



HAL
open science

Synthèse de bisubstrats et biligands pour la conception d'inhibiteurs inédits de la désoxyxylulose phosphate réducto-isomérase (DXR) : nouveaux antimicrobiens

Aurore Dreneau

► To cite this version:

Aurore Dreneau. Synthèse de bisubstrats et biligands pour la conception d'inhibiteurs inédits de la désoxyxylulose phosphate réducto-isomérase (DXR) : nouveaux antimicrobiens. Autre. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAF037 . tel-02945693

HAL Id: tel-02945693

<https://theses.hal.science/tel-02945693v1>

Submitted on 22 Sep 2020

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

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



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

EDSC
École Doctorale des
Sciences Chimiques

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie de Strasbourg – UMR 7177

THÈSE

présentée par :

Aurore DRENEAU

soutenue le : **7 Septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Synthèse de bisubstrats et biligands
pour la conception d'inhibiteurs inédits
de la désoxyxylulose phosphate
réducto-isomérase (DXR) : nouveaux
antimicrobiens**

THÈSE dirigée par :

Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine
Mr. ROHMER Michel

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur Emérite, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr. NAY Bastien

Directeur de recherche, Ecole Polytechnique,
Palaiseau

Mr. VIRIEUX David

Professeur, Ecole Normale Supérieure de Chimie
Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. HIBERT Marcel

Professeur de classe exceptionnelle, Université de
Strasbourg

Remerciements

Je remercie Monsieur Marcel Hibert, Monsieur Bastien Nay et Monsieur David Virieux d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je remercie également Monsieur Andrew Abell pour sa participation en tant que membre invité.

Je remercie Catherine Grosdemange-Billiard pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son labo. Merci, pour ces quatre années passées en votre compagnie, les toutouyoutours, l'approvisionnement en Dinosaurius et pour tout le reste.

Je remercie Michel Rohmer, pour le partage de votre immense culture. C'est toujours une joie de venir discuter avec vous et d'en apprendre à chaque instant. Merci également pour ces moments chaleureux passés autour d'un apéro.

Je remercie Denis Tritsch, maintenant retraité mais qui est l'homme sage du labo. Toujours prêt à nous donner de la motivation et à rire des petites blagues « cochonnes » de Mathilde. Merci également pour tous les tests bio, car sans toi, mon travail n'aurait pas eu de sens.

Je remercie Mathilde et Fanny, qui furent mes deux premières binômes de thèse. Merci Mathilde pour tes expressions qui viennent d'un autre monde, ta dramaturgie débordante, ton soutien et pour nos longues soirées à refaire le monde. Merci Fanny d'être toujours là, tu es toujours d'un grand soutien et surtout toujours positive, et merci pour tes expressions faciales qui resteront à jamais dans ma mémoire. Nos apéros improvisés avec vous le soir tard après une bonne journée de travail me manquent énormément. Merci pour tous les moments de joie passés en votre compagnie.

Je remercie Justine, ma nouvelle binôme que je vais bientôt abandonner à mon grand regret. J'ai passé d'excellents moments avec toi et notamment à Rhodes et cela ne fait que commencer !! Merci pour ton soutien de tous les jours et pour la motivation car sans toi cela aurait bien plus difficile. Merci à Marcus pour son énergie et ses talents de cuisinier. Merci également à Babou, j'ai eu peu de signes amicaux de sa part, mais le check tête restera dans ma mémoire.

Je remercie Elise, je suis bien contente que tu aies dû faire la zone tampon et de t'avoir ainsi rencontré. Merci pour tes moments de délires où tu nous fatigues plus qu'autre chose mais tellement drôles. Merci également pour ton soutien, je passerai te régler tes honoraires une fois que tout sera fini.

Je remercie Clément et Agatha, tous les deux extrêmement calmes et toujours un peu philosophes. Je remercie Chheng pour sa gentillesse et ses succulents gâteaux. Merci Didier pour ton enthousiasme et ta sympathie.

