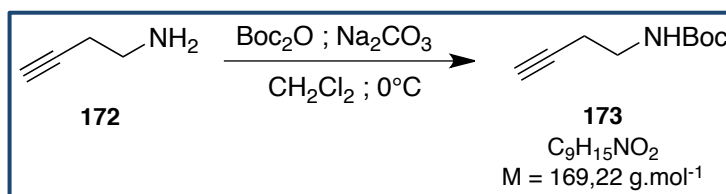
Mp : 40-42°C ; litt³²⁶. 41-42°C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 3,04 (t, 1H, *J* = 2,4Hz, C≡C-H) ; 3,69 (dd, 2H, *J*₁ = 2,4Hz, *J*₂ = 5,8Hz, CH₂N) ; 7,25 (br s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 28,2 (C(CH₃)₃) ; 29,3 (CH₂N) ; 72,6 (C≡C-H) ; 78,2 (C(CH₃)₃) ; 81,7 (C≡C-H) ; 155,2 (NCO₂).

IR (cm⁻¹): 1673 (ν_{C=O}) ; 2919, 2981 (ν_{NH}) ; 3280, 3305 (ν_{C≡C-H}).

But-3-ynecarbamate de *tert*-butyle (173)



À une solution de 1-amino-3-butyne **172** (0,904g ; 13,1 mmol) dans un mélange THF/eau (88 mL ; 1/1 ; v/v) sont ajoutés du Boc_2O (4,277g ; 19,6 mmol) et du carbonate de sodium (4,165g ; 39,3 mmol).

Après 3h sous agitation à température ambiante, la solution est diluée avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Les deux phases sont séparées et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre et concentrées sous vide. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Huile incolore

$R_f = 0,39$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 62%

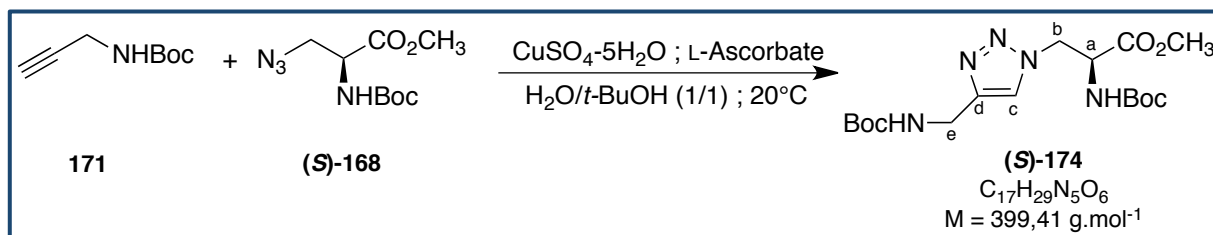
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,99 (t, 1H, $J = 2,6\text{Hz}$, $\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 2,38 (td, 2H, $J_1 = 6,5\text{Hz}$, $J_2 = 2,6\text{Hz}$, $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$) ; 3,28 (q, 2H, $J = 6,5\text{Hz}$, CH_2NH) ; 4,84 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 20,1 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$) ; 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 39,4 (CH_2N) ; 70,0 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 79,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 81,8 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 155,8 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1691 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2934, 2978 (ν_{NH}) ; 3305 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C-H}}$).

((S)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((S)-174)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,24$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7/3)

Rendement = 45%

Mp : 48-50°C

$[\alpha]_D^{20} = +32,6$ ($CHCl_3$; $c=0,86$)

e.e. = 97,9%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,44 (s, 18H, $C(CH_3)_3$) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,37 (d, 2H, $J = 6,0\text{Hz}$, $2H_e$) ; 4,69-4,86 (m, 3H, H_a , $2H_b$) ; 5,09 (br s, 1H, H_f) ; 5,35 (d, 1H, $J = 6,2\text{Hz}$, H_g) ; 7,47 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4, 28,5 ($C(CH_3)_3$) ; 36,2 (C_e) ; 51,1 (C_b) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,9 (C_a) ; 79,9, 80,9 ($C(CH_3)_3$) ; 123,2 (C_c) ; 145,6 (C_d) ; 155,2, 155,9 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1693 ($\nu_{C=O}$) ; 2976 (ν_{NH}).

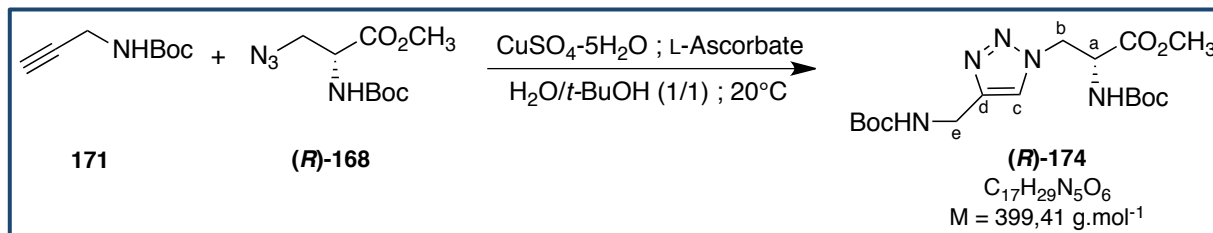
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{17}H_{29}N_5O_6$, 400,2196 ; trouvée, 400,2196.

HPLC : $t_R = 13,47 \text{ min}$; pureté: 96,9%.

Masse (ES^+) : 401 ($M+H$).

((R)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((R)-174)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,24$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7/3)

Rendement = 45%

Mp : 48-50°C

$[\alpha]_D^{20} = -33,9$ ($CHCl_3$; $c=0,88$)

e.e. = 98,7%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,44 (s, 18H, $C(CH_3)_3$) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,37 (d, 2H, $J = 4,8\text{Hz}$, $2H_e$) ; 4,72-4,81 (m, 3H, H_a , $2H_b$) ; 5,11 (br s, 1H, H_f) ; 5,35 (d, 1H, $J = 6,0\text{Hz}$, H_g) ; 7,49 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4; 28,5 ($C(CH_3)_3$) ; 36,1 (C_e) ; 51,3 (C_b) ; 53,3 (CO_2CH_3) ; 53,9 (C_a) ; 79,9; 81,0 ($C(CH_3)_3$) ; 123,4 (C_c) ; 145,5 (C_d) ; 155,2; 156,0 (NCO_2) ; 169,5 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1693 ($\nu_{C=O}$) ; 2976 (ν_{NH}).

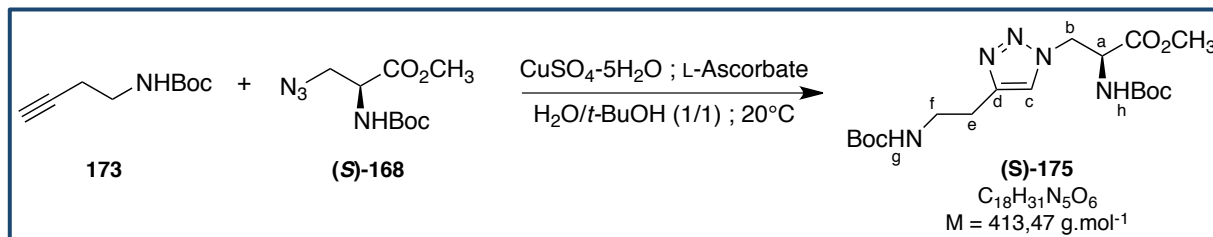
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{17}H_{29}N_5O_6$, 400,2196 ; trouvée, 400,2196.

HPLC : $t_R = 13,51 \text{ min}$; pureté : 96,9%.

Masse (ES^+) : 401 ($M+H$).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((S)-175)

Selon la méthode J :



Solide blanc

R_f = 0,31 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 8/2)

Rendement = 41%

Mp : 133-135°C

[α]_D²⁰ = +28,6 (CHCl₃ ; c=0,95)

e.e. = 97,9%

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,43 (s, 18H, C(CH₃)₃) ; 2,88 (t, 2H, *J* = 6,3Hz, 2H_e) ; 3,45 (d, 2H, *J* = 5,9Hz, 2H_f) ; 3,78 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 4,71-4,76 (m, 3H, H_a, 2H_b) ; 5,00 (br s, 1H, H_g) ; 5,37 (d, 1H, *J* = 5,9Hz, H_h) ; 7,32 (s, 1H, H_c).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 26,3 (C_e) ; 28,4; 28,5 (C(CH₃)₃) ; 39,9 (C_f) ; 51,1 (C_b) ; 53,2 (CO₂CH₃) ; 53,9 (C_a) ; 79,4, 80,9 (C(CH₃)₃) ; 122,7 (C_c) ; 145,7 (C_d) ; 155,2; 156,1 (NCO₂) ; 169,7 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1682 (ν_{C=O}) ; 1737 (ν_{C=O}) ; 2980, 2931 (ν_{NH}).

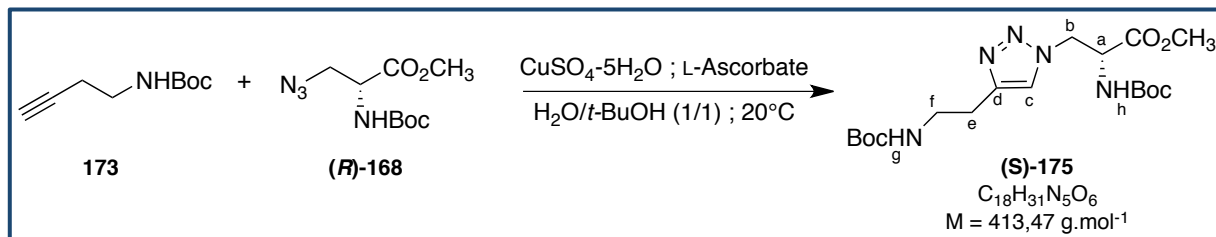
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₈H₃₂N₅O₆, 414,2353 ; trouvée, 414,2351.

HPLC : t_R = 13,68 min ; pureté : 99,6%.

Masse (ES⁺) : 415 (M+H).

(R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((R)-175)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,31$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 8/2)

Rendement = 41%

Mp : 133-135°C

$[\alpha]_D^{20} = -27,9$ ($CHCl_3$; $c=1,01$)

e.e. = 99,2%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,43 (2s, 18H, $C(CH_3)_3$) ; 2,90 (t, 2H, $J = 6,5\text{Hz}$, $2H_e$) ; 3,45 (s, 2H, $2H_f$) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,69-4,84 (m, 3H, H_a , $2H_b$) ; 5,02 (br s, 1H, H_g) ; 5,38 (d, 1H, $J = 6,4\text{Hz}$, H_h) ; 7,35 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 26,2 (C_e) ; 28,4; 28,5 ($C(CH_3)_3$) ; 39,9 (C_f) ; 51,3 (C_b) ; 53,3 (CO_2CH_3) ; 53,8 (C_a) ; 79,4; 80,9 ($C(CH_3)_3$) ; 123,0 (C_c) ; 145,3 (C_d) ; 155,2; 156,1 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1682 ($\nu_{C=O}$) ; 1737 ($\nu_{C=O}$) ; 2980, 2931 (ν_{NH}).

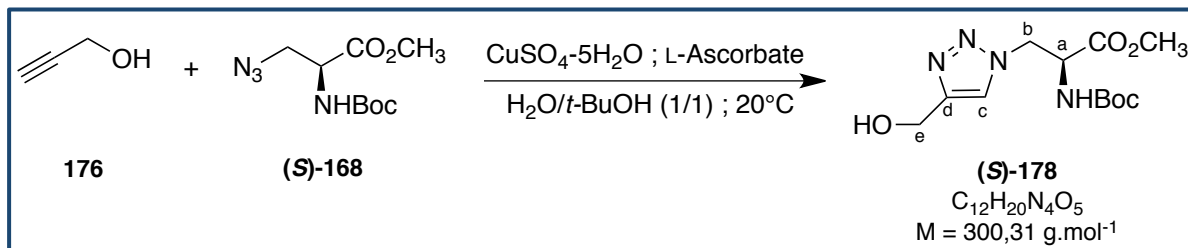
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{18}H_{32}N_5O_6$, 414,2353 ; trouvée, 414,2354.

HPLC : $t_R = 13,71 \text{ min}$; pureté : 95,8%.

Masse (ES^+) : 415 ($M+H$).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(hydroxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((S)-178)

Selon la méthode J :



Huile incolore

$R_f = 0,44$ (acétate d'éthyle/méthanol : 95/5)

Rendement = 42%

$[\alpha]_D^{20} = +42,9$ ($CHCl_3$; $c=0,79$)

e.e. = 98,2%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,43 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 2,72 (br s, 1H, OH) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,70-4,88 (m, 5H, H_a , $2H_b$, $2H_c$) ; 5,49 (d, 1H, $J = 6,5\text{Hz}$, NH) ; 7,53 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4 ($C(CH_3)_3$) ; 51,2 (C_b) ; 53,3 (CO_2CH_3) ; 53,9 (C_a) ; 56,5 (C_e) ; 81,0 ($C(CH_3)_3$) ; 123,2 (C_c) ; 147,8 (C_d) ; 155,3 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1699 ($\nu_{C=O}$) ; 2934, 2978 (ν_{NH}) ; 3368 (ν_{OH}).

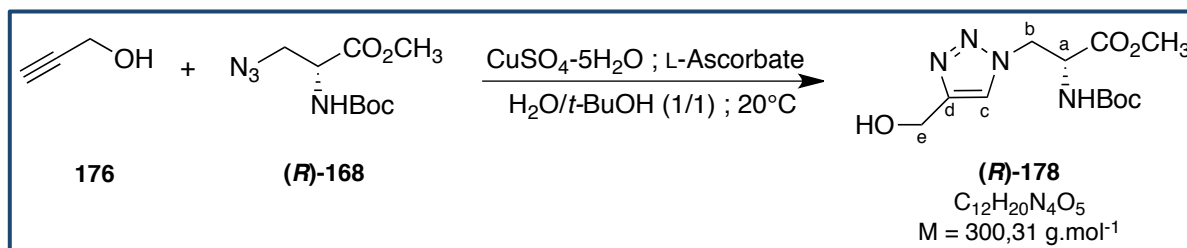
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{21}N_4O_5$, 301,1512 ; trouvée, 301,1512.

HPLC : $t_R = 9,17$; pureté : 98,5%.

Masse (ES^+) : 301 ($M+H$).

(R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(hydroxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((R)-178)

Selon la méthode J :



Huile incolore

$R_f = 0,44$ (acétate d'éthyle/méthanol : 95/5)

Rendement = 42%

$[\alpha]_D^{20} = -43,2$ ($CHCl_3$; $c=0,79$)

e.e. = 98,8%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,43 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 2,46 (br s, 1H, OH) ; 3,78 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,70-4,81 (m, 5H, H_a , $2H_b$, $2H_e$) ; 5,49 (d, 1H, $J = 6,5\text{Hz}$, NH) ; 7,53 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4 ($C(CH_3)_3$) ; 51,2 (C_b) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,9 (C_a) ; 56,5 (C_e) ; 81,0 ($C(CH_3)_3$) ; 123,2 (C_c) ; 147,8 (C_d) ; 155,3 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1699 ($\nu_{C=O}$) ; 2934, 2978 (ν_{NH}) ; 3368 (ν_{OH}).

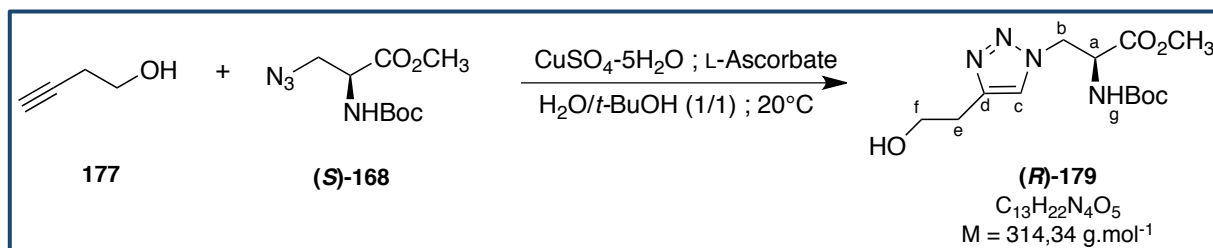
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{12}H_{21}N_4O_5$, 301,1512 ; trouvée, 301,1514.

HPLC : $t_R = 9,16$; pureté : 98,2%.

Masse (ES^+) : 301 ($M+H$).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((S)-179)

Selon la méthode J :



Solide jaune pâle

$R_f = 0,22$ (acétate d'éthyle/méthanol : 95/5)

Rendement = 34%

Mp : 72-74°C

$[\alpha]_D^{20} = +37,8$ ($CHCl_3$; $c=0,78$)

e.e. = 96,3%

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,43 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 2,88 (br s, 1H, OH) ; 2,94 (t, 2H, $J = 5,8\text{Hz}$, $2H_e$) ; 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,92 (t, 2H, $J = 5,8\text{Hz}$, $2H_f$) ; 4,69-4,84 (m, 3H, H_a , $2H_b$) ; 5,44 (d, 1H, $J = 6,7\text{Hz}$, H_g) ; 7,41 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4 ($C(CH_3)_3$) ; 28,7 (C_e) ; 51,3 (C_b) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,9 (C_a) ; 61,5 (C_f) ; 80,9 ($C(CH_3)_3$) ; 123,3 (C_c) ; 145,5 (C_d) ; 155,3 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1686 ($\nu_{C=O}$) ; 1735 ($\nu_{C=O}$) ; 3343 (ν_{OH}).

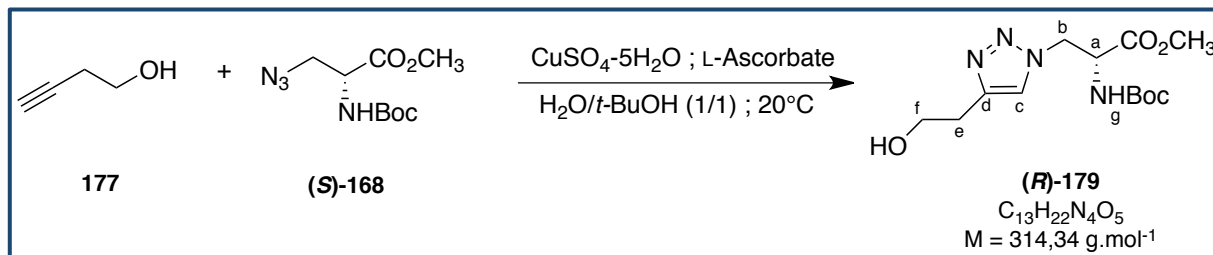
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{13}H_{23}N_4O_5$, 315,1668 ; trouvée, 315,1670.

HPLC : $t_R = 9,46$ min ; pureté : 100%.

Masse (ES^+) : 315 ($M+H$).

(R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((R)-179)

Selon la méthode J :



Solide jaune pâle

R_f = 0,22 (acétate d'éthyle/méthanol : 95/5)

Rendement = 34%

Mp : 72-74°C

[α]_D²⁰ = -37,7 (CHCl₃ ; c=0,77)

e.e. = 98,5%

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 2,59 (t, 1H, J=4,9Hz, OH) ; 2,93 (t, 2H, J= 5,8Hz, 2H_e) ; 3,79 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,93 (dd, 2H, J_I = 10,9Hz, J₂ =5,8Hz, 2H_f) ; 4,68-4,84 (m, 3H, H_a, 2H_b) ; 5,39 (d, 1H, J_I = 6,3Hz, H_g) ; 7,38 (s, 1H, H_c).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4 (C(CH₃)₃) ; 28,7 (C_e) ; 51,1 (C_b) ; 53,3 (CO₂CH₃) ; 53,9 (C_a) ; 61,7 (C_f) ; 80,9 (C(CH₃)₃) ; 123,0 (C_c) ; 145,7 (C_d) ; 155,2 (NCO₂) ; 169,7 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1686 (ν_{C=O}) ; 1735 (ν_{C=O}) ; 3343 (ν_{OH}).

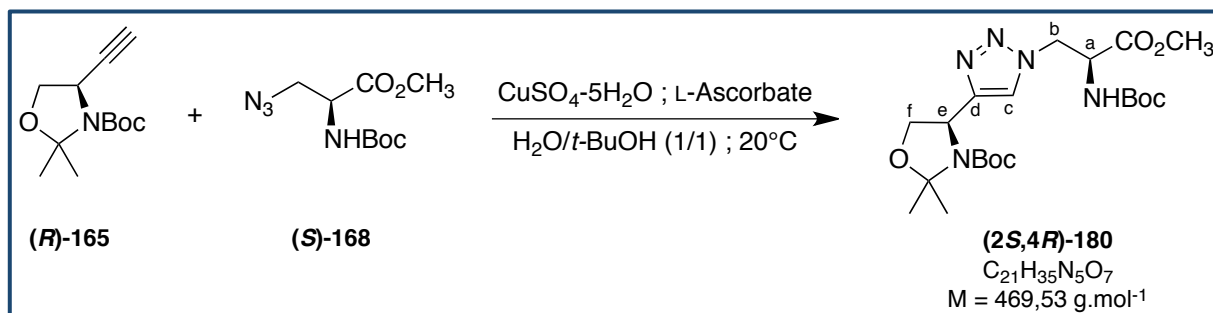
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₃H₂₃N₄O₅, 315,1668 ; trouvée, 315,1670.

HPLC : t_R = 9,48 min ; pureté : 98,5%.

Masse (ES⁺) : 315 (M+H).

(R)-4-(1-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-méthoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((2S,4R)-180)

Selon la méthode J :



Solide blanc

R_f = 0,28 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 64%

Mp : 47-49°C

[α]_D²⁰ = -20,9 (CHCl₃ ; c=0,94)

e.e. = 99,5%

r.d. = 90,74/9,26 (R*S*/R*R*)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,34; 1,43; 1,48; 1,56; 1,67 (5s, 30H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 3,76 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 4,11-4,40 (m, 2H, H_f) ; 4,70-4,80 (m, 3H, H_e et H_b) ; 5,10 (br s, 1H, H_a) ; 5,38 (br s, 1H, NH) ; 7,35; 7,40 (2s, 1H, H_c).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 23,5; 24,9; 26,6; 27,3; 28,4; 28,5 (6s, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 51,1 (C_b) ; 53,2 (CO₂CH₃) ; 53,8 (C_a et C_e) ; 67,9; 69,1 (C_f) ; 80,3; 80,8 (C(CH₃)₃) ; 94,2; 94,5 (C(CH₃)₂) ; 122,5; 123,6 (C_c) ; 148,4; 149,9 (C_d) ; 151,7; 152,3 (NCO₂) ; 155,2 (NCO₂) ; 169,6 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1696 (ν_{C=O}) ; 1746 (ν_{C=O}) ; 2937, 2977 (ν_{NH}).

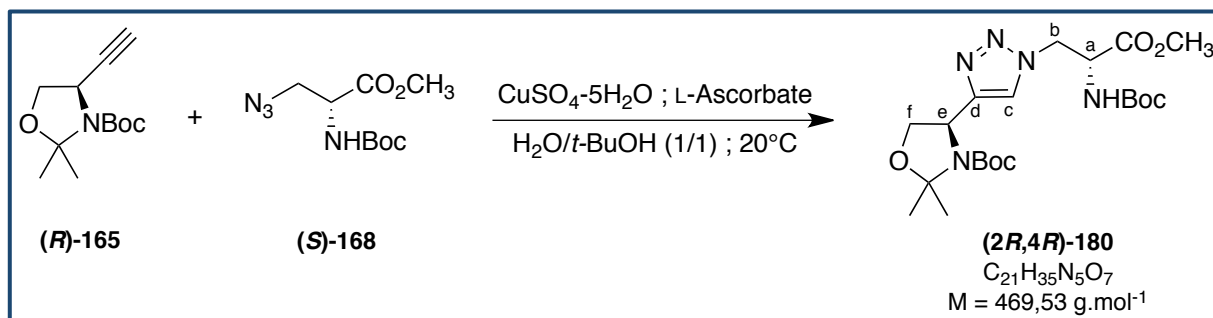
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₂₁H₃₆N₅O₇, 470,2615 ; trouvée, 470,2611.

UPLC : t_R = 12,82 min ; pureté : 97,0%.

Masse (ES⁺) : 470 (M+H).

(R)-4-(1-((R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-méthoxy-3-oxopropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((2*R*,4*R*)-180)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,28$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 68%

Mp : 47-49°C

$[\alpha]_D^{20} = -79,0$ (CHCl_3 ; $c=0,91$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 90,26/9,74 (R^*S^*/R^*R^*)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,35; 1,43; 1,47; 1,55; 1,57; 1,66 (6s, 25H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3,75; 3,78 (2s, 3H, CO_2CH_3), 4,10-4,43 (m, 2H, H_f), 4,69-4,91 (m, 3H, H_e et H_b), 5,08-5,13 (m, 1H, H_a), 5,37 (dd, 1H, $J = 30,7\text{Hz}$, $J = 6,0\text{Hz}$, NH), 7,35, 7,43 (2s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,4; 24,9; 26,6; 27,3; 28,3; 28,5 (6s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 51,1 (C_b) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,5; 53,9 (C_a et C_e) ; 67,8; 69,0 (C_f) ; 80,3; 80,8; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,2; 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 122,5; 123,8 (C_c) ; 148,4; 149,9 (C_d) ; 151,7; 152,3 (NCO_2) ; 155,2 (NCO_2) ; 169,5 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1746 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2937, 2977 (ν_{NH}).

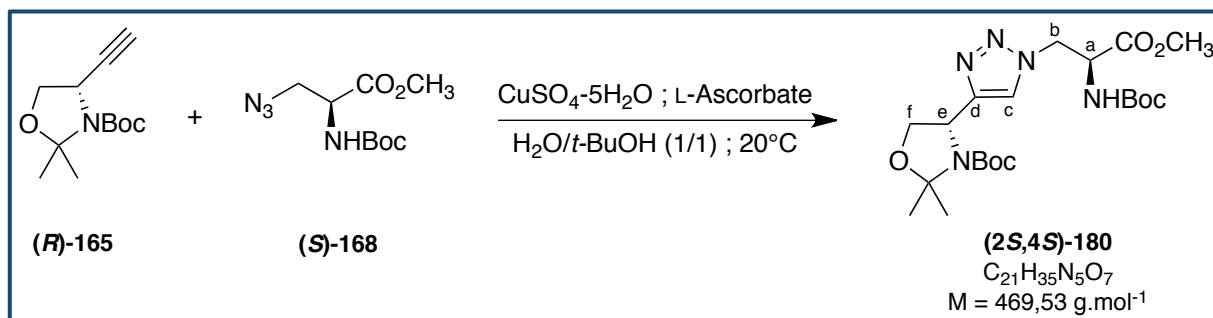
HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_7$, 470,2615 ; trouvée, 470,2612.

HPLC : $t_R = 15,01 \text{ min}$; pureté : 98,4%.

Masse (ES^+) : 470 ($\text{M}+\text{H}$).

(S)-4-(1-((S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-méthoxy-3-oxopropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((2*S*,4*S*)-180)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,28$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 5/5)

Rendement = 65%

Mp : 47-49°C

$[\alpha]_D^{20} = +80,7$ (CHCl_3 ; $c=0,86$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 93,5/6,5 (R^*S^*/R^*R^*)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,35; 1,43; 1,47; 1,56; 1,66 (5s, 25H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 3,76 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,10-4,39 (m, 2H, H_f) ; 4,68-4,84 (m, 3H, H_e et H_b) ; 5,10 (br s, 1H, H_a) ; 5,30 (br s, 1H, NH) ; 7,34; 7,43 (2s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,4; 24,9; 26,6; 27,3; 28,3; 28,5 (6s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 51,1 (C_b) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,6; 54,0 (C_a et C_e) ; 67,8; 69,0 (C_f) ; 80,3; 80,8; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,2; 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 122,5; 123,8 (C_c) ; 148,2; 150,0 (C_d) ; 151,7; 152,4 (NCO_2) ; 155,2 (NCO_2) ; 169,6 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1746 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2937, 2977 (ν_{NH}).

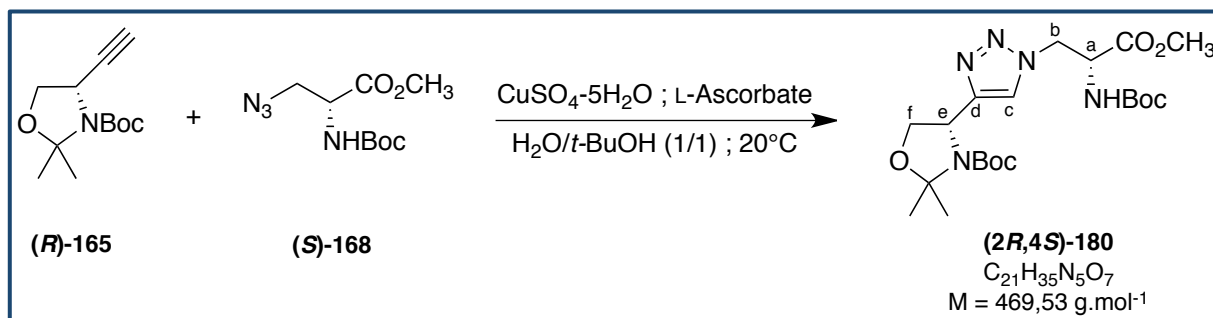
HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_7$, 470,2615 ; trouvée, 470,2614.

HPLC : $t_R = 15,24$ min ; pureté : 94,8%.

Masse (ES^+) : 470 ($\text{M}+\text{H}$).

(S)-4-(1-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-méthoxy-3-oxopropyle)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((2R,4S)-180)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,28$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole: 5/5)

Rendement = 68%

Mp : 47-49°C

$[\alpha]_D^{20} = +22,1$ (CHCl_3 ; $c=0,93$)

e.e. = 96,2%

r.d. = 94,03/5,97 (R^*S^*/R^*R^*)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,33, 1,43, 1,47, 1,55, 1,57, 1,67 (6s, 25H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3,76 (s, 3H, CO_2CH_3), 4,11-4,39 (m, 2H, H_f), 4,70-4,83 (m, 3H, H_e et H_b), 5,08-5,12 (m, 1H, H_a), 5,39 (br s, 1H, NH), 7,35, 7,40 (2s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,4, 24,8, 26,6, 27,3, 28,3, 28,5 (6s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 51,1 (C_b), 53,3 (CO_2CH_3), 53,7, 53,9 (C_a et C_e), 67,9, 69,0 (C_f), 80,3, 80,8, 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 94,1, 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 122,5, 123,5 (C_c), 148,3, 149,8 (C_d), 151,7, 152,3 (NCO_2), 155,2 (NCO_2), 169,6 (CO_2CH_3).

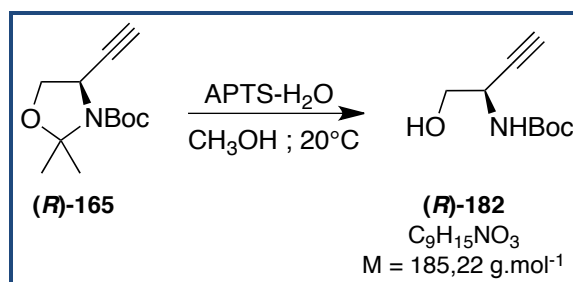
IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1746 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2937, 2977 (ν_{NH}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_7$, 470,2615 ; trouvée, 470,2612.

HPLC : $t_R = 15,00$ min ; pureté : 95,3%.

Masse (ES^+) : 470 ($\text{M}+\text{H}$).

(R)-(1-hydroxybut-3-yn-2-yl)carbamate de *tert*-butyle ((R)-182)



À une solution de **(R)-165** (2,539 g ; 11,3 mmol) dans 67 mL de méthanol est ajouté de l'acide *para*-toluènesulfonique monohydrate (2,149 g ; 11,3 mmol).

Après 2 h d'agitation à température ambiante, sont ajoutés 100 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*70 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (50 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (50 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide blanc

$R_f = 0,22$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 48%

Mp : 51-53°C ; litt³²⁷. 78-79°C

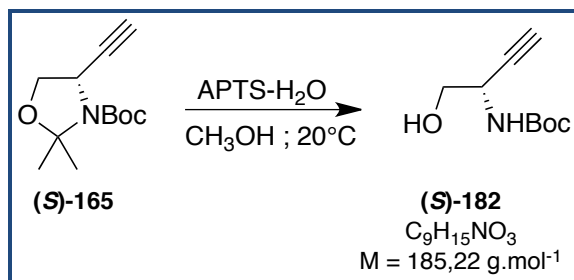
$[\alpha]_D^{20} = -37,9$ (CHCl_3 ; $c=1,05$) ; litt³²⁷. -43,0 (CHCl_3 ; $c=1,08$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,24 (br s, 1H, OH) ; 2,33 (d, 1H, $J = 2,4\text{Hz}$, $\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 3,73 (d, 2H, $J = 4,7\text{Hz}$, CH_2) ; 4,53 (br s, 1H, CH) ; 5,04 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 45,3 (CH) ; 65,7 (CH_2) ; 72,7 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 80,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 80,9 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 155,4 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1682 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2933, 2976 (ν_{NH}) ; 3311 (ν_{OH}).

(*R*)-(1-hydroxybut-3-yn-2-yl)carbamate de *tert*-butyle ((*S*)-182)



Le composé (*S*)-**182** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 2,539g (11,3 mmol) de (*S*)-**165**.

Solide blanc

$R_f = 0,22$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 3/7)

Rendement = 48%

Mp : 76-78°C

$[\alpha]_D^{20} = +40,3$ (CHCl_3 ; $c=1,04$)

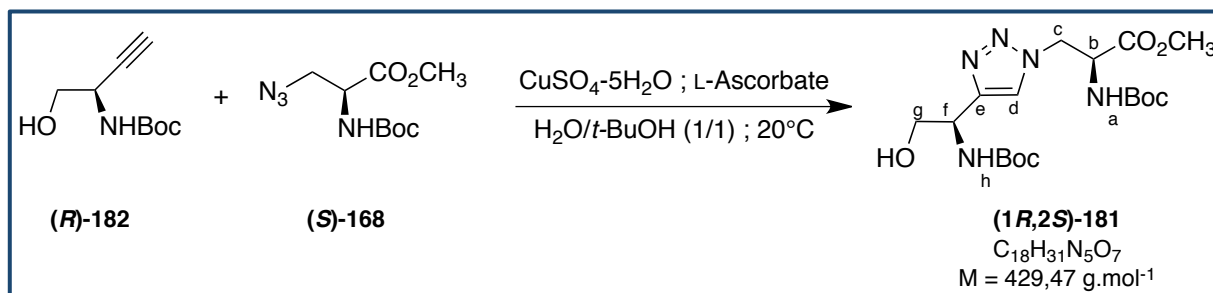
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,10 (br s, 1H, OH) ; 2,33 (d, 1H, $J = 2,4\text{Hz}$, $\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 3,73 (dd, 2H, $J_1 = 4,7\text{Hz}$, $J_2 = 1,0\text{Hz}$, CH_2) ; 4,54 (br s, 1H, CH) ; 5,03 (br s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 45,4 (CH) ; 65,8 (CH_2) ; 72,7 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 80,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 80,8 ($\text{C}\equiv\text{C-H}$) ; 155,4 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1682 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2933, 2976 (ν_{NH}) ; 3311 (ν_{OH}).

(S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-((R)-1-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxyéthyle)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((1R,2S)-181)

Selon la méthode J :



Solide blanc

R_f = 0,26 (acétate d'éthyle)

Rendement = 65%

Mp : 118-120°C

[α]_D²⁰ = 7,74 (CHCl₃ ; c=1,09)

e.e. = 97,2%

r.d. = 90,41/9,59 (R*S*/R*R*)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,42; 1,44 (2s, 18H, C(CH₃)₃) ; 2,71 (br s, 1H, OH) ; 3,79 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,87 (dd, 1H, *J* = 11,4Hz, *J* = 4,2Hz, H_g) et 4,08-4,11 (m, 1H, H_g) ; 4,69-4,72 (m, 1H, H_b) ; 4,78-4,79 (m, 2H, H_c) ; 4,84-4,88 (m, 1H, H_f) ; 5,41 (d, 1H, *J* = 6,8Hz, H_h) ; 5,58 (d, 1H, *J* = 6,6Hz, H_a) ; 7,56 (s, 1H, H_e).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4; 28,5 (2s, C(CH₃)₃) ; 48,4 (C_f) ; 51,5 (C_c) ; 53,3 (CO₂CH₃) ; 53,8 (C_b) ; 65,0 (C_g) ; 80,1; 81,0 (C(CH₃)₃) ; 123,9 (C_d) ; 147,2 (C_e) ; 155,2; 155,8 (NCO₂) ; 169,5 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1683 (ν_{C=O}) ; 1742 (ν_{C=O}) ; 2338, 2362 (ν_{triazole}) ; 3358 (ν_{OH}).

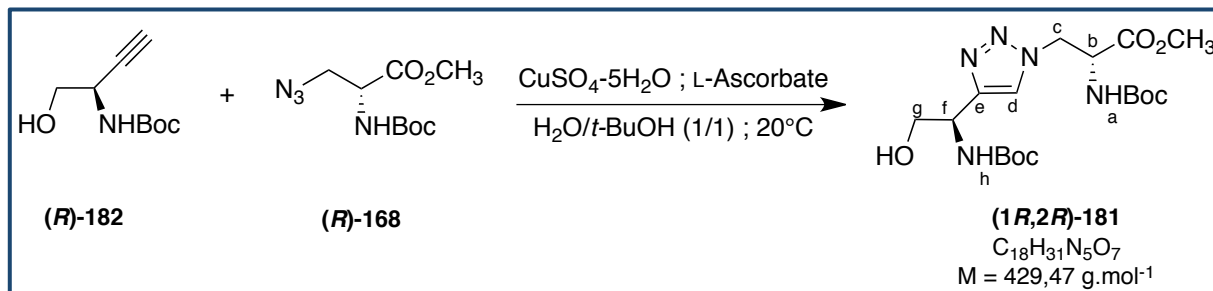
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₈H₃₂N₅O₇, 430,2302 ; trouvée, 430,2301.