Je remercie bien évidemment le service RMN, Maurice, Bruno et Lionel. On est toujours accueilli avec un immense sourire. Je pense que descendre vous voir sera ce qui me manquera le plus, bien que j'ai un peu déserté les lieux pendant la rédaction.

Je remercie Lydia, Antonio, Georges et Jonathan du magasin pour leur accueil et leur sympathie. Un grand merci à Lydia, qui sait prendre soins des doctorants.

Je remercie le service de masse, que j'ai harcelé d'échantillons au cours des derniers mois.

Je remercie Oriane, Elodie, Juju et Matthieu. Oriane ta folie me fera toujours rire. Tu es d'une bonne humeur permanente, qui fait un bien fou. Merci Juju toujours présent dans les moments importants et Elodie, ma colocataire de quelques temps, toujours montée sur pile. Merci à Matthieu pour son calme et sa patience légendaire.

Je remercie tous les stagiaires que j'ai eu à encadrer ou pas, Mathieu alias Mattevoun, Clarence, Fiona, Céline alias tu es plus lourde que le dichlo, Jérémy pour ses jérémiades uniques, Chris, Antoine aliais piou piou, Adrien aliais Handi Capé, Thibault, Elyse et son Maxou d'amour, Morane, Clément alias tous les noms qui me passaient par la tête et Thibaud. On vous appelait les esclaves mais j'espère que vous gardez un bon souvenir de votre passage au labo. En ce qui me concerne, j'ai de très bons souvenirs avec beaucoup d'entre vous.

Je remercie mes amis proches : Aurore alias Aurrrore pour sa folie légendaire que nous partageons ; Aveline mon amie de toujours que je ne vois pas assez souvent mais que je retrouve avec beaucoup de plaisir ; Christelle alias fofolle, jamais à l'heure mais toujours partante pour rire ; Ghanwa, jeune maman qui restera pour toujours ma petite Ghanwa ; Helin qui est toujours à la ramasse mais c'est pour ça qu'on t'aime ; Karine alias Karibou, qui vous donne toujours le sourire ; Sandra, ma portugaise préférée ; Sabine alias Sabore, la distance nous sépare mais tu seras pour toujours mon amie alcoolique ; Stéphanie, toujours dans la lune mais on l'adore pour ça. Merci pour tous ces moments de joie que nous partageons et qui me poussent tous les jours à avancer. Je pourrais citer des moments de folie avec chacune d'entre vous mais cela deviendrait un roman. Je vous ai bassiné pendant des années avec ma thèse mais ne vous inquiétez pas ce sera bientôt fini et je n'aurai plus d'excuses !!! Merci également à Morgan, Hajo, Milton, Alex et Laetitia alias cagette, pour leur amitié.

Merci à ma cagole préférée alias Erwann, malgré la distance on réussit toujours à se voir et c'est toujours avec une joie immense que j'attends nos retrouvailles.

Merci à la team « Escom », Justine, Alex, Hélène, Joël, MD, Stevens. C'est toujours un plaisir de nous revoir même si ce n'est pas aussi souvent que je le souhaiterais. J'espère que nous aurons

prochainement un évènement à fêter pour nous retrouver. Petite dédicace à Justine qui me copie tout le temps, donc si tu fonctionnes bien on devrait bientôt se retrouver au travail.

Merci également à Charlotte, Isabelle et Fanny, le quatuor des TP, nous avons toutes pris des chemins bien différents, mais malgré la distance nous restons amies pour la vie.

Je remercie la team tennis, Nathalie, Gaëlle, Margaux, Serge, Charlène, Delphine etc. C'était souvent la foire Saint Jean le lundi mais ça m'a permis de bien me défouler et d'évacuer la pression.

Je remercie la team RU, Marine, Grace, Alex and co. On a perdu le rythme mais c'est aussi que la fin arrive à grands pas pour les derniers d'entre nous.

Je remercie mes petits anges, qui sont toujours là avec moi, et qui m'ont poussée là où j'en suis aujourd'hui. Vous me manquez mais rien ne nous séparera.