HPLC : t_R = 12,60 min ; pureté : 99,1%.

Masse (ES⁺) : 430 (M+H).

(R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-((R)-1-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxyéthyle)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((1R,2R)-181)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,26$ (acétate d'éthyle)

Rendement = 65%

Mp : 49-51°C

$[\alpha]_D^{20} = -51,7$ ($CHCl_3$; $c=0,92$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 90,61/9,39 (R*S*/R*R*)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,43 (s, 18H, $C(CH_3)_3$) ; 2,79 (br s, 1H, OH) ; 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,85 (dd, 1H, $J = 11,4\text{Hz}$, $J = 4,4\text{Hz}$, H_g) et 4,10-4,13 (m, 1H, H_g) ; 4,69-4,87 (m, 5H, H_b , H_c , H_f) ; 5,42 (d, 1H, $J = 7,1\text{Hz}$, H_h) ; 5,58 (d, 1H, $J = 6,7\text{Hz}$, H_a) ; 7,56 (s, 1H, H_c).
 RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,3; 28,5 (2s, $C(CH_3)_3$) ; 48,2 (C_f) ; 51,5 (C_e) ; 53,3 (CO_2CH_3) ; 53,8 (C_b) ; 64,9 (C_g) ; 80,1; 81,0 ($C(CH_3)_3$) ; 123,9 (C_d) ; 147,2 (C_e) ; 155,2; 155,8 (NCO_2) ; 169,5 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1683 ($\nu_{C=O}$) ; 1742 ($\nu_{C=O}$) ; 2338, 2362 ($\nu_{triazole}$) ; 3358 (ν_{OH}).

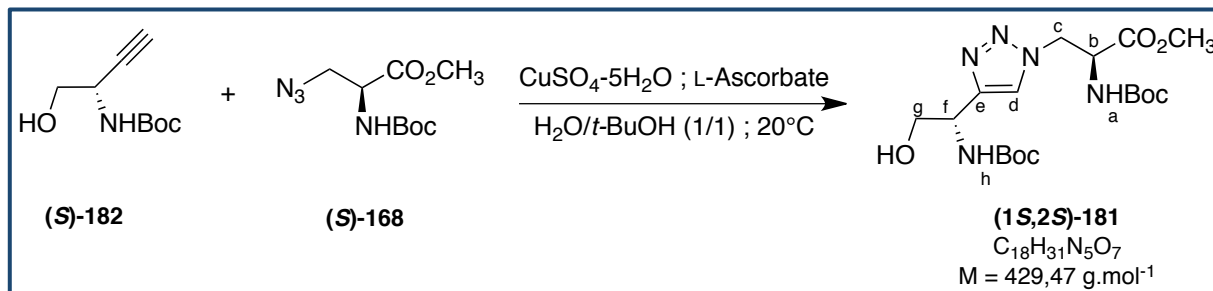
HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{18}H_{32}N_5O_7$, 430,2302 ; trouvée, 430,2300.

HPLC : $t_R = 12,23 \text{ min}$; pureté : 96,6%.

Masse (ES^+) : 430 (M+H).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-((S)-1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxyéthyle)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((1*S*,2*S*)-181)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,26$ (acétate d'éthyle)

Rendement = 65%

Mp : 55-57°C

$[\alpha]_D^{20} = +49,9$ (CHCl₃ ; c=0,91)

e.e. = 99,5%

r.d. = 91,92/8,08 (R*S*/R*R*)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,43 (s, 18H, C(CH₃)₃) ; 2,88 (br s, 1H, OH) ; 3,80 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,84-3,87 (m, 1H, H_g) et 4,10-4,12 (m, 1H, H_g) ; 4,70-4,86 (m, 5H, H_b, H_c, H_f) ; 5,42 (br s, 1H, H_h) ; 5,58 (br s, 1H, H_a) ; 7,58 (s, 1H, H_c).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4; 28,5 (2s, C(CH₃)₃) ; 48,2 (C_f) ; 51,6 (C_e) ; 53,4 (CO₂CH₃) ; 53,9 (C_b) ; 65,0 (C_g) ; 80,1; 81,0 (C(CH₃)₃) ; 124,0 (C_d) ; 147,1 (C_e) ; 155,2; 155,8 (NCO₂) ; 169,5 (CO₂CH₃).

IR (cm⁻¹): 1683 (ν_{C=O}) ; 1742 (ν_{C=O}) ; 2338, 2362 (ν_{triazole}) ; 3358 (ν_{OH}).

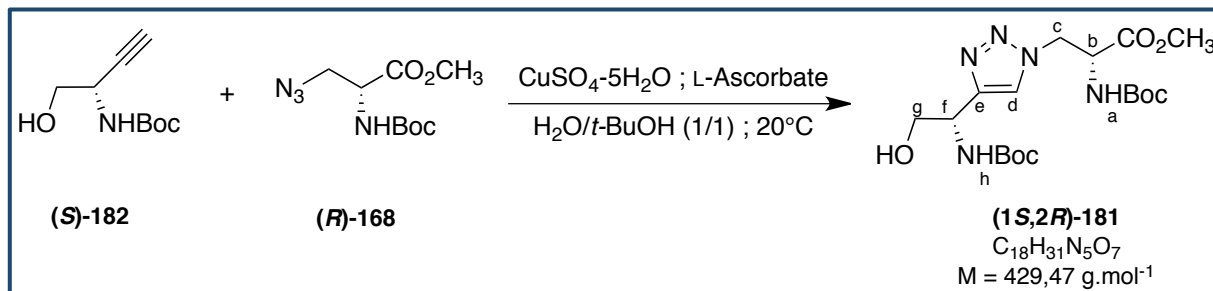
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₁₈H₃₂N₅O₇, 430,2302 ; trouvée, 430,2303.

HPLC : t_R = 12,43 min ; pureté : 99,6%.

Masse (ES⁺) : 430 (M+H).

(R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-((S)-1-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxyéthyle)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate de méthyle ((1S,2R)-181)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,26$ (acétate d'éthyle)

Rendement = 65%

Mp : 122-124°C

$[\alpha]_D^{20} = -8,12$ ($CHCl_3$; $c=0,99$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 93,11/6,90 (R*S*/R*R*)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,41; 1,43 (2s, 18H, $C(CH_3)_3$) ; 3,05 (br s, 1H, OH) ; 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,86 (dd, 1H, $J = 11,4\text{Hz}$, $J = 4,2\text{Hz}$, H_g) et 4,07-4,11 (m, 1H, H_g) ; 4,68-4,72 (m, 1H, H_b) ; 4,77-4,79 (m, 2H, H_c) ; 4,84-4,88 (m, 1H, H_f) ; 5,46 (d, 1H, $J = 7,1\text{Hz}$, H_h) ; 5,61 (d, 1H, $J = 6,9\text{Hz}$, H_a) ; 7,56 (s, 1H, H_e).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4; 28,5 (2s, $C(CH_3)_3$) ; 48,4 (C_f) ; 51,5 (C_c) ; 53,3 (CO_2CH_3) ; 53,8 (C_b) ; 65,0 (C_g) ; 80,1; 81,0 ($C(CH_3)_3$) ; 123,9 (C_d) ; 147,2 (C_e) ; 155,2; 155,8 (NCO_2) ; 169,5 (CO_2CH_3).

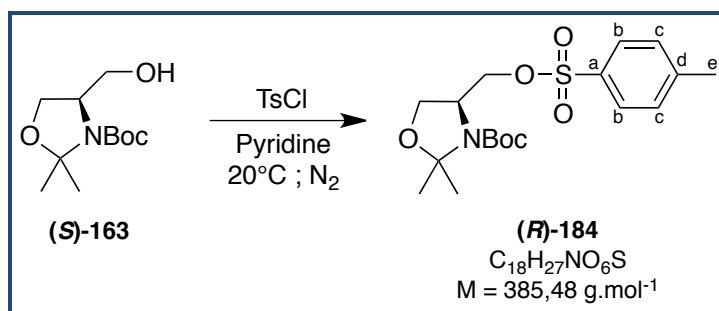
IR (cm^{-1}): 1683, 1742 ($\nu_{C=O}$) ; 2338, 2362 ($\nu_{triazole}$) ; 3358 (ν_{OH}).

HRMS (ES^+): $[M+H]^+$ calculée pour $C_{18}H_{32}N_5O_7$, 430,2302 ; trouvée, 430,2301.

HPLC : $t_R = 12,34$ min ; pureté : 100%.

Masse (ES^+) : 430 ($M+H$).

(*R*)-2,2-diméthyle-4-((tosyloxy)méthyl)oxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((*R*)-184)



À une solution de (*R*)-**163** (3,001g ; 13 mmol) dans 14 mL de pyridine à 0°C sous atmosphère d'azote, est ajouté du chlorure de tosyloxy (2,974g ; 15,6 mmol). La solution est laissée sous agitation pendant 16h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est dilué avec 50 mL d'acétate d'éthyle et filtré sur fritté de porosité 4. Le solide est lavé avec 40 mL d'acétate d'éthyle. Le filtrat est dilué avec de l'acétate d'éthyle jusqu'à obtenir un volume d'environ 200 mL. La phase organique est lavée avec une solution saturée de sulfate de cuivre (2*80 mL) et une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrée sous pression réduite. Le résidu brut d'évaporation est lavé rapidement sur fritté de porosité 4 avec 15 mL d'éther diéthylique et le produit désiré est collecté. Le filtrat est évaporé et le solide obtenu est lavé rapidement avec 10 mL d'éther diéthylique. Le produit désiré est à nouveau collecté.

Solide beige pâle

$R_f = 0,54$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 76%

Mp : 111-113°C ; litt³²⁸. 108-109°C

$[\alpha]_D^{20} = -39,69$ (CHCl_3 ; $c=1,05$) ; litt³²⁸. $-79,02$ (CHCl_3 ; $c=2,01$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,39; 1,44; 1,49; 1,50 (4s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,45 (s, 3H, H_e) ; 3,78-4,16 (m, 5H, CH et $2\text{CH}_2\text{O}$) ; 7,35 (m, 2H, H_b) ; 7,79 (d, 2H, $J = 8,3\text{Hz}$, H_c).

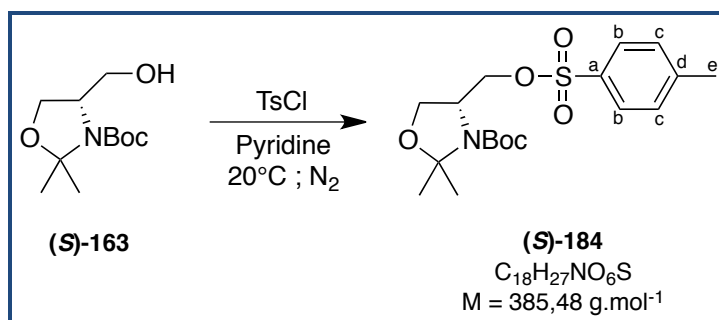
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 21,8 (C_e) ; 23,0; 24,3; 26,8; 27,4; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 55,6; 55,7 (CH) ; 64,7; 65,0 (CH_2O) ; 67,6; 68,0 (CH_2O) ; 80,6; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 93,9; 94,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 128,1 (C_b) ; 130,1 (C_c) ; 132,8; 132,9 (C_d) ; 145,0; 145,3 (C_a) ; 151,4; 152,2 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1693 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HPLC : $t_R = 17.43 \text{ min}$; pureté : 100%.

Masse (ES^+) : 386 ($\text{M}+\text{H}$).

(S)-2,2-diméthyle-4-((tosyloxy)méthyl)oxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((S)-184)



Le composé (S)-184 est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 3,001g (13 mmol) de (S)-163.

Solide blanc

$R_f = 0,54$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 2/8)

Rendement = 76%

Mp : 111-113°C

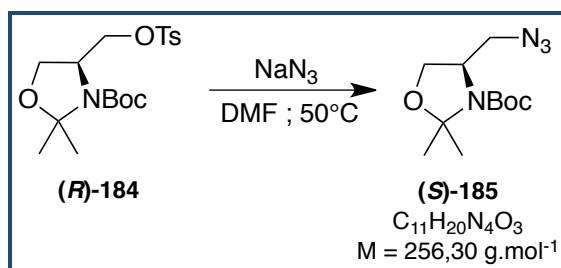
$[\alpha]_D^{20} = +38,60$ (CHCl_3 ; $c=1,03$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,39; 1,44; 1,49; 1,50 (4s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,45 (s, 3H, H_e) ; 3,78-4,16 (m, 5H, CH et $2\text{CH}_2\text{O}$) ; 7,35 (m, 2H, H_b) ; 7,79 (d, 2H, $J = 8,3\text{Hz}$, H_c).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 21,8 (C_e) ; 23,0; 24,3; 26,8; 27,4; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 55,6; 55,7 (CH) ; 64,7; 65,1 (CH_2O) ; 67,6; 68,0 (CH_2O) ; 80,7; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 93,9, 94,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 128,1 (C_b) ; 130,1 (C_c) ; 132,8 ; 133,0 (C_d) ; 145,0; 145,3 (C_a) ; 151,4; 152,2 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1693 ($\nu_{\text{C=O}}$).

(S)-4-(azidométhyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((S)-185)



À une solution de (R)-**184** (1,110g ; 2,88 mmol) dans 8 mL de DMF est ajouté de l'azoture de sodium (1,872g ; 28,8 mmol). La solution est placée 3 jours à 50°C.

Le mélange réactionnel est transféré dans un bécher contenant 100 mL d'eau froide sous agitation. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (5*40 mL), séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par flash chromatographie en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Huile incolore

$R_f = 0,48$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 68%

$[\alpha]_D^{20} = -28,6$ (CHCl_3 ; $c=0,52$)

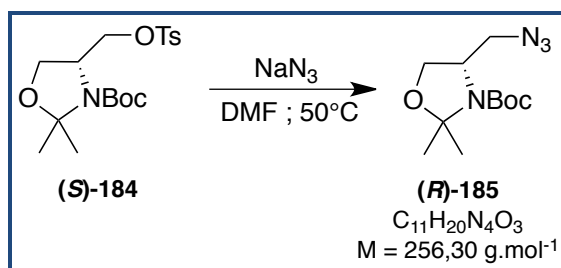
Le composé est volatil. Une exposition prolongée sous pression réduite diminue la quantité de produit.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,48; 1,56; 1,59 (3s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,23-3,56 (m, 2H, CH_2N_3) ; 3,88-4,04 (m, 3H, CH et CH_2O).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,2; 24,5; 26,8; 27,4; 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 51,3; 52,4 (CH_2N_3) ; 56,5; 55,6 (CH) ; 65,4; 65,8 (CH_2O) ; 80,5; 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,0; 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 151,5; 152,4 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1692 ($\nu_{\text{C=O}}$), 2099 (ν_{N_3}).

(R)-4-(azidométhyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle ((R)-185)



Le composé (R)-185 est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 1,110g (2,88 mmol) de (R)-184.

Huile incolore

$R_f = 0,48$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 68%

$[\alpha]_D^{20} = +26,2$ (CHCl_3 ; $c=0,57$) ; $\text{litt}^{329} : +28$ (CHCl_3 ; $c=0,50$)

Le composé est volatil. Une exposition prolongée sous pression réduite diminue la quantité de produit.

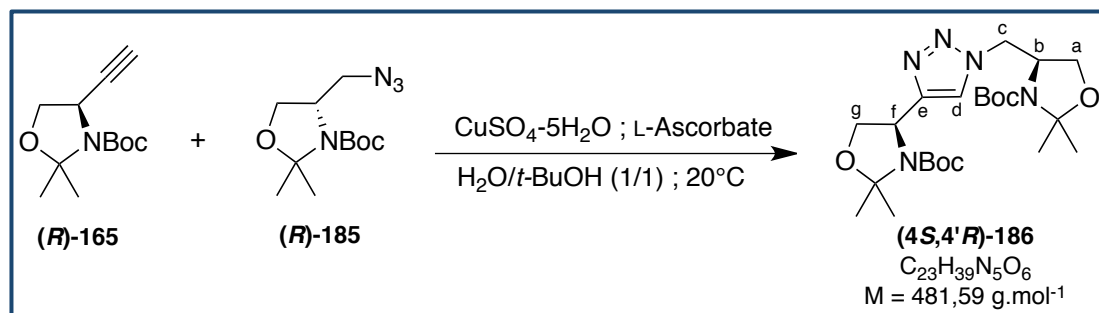
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,48; 1,56; 1,59 (3s, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,22-3,57 (m, 2H, CH_2N_3) ; 3,87-4,03 (m, 3H, CH et CH_2O).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,1; 24,5; 26,8; 27,3; 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 51,2; 52,4 (CH_2N_3) ; 56,5; 55,6 (CH) ; 65,4; 65,8 (CH_2O) ; 80,5; 80,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,0; 94,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 151,5; 152,4 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1692 ($\nu_{\text{C=O}}$), 2099 (ν_{N_3}).

(S)-4-((4-((R)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-diméthyloxazolidine-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((4S,4'R)-186)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,23$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 67%

Mp : 48-50°C

$[\alpha]_D^{20} = -48,3$ (CHCl_3 ; $c=0,86$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 91,4/8,96 (R^*S^*/R^*R^*)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,24; 1,30; 1,33; 1,41; 1,45; 1,48; 1,50; 1,55; 1,57; 1,60; 1,68 (11s, 30H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 3,93-4,59 (m, 7H, 2H_a , 2H_c , H_f , 2H_g) ; 5,09-5,15 (m, 1H, H_b) ; 7,34-7,48 (m, 1H, H_d).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,0; 23,4; 24,4; 24,7; 26,6; 26,8; 27,3; 27,4; 28,5 (9s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 50,1; 51,4 (C_c) ; 53,7; 53,8; 54,0; 54,1 (C_f) ; 57,3 (C_b) ; 64,9; 65,0; 65,4; 65,5 (C_g) ; 67,8; 68,1; 69,0; 69,1 (C_a) ; 80,2; 80,8; 81,1; 81,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,2; 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 121,7; 121,9; 123,0 (C_d) ; 148,5; 150,1 (C_e) ; 151,4; 151,7; 152,4; 152,5 (NCO_2).

IR (cm^{-1}): 1690 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2335, 2361 (ν_{triazole}) ; 2879, 2937, 2979 (ν_{CH}).

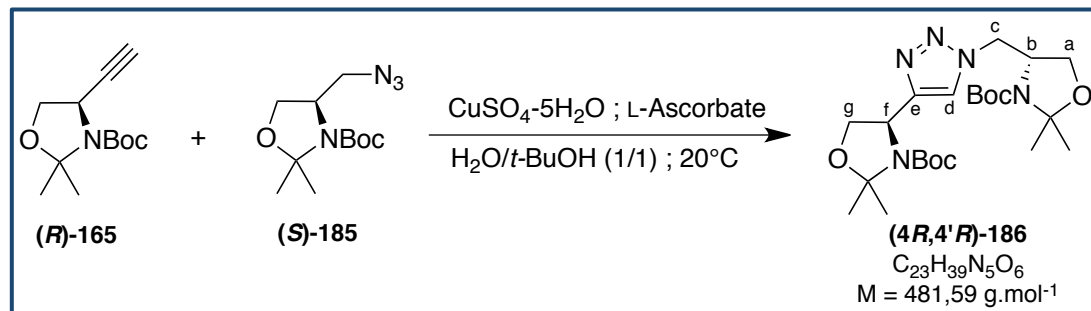
HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_6$, 482,2979 ; trouvée, 482,2981.

HPLC : $t_R = 16,59$ min ; pureté : 98,7%.

Masse (ES^+) : 482 ($\text{M}+\text{H}$).

(R)-4-((4-((R)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-diméthyloxazolidine-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((4R,4'R)-186)

Selon la méthode J :



Solide blanc

R_f = 0,23 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 70%

Mp : 48-50°C

[α]_D²⁰ = -53,0 (CHCl₃ ; c=0,90)

e.e. = 99,5%

r.d. = 91,99/8,01 (R*S*/R*R*)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,33; 1,43; 1,46; 1,48; 1,50; 1,56; 1,68 (7s, 30H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 3,93-4,53 (m, 7H, 2H_a, 2H_c, H_f, 2H_g) ; 5,11-5,15 (m, 1H, H_b) ; 7,35-7,47 (m, 1H, H_d).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 23,0; 23,4; 24,3; 24,7; 26,6; 26,9; 27,4; 28,5 (8s, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂) ; 50,3; 50,4; 51,4 (C_e) ; 53,8; 53,9; 54,1 (C_f) ; 57,3 (C_b) ; 65,1; 65,4; 65,5 (C_g) ; 67,9; 68,2; 69,1; 69,2 (C_a) ; 80,3; 80,8; 81,2 (C(CH₃)₃) ; 94,1; 94,5 (C(CH₃)₂) ; 121,8; 122,9 (C_d) ; 148,6; 150,1 (C_e) ; 151,4; 151,8; 152,4; 152,5 (NCO₂).

IR (cm⁻¹): 1690 (ν_{C=O}) ; 2335, 2361 (ν_{triazole}) ; 2879, 2937, 2979 (ν_{CH}).

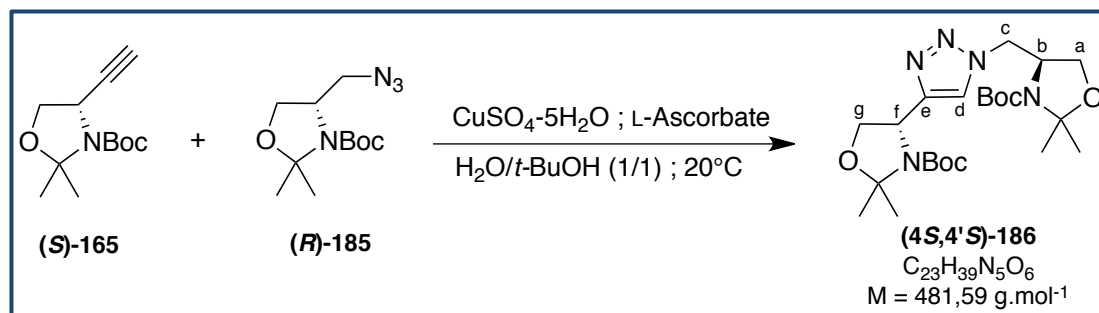
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₂₃H₄₀N₅O₆, 482,2979 ; trouvée, 482,2976.

HPLC : t_R = 16,65 min ; pureté : 96,8%.

Masse (ES⁺) : 482 (M+H).

(S)-4-((4-((S)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-diméthyloxazolidine-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((4S,4'S)-186)

Selon la méthode J :



Solide blanc

R_f = 0,23 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 70%

Mp : 48-50°C

[α]_D²⁰ = +52,8 (CHCl₃ ; c=1,06)

e.e. = 92,9%

r.d. = 95,17/4,83 (R*S*/R*R*)

RMN ¹H (CDCl₃, 300,13 MHz): 1,31; 1,41; 1,45; 1,47; 1,49; 1,54; 1,58; 1,67 (8s, 30H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 3,92-4,54 (m, 7H, 2H_a, 2H_c, H_f, 2H_g), 5,09-5,15 (m, 1H, H_b), 7,34-7,48 (m, 1H, H_d).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 22,9; 23,4; 24,3; 24,7; 26,6; 26,8; 27,3; 27,4; 28,5 (9s, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 50,2; 50,3; 51,3 (C_e), 53,7; 53,8; 54,0 (C_f), 57,3 (C_b), 65,1; 65,4; 65,5 (C_g), 67,9; 68,2; 69,0; 69,2 (C_a), 80,2; 80,8; 81,1; 81,2 (C(CH₃)₃), 94,1; 94,5 (C(CH₃)₂), 121,8; 122,8 (C_d), 148,6; 150,0 (C_e), 151,4; 151,7 (NCO₂), 152,4; 152,5 (NCO₂).

IR (cm⁻¹): 1690 (ν_{C=O}) ; 2335, 2361 (ν_{triazole}) ; 2879, 2937, 2979 (ν_{CH}).

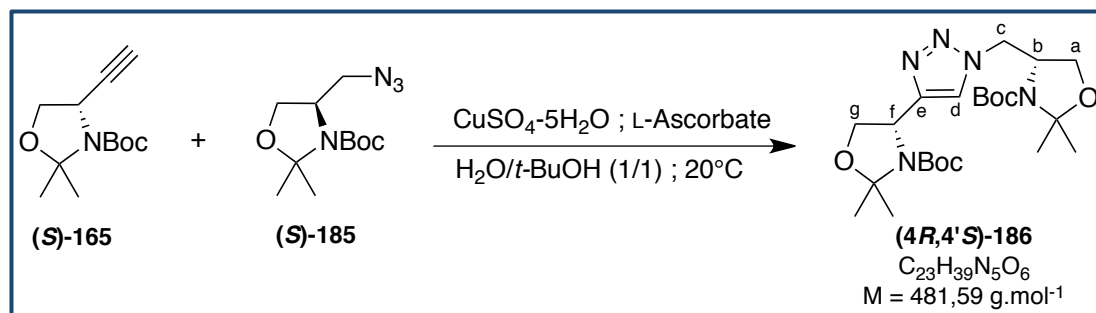
HRMS (ES⁺): [M+H]⁺ calculée pour C₂₃H₄₀N₅O₆, 482,2979 ; trouvée, 482,2984.

HPLC : t_R = 16,70 min ; pureté : 94%.

Masse (ES⁺) : 482 (M+H).

(R)-4-((4-((S)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-diméthyloxazolidine-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyle)-2,2-diméthyloxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle ((4R,4'S)-186)

Selon la méthode J :



Solide blanc

$R_f = 0,23$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 4/6)

Rendement = 70%

Mp : 48-50°C

$[\alpha]_D^{20} = +53,3$ (CHCl_3 ; $c=0,90$)

e.e. = 99,5%

r.d. = 94,57/5,43 (R^*S^*/R^*R^*)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,31; 1,41; 1,45; 1,48; 1,50; 1,56; 1,68 (7s, 30H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 3,93-4,54 (m, 7H, 2H_a , 2H_c , H_f , 2H_g) ; 5,11-5,14 (m, 1H, H_b) ; 7,35-7,48 (m, 1H, H_d).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 23,0; 23,4; 24,4; 24,7; 26,7; 26,8; 27,3; 27,4; 28,5 (9s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 50,2; 51,3 (C_e) ; 53,8; 54,1 (C_f) ; 57,4 (C_b) ; 65,0; 65,5 (C_g) ; 67,8; 68,1; 69,1 (C_a) ; 80,2; 80,8; 81,2; 81,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 94,2; 94,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 121,8; 123,0 (C_d) ; 148,5; 150,1 (C_e) ; 151,4; 151,7; 152,4; 152,5 (NCO_2).

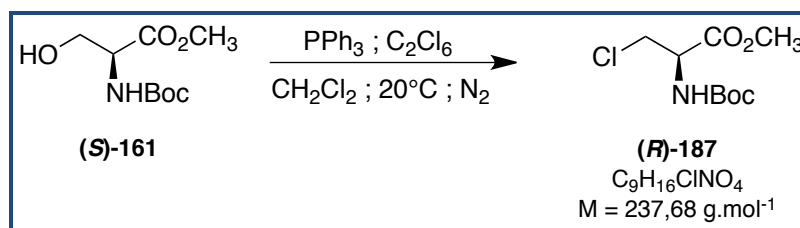
IR (cm^{-1}): 1690 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2335, 2361 (ν_{triazole}) ; 2879, 2937, 2979 (ν_{CH}).

HRMS (ES^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_6$, 482,2979 ; trouvée, 482,2979.

HPLC : $t_R = 16,64$ min ; pureté : 97,2%.

Masse (ES^+) : 482 ($\text{M}+\text{H}$).

(R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-chloropropanoate de méthyle ((R)-187)



À une solution de (S)-**161** (1,00g ; 4,6 mmol) dans 10 mL de dichlorométhane anhydre sous atmosphère inerte, sont ajoutés de la triphénylphosphine (1,32g ; 5,0 mmol) et de l'hexachloroéthane (1,18g ; 5,0 mmol) préalablement solubilisés dans 10 mL de dichlorométhane anhydre.

Après 2h d'agitation à température ambiante, 40 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés à la solution. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*40 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par colonne ouverte en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide blanc

R_f = 0,45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 81%

Mp : 59-61°C ; litt³¹⁷. 62-64°C

[α]_D²⁰ = +39,2 (CHCl₃ ; c=1,48) ; litt³¹⁷. +37,8 (CHCl₃, c=1,50)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 3,80 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,84 (dd, 1H, J = 3,5Hz, J = 11,5Hz, CH₂) ; 3,97 (dd, 1H, J = 3,5Hz, J = 11,5Hz, CH₂) ; 4,69-4,73 (m, 1H, CH) ; 5,43 (d, 1H, J = 7,1Hz, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4 (C(CH₃)₃) ; 45,7 (CH₂) ; 53,1 (CO₂CH₃) ; 54,5 (CH) ; 80,6 (C(CH₃)₃) ; 155,2 (NCO₂) ; 169,7 (CO₂CH₃).

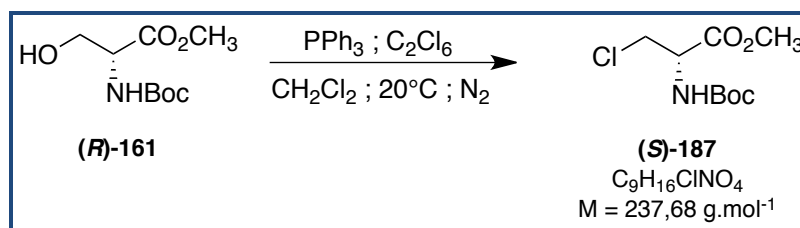
IR (cm⁻¹): 708 (ν_{C-Cl}), 1676 (ν_{C=O}), 1792 (ν_{C=O}).

HRMS (ES⁺): [M-100]⁺ calculée pour C₄H₉ClNO₂, 138,0322 ; trouvée, 138,0323.

HPLC : t_R = 12,02 min ; pureté: 95,3%.

Masse (ES⁺) : 238 (M+H).

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-chloropropanoate de méthyle ((S)-187)



Le composé (S)-**187** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 1,00g (4,6 mmol) de (R)-**161**.

Solide blanc

$R_f = 0,45$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 81%

Mp : 62-64°C

$[\alpha]_D^{20} = -40,67$ (CHCl_3 ; $c=1,47$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,83 (dd, 1H, $J = 3,5\text{Hz}$, $J = 11,5\text{Hz}$, CH_2) ; 3,96 (dd, 1H, $J = 3,5\text{Hz}$, $J = 11,5\text{Hz}$, CH_2) ; 4,68-4,73 (m, 1H, CH) ; 5,43 (d, 1H, $J = 7,4\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 45,7 (CH_2) ; 53,0 (CO_2CH_3) ; 54,5 (CH) ; 80,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,1 (NCO_2) ; 169,7 (CO_2CH_3).

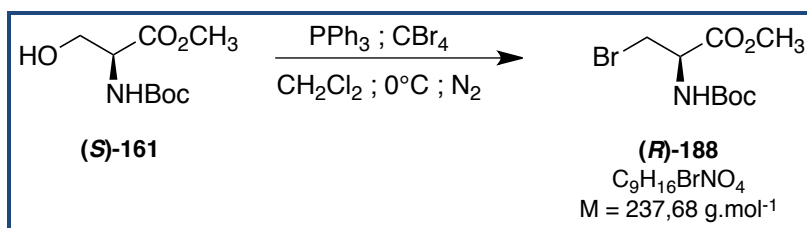
IR (cm^{-1}): 708 ($\nu_{\text{C-Cl}}$), 1676 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1792 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}-100]^+$ calculée pour $\text{C}_4\text{H}_9\text{ClNO}_2$, 138,0322 ; trouvée, 138,0324.

HPLC : $t_R = 12,02$ min ; pureté: 98,4%.

Masse (ES^+) : 238 (M+H).

(R)-3-bromo-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate de méthyle ((R)-188)



À une solution de (S)-**161** (1,00g ; 4,6 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C sous atmosphère d'azote, sont ajoutés du tétrabromométhane (1,67g ; 5,0 mmol) et de la triphénylphosphine (1,32g ; 5,0 mmol) en trois portions égales en l'espace de 30 minutes. Après 1h sous agitation à 0°C, 40 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés à la solution. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*40 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est purifié par colonne ouverte en éluant par un mélange AcOEt/EdP.

Solide blanc

R_f = 0,45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 78%

Mp : 51-53°C ; litt³¹⁸. 50-52°C

[α]_D²⁰ = +37,2 (CHCl₃ ; c=1,30) ; litt³³⁰. +21,3 (CHCl₃, c=1,30)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 3,71 (dd, 1H, *J* = 3,5Hz, *J* = 10,5Hz, CH₂) ; 3,80 (s, 3H, CO₂CH₃) ; 3,85 (dd, 1H, *J* = 3,5Hz, *J* = 10,5Hz, CH₂) ; 4,73-4,78 (m, 1H, CH) ; 5,41 (d, 1H, *J* = 7,0Hz, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 28,4 (C(CH₃)₃) ; 34,3 (CH₂) ; 53,1 (CO₂CH₃) ; 54,0 (CH) ; 80,7 (C(CH₃)₃) ; 155,1 (NCO₂) ; 169,8 (CO₂CH₃).

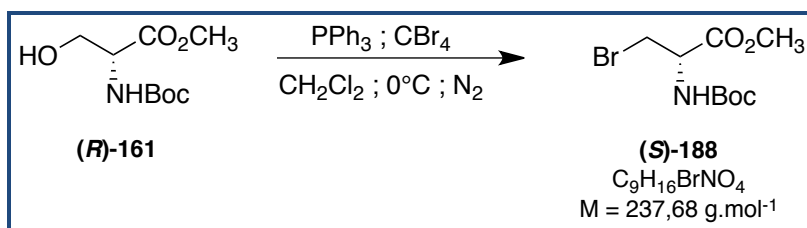
IR (cm⁻¹): 618 (ν_{C-Br}), 1677 (ν_{C=O}), 1726 (ν_{C=O}).

HRMS (ES⁺): [M-100]⁺ calculée pour C₄H₉BrNO₂, 181,9817 ; trouvée, 181,9818.

HPLC : t_R = 12,40 min ; pureté: 95,9%.

Masse (ES⁺) : 282 (M+H ; ⁷⁹Br) ; 284 (M+H ; ⁸¹Br).

(S)-3-bromo-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate de méthyle ((S)-188)



Le composé (S)-**188** est synthétisé de la même façon que précédemment en partant de 1,00g (4,6 mmol) de (R)-**161**.

Solide blanc

$R_f = 0,45$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 78%

M_p : 47-49°C

$[\alpha]_D^{20} = -34,0$ ($CHCl_3$; $c=1,29$)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 3,70 (dd, 1H, $J = 3,5\text{Hz}$, $J = 10,5\text{Hz}$, CH_2) ; 3,80 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 3,84 (dd, 1H, $J = 3,5\text{Hz}$, $J = 10,5\text{Hz}$, CH_2) ; 4,73-4,77 (m, 1H, CH) ; 5,41 (d, 1H, $J = 7,4\text{Hz}$, NH).

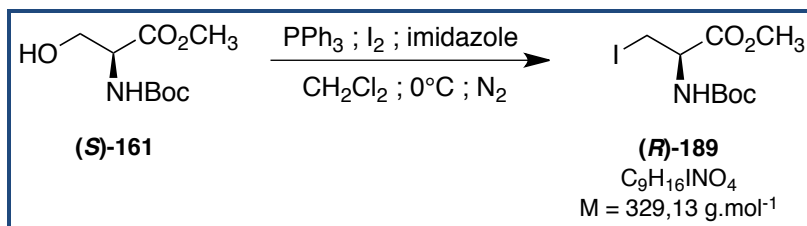
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): 28,4 ($C(CH_3)_3$) ; 34,2 (CH_2) ; 53,1 (CO_2CH_3) ; 54,0 (CH) ; 80,7 ($C(CH_3)_3$) ; 155,1 (NCO_2) ; 169,8 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 618 (ν_{C-Br}), 1677 ($\nu_{C=O}$), 1726 ($\nu_{C=O}$).

HRMS (ES^+): $[M-100]^+$ calculée pour $C_4H_9BrNO_2$, 181,9817 ; trouvée, 181,9816.

(R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-iodopropanoate de méthyle ((R)-189)

Selon la méthode K :



Solide blanc

$R_f = 0,45$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 45%

Mp : $46-48^\circ\text{C}$; litt²⁹⁰. $45-47^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -3,56$ (CHCl_3 ; $c=2,99$) ; litt²⁹⁰. $-3,70$ (CHCl_3 , $c=3,00$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,52-3,62 (m, 2H, CH_2) ; 3,80 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,50-4,55 (m, 1H, CH) ; 5,41 (d, 1H, $J = 6,4\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 8,0 (CH_2) ; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,8 (CH) ; 80,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 155,0 (NCO_2) ; 170,2 (CO_2CH_3).