Je remercie ma famille à qui je dois énormément. Merci pour tout, on a une petite famille mais une famille en or. Merci à Barbara et Chloé, toujours au top, prête pour rire et aussi fofolle que moi. Je ne pourrais rêver mieux comme belles sœurs. Merci à JB et Olivier, Aline, Elya et Sophie pour toute la joie que vous m'apportez et pour tous les bons moments que nous partageons en famille.

Je remercie plus particulièrement ma tante Thérèse, qui a toujours été là pour nous et qui reste une grande enfant pour moi. J'ai passé et passerai des moments exceptionnels avec toi.

Je remercie mes frères, Julien et Michel. Nous avons eu des moments difficiles mais je n'en retiendrai que le meilleur. Merci d'être mes frères, je sais que je pourrai toujours compter sur vous et je ne sais pas si je vous l'ai déjà dit mais je vous aime fort.

Pour finir, je remercie la personne sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, ma mère. Je te remercie de nous avoir donné tant d'opportunités avec papa. Tous les jours tu participes à ma joie de vivre et je peux profiter de la vie grâce à toi. Tu es la personne la plus importante au monde alors merci maman et je t'aime fort.

Abréviations

μM	Micromolaire
Å	Angström
Ac	Acétyle
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
EA	acétate d'éthyle
Ala	Alanine
APTS	Acide para-toluènesulfonique
Ar	Aryle
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
AZT	Azidothymidine
BAP	Acétylphosphonate de butyle
BCl₃	Trichlorure de Bore
BCN	Bicyclononyne
BITZ	Benzisothiazolone
Boc	Tert-butoxycarbone
Bn	Benzyle
BnAP	Acétylphosphonate de benzyle
Bu	Butyle
BuOH	Butanol
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
cat.	Catalytique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDI	Carbonyldiimidazole
CDP-ME	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol

CDP-MEP	2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol
CDP-ME2P	4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol 2-phosphate
CH₃CN	Acétonitrile
CHARMM	Chemistry of Harvard molecular mechanics
CMP	Cytidine monophosphate
[Cp*RuCl]	ruthénium pentaméthylcyclopentadiényle
CTP	Cytidine triphosphate
CuAAC	Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
Cys	Cystéine
D-GAP	D-glycéraldéhyde 3-phosphate
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	Dicyclohexyle carbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIC	Diisopropyl carbodiimide
DIFO	Difluorinated
DIMAC	Diméthoxyazacyclooctyne
DIPEA	Diisopropyl éthylamine
DMAPP	Diméthylallyl-pyrophosphate
DMB	Domiphène
DMF	Diméthylformamide
DMP	Périodinane de Dess-Martin
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dppe	1,2-Bis(diphénylphosphino)éthane
DX	Désoxyxylulose
DXP	1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate
DXR	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
DXS	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
PE	Ether de pétrole
eq	Equivalent(s)

ESI-MS	Spectrométrie de masse par ionisation à électrospray
Et	Ethyle
Et₂O	Ether diéthylique
ETH	Ethionamide
Fom	Fosmidomycine
Fos	Fosfoxacine
FPP	Diphosphate de farnésyle
GHMP	galactose/homosérine/mévalonate/phosphomévalonate
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GGPP	Diphosphate de géranylgeranyle
GPP	Diphosphate de géranyle
HBr	Bromure d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
His	Histidine
HMBPP	<i>E</i> -4-hydroxy-3-méthyl-butényl 1-diphosphate
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
HMGR	HMG-CoA réductase
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HOMO	Orbitale moléculaire la plus haute occupée
HR-M	Spectrométrie de masse à haute résolution
Hz	Hertz
IBX	Acide 2-iodobenzoïque
IspD	2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate/MEP cytidyltransférase
IspE	4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase
IspF	2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase
IspG	<i>E</i> -1-hydroxy-2-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase
IspH	<i>E</i> -1-hydroxy-2-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase
Ile	Isoleucine
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
<i>i</i>Pr	<i>Isopropyle</i>

LC/MS-SIM	Liquid chromatography.Mass spectrum-Selected Ion Monitoring
LDA	Diisopropylamidure de lithium
Leu	Leucine
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
LUMO	Orbitale moléculaire la plus basse vacante
Lys	Lysine
MAP	Acétylphosphonate de méthyle
Me	Méthyle
MECP	2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate
MeOH	Méthanol
MeOD	Méthanol deutéré
MEP	2-C-méthylérythritol-4-phosphate
Met	Méthionine
mm	Millimètre
Ms	Mycobactérium smegmatis
MsCl	Chlorure de mésylate
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
MVA	Mévalonate
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NaHCO₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NaH₂PO₄	Dihydrogénophosphonate de sodium
NaN₃	Azoture de sodium
nM	Nanomolaire
NOS	Synthase de l'oxyde nitrique
Nu⁽⁻⁾	Nucléophile
PCC	Chlorochromate de pyridinium
PDB	Protein data Bank
Ph	Phényle
Phe	Phénylalanine
PPh₃	Triphénylphosphine
ppm	Parties par millions

PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Pro	Proline
Rf	Rapports frontaux
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RuAAC	Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
Ser	Sérine
SPAAC	Strain promoted azide alkyne cycloaddition
STD	Saturation-Transfer Difference
t.a.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de 10tetra- <i>n</i> -butylammonium
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle
<i>t</i>Bu	<i>Tert</i> -butyle
<i>t</i>BuOH	Butanol
TBSCI	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle
TDP	Thiamine diphosphate
TEA	Triméthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TGS	Target guided synthesis
THF	Tétrahydrofurane
TIM	Triose Phosphate Isomérase
Thr	Thréonine
TMS	Triméthylsilane
TMSBr	Bromure de triméthylsilyl
TPP	Thiamine pyrophosphate
trNOE	Transfer-NOE
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UV	Ultraviolet
Val	Valine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Table des matières

Introduction.....	7
I. Les isoprénoïdes.....	7
1. Généralités.....	7
2. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP.....	9
3. La voie du mévalonate MVA.....	10
4. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).....	11
a. Une cible pour de nouveaux antimicrobiens.....	11
b. Voie de biosynthèse.....	14
c. Première enzyme de la voie du MEP : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS).....	15
d. Seconde enzyme de la voie du MEP : la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase.....	19
e. Troisième enzyme de la voie du MEP : IspD.....	28
f. Quatrième enzyme de la voie du MEP : IspE.....	33
g. Cinquième enzyme de la voie du MEP : IspF.....	38
h. Sixième enzyme de la voie du MEP : IspG/GcpE.....	44
i. Septième enzyme de la voie du MEP : IspH/LytB.....	47
j. Cible de choix : DXR.....	50
II. Fosmidomycine et FR-900098.....	51
1. Découverte, activité antibactérienne et limite.....	51
2. Fosmidomycine, tête de série pour la conception de nouveaux inhibiteurs.....	52
a. Modification de l'acide rétro-hydroxamique.....	53
b. Modification de la chaîne carbonée.....	56
c. Modification du point d'ancrage.....	66
i. Remplacement du phosphonate.....	66
ii. Modification sous forme de prodrogue.....	66
d. Augmentation du caractère lipophile par élongation au niveau de l'acide hydroxamique / approche bisubstrat.....	71

Cadre général et stratégies	93
.....	94
Chapitre 1 : Stratégie Biligand	99
I. Introduction.....	99
1. Chimie click.....	99
2. Réaction click catalysée au cuivre ou au ruthénium	101
a. Catalyse au cuivre.....	101
b. Catalyse au ruthénium	101
3. Réaction click in situ	102
4. Chimie click sans cuivre (« Copper free click chemistry »).....	102
5. Le groupe triazole en milieu biologique.....	103
II. Groupement azoture	104
1. Choix des azotures à synthétiser.....	104
2. Synthèse des azotures fonctionnalisés avec un acide phosphono rétro-hydroxamique....	106
a. Synthèse du phosphono benzylhydroxylamine 143.....	107
b. Synthèse de l'azoture 150b (n = 2) à partir du 1,3-propanediol et du phosphono benzylhydroxylamine (voie A1)	107
c. Synthèse des azotures à partir de lactone et bromo-phosphonate 140 (voie A2)	108
d. Synthèse des azotures à partir d'ester bromé (voie B)	110
3. Analyse spectroscopique en RMN des azotures en pince rétro-hydroxamique, dite pince naturelle	111
4. Synthèse d'azotures fonctionnalisés avec un acide hydroxamique, dite pince inversée ...	114
5. Evaluation biologique des azotures sur la DXR purifiée et par la méthode de diffusion en gélose sur une souche d'E. coli.....	118
III. Synthèse d'analogues bromés et hydroxylés de la fosmidomycine.....	122
1. Synthèse des dérivés bromés en pince naturelle.....	122
2. Synthèse des dérivés bromés en pince inversée.....	124
3. Synthèse des alcools en pince naturelle	124