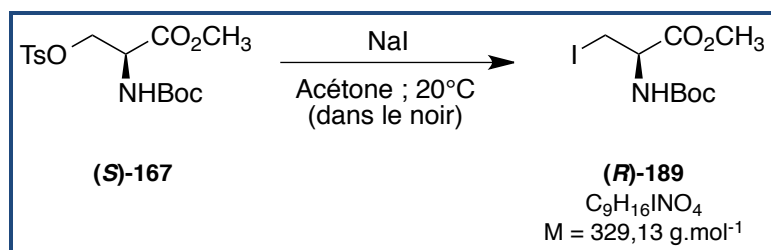
IR (cm^{-1}): 648 ($\nu_{\text{C-I}}$), 1689 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1731 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}-100]^+$ calculée pour $\text{C}_4\text{H}_9\text{INO}_2$, 229,9678 ; trouvée, 229,9681.

HPLC : $t_R = 13,32 \text{ min}$; pureté: 96,3%.

Masse (ES^+) : 330 (M+H).

Selon la méthode L :

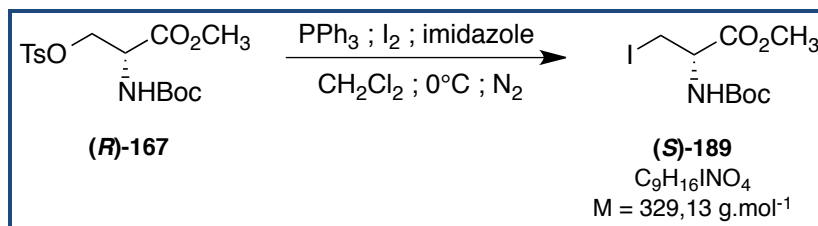


Rendement = 53%

Les analyses des composés (R)-**189** sont en accord avec les données présentées pour la méthode K.

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-iodopropanoate de méthyle ((S)-189)

Selon la méthode L :



Solide jaune pâle

$R_f = 0,45$ (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 1/9)

Rendement = 53%

Mp : $49\text{-}51^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = +4,15$ (CHCl_3 ; $c=2,97$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3,51-3,61 (m, 2H, CH_2) ; 3,79 (s, 3H, CO_2CH_3) ; 4,49-4,54 (m, 1H, CH) ; 5,35 (d, 1H, $J = 6,9\text{Hz}$, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): 8,1 (CH_2) ; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 53,2 (CO_2CH_3) ; 53,8 (CH) ; 80,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 154,9 (NCO_2) ; 170,2 (CO_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 648 ($\nu_{\text{C-I}}$), 1689 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1731 ($\nu_{\text{C=O}}$).

HRMS (ES^+): $[\text{M}-100]^+$ calculée pour $\text{C}_4\text{H}_9\text{INO}_2$, 229,9678 ; trouvée, 229,9682.

HPLC : $t_R = 13,60 \text{ min}$; pureté: 99%.

Masse (ES^+) : 330 (M+H).

Bibliographie

- (1) Ligon-Borden, B. L. Biography: Selman A. Waksman, PhD (1888-1973): Pioneer in Development of Antibiotics and Nobel Laureate. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **2003**, 14 (1), 60–63.
- (2) Newton, G. G. F.; Abraham, E. P. Some Chemical and Medical Aspects of the Antibiotics. *J. Pharm. Pharmacol.* **1958**, 10 (1), 401–426.
- (3) Waksman, S. A. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia* **1947**, 39 (5), 565.
- (4) Turpin, R.; Velu, H. *Thérapeutique antibiotique*. G. Doin & Cie: Paris, France, 1957.
- (5) Green, B. N.; Johnson, C. D.; Egan, J. T.; Rosenthal, M.; Griffith, E. A.; Evans, M. W. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: An Overview for Manual Therapists. *J. Chiropr. Med.* **2012**, 11 (1), 64–76.
- (6) Rupp, M. E.; Fey, P. D. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae: Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Drugs* **2003**, 63 (4), 353–365.
- (7) Velayati, A. A.; Masjedi, M. R.; Farnia, P.; Tabarsi, P.; Ghanavi, J.; ZiaZarifi, A. H.; Hoffner, S. E. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli: Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. *Chest* **2009**, 136 (2), 420–425.
- (8) Aminov, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* **2010**, 1.
- (9) OMS - Résistance aux antibiotiques
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/> (Consulté le 01/08/2016).
- (10) Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol.* **2016**, 24 (11), 862–871.
- (11) Cashin, P.; Goldsack, L.; Hall, D.; O'Toole, R. Contrasting Signal Transduction Mechanisms in Bacterial and Eukaryotic Gene Transcription. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 261 (2), 155–164.
- (12) Wurgler-Murphy, S. M.; Saito, H. Two-Component Signal Transducers and MAPK Cascades. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22 (5), 172–176.
- (13) Bourret, R. B.; Silversmith, R. E. Two-Component Signal Transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, 13 (2), 113–115.
- (14) Laub, M. T.; Goulian, M. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* **2007**, 41, 121–145.
- (15) Capra, E. J.; Laub, M. T. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, 66 (1), 325–347.
- (16) Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 183–215.
- (17) Bhate, M. P.; Molnar, K. S.; Goulian, M.; DeGrado, W. F. Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* **2015**, 23 (6), 981–994.
- (18) Mascher, T.; Helmann, J. D.; Uden, G. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, 70 (4), 910–938.
- (19) Wang, S. Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. In *Protein Phosphorylation in Human Health*. Huang, C., Ed.; InTech, 2012.

- (20) Stock, A. M.; West, A. H. Chapter 12 - Response Regulator Proteins and Their Interactions with Histidine Protein Kinases. In *Histidine Kinases in Signal Transduction*; Academic Press: San Diego, 2003; pp 237–271.
- (21) West, A. H.; Stock, A. M. Histidine Kinases and Response Regulator Proteins in Two-Component Signaling Systems. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (6), 369–376.
- (22) Trémolières, F.; Bernard, L.; Cavallo, J.-D.; Sollet, J.-P. Faut-il développer de nouveaux antibiotiques ? *Médecine Mal. Infect.* **2005**, *35*, S79–S86.
- (23) Worthington, R. J.; Melander, C. Combination Approaches to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31* (3), 177–184.
- (24) Mitchison, D. A. Role of Individual Drugs in the Chemotherapy of Tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2000**, *4* (9), 796–806.
- (25) Kalan, L.; Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Multicomponent Anti-Infective Strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*, e5.
- (26) Bernal, P.; Molina-Santiago, C.; Daddaoua, A.; Llamas, M. A. Antibiotic Adjuvants: Identification and Clinical Use. *Microb. Biotechnol.* **2013**, *6* (5), 445–449.
- (27) Bem, A. E.; Velikova, N.; Pellicer, M. T.; Baarlen, P. van; Marina, A.; Wells, J. M. Bacterial Histidine Kinases as Novel Antibacterial Drug Targets. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 213–224.
- (28) Hubbard, J.; Burnham, M. K. R.; Throup, J. P. Chapter 22 - Pathogenicity and Histidine Kinases: Approaches Toward the Development of a New Generation of Antibiotics. In *Histidine Kinases in Signal Transduction*; Academic Press: San Diego, 2003; pp 459–481.
- (29) Watanabe, T.; Okada, A.; Gotoh, Y.; Utsumi, R. Inhibitors Targeting Two-Component Signal Transduction. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*; Utsumi, R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer New York, 2008; pp 229–236.
- (30) Francis, S.; Wilke, K. E.; Brown, D. E.; Carlson, E. E. Mechanistic Insight into Inhibition of Two-Component System Signaling. *MedChemComm* **2013**, *4* (1), 269–277.
- (31) Njoroge, J. W.; Sperandio, V. Interference with Bacterial Cell-to-Cell Chemical Signaling in Development of New Anti-Infectives. In *Antibiotics*; Gualerzi, C. O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C. L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013; pp 241–261.
- (32) Worthington, R. J.; Blackledge, M. S.; Melander, C. Small-Molecule Inhibition of Bacterial Two-Component Systems to Combat Antibiotic Resistance and Virulence. *Future Med. Chem.* **2013**, *5* (11), 1265–1284.
- (33) Dutta, R.; Inouye, M. GHKL, an Emergent ATPase/kinase Superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25* (1), 24–28.
- (34) Stephenson, K.; Hoch, J. A. Two-Component and Phosphorelay Signal-Transduction Systems as Therapeutic Targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2* (5), 507–512.
- (35) Méjean, V. Two-Component Regulatory Systems: The Moment of Truth. *Res. Microbiol.* **2016**, *167* (1), 1–3.
- (36) Roychoudhury, S.; Zielinski, N. A.; Ninfa, A. J.; Allen, N. E.; Jungheim, L. N.; Nicas, T. I.; Chakrabarty, A. M. Inhibitors of Two-Component Signal Transduction Systems: Inhibition of Alginate Gene Activation in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (3), 965–969.

- (37) Barrett, J. F.; Goldschmidt, R. M.; Lawrence, L. E.; Foleno, B.; Chen, R.; Demers, J. P.; Johnson, S.; Kanojia, R.; Fernandez, J.; Bernstein, J.; Licata, L.; Donetz, A.; Huang, S.; Hlasta, D. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K.; Frechette, R.; Frosco, M. B.; Klaubert, D. H.; Whiteley, J. M.; Wang, L.; Hoch, J. A. Antibacterial Agents That Inhibit Two-Component Signal Transduction Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (9), 5317–5322.
- (38) Macielag, M. J.; Demers, J. P.; Fraga-Spano, S. A.; Hlasta, D. J.; Johnson, S. G.; Kanojia, R. M.; Russell, R. K.; Sui, Z.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H.; Foleno, B. D.; Goldschmidt, R. M.; Loeloff, M. J.; Webb, G. C.; Barrett, J. F. Substituted Salicylanilides as Inhibitors of Two-Component Regulatory Systems in Bacteria. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (16), 2939–2945.
- (39) Hlasta, D. J.; Demers, J. P.; Foleno, B. D.; Fraga-Spano, S. A.; Guan, J.; Hilliard, J. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K. A.; Sheppard, C. M.; Sui, Z.; Webb, G. C.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H.; Barrett, J. F. Novel Inhibitors of Bacterial Two-Component Systems with Gram Positive Antibacterial Activity: Pharmacophore Identification Based on the Screening Hit Closantel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1923–1928.
- (40) Sui, Z.; Guan, J.; Hlasta, D. J.; Macielag, M. J.; Foleno, B. D.; Goldschmidt, R. M.; Loeloff, M. J.; Webb, G. C.; Barrett, J. F. SAR Studies of Diaryltriazoles against Bacterial Two-Component Regulatory Systems and Their Antibacterial Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1929–1934.
- (41) Stephenson, K.; Yamaguchi, Y.; Hoch, J. A. The Mechanism of Action of Inhibitors of Bacterial Two-Component Signal Transduction Systems. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (49), 38900–38904.
- (42) Hilliard, J. J.; Goldschmidt, R. M.; Licata, L.; Baum, E. Z.; Bush, K. Multiple Mechanisms of Action for Inhibitors of Histidine Protein Kinases from Bacterial Two-Component Systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (7), 1693–1699.
- (43) Weidner-Wells, M. A.; Ohemeng, K. A.; Nguyen, V. N.; Fraga-Spano, S.; Macielag, M. J.; Werblood, H. M.; Foleno, B. D.; Webb, G. C.; Barrett, J. F.; Hlasta, D. J. Amidino Benzimidazole Inhibitors of Bacterial Two-Component Systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (12), 1545–1548.
- (44) Kanojia, R. M.; Murray, W.; Bernstein, J.; Fernandez, J.; Foleno, B. D.; Krause, H.; Lawrence, L.; Webb, G.; Barrett, J. F. 6-Oxa Isosteres of Anacardic Acids as Potent Inhibitors of Bacterial Histidine Protein Kinase (HPK)-Mediated Two-Component Regulatory Systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (20), 2947–2952.
- (45) Gilmour, R.; Foster, J. E.; Sheng, Q.; McClain, J. R.; Riley, A.; Sun, P.-M.; Ng, W.-L.; Yan, D.; Nicas, T. I.; Henry, K.; Winkler, M. E. New Class of Competitive Inhibitor of Bacterial Histidine Kinases. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (23), 8196–8200.
- (46) Rasko, D. A.; Moreira, C. G.; Li, D. R.; Reading, N. C.; Ritchie, J. M.; Waldor, M. K.; Williams, N.; Taussig, R.; Wei, S.; Roth, M.; Hughes, D. T.; Huntley, J. F.; Fina, M. W.; Falck, J. R.; Sperandio, V. Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. *Science* **2008**, *321* (5892), 1078–1080.
- (47) Harris, T. L.; Worthington, R. J.; Hittle, L. E.; Zurawski, D. V.; Ernst, R. K.; Melander, C. Small Molecule Downregulation of PmrAB Reverses Lipid A Modification and Breaks Colistin Resistance. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (1), 122–127.

- (48) Lea, W. A.; Simeonov, A. Fluorescence Polarization Assays in Small Molecule Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6* (1), 17–32.
- (49) Wilke, K. E.; Francis, S.; Carlson, E. E. Inactivation of Multiple Bacterial Histidine Kinases by Targeting the ATP-Binding Domain. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 328–335.
- (50) Dubrac, S.; Bisicchia, P.; Devine, K. M.; Msadek, T. A Matter of Life and Death: Cell Wall Homeostasis and the WalkR (YycGF) Essential Signal Transduction Pathway. *Mol. Microbiol.* **2008**, *70* (6), 1307–1322.
- (51) Dubrac, S.; Msadek, T. Tearing Down the Wall: Peptidoglycan Metabolism and the WalkK/WalR (YycG/YycF) Essential Two-Component System. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*; Utsumi, R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer New York, 2008; pp 214–228.
- (52) Bisicchia, P.; Noone, D.; Lioliou, E.; Howell, A.; Quigley, S.; Jensen, T.; Jarmer, H.; Devine, K. M. The Essential YycFG Two-Component System Controls Cell Wall Metabolism in *Bacillus Subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65* (1), 180–200.
- (53) Silver, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24* (1), 71–109.
- (54) Velikova, N.; Bem, A. E.; van Baarlen, P.; Wells, J. M.; Marina, A. WalkK, the Path towards New Antibacterials with Low Potential for Resistance Development. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (10), 891–894.
- (55) Yamamoto, K.; Kitayama, T.; Minagawa, S.; Watanabe, T.; Sawada, S.; Okamoto, T.; Utsumi, R. Antibacterial Agents That Inhibit Histidine Protein Kinase YycG of *Bacillus Subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (10), 2306–2310.
- (56) Abdul, A. B.; Abdelwahab, S. I.; Al-Zubairi, A. S.; Elhassan, M. M.; Murali, S. M. Anticancer and Antimicrobial Activities of Zerumbone from the Rhizomes of *Zingiber Zerumbut*. *Int. J. Pharmacol.* **2008**, *4* (4), 301–304.
- (57) Kitayama, T.; Iwabuchi, R.; Minagawa, S.; Shiomi, F.; Cappiello, J.; Sawada, S.; Utsumi, R.; Okamoto, T. Unprecedented Olefin-Dependent Histidine-kinase Inhibitory of Zerumbone Ring-Opening Material. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (23), 5943–5946.
- (58) Kitayama, T.; Iwabuchi, R.; Minagawa, S.; Sawada, S.; Okumura, R.; Hoshino, K.; Cappiello, J.; Utsumi, R. Synthesis of a Novel Inhibitor against MRSA and VRE: Preparation from Zerumbone Ring Opening Material Showing Histidine-Kinase Inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 1098–1101.
- (59) de Lima Procópio, R. E.; da Silva, I. R.; Martins, M. K.; de Azevedo, J. L.; de Araújo, J. M. Antibiotics Produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* **2012**, *16* (5), 466–471.
- (60) Okada, A.; Igarashi, M.; Okajima, T.; Kinoshita, N.; Umekita, M.; Sawa, R.; Inoue, K.; Watanabe, T.; Doi, A.; Martin, A.; Quinn, J.; Nishimura, Y.; Utsumi, R. Walkmycin B Targets WalkK (YycG), a Histidine Kinase Essential for Bacterial Cell Growth. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63* (2), 89–94.
- (61) Eguchi, Y.; Kubo, N.; Matsunaga, H.; Igarashi, M.; Utsumi, R. Development of an Antivirulence Drug against *Streptococcus Mutans*: Repression of Biofilm Formation, Acid Tolerance, and Competence by a Histidine Kinase Inhibitor, Walkmycin C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (4), 1475–1484.
- (62) Igarashi, M.; Watanabe, T.; Hashida, T.; Umekita, M.; Hatano, M.; Yanagida, Y.; Kino, H.; Kimura, T.; Kinoshita, N.; Inoue, K.; Sawa, R.; Nishimura, Y.; Utsumi, R.; Nomoto,

- A. Waldiomycin, a Novel WalK-Histidine Kinase Inhibitor from *Streptomyces* Sp. MK844-mF10. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2013**, 66 (8), 459–464.
- (63) Rohr, J.; Thiericke, R. Angucycline Group Antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 9 (2), 103–137.
- (64) Fakhruzzaman, M.; Inukai, Y.; Yanagida, Y.; Kino, H.; Igarashi, M.; Eguchi, Y.; Utsumi, R. Study on in Vivo Effects of Bacterial Histidine Kinase Inhibitor, Waldiomycin, in *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2015**, 61 (5), 177–184.
- (65) Qin, Z.; Zhang, J.; Xu, B.; Chen, L.; Wu, Y.; Yang, X.; Shen, X.; Molin, S.; Danchin, A.; Jiang, H.; Qu, D. Structure-Based Discovery of Inhibitors of the YycG Histidine Kinase: New Chemical Leads to Combat *Staphylococcus Epidermidis* Infections. *BMC Microbiol.* **2006**, 6, 96.
- (66) Huang, R.; Zheng, L.; Liu, H.; Pan, B.; Hu, J.; Zhu, T.; Wang, W.; Jiang, D.; Wu, Y.; Han, S.; Qu, D. Thiazolidione Derivatives Targeting the Histidine Kinase YycG Are Effective against Both Planktonic and Biofilm-Associated *Staphylococcus Epidermidis*. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, 33 (3), 418–425.
- (67) Pan, B.; Huang, R.; Zheng, L.; Chen, C.; Han, S.; Qu, D.; Zhu, M.; Wei, P. Thiazolidione Derivatives as Novel Antibiofilm Agents: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–activity Relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (3), 819–824.
- (68) Zhao, D.; Chen, C.; Liu, H.; Zheng, L.; Tong, Y.; Qu, D.; Han, S. Biological Evaluation of Halogenated thiazolo[3,2-A]pyrimidin-3-One Carboxylic Acid Derivatives Targeting the YycG Histidine Kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87, 500–507.
- (69) Liu, H.; Zhao, D.; Chang, J.; Yan, L.; Zhao, F.; Wu, Y.; Xu, T.; Gong, T.; Chen, L.; He, N.; Wu, Y.; Han, S.; Qu, D. Efficacy of Novel Antibacterial Compounds Targeting Histidine Kinase YycG Protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98 (13), 6003–6013.
- (70) Guarnieri, M. T.; Blagg, B. S. J.; Zhao, R. A High-Throughput TNP-ATP Displacement Assay for Screening Inhibitors of ATP-Binding in Bacterial Histidine Kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, 9 (2), 174–183.
- (71) Wilke, K. E.; Carlson, E. E. All Signals Lost. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5 (203), 203ps12–ps203ps12.
- (72) Hu, X.; Machius, M.; Yang, W. Monovalent Cation Dependence and Preference of GHKL ATPases and Kinases. *FEBS Lett.* **2003**, 544 (1-3), 268–273.
- (73) Guarnieri, M. T.; Zhang, L.; Shen, J.; Zhao, R. The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ. *J. Mol. Biol.* **2008**, 379 (1), 82–93.
- (74) Celikel, R.; Veldore, V. H.; Mathews, I.; Devine, K. M.; Varughese, K. I. ATP Forms a Stable Complex with the Essential Histidine Kinase WalK (YycG) Domain. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, 68 (Pt 7), 839–845.
- (75) Brvar, M.; Perdih, A.; Renko, M.; Anderluh, G.; Turk, D.; Solmajer, T. Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (14), 6413–6426.
- (76) Grillot, A.-L.; Tiran, A. L.; Shannon, D.; Krueger, E.; Liao, Y.; O'Dowd, H.; Tang, Q.; Ronkin, S.; Wang, T.; Waal, N.; Li, P.; Laufer, D.; Sizensky, E.; Tanoury, J.; Perola, E.; Grossman, T. H.; Doyle, T.; Hanzelka, B.; Jones, S.; Dixit, V.; Ewing, N.; Liao, S.; Boucher, B.; Jacobs, M.; Bennani, Y.; Charifson, P. S. Second-Generation