IV.	Cycloalcyne	127
1.	Choix des cyclooctynes et azacyclooctynes	127
2.	Stratégie de synthèse des cyclooctynes et azacyclooctynes	130
a.	Tentative de synthèse d'un cyclooctyne	131
b.	Tentative de synthèse d'azacyclooctyne	137
V.	Conclusion	141
Chapitre 2 : Stratégie bisubstrat		151
I.	Introduction	151
II.	Modélisation moléculaire	153
1.	Première approche pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat	153
2.	Seconde approche pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat	155
a.	Simplification des mimes de NADPH	155
b.	Sélection des acides commerciaux	155
III.	Synthèse des inhibiteurs de type bisubstrat	157
1.	Stratégie de synthèse convergente	157
2.	Synthèse des inhibiteurs de type bisubstrat	157
a.	Synthèse des différents fragments Y	157
b.	Condensation du composé 143 et du fragment Y	159
3.	Analyse spectroscopique RMN	162
4.	Evaluation biologique	164
a.	Test enzymatique sur la DXR purifiée d'E. coli du premier panel d'inhibiteurs	164
b.	Test in vitro par la méthode de diffusion en gélose sur E. coli	167
5.	Synthèse partielle des inhibiteurs à partir des acides comportant un groupement hydroxyle	169
IV.	Conclusion	171
Chapitre 3 : Interface stratégie biligand et bisubstrat		177
I.	Etat de l'art sur la chimie click in situ en présence d'alcyne vrais	177
II.	Synthèse d'alcynes terminaux et évaluation biologique	179

1.	Sélection des alcynes à synthétiser par modélisation moléculaire.....	179
2.	Synthèse des alcynes fonctionnalisés avec le mime du NADPH	180
3.	Evaluation biologique des alcynes sur la DXR purifiée d'E. coli	181
III.	Synthèse de triazoles bisubstrats : de potentiels inhibiteurs de la DXR	182
1.	Synthèse des triazoles par réaction de click.....	182
2.	Etudes spectroscopiques RMN des triazoles.....	185
3.	Evaluation biologique.....	188
a.	Tests enzymatiques sur la DXR purifié d'E. coli.....	188
b.	Tests in vitro par la méthode de diffusion en gélose sur E. coli.....	190
IV.	Conclusion	192
Chapitre 4 : Nouvelle cible au sein de la DXR.....		199
I.	Introduction.....	199
II.	Modélisation du dansyle dans la poche	200
III.	Synthèse des inhibiteurs de type dansyle	201
1.	Schéma rétro-synthétique.....	201
2.	Synthèse des analogues dansylés.....	201
3.	Etudes spectroscopiques RMN des inhibiteurs de type dansyle.....	206
4.	Evaluation biologique.....	208
a.	Tests enzymatiques sur la DXR purifiée d'E. coli.....	208
b.	Tests in vitro sur boîte de Pétri	209
c.	Test sur une souche d'E. coli résistante à la fosmidomycine	210
IV.	Conclusion	211
Conclusion générale		217
I.	Partie expérimentale chapitre 1.....	228
II.	Partie expérimentale chapitre 2.....	261
III.	Partie expérimentale chapitre 3.....	293
IV.	Partie expérimentale chapitre 4.....	325
Biochemical general procedure.....		335