- Antibacterial Benzimidazole Ureas: Discovery of a Preclinical Candidate with Reduced Metabolic Liability. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (21), 8792–8816.
- (77) Sherer, B. A.; Hull, K.; Green, O.; Basarab, G.; Hauck, S.; Hill, P.; Loch, J. T.; Mullen, G.; Bist, S.; Bryant, J.; Boriack-Sjodin, A.; Read, J.; DeGrace, N.; Uria-Nickelsen, M.; Illingworth, R. N.; Eakin, A. E. Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Optimization of Antibacterial Activity and Efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (24), 7416–7420.
- (78) Martin, L.; Catherinot, V.; Labesse, G. kinDOCK: A Tool for Comparative Docking of Protein Kinase Ligands. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (Web Server issue), W325–W329.
- (79) Pons, J.-L.; Labesse, G. @TOME-2: A New Pipeline for Comparative Modeling of Protein-Ligand Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (Web Server issue), W485–W491.
- (80) Catherinot, V.; Labesse, G. ViTO: Tool for Refinement of Protein Sequence-Structure Alignments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2004**, *20* (18), 3694–3696.
- (81) Neudert, G.; Klebe, G. DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2731–2745.
- (82) Korb, O.; Stützel, T.; Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (1), 84–96.
- (83) The Nobel Prize in Chemistry 2010
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010/.
- (84) Johansson Seechurn, C. C. C.; Kitching, M. O.; Colacot, T. J.; Snieckus, V. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling: A Historical Contextual Perspective to the 2010 Nobel Prize. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5062–5085.
- (85) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440.
- (86) Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (E)-Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 866–867.
- (87) Biajoli, A. F. P.; Schwalm, C. S.; Limberger, J.; Claudino, T. S.; Monteiro, A. L. Recent Progress in the Use of Pd-Catalyzed C-C Cross-Coupling Reactions in the Synthesis of Pharmaceutical Compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (12), 2186–2214.
- (88) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. Recent Applications of the Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58* (48), 9633–9695.
- (89) Martin, R.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (11), 1461–1473.
- (90) Maluenda, I.; Navarro, O. Recent Developments in the Suzuki-Miyaura Reaction: 2010–2014. *Molecules* **2015**, *20* (5), 7528–7557.
- (91) Goossen, L. J.; Melzer, B. Synthesis of Valsartan via Decarboxylative Biaryl Coupling. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (19), 7473–7476.
- (92) Garg, N. K.; Caspi, D. D.; Stoltz, B. M. The Total Synthesis of (+)-Dragmacidin F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9552–9553.

- (93) Hsu, S.-C.; Narsingam, M.; Lin, Y.-F.; Hsu, F.-L.; Uang, B.-J. Synthesis of (±)-Pterodin A via Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction. *Tetrahedron* **2013**, 69 (12), 2572–2576.
- (94) L. Budarin, V.; S. Shuttleworth, P.; H. Clark, J.; Luque, R. Industrial Applications of C-C Coupling Reactions. *Curr. Org. Synth.* **2010**, 7 (6), 614–627.
- (95) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457–2483.
- (96) Slevin, A.; Koolmeister, T.; Scobie, M. A Versatile Synthesis of Diverse 3,4-Fused Cinnolines via the Base-Catalysed Condensation of 2-Amino-2'-Nitrobiaryls. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2007**, 2506–2508.
- (97) Bugge, S.; Kaspersen, S. J.; Larsen, S.; Nonstad, U.; Bjørkøy, G.; Sundby, E.; Hoff, B. H. Structure-Activity Study Leading to Identification of a Highly Active Thienopyrimidine Based EGFR Inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 75, 354–374.
- (98) Valant, C.; May, L. T.; Aurelio, L.; Chuo, C. H.; White, P. J.; Baltos, J.-A.; Sexton, P. M.; Scammells, P. J.; Christopoulos, A. Separation of on-Target Efficacy from Adverse Effects through Rational Design of a Bitopic Adenosine Receptor Agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 111 (12), 4614–4619.
- (99) Ashwell, S.; Gero, T.; Ioannidis, S.; Janetka, J.; Lyne, P.; Su, M.; Toader, D.; Yu, D.; Yu, Y. Thiophene Derivatives as Chk 1 Inhibitors. WO2005066163 A2, July 21, 2005.
- (100) Lucas, B. Heterocyclic Compounds and Their Use as Inhibitors of pi3k Activity. WO2012003271 A1, January 5, 2012.
- (101) Prasad, B. A. B.; Gilbertson, S. R. One-Pot Synthesis of Unsymmetrical N-Heterocyclic Carbene Ligands from N -(2-Iodoethyl)arylamine Salts. *Org. Lett.* **2009**, 11 (16), 3710–3713.
- (102) Pérez, J.; Castañeda-García, A.; Jenke-Kodama, H.; Müller, R.; Muñoz-Dorado, J. Eukaryotic-like Protein Kinases in the Prokaryotes and the Myxobacterial Kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (41), 15950–15955.
- (103) Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 603–616.
- (104) Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 2012.
- (105) OMS - L'espérance de vie a progressé de 5 ans depuis 2000, mais les inégalités sanitaires persistent
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/health-inequalities-persist/fr/> (Consulté le 01/09/2016).
- (106) Sheldon, R. A. The E Factor: Fifteen Years on. *Green Chem.* **2007**, 9 (12), 1273–1283.
- (107) Kümmerer, K. Pharmaceuticals in the Environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2010**, 35 (1), 57–75.
- (108) Haguenoer, J.-M. Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique ? *Santé Publique* **2010**, 22 (3), 325–342.
- (109) Daghrir, R.; Drogui, P. Tetracycline Antibiotics in the Environment: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2013**, 11 (3), 209–227.
- (110) Larsson, D. G. J.; de Pedro, C.; Paxeus, N. Effluent from Drug Manufactures Contains Extremely High Levels of Pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* **2007**, 148 (3), 751–755.

- (111) Passerat, J.; Tamtam, F.; Le Bot, B.; Eurin, J.; Chevreuil, M.; Servais, P. Rejets Hospitaliers D'antibiotiques et de Bactéries Fécales Antibiorésistantes Dans Les Rivières Du Bassin de La Seine. *Eur. J. Water Qual.* **2010**, *41* (1), 1–13.
- (112) Martinez, J. L. Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (11), 2893–2902.
- (113) Miquel, G. La qualité de l'eau et l'assainissement en France. https://www.senat.fr/rap/l02-215-1/l02-215-1_mono.html (Consulté le 09/01/2016).
- (114) Radjenović, J.; Petrović, M.; Barceló, D. Fate and Distribution of Pharmaceuticals in Wastewater and Sewage Sludge of the Conventional Activated Sludge (CAS) and Advanced Membrane Bioreactor (MBR) Treatment. *Water Res.* **2009**, *43* (3), 831–841.
- (115) Behera, S. K.; Kim, H. W.; Oh, J.-E.; Park, H.-S. Occurrence and Removal of Antibiotics, Hormones and Several Other Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Plants of the Largest Industrial City of Korea. *Sci. Total Environ.* **2011**, *409* (20), 4351–4360.
- (116) Besse, J.-P. Le rejet des substances pharmaceutiques dans le milieu aquatique : présence, impact et gestion du risque. *Revue du Soignant en santé publique* **2008**, *4* (24), 14–23.
- (117) Owens, B. Pharmaceuticals in the Environment: A Growing Problem. *Pharm. J.* **2015**, 294 (7850).
- (118) Oaks, J. L.; Gilbert, M.; Virani, M. Z.; Watson, R. T.; Meteyer, C. U.; Rideout, B. A.; Shivaprasad, H. L.; Ahmed, S.; Iqbal Chaudhry, M. J.; Arshad, M.; Mahmood, S.; Ali, A.; Ahmed Khan, A. Diclofenac Residues as the Cause of Vulture Population Decline in Pakistan. *Nature* **2004**, *427* (6975), 630–633.
- (119) Kidd, K. A.; Blanchfield, P. J.; Mills, K. H.; Palace, V. P.; Evans, R. E.; Lazorchak, J. M.; Flick, R. W. Collapse of a Fish Population after Exposure to a Synthetic Estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (21), 8897–8901.
- (120) Kümmerer, K. Antibiotics in the Aquatic Environment – A Review – Part II. *Chemosphere* **2009**, *75* (4), 435–441.
- (121) Gothwal, R.; Shashidhar, T. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN – Soil Air Water* **2015**, *43* (4), 479–489.
- (122) Barra Caracciolo, A.; Topp, E.; Grenni, P. Pharmaceuticals in the Environment: Biodegradation and Effects on Natural Microbial Communities. A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *106*, 25–36.
- (123) Park, H.; Park, K.; Shalaby, W. S. W. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*; CRC Press, 1993.
- (124) Scott, M. J.; Jones, M. N. The Biodegradation of Surfactants in the Environment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2000**, *1508* (1–2), 235–251.
- (125) OECD. *Test No. 301: Ready Biodegradability*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3; OECD Publishing, 1992.
- (126) Alexy, R.; Kümpel, T.; Kümmerer, K. Assessment of Degradation of 18 Antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* **2004**, *57* (6), 505–512.
- (127) Kümmerer, K. Rational Design of Molecules by Life Cycle Engineering. In *Green and Sustainable Pharmacy*; Kümmerer, K., Hempel, M., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2010; pp 135–146.

- (128) Nerdinger, S.; Kendall, C.; Cai, X.; Marchart, R.; Riebel, P.; Johnson, M. R.; Yin, C.-F.; Eltis, L. D.; Snieckus, V. Combined Directed Ortho Metalation/Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Strategies. Regiospecific Synthesis of Chlorodihydroxybiphenyls and Polychlorinated Biphenyls. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (16), 5960–5967.
- (129) Qiu, J.; Zhao, B.; Shen, Y.; Chen, W.; Ma, Y.; Shen, Y. A Novel P-Terphenyl Derivative Inducing Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in MDA-MB-435 Cells through Topoisomerase Inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 192–202.
- (130) Weissman, S. A.; Zewge, D. Recent Advances in Ether Dealkylation. *Tetrahedron* **2005**, *61* (33), 7833–7863.
- (131) Conde, S.; Corral, C.; Lissavetzky, J. *E* - and *Z* -Isomerism of 2-Acetylthiophene Oximes. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22* (2), 301–304.
- (132) Heijenoort, J. van. Recent Advances in the Formation of the Bacterial Peptidoglycan Monomer Unit (1985 to 2000). *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (5), 503–519.
- (133) Lovering, A. L.; Safadi, S. S.; Strynadka, N. C. J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81* (1), 451–478.
- (134) Mohammadi, T.; van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-de Bruin, M.; Nguyen-Distèche, M.; de Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a Transporter of Lipid-Linked Cell Wall Precursors across the Membrane. *EMBO J.* **2011**, *30* (8), 1425–1432.
- (135) Nikolaidis, I.; Favini-Stabile, S.; Dessen, A. Resistance to Antibiotics Targeted to the Bacterial Cell Wall. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2014**, *23* (3), 243–259.
- (136) Bush, K. Antimicrobial Agents Targeting Bacterial Cell Walls and Cell Membranes. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* **2012**, *31* (1), 43–56.
- (137) Kong, K.-F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2010**, *118* (1), 1–36.
- (138) Bush, K. Antimicrobial Agents Targeting Bacterial Cell Walls and Cell Membranes. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* **2012**, *31* (1), 43–56.
- (139) Poole, K. Resistance to Beta-Lactam Antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2004**, *61* (17), 2200–2223.
- (140) Abraham, E. P.; Chain, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146* (3713), 837–837.
- (141) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of Beta-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201.
- (142) Chambers, H. F. Penicillin-Binding Protein-Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci. *J. Infect. Dis.* **1999**, *179* Suppl 2, S353–S359.
- (143) Pages, J.-M.; Lavigne, J.-P.; Leflon-Guibout, V.; Marcon, E.; Bert, F.; Noussair, L.; Nicolas-Chanoine, M.-H. Efflux Pump, the Masked Side of Beta-Lactam Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Isolates. *PloS One* **2009**, *4* (3), e4817.
- (144) de Kruijff, B.; van Dam, V.; Breukink, E. Lipid II: A Central Component in Bacterial Cell Wall Synthesis and a Target for Antibiotics. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2008**, *79* (3-5), 117–121.
- (145) Binda, E.; Marinelli, F.; Marcone, G. L. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics* **2014**, *3* (4), 572–594.

- (146) Hiramatsu, K. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A New Model of Antibiotic Resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2001**, 1 (3), 147–155.
- (147) Jung, G. Lantibiotics—Ribosomally Synthesized Biologically Active Polypeptides Containing Sulfide Bridges and α,β -Didehydroamino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30 (9), 1051–1068.
- (148) Bierbaum, G.; Sahl, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, 10 (1), 2–18.
- (149) McAuliffe, O.; Ross, R. P.; Hill, C. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25 (3), 285–308.
- (150) Mattick, A. T. R.; Hirsch, A. Further Observations on an Inhibitory Substance (nisin) from Lactic Streptococci. *Lancet Lond. Engl.* **1947**, 2 (6462), 5–8.
- (151) Delves-Broughton, J.; Blackburn, P.; Evans, R. J.; Hugenholtz, J. Applications of the Bacteriocin, Nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1996**, 69 (2), 193–202.
- (152) Kruszewska, D. Mersacidin Eradicates Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in a Mouse Rhinitis Model. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54 (3), 648–653.
- (153) Steenbergen, J. N. Daptomycin: A Lipopeptide Antibiotic for the Treatment of Serious Gram-Positive Infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, 55 (3), 283–288.
- (154) Mengin-Lecreulx, D.; Allen, N. E.; Hobbs, J. N.; van Heijenoort, J. Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis in *Bacillus Megaterium* by Daptomycin. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, 57 (3), 245–248.
- (155) Muthaiyan, A.; Silverman, J. A.; Jayaswal, R. K.; Wilkinson, B. J. Transcriptional Profiling Reveals That Daptomycin Induces the *Staphylococcus Aureus* Cell Wall Stress Stimulon and Genes Responsive to Membrane Depolarization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52 (3), 980–990.
- (156) Humphries, R. M.; Pollett, S.; Sakoulas, G. A Current Perspective on Daptomycin for the Clinical Microbiologist. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, 26 (4), 759–780.
- (157) Rossolini, G. M.; Mantengoli, E.; Montagnani, F.; Pollini, S. Epidemiology and Clinical Relevance of Microbial Resistance Determinants versus Anti-Gram-Positive Agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, 13 (5), 582–588.
- (158) Bayer, A. S.; Schneider, T.; Sahl, H.-G. Mechanisms of Daptomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Role of the Cell Membrane and Cell Wall. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, 1277, 139–158.
- (159) Cycloserine. *Tuberculosis* **2008**, 88 (2), 100–101.
- (160) Halouska, S.; Chacon, O.; Fenton, R. J.; Zinniel, D. K.; Barletta, R. G.; Powers, R. Use of NMR Metabolomics to Analyze the Targets of D-Cycloserine in *Mycobacteria*: Role of D-Alanine Racemase. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (12), 4608–4614.
- (161) Prosser, G. A.; de Carvalho, L. P. S. Metabolomics Reveal D-Alanine:d-Alanine Ligase As the Target of D-Cycloserine in *Mycobacterium Tuberculosis*. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4 (12), 1233–1237.
- (162) Chudzik-Rzad, B.; Andrzejczuk, S.; Rzad, M.; Tomasiewicz, K.; Malm, A. Overview on Fosfomycin and Its Current and Future Clinical Significance. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **2015**, 28 (1), 33–36.
- (163) Bergogne-BéRézin, E. Fosfomycin and Derivatives. In *Antimicrobial Agents*; Bryskier, M.D., A., Ed.; American Society of Microbiology, 2005; pp 972–982.
- (164) Michalopoulos, A. S.; Livaditis, I. G.; Gougoutas, V. The Revival of Fosfomycin. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **2011**, 15 (11), e732–e739.

- (165) Raz, R. Fosfomycin: An Old—new Antibiotic. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18* (1), 4–7.
- (166) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. I. FR-900098, Isolation and Characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33* (1), 13–17.
- (167) Chofor, R.; Sooriyaarachchi, S.; Risseuw, M. D. P.; Bergfors, T.; Pouyez, J.; Johnny, C.; Haymond, A.; Everaert, A.; Dowd, C. S.; Maes, L.; Coenye, T.; Alex, A.; Couch, R. D.; Jones, T. A.; Wouters, J.; Mowbray, S. L.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Bioactivity of β -Substituted Fosmidomycin Analogues Targeting 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 2988–3001.
- (168) Armstrong, C. M.; Meyers, D. J.; Imlay, L. S.; Meyers, C. F.; Odom, A. R. Resistance to the Antimicrobial Agent Fosmidomycin and an FR900098 Prodrug through Mutations in the Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase Gene (dxr). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (9), 5511–5519.
- (169) Hassall, C. H. Alafosfalin (Ro 03-7008, Alaphosphin). In *Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors*; Hahn, F. E., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1983; pp 1–11.
- (170) Neuman, M. Recent Developments in the Field of Phosphonic Acid Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, *14* (4), 309–311.
- (171) Bovill, R.; Evans, P. G.; Howse, G. L.; Osborn, H. M. I. Synthesis and Biological Analysis of Novel Glycoside Derivatives of L-AEP, as Targeted Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3774–3779.
- (172) Castañeda-García, A.; Blázquez, J.; Rodríguez-Rojas, A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics* **2013**, *2* (2), 217–236.
- (173) Kadner, R. J.; Winkler, H. H. Isolation and Characterization of Mutations Affecting the Transport of Hexose Phosphates in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1973**, *113* (2), 895–900.
- (174) Kim, D. H.; Lees, W. J.; Kempell, K. E.; Lane, W. S.; Duncan, K.; Walsh, C. T. Characterization of a Cys115 to Asp Substitution in the Escherichia Coli Cell Wall Biosynthetic Enzyme UDP-GlcNAc Enolpyruvyl Transferase (MurA) That Confers Resistance to Inactivation by the Antibiotic Fosfomycin. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35* (15), 4923–4928.
- (175) Venkateswaran, P. S.; Wu, H. C. Isolation and Characterization of a Phosphonomycin-Resistant Mutant of Escherichia Coli K-12. *J. Bacteriol.* **1972**, *110* (3), 935–944.
- (176) Rigsby, R. E.; Fillgrove, K. L.; Beihoffer, L. A.; Armstrong, R. N. Fosfomycin Resistance Proteins: A Nexus of Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in a Metalloenzyme Superfamily. *Methods Enzymol.* **2005**, *401*, 367–379.
- (177) Hrast, M.; Sosič, I.; Šink, R.; Gobec, S. Inhibitors of the Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes MurA-F. *Bioorganic Chem.* **2014**, *55*, 2–15.
- (178) Olesen, S. H.; Ingles, D. J.; Yang, Y.; Schönbrunn, E. Differential Antibacterial Properties of the MurA Inhibitors Terreic Acid and Fosfomycin: Antibacterial Properties of Terreic Acid. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54* (4), 322–326.
- (179) Cox, R. J.; Sutherland, A.; Vederas, J. C. Bacterial Diaminopimelate Metabolism as a Target for Antibiotic Design. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (5), 843–871.

- (180) Hutton, C. A.; Perugini, M. A.; Gerrard, J. A. Inhibition of Lysine Biosynthesis: An Evolving Antibiotic Strategy. *Mol. Biosyst.* **2007**, 3 (7), 458–465.
- (181) Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochimie*; Lubochinsky, B., Translator; Paris, France, Belgique, 2000.
- (182) Wiseman, J. S.; Nichols, J. S. Purification and Properties of Diaminopimelic Acid Epimerase from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 (14), 8907–8914.
- (183) Antia, M.; Hoare, D. S.; Work, E. The Stereoisomers of α -Diaminopimelic Acid. 3. Properties and Distribution of Diaminopimelic Acid Racemase, an Enzyme Causing Interconversion of the LL and *meso* Isomers. *Biochem. J.* **1957**, 65 (3), 448–459.
- (184) Lloyd, A. J.; Huyton, T.; Turkenburg, J.; Roper, D. I. Refinement of *Haemophilus Influenzae* Diaminopimelic Acid Epimerase (DapF) at 1.75 Å Resolution Suggests a Mechanism for Stereocontrol during Catalysis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, 60 (Pt 2), 397–400.
- (185) Brunetti, L.; Galeazzi, R.; Orena, M.; Bottoni, A. Catalytic Mechanism of L,L-Diaminopimelic Acid with Diaminopimelate Epimerase by Molecular Docking Simulations. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, 26 (7), 1082–1090.
- (186) Koo, C. W.; Blanchard, J. S. Chemical Mechanism of *Haemophilus Influenzae* Diaminopimelate Epimerase. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38 (14), 4416–4422.
- (187) Pillai, B.; Cherney, M. M.; Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C.; James, M. N. G. Structural Insights into Stereochemical Inversion by Diaminopimelate Epimerase: An Antibacterial Drug Target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (23), 8668–8673.
- (188) Cox, R. J. The DAP Pathway to Lysine as a Target for Antimicrobial Agents. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 13 (1), 29–43.
- (189) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A. Antibiotics in the Clinical Pipeline at the End of 2015. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2016**.
- (190) Girodeau, J. M.; Agouridas, C.; Masson, M.; Pineau, R.; Le Goffic, F. The Lysine Pathway as a Target for a New Genera of Synthetic Antibacterial Antibiotics? *J. Med. Chem.* **1986**, 29 (6), 1023–1030.
- (191) Lam, L. K.; Arnold, L. D.; Kalantar, T. H.; Kelland, J. G.; Lane-Bell, P. M.; Palcic, M. M.; Pickard, M. A.; Vederas, J. C. Analogs of Diaminopimelic Acid as Inhibitors of *Meso*-Diaminopimelate Dehydrogenase and LL-Diaminopimelate Epimerase. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (24), 11814–11819.
- (192) Baumann, R. J.; Bohme, E. H.; Wiseman, J. S.; Vaal, M.; Nichols, J. S. Inhibition of *Escherichia Coli* Growth and Diaminopimelic Acid Epimerase by 3-Chlorodiaminopimelic Acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32 (8), 1119–1123.
- (193) Gerhart, F.; Higgins, W.; Tardif, C.; Ducep, J. B. 2-(4-Amino-4-Carboxybutyl)aziridine-2-Carboxylic Acid. A Potent Irreversible Inhibitor of Diaminopimelic Acid Epimerase. Spontaneous Formation from α -(halomethyl)diaminopimelic Acids. *J. Med. Chem.* **1990**, 33 (8), 2157–2162.
- (194) Higgins, W.; Tardif, C.; Richaud, C.; Krivanek, M. A.; Cardin, A. Expression of Recombinant Diaminopimelate Epimerase in *Escherichia Coli*. Isolation and Inhibition with an Irreversible Inhibitor. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1989**, 186 (1-2), 137–143.
- (195) Gelb, M. H.; Lin, Y.; Pickard, M. A.; Song, Y.; Vederas, J. C. Synthesis of 3-Fluorodiaminopimelic Acid Isomers as Inhibitors of Diaminopimelate Epimerase:

- Stereocontrolled Enzymatic Elimination of Hydrogen Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (12), 4932–4942.
- (196) Friedman, H. L. Relationship Between Chemical Structure and Biological Activity in Mercurial Compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1957**, *65* (5), 461–470.
- (197) Burger, A. Isosterism and Bioisosterism in Drug Design. *Progress in Drug Research* **1991**, *37*, 287–371.
- (198) Song, Y.; Niederer, D.; Lane-Bell, P. M.; Lam, L. K. P.; Crawley, S.; Palcic, M. M.; Pickard, M. A.; Pruess, D. L.; Vederas, J. C. Stereospecific Synthesis of Phosphonate Analogs of Diaminopimelic Acid (DAP), Their Interaction with DAP Enzymes, and Antibacterial Activity of Peptide Derivatives. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (19), 5784–5793.
- (199) Ballatore, C.; Huryn, D. M.; Smith, A. B. Carboxylic Acid (bio)isosteres in Drug Design. *ChemMedChem* **2013**, *8* (3), 385–395.
- (200) Abbott, S. D.; Lane-Bell, P.; Sidhu, K. P. S.; Vederas, J. C. Synthesis and Testing of Heterocyclic Analogs of Diaminopimelic Acid (DAP) as Inhibitors of DAP Dehydrogenase and DAP Epimerase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (15), 6513–6520.
- (201) Williams, R. M.; Fegley, G. J.; Gallegos, R.; Schaefer, F.; Pruess, D. L. Asymmetric Syntheses of (2S,3S,6S)-, (2S,3S,6R)-, and (2R,3R,6S)-2,3-Methano-2,6-Diaminopimelic Acids. Studies Directed to the Design of Novel Substrate-Based Inhibitors of L,L-Diaminopimelate Epimerase. *Tetrahedron* **1996**, *52* (4), 1149–1164.
- (202) Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Pillai, B.; James, M. N. G.; Semchuk, P.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C. The Stereoselective Synthesis of Aziridine Analogues of Diaminopimelic Acid (DAP) and Their Interaction with Dap Epimerase. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (24), 4402–4411.
- (203) Caplan, J. F.; Zheng, R.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C. Vinylogous Amide Analogues of Diaminopimelic Acid (DAP) as Inhibitors of Enzymes Involved in Bacterial Lysine Biosynthesis. *Org. Lett.* **2000**, *2* (24), 3857–3860.
- (204) Cox, R. J.; Durston, J.; Roper, D. I. Synthesis and in Vitro Enzyme Activity of an Oxa Analogue of Azi-DAP. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2002**, No. 8, 1029–1035.
- (205) Kouidmi, I.; Levesque, R. C.; Paradis-Bleau, C. The Biology of Mur Ligases as an Antibacterial Target. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94* (2), 242–253.
- (206) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.
- (207) Barreteau, H.; Kovac, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 168–207.
- (208) Anderson, M. S.; Eveland, S. S.; Onishi, H. R.; Pompliano, D. L. Kinetic Mechanism of the Escherichia Coli UDPMurNAc-Tripeptide D-Alanyl-D-Alanine-Adding Enzyme: Use of a Glutathione S-Transferase Fusion. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35* (50), 16264–16269.
- (209) Emanuele, J. J.; Jin, H.; Yanchunas, J.; Villafranca, J. J. Evaluation of the Kinetic Mechanism of Escherichia Coli Uridine Diphosphate-N-Acetylmuramate:l-Alanine Ligase. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (23), 7264–7271.
- (210) Bouhss, A.; Dementin, S.; van Heijenoort, J.; Parquet, C.; Blanot, D. MurC and MurD Synthetases of Peptidoglycan Biosynthesis: Borohydride Trapping of Acyl-Phosphate Intermediates. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2002; Vol. 354, pp 189–196.

- (211) Bertrand, J. A.; Auger, G.; Martin, L.; Fanchon, E.; Blanot, D.; Le Beller, D.; van Heijenoort, J.; Dideberg, O. Determination of the MurD Mechanism through Crystallographic Analysis of Enzyme complexes. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289* (3), 579–590.
- (212) Perdih, A.; Kotnik, M.; Hodoscek, M.; Solmajer, T. Targeted Molecular Dynamics Simulation Studies of Binding and Conformational Changes in E. Coli MurD. *Proteins* **2007**, *68* (1), 243–254.
- (213) Bouhss, A.; Mengin-Lecreulx, D.; Blanot, D.; van Heijenoort, J.; Parquet, C. Invariant Amino Acids in the Mur Peptide Synthetases of Bacterial Peptidoglycan Synthesis and Their Modification by Site-Directed Mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-Alanine Ligase from *Escherichia Coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (39), 11556–11563.
- (214) Šink, R.; Kotnik, M.; Zega, A.; Barreateau, H.; Gobec, S.; Blanot, D.; Dessen, A.; Contreras-Martel, C. Crystallographic Study of Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurD: Domain Movement Revisited. *PLOS ONE* **2016**, *11* (3), e0152075.
- (215) Smith, C. A. Structure, Function and Dynamics in the Mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J. Mol. Biol.* **2006**, *362* (4), 640–655.
- (216) Gordon, E.; Flouret, B.; Chantalat, L.; van Heijenoort, J.; Mengin-Lecreulx, D.; Dideberg, O. Crystal Structure of UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamate: Meso-Diaminopimelate Ligase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (14), 10999–11006.
- (217) van Assche, I.; Soroka, M.; Haemers, A.; Hooper, M.; Blanot, D.; van Heijenoort, J. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Phosphonic Acid Analogues of Diaminopimelic Acid. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26* (5), 505–515.
- (218) Auger, G.; van Heijenoort, J.; Vederas, J. C.; Blanot, D. Effect of Analogues of Diaminopimelic Acid on the Meso-Diaminopimelate-Adding Enzyme from *Escherichia Coli*. *FEBS Lett.* **1996**, *391* (1-2), 171–174.
- (219) Le Roux, P.; Auger, G.; van Heijenoort, J.; Blanot, D. Synthesis of New Peptide Inhibitors of the Meso-Diaminopimelate-Adding Enzyme. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27* (9), 899–907.
- (220) Zeng, B.; Wong, K. K.; Pompliano, D. L.; Reddy, S.; Tanner, M. E. A Phosphinate Inhibitor of the Meso-Diaminopimelic Acid-Adding Enzyme (MurE) of Peptidoglycan Biosynthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (26), 10081–10085.
- (221) Zivec, M.; Turk, S.; Blanot, D.; Gobec, S. Design and Synthesis of New Peptidomimetics as Potential Inhibitors of MurE. *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58* (1), 95–109.
- (222) Humljan, J.; Kotnik, M.; Boniface, A.; Šolmajer, T.; Urleb, U.; Blanot, D.; Gobec, S. A New Approach towards Peptidosulfonamides: Synthesis of Potential Inhibitors of Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes MurD and MurE. *Tetrahedron* **2006**, *62* (47), 10980–10988.
- (223) Sova, M.; Kovac, A.; Turk, S.; Hrast, M.; Blanot, D.; Gobec, S. Phosphorylated Hydroxyethylamines as Novel Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzymes MurC to MurF. *Bioorganic Chem.* **2009**, *37* (6), 217–222.
- (224) Strancar, K.; Boniface, A.; Blanot, D.; Gobec, S. Phosphinate Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamate: L-Lysine Ligase (MurE). *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2007**, *340* (3), 127–134.

- (225) Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I. Bacterial Cell Wall Assembly: Still an Attractive Antibacterial Target. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29 (4), 167–173.
- (226) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, 66 (1), 334–395.
- (227) Villoutreix, B. O.; Eudes, R.; Miteva, M. A. Structure-Based Virtual Ligand Screening: Recent Success Stories. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2009**, 12 (10), 1000–1016.
- (228) Mansour, T. S.; Caufield, C. E.; Rasmussen, B.; Chopra, R.; Krishnamurthy, G.; Morris, K. M.; Svenson, K.; Bard, J.; Smeltzer, C.; Naughton, S.; Antane, S.; Yang, Y.; Severin, A.; Quagliato, D.; Petersen, P. J.; Singh, G. Naphthyl Tetronic Acids as Multi-Target Inhibitors of Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *ChemMedChem* **2007**, 2 (10), 1414–1417.
- (229) Tomasić, T.; Zidar, N.; Rupnik, V.; Kovac, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Masic, L. P. Synthesis and Biological Evaluation of New Glutamic Acid-Based Inhibitors of MurD Ligase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (1), 153–157.
- (230) Tomašić, T.; Šink, R.; Zidar, N.; Fic, A.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Müller-Premru, M.; Gobec, S.; Zega, A.; Kikelj, D.; Mašič, L. P. Dual Inhibitor of MurD and MurE Ligases from Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3 (8), 626–630.
- (231) Perdih, A.; Kovac, A.; Wolber, G.; Blanot, D.; Gobec, S.; Solmajer, T. Discovery of Novel Benzene 1,3-Dicarboxylic Acid Inhibitors of Bacterial MurD and MurE Ligases by Structure-Based Virtual Screening Approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (10), 2668–2673.
- (232) Perdih, A.; Hrast, M.; Barreateau, H.; Gobec, S.; Wolber, G.; Solmajer, T. Benzene-1,3-Dicarboxylic Acid 2,5-Dimethylpyrrole Derivatives as Multiple Inhibitors of Bacterial Mur Ligases (MurC-MurF). *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (15), 4124–4134.
- (233) Perdih, A.; Hrast, M.; Pureber, K.; Barreateau, H.; Grdadolnik, S. G.; Kocjan, D.; Gobec, S.; Solmajer, T.; Wolber, G. Furan-Based Benzene Mono- and Dicarboxylic Acid Derivatives as Multiple Inhibitors of the Bacterial Mur Ligases (MurC-MurF): Experimental and Computational Characterization. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2015**, 29 (6), 541–560.
- (234) Tomasić, T.; Zidar, N.; Kovac, A.; Turk, S.; Simcic, M.; Blanot, D.; Müller-Premru, M.; Filipic, M.; Grdadolnik, S. G.; Zega, A.; Anderluh, M.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Masic, L. 5-Benzylidenethiazolidin-4-Ones as Multitarget Inhibitors of Bacterial Mur Ligases. *ChemMedChem* **2010**, 5 (2), 286–295.
- (235) Thornsberry, C. The In Vitro Antibacterial Activity of Quinolones: A Review. *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer Berlin Heidelberg, 1998; pp 167–178.
- (236) Adams, M.; Wube, A. A.; Bucar, F.; Bauer, R.; Kunert, O.; Haslinger, E. Quinolone Alkaloids from Evodia Rutaecarpa: A Potent New Group of Antimycobacterial Compounds. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, 26 (3), 262–264.
- (237) Guzman, J. D.; Wube, A.; Evangelopoulos, D.; Gupta, A.; Hüfner, A.; Basavannacharya, C.; Rahman, M. M.; Thomaschitz, C.; Bauer, R.; McHugh, T. D.; Nobeli, I.; Prieto, J. M.; Gibbons, S.; Bucar, F.; Bhakta, S. Interaction of N-Methyl-2-Alkenyl-4-Quinolones with ATP-Dependent MurE Ligase of Mycobacterium

- Tuberculosis: Antibacterial Activity, Molecular Docking and Inhibition Kinetics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, 66 (8), 1766–1772.
- (238) Wube, A.; Guzman, J.-D.; Hüfner, A.; Hochfellner, C.; Blunder, M.; Bauer, R.; Gibbons, S.; Bhakta, S.; Bucar, F. Synthesis and Antibacterial Evaluation of a New Series of N-Alkyl-2-alkynyl/(E)-Alkenyl-4-(1H)-Quinolones. *Mol. Basel Switz.* **2012**, 17 (7), 8217–8240.
- (239) Guzman, J. D.; Pesnot, T.; Barrera, D. A.; Davies, H. M.; McMahon, E.; Evangelopoulos, D.; Mortazavi, P. N.; Munshi, T.; Maitra, A.; Lamming, E. D.; Angell, R.; Gershater, M. C.; Redmond, J. M.; Needham, D.; Ward, J. M.; Cuca, L. E.; Hailes, H. C.; Bhakta, S. Tetrahydroisoquinolines Affect the Whole-Cell Phenotype of Mycobacterium Tuberculosis by Inhibiting the ATP-Dependent MurE Ligase. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, 70 (6), 1691–1703.
- (240) Hanessian, S. *Natural Products in Medicinal Chemistry*. Methods and Principles in Medicinal Chemistry; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014.
- (241) Guzman, J. D.; Gupta, A.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Pabon, L. C.; Plazas, E. A.; Muñoz, D. R.; Delgado, W. A.; Cuca, L. E.; Ribon, W.; Gibbons, S.; Bhakta, S. Anti-Tubercular Screening of Natural Products from Colombian Plants: 3-Methoxynordomesticine, an Inhibitor of MurE Ligase of Mycobacterium Tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, 65 (10), 2101–2107.
- (242) Osman, K.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Gupta, A.; McHugh, T. D.; Bhakta, S.; Gibbons, S. An Antibacterial from Hypericum Acrosepalum Inhibits ATP-Dependent MurE Ligase from Mycobacterium Tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, 39 (2), 124–129.
- (243) Shiu, W. K. P.; Malkinson, J. P.; Rahman, M. M.; Curry, J.; Stapleton, P.; Gunaratnam, M.; Neidle, S.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Livermore, D. M.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Bhakta, S.; Schindler, B. D.; Seo, S. M.; Coleman, D.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. A New Plant-Derived Antibacterial Is an Inhibitor of Efflux Pumps in Staphylococcus Aureus. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**, 42 (6), 513–518.
- (244) Fukuda, K. OMS - Le monde risque de sombrer dans une ère post-antibiotiques: le moment est venu de prendre des mesures énergiques. <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/antibiotic-resistance/fr/> (Consulté le 06/07/2016).
- (245) Chopra, I.; Schofield, C.; Everett, M.; O'Neill, A.; Miller, K.; Wilcox, M.; Frère, J.-M.; Dawson, M.; Czaplewski, L.; Urleb, U.; Courvalin, P. Treatment of Health-Care-Associated Infections Caused by Gram-Negative Bacteria: A Consensus Statement. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, 8 (2), 133–139.
- (246) El Zoeiby, A.; Sanschagrín, F.; Levesque, R. C. Structure and Function of the Mur Enzymes: Development of Novel Inhibitors. *Mol. Microbiol.* **2003**, 47 (1), 1–12.
- (247) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2 (11), 633–645.
- (248) Carey, F. A.; Sundberg, R. J. Cycloadditions, Unimolecular Rearrangements, and Thermal Eliminations. In *Part B: Reactions and Synthesis*; Advanced Organic Chemistry; Springer Berlin Heidelberg, 2001; pp 331–431.
- (249) Michael, A. Ueber Die Einwirkung von Diazobenzolimid Auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Für Prakt. Chem.* **1893**, 48 (1), 94–95.