Introduction

Introduction

I. Les isoprénoïdes

1. Généralités

Les isoprénoïdes appartiennent à une importante famille de plus de 30 000 composés dont la majorité est issue des plantes. Ces molécules, bien qu'issues de la même famille, présentent des activités physico-chimiques et biologiques bien différentes. Ils ont de nombreuses fonctions dans la photosynthèse, l'architecture des membranes, la régulation de l'accroissement et du développement cellulaires, la défense contre les attaques des pathogènes, la signalisation cellulaire, etc.¹

L'élément constitutif de base de tous les isoprénoïdes est le diphosphate d'isopentényle (IPP, **2**, Fig. 1), une unité en C₅ qui est l'équivalent biologique du 2-méthylbuta-1,3-diène plus connu sous le nom d'isoprène **1**. La chaîne hydrocarbonée des isoprénoïdes est ainsi construite une unité après l'autre. C'est en premier lieu Wallach, qui en 1887, proposa l'existence de motifs isopréniques. Ce dernier proposa une règle stipulant que la condensation de type « tête à queue » de plusieurs unités en C₅, forment des composés C_{5n}.² C'est ensuite Ruzicka qui établit en 1953 la « règle isoprénique biogénétique ».^{3,4} Cette règle permet de déduire en fonction du squelette carboné d'isoprénoïdes, le nombre de condensations mis en jeu via des réactions courantes de chimie organique telles que la formation d'isoprénoïdes acycliques par condensation d'unités isopréniques, la formation de carbocations induisant la cyclisation de 1,5-polyène⁵, la conformation du substrat lors de la cyclisation et des réarrangements de Wagner-Meerwein.⁶

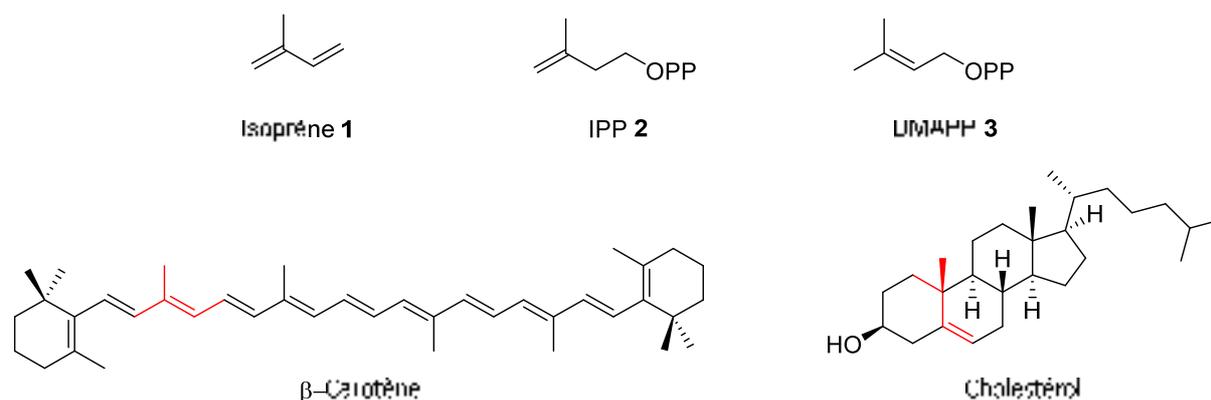


Figure 1 : Isoprène 1 et quelques exemples d'isoprénoïdes.

La biosynthèse des isoprénoïdes se fait chez tous les organismes vivants à partir de l'IPP **2** et du diphosphate de diméthylallyle **3** (DMAPP). L'IPP pouvant être isomérisé en DMAPP par l'IPP isomérase.^{7,8} La première étape de cette biosynthèse est la condensation entre une entité nucléophile, l'IPP **2** et une entité électrophile, le DMAPP **3**, pour conduire au diphosphate de géranyle **4** (GPP) qui est le précurseur des monoterpènes (C₁₀) (Fig. 2). Cette réaction se fait par l'attaque de la double liaison

terminale de l'IPP sur le carbone allylique du DMAPP porteur du groupement partant diphosphate. Une seconde condensation entre le GPP **4** et l'IPP **2** conduit au diphosphate de farnésyle **5** (FPP) qui est le précurseur des sesquiterpènes en C₁₅, l'un des plus grands groupes de terpénoïdes. Une troisième condensation entre le FPP **5** et l'IPP **2**, conduit au diphosphate de géranylgéranyl **6** (GGPP) qui est le précurseur des diterpènes et des caroténoïdes en C₂₀ en C₄₀.