- (250) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2 (10), 565–598.
- (251) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.
- (252) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (9), 3057–3064.
- (253) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A Convenient Synthesis of Acetylenes: Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes and Bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16 (50), 4467–4470.
- (254) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (1), 210–216.
- (255) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. Isolation of a Copper(I) Triazolide: A “Click” Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (12), 2101–2103.
- (256) Totobenazara, J.; Burke, A. J. New Click-Chemistry Methods for 1,2,3-Triazoles Synthesis: Recent Advances and Applications. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (22), 2853–2859.
- (257) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (46), 15998–15999.
- (258) Naota, T.; Takaya, H.; Murahashi, S.-I. Ruthenium-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (7), 2599–2660.
- (259) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (28), 8923–8930.
- (260) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (11), 2004–2021.
- (261) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, 25 (10), 2216–2230.
- (262) Ferreira, V. F.; da Rocha, D. R.; da Silva, F. C.; Ferreira, P. G.; Boechat, N. A.; Magalhães, J. L. Novel 1H-1,2,3-, 2H-1,2,3-, 1H-1,2,4- and 4H-1,2,4-Triazole Derivatives: A Patent Review (2008 - 2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, 23 (3), 319–331.
- (263) Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. – Asian J.* **2011**, 6 (10), 2696–2718.
- (264) Fichtali, I.; Chraïbi, M.; El Aroussi, F.; Ben-Tama, A.; El Hadrami, E. M.; Bendrahim, K. F.; Stiriba, S.-E. Synthesis of Some 1,2,3-Triazoles Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial Activity. *Pharma Chem.* **2016**, 8 (5), 236–242.
- (265) Bryson, H. M.; Brogden, R. N. Piperacillin/tazobactam. A Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential. *Drugs* **1994**, 47 (3), 506–535.
- (266) Yang, Y.; Rasmussen, B. A.; Shlaes, D. M. Class A Beta-Lactamases--Enzyme-Inhibitor Interactions and Resistance. *Pharmacol. Ther.* **1999**, 83 (2), 141–151.

- (267) Weinstein, A. J. The Cephalosporins: Activity and Clinical Use. *Drugs* **1980**, *20* (2), 137–154.
- (268) Ju, R.; Guo, L.; Li, J.; Zhu, L.; Yu, X.; Chen, C.; Chen, W.; Ye, C.; Zhang, D. Carboxyamidotriazole Inhibits Oxidative Phosphorylation in Cancer Cells and Exerts Synergistic Anti-Cancer Effect with Glycolysis Inhibition. *Cancer Lett.* **2016**, *370* (2), 232–241.
- (269) Hou, J.; Liu, X.; Shen, J.; Zhao, G.; Wang, P. G. The Impact of Click Chemistry in Medicinal Chemistry. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7* (6), 489–501.
- (270) Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Del Grosso, E.; Grosa, G.; Sorba, G.; Tron, G. C. Are 1,4- and 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles Good Pharmacophoric Groups? *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2497–2508.
- (271) Costa, M. S.; Boechat, N.; Rangel, É. A.; da Silva, F. de C.; de Souza, A. M. T.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Junior, I. N.; Lourenço, M. C. S.; Wardell, S. M. S. V.; Ferreira, V. F. Synthesis, Tuberculosis Inhibitory Activity, and SAR Study of N-Substituted-Phenyl-1,2,3-Triazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8644–8653.
- (272) Silva, F. de C. da; Cardoso, M. F. do C.; Ferreira, P. G.; Ferreira, V. F. Biological Properties of 1H-1,2,3- and 2H-1,2,3-Triazoles. In *Chemistry of 1,2,3-triazoles*; Dehaen, W., Bakulev, V. A., Eds.; Topics in Heterocyclic Chemistry; Springer International Publishing, 2014; pp 117–165.
- (273) Dalvie, D. K.; Kalgutkar, A. S.; Khojasteh-Bakht, S. C.; Obach, R. S.; O'Donnell, J. P. Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (3), 269–299.
- (274) Ferrières, J. The French Paradox: Lessons for Other Countries. *Heart* **2004**, *90* (1), 107–111.
- (275) Pagliai, F.; Pirali, T.; Del Grosso, E.; Di Brisco, R.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 467–470.
- (276) Hatanaka, S.-I. Amino Acids from Mushrooms. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **1992**; pp 1–140.
- (277) Dittmer, K.; Goering, H. L.; Goodman, I.; Cristol, S. J. The Inhibition of Microbiological Growth by Allylglycine, Methallylglycine and Crotylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70* (7), 2499–2501.
- (278) Fowden, L.; Smith, A. Newly Characterized Amino Acids from *Aesculus Californica*. *Phytochemistry* **1968**, *7* (5), 809–819.
- (279) Millington, D. S.; Sheppard, R. C. Addendum. Spectroscopic Characterization of Two New Amino Acids from *Aesculus Californica*. *Phytochemistry* **1968**, *7* (6), 1027–1029.
- (280) Edelson, J.; Skinner, C. G.; Ravel, J. M.; Shive, W. Structural Specificity of Some Amino Acid Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (19), 5150–5153.
- (281) Garner, P.; Park, J. M. 1,1-Dimethylethyl (S)- or (R)-4-Formyl-2,2-Dimethyl-3-Oxazolidinecarboxylate: A Useful Serinal Derivative. *Org. Synth.* **1992**, *70*, 18.
- (282) Habrant, D.; Rauhala, V.; Koskinen, A. M. P. Conversion of Carbonyl Compounds to Alkynes: General Overview and Recent Developments. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2007–2017.
- (283) Benfodda, Z.; Bénimélis, D.; Reginato, G.; Meffre, P. Ethynylglycine Synthons, a Useful Precursor for the Synthesis of Biologically Active Compounds: An Update:

- Part I: Preparations of Ethynylglycine Synthons. *Amino Acids* **2015**, 47 (2), 271–279.
- (284) Baum, J. S.; Shook, D. A.; Davies, H. M. L.; Smith, H. D. Diazotransfer Reactions with P-Acetamidobenzenesulfonyl Azide. *Synth. Commun.* **1987**, 17 (14), 1709–1716.
- (285) Davies, H. M. L.; Cantrell, W. R. J.; Romines, K. R.; Baum, J. S. Synthesis of Furans via Rhodium(II) Acetate-Catalyzed Reaction of Acetylenes with α -Diazocarbonyls: Ethyl 2-Methyl-5-Phenyl-3-Furancarboxylate. *Org. Synth.* **1992**, 70, 93.
- (286) Ohira, S. Methanolysis of Dimethyl (1-Diazo-2-Oxopropyl) Phosphonate: Generation of Dimethyl (Diazomethyl) Phosphonate and Reaction with Carbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **1989**, 19 (3-4), 561–564.
- (287) Crisp, G. T.; Jiang, Y.-L.; Pullman, P. J.; De Savi, C. Elaboration of the Side-Chain of Amino Acid Derivatives by Palladium Catalysed Couplings. *Tetrahedron* **1997**, 53 (51), 17489–17500.
- (288) Gilbert, J. C.; Weerasooriya, U. Diazoethenes: Their Attempted Synthesis from Aldehydes and Aromatic Ketones by Way of the Horner-Emmons Modification of the Wittig Reaction. A Facile Synthesis of Alkynes. *J. Org. Chem.* **1982**, 47 (10), 1837–1845.
- (289) Shetty, D.; Jeong, J. M.; Ju, C. H.; Kim, Y. J.; Lee, J.-Y.; Lee, Y.-S.; Lee, D. S.; Chung, J.-K.; Lee, M. C. Synthesis and Evaluation of Macrocyclic Amino Acid Derivatives for Tumor Imaging by Gallium-68 Positron Emission Tomography. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (21), 7338–7347.
- (290) Jackson, R. F. W.; Perez-Gonzalez, M. Synthesis of N-(tert-Butoxycarbonyl)- β -Iodoalanine Methyl Ester: A Useful Building Block in the Synthesis of Nonnatural α -Amino Acids via Palladium Catalyzed Cross Coupling Reactions. *Org. Synth.* **2005**, 81, 77.
- (291) Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (45), 18809–18815.
- (292) Stanley, N. J.; Pedersen, D. S.; Nielsen, B.; Kvist, T.; Mathiesen, J. M.; Bräuner-Osborne, H.; Taylor, D. K.; Abell, A. D. 1,2,3-Triazolyl Amino Acids as AMPA Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (24), 7512–7515.
- (293) Johansson, H.; Pedersen, D. S. Azide- and Alkyne-Derivatised α -Amino Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (23), 4267–4281.
- (294) Denton, T. T.; Zhang, X.; Cashman, J. R. 5-Substituted, 6-Substituted, and Unsubstituted 3-Heteroaromatic Pyridine Analogues of Nicotine as Selective Inhibitors of Cytochrome P-450 2A6. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (1), 224–239.
- (295) Ranyuk, E.; Lebel, R.; Bérubé-Lauzière, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; van Lier, J. E.; Guérin, B. ^{68}Ga /DOTA- and ^{64}Cu /NOTA-Phthalocyanine Conjugates as Fluorescent/PET Bimodal Imaging Probes. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24 (9), 1624–1633.
- (296) Gajewski, M.; Seaver, B.; Esslinger, C. S. Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Triazole Amino Acids Used to Probe Binding Interactions between Ligand and Neutral Amino Acid Transport Protein SN1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (15), 4163–4166.
- (297) Goswami, K.; Duttagupta, I.; Sinha, S. Synthesis of Optically Active 2- and 3-Indolylglycine Derivatives and Their Oxygen Analogues. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (16), 7081–7085.

- (298) Clerc, J.; Schellenberg, B.; Groll, M.; Bachmann, A. S.; Huber, R.; Dudler, R.; Kaiser, M. Convergent Synthesis and Biological Evaluation of Syringolin A and Derivatives as Eukaryotic 20S Proteasome Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010 (21), 3991–4003.
- (299) Owens, L. D.; Guggenheim, S.; Hilton, J. L. Rhizobium-Synthesized Phytotoxin: An Inhibitor of β -Cystathionase in Salmonella Typhimurium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1968**, 158 (2), 219–225.
- (300) Boibessot, T.; Bénimèlis, D.; Jean, M.; Benfodda, Z.; Meffre, P. Synthesis of a Novel Rhizobitoxine-Like Triazole-Containing Amino Acid. *Synlett* **2016**.
- (301) Clausen, T.; Huber, R.; Messerschmidt, A.; Pohlenz, H. D.; Laber, B. Slow-Binding Inhibition of Escherichia Coli Cystathionine Beta-Lyase by L-Aminoethoxyvinylglycine: A Kinetic and X-Ray Study. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, 36 (41), 12633–12643.
- (302) Willke, T. Methionine Production--a Critical Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98 (24), 9893–9914.
- (303) Ejim, L. J.; D'Costa, V. M.; Elowe, N. H.; Loredó-Osti, J. C.; Malo, D.; Wright, G. D. Cystathionine Beta-Lyase Is Important for Virulence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **2004**, 72 (6), 3310–3314.
- (304) Meffre, P.; Gauzy, L.; Branquet, E.; Durand, P.; Le Goffic, F. Synthesis of Optically Active β,γ -Alkynylglycine Derivatives. *Tetrahedron* **1996**, 52 (34), 11215–11238.
- (305) Marshall, A. J.; Lin, J.-M.; Grey, A.; Reid, I. R.; Cornish, J.; Denny, W. A. Long-Chain Triazolyl Acids as Inhibitors of Osteoclastogenesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (14), 4112–4119.
- (306) Zhao, M.; Li, J.; Mano, E.; Song, Z.; Tschaen, D. M.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J. Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite Catalyzed by TEMPO and Bleach. *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (7), 2564–2566.
- (307) Zhao, M. M.; Li, J.; Mano, E.; Song, Z. J.; Tschaen, D. M. Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite Catalyzed by TEMPO and Bleach: 4-Methoxyphenylacetic Acid. *Org. Synth.* **2005**, 81, 195.
- (308) Ermert, P.; Meyer, J.; Stucki, C.; Schneebeli, J.; Obrecht, J.-P. A Stereoselective Synthesis of N-Boc- α -Amino Alcohols and α -Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (11), 1265–1268.
- (309) Reginato, G.; Meffre, P.; Gaggini, F. Ethynylglycine Synthons from Garner's Aldehyde: A Useful Precursor for the Synthesis of Non-Natural Amino Acids. *Amino Acids* **2005**, 29 (2), 81–87.
- (310) Kavitha, M.; Mahipal, B.; Mainkar, P. S.; Chandrasekhar, S. Click Reaction on in Situ Generated β -Azidostyrenes from Cinnamic Acid Using CAN–NaN₃: Synthesis of N-Styryl Triazoles. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (14), 1658–1662.
- (311) Callahan, J. F.; Khatana, S. S.; Bhatnagar, P. K. Stereoselective Synthesis of Diaminosuberic Acid Via a Chiral Alkynyl Oxazolidine. *Synth. Commun.* **2000**, 30 (7), 1213–1219.
- (312) Karjalainen, O. K.; Koskinen, A. M. P. Diastereoselective Synthesis of Vicinal Amino Alcohols. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10 (22), 4311–4326.
- (313) Ghosal, P.; Shaw, A. K. An Efficient Total Synthesis of the Anticancer Agent (+)-Spisulosine (ES-285) from Garner's Aldehyde. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (31), 4140–4142.

- (314) Baird, R. D.; Kitzen, J.; Clarke, P. A.; Planting, A.; Reade, S.; Reid, A.; Welsh, L.; López Lázaro, L.; de las Heras, B.; Judson, I. R.; Kaye, S. B.; Eskens, F.; Workman, P.; deBono, J. S.; Verweij, J. Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacogenomic Trial of ES-285, a Novel Marine Cytotoxic Agent, Administered to Adult Patients with Advanced Solid Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8* (6), 1430–1437.
- (315) Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14* (12), 801–811.
- (316) Niecke, E.; Filippou, A. C. Rolf Appel (1921–2012). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (37), 9216–9216.
- (317) Barfoot, C. W.; Harvey, J. E.; Kenworthy, M. N.; Kilburn, J. P.; Ahmed, M.; Taylor, R. J. K. Highly Functionalised Organolithium and Organoboron Reagents for the Preparation of Enantiomerically Pure α -Amino Acids. *Tetrahedron* **2005**, *61* (13), 3403–3417.
- (318) Oh, J. E.; Lee, K. H. Synthesis of Novel Unnatural Amino Acid as a Building Block and Its Incorporation into an Antimicrobial Peptide. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (12), 2985–2990.
- (319) Garegg, P. J. Some Aspects of Regio-, Stereo-, and Chemoselective Reactions in Carbohydrate Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56* (7).
- (320) Garegg, P. J.; Samuelsson, B. Novel Reagent System for Converting a Hydroxy-Group into an Iodo-Group in Carbohydrates with Inversion of Configuration. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, No. 22, 978–980.
- (321) Garegg, P. J.; Samuelsson, B. Novel Reagent System for Converting a Hydroxy-Group into an Iodo-Group in Carbohydrates with Inversion of Configuration. Part 2. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1980**, No. 0, 2866–2869.
- (322) Garegg, P. J.; Johansson, R.; Ortega, C.; Samuelsson, B. Novel Reagent System for Converting a Hydroxy-Group into an Iodogroup in Carbohydrates with Inversion of Configuration. Part 3. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1982**, No. 0, 681–683.
- (323) Murakami, Y.; Yanuma, H.; Usuki, T. Total Synthesis of the Elastin Crosslinker (+)-Desmopyridine. *Tetrahedron Asymmetry* **2012**, *23* (22–23), 1557–1563.
- (324) Reginato, G.; Mordini, A.; Degl’Innocenti, A.; Caracciolo, M. Stereoselective Synthesis of (R)-(-)-2,2-Dimethyl-3-T-Butoxycarbonyl-4-Ethynyl-Oxazolidine: A Chiral Building Block for the Synthesis of a New Class of Substituted Alkynes. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (45), 8275–8278.
- (325) Dondoni, A.; Perrone, D. SYNTHESIS OF 1,1-DIMETHYLETHYL (S)-4-FORMYL-2,2-DIMETHYL-3-OXAZOLIDINECARBOXYLATE BY OXIDATION OF THE ALCOHOL. *Org. Synth.* **2000**, *77*, 64.
- (326) Molander, G. A.; Cadoret, F. Synthesis of the Stereogenic Triad of the Halicyclamine A Core. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (17), 2199–2202.
- (327) Meffre, P.; Gauzy, L.; Branquet, E.; Durand, P.; Le Goffic, F. Synthesis of Optically Active β,γ -Alkynylglycine Derivatives. *Tetrahedron* **1996**, *52* (34), 11215–11238.
- (328) Porte, A. M.; van der Donk, W. A.; Burgess, K. New and Efficient Synthesis of an Amino Acid for Preparing Phosphine-Functionalized Peptidomimetics. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (15), 5262–5264.
- (329) Dondoni, A.; Giovannini, P. P.; Massi, A. Assembling Heterocycle-Tethered C -Glycosyl and α -Amino Acid Residues via 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2929–2932.

- (330) Tao, F.; Luo, Y.; Huang, Q.; Liu, Y.; Li, B.; Zhang, G. Facile Syntheses of L. *Amino Acids* **2008**, *37* (4), 603–607.

Publications