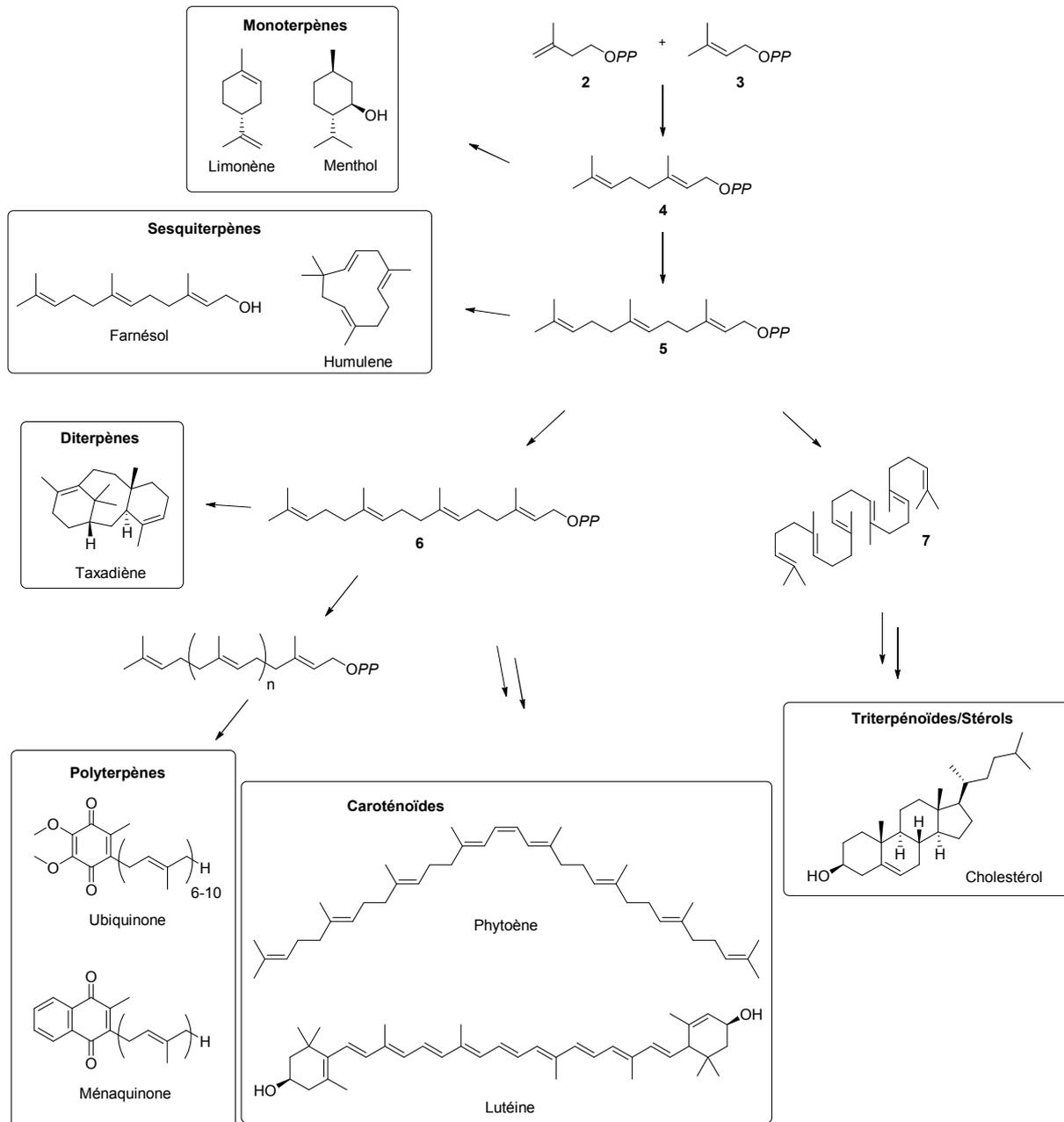


Figure 2 : Biosynthèse des isoprénoïdes à partir de l'IPP **2** et du DMAPP **3**.
Condensation de type tête-à-queue ou tête-à-tête.

Les trois condensations décrites précédemment sont de type tête-à-queue mais il existe également des condensations de type tête-à-tête. On retrouve ce type de condensation lors de la formation du squalène **7** (C₃₀), par condensation entre deux molécules de FPP **5** et qui est le précurseur des

triterpènes dont les stérols et hopanoïdes et lors de la formation du phytoène par condensation de deux molécules de GGPP **6**, précurseur des caroténoïdes (C₄₀). Le couplage d'un très grand nombre d'unités C₅ conduit au latex naturel des végétaux.

L'ensemble de ces élongations est catalysé par des prényltransférases. Les isoprénoïdes sont ensuite produits via de multiples réactions chimiques telles que des cyclisations suivies de transpositions suivies éventuellement par des oxydations permettant de passer des précurseurs acycliques à toutes les familles d'isoprénoïdes.

2. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP

L'IPP **2** et le DMAPP **3** peuvent être synthétisés via deux voies de biosynthèse. La première qui fut découverte en 1950 est la voie du mévalonate (MVA) qui a pendant longtemps été considérée comme l'unique voie de biosynthèse chez tous les organismes vivants.⁹ Cependant, dans les années 1950, il y avait de nombreuses contradictions sur le rôle universel de la voie du MVA. En effet, le marquage isotopique de l'acétate et du MVA était peu ou pas du tout incorporé dans les caroténoïdes, les monoterpènes et les diterpènes chez les végétaux. Alors que, au contraire, il l'était dans les stérols, les triterpénoïdes et parfois dans les sesquiterpènes.¹⁰ De plus, la mévinoline, un inhibiteur compétitif de l'HMG-CoA réductase qui est une enzyme catalysant une étape de la voie du MVA, inhibait la biosynthèse des stérols dans les végétaux mais n'affectait pas la formation des isoprénoïdes des chloroplastes tels que les caroténoïdes.¹¹ C'est dans les années 1990, que le groupe de Rohmer a mis en évidence l'existence d'une seconde voie, la voie de 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).^{12,13} La découverte de cette seconde voie a conduit à de nombreuses études sur sa distribution chez les organismes vivants dont voici une succincte répartition.¹⁴ La voie du MVA est présente chez les animaux, les champignons, le cytosol des végétaux, les archéobactéries et quelques bactéries. En revanche, la voie du MEP est présente chez la plupart des bactéries, en particulier chez des bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, dans les plastides des végétaux, chez les algues vertes unicellulaires¹⁰, et chez des protozoaires parasites, comme *Plasmodium falciparum* qui est le responsable de la malaria.¹⁵ Certaines espèces telles que les *Streptomyces* spp. possèdent les deux voies, mais dans ce cas, elles ne sont pas exprimées en simultanée.¹⁶ En effet, la voie du MEP est impliquée dans la biosynthèse des métabolites primaires tels que dans la chaîne prényle de la ménaquinone au cours de la phase de croissance exponentielle. Par la suite, au cours de la phase stationnaire, il y a un switch vers la voie du mévalonate qui est utilisée pour la formation de fragments isopréniques de métabolites secondaires ayant une activité antibiotique. Concernant les végétaux, il y a une dualité entre les voies, car la voie du MVA est localisée dans le cytoplasme et y est responsable de la formation des stérols ou triterpènes par exemple alors que la voie du MEP est localisée dans les chloroplastes.^{17,18}

Voie du Mévalonate	Voie du MEP
Animaux	Bactéries (dont pathogènes)
Champignons	Algues vertes unicellulaires
Quelques Bactéries	<i>Plasmodium falciparum</i>
Végétaux (cytoplasme)	Végétaux (chloroplaste)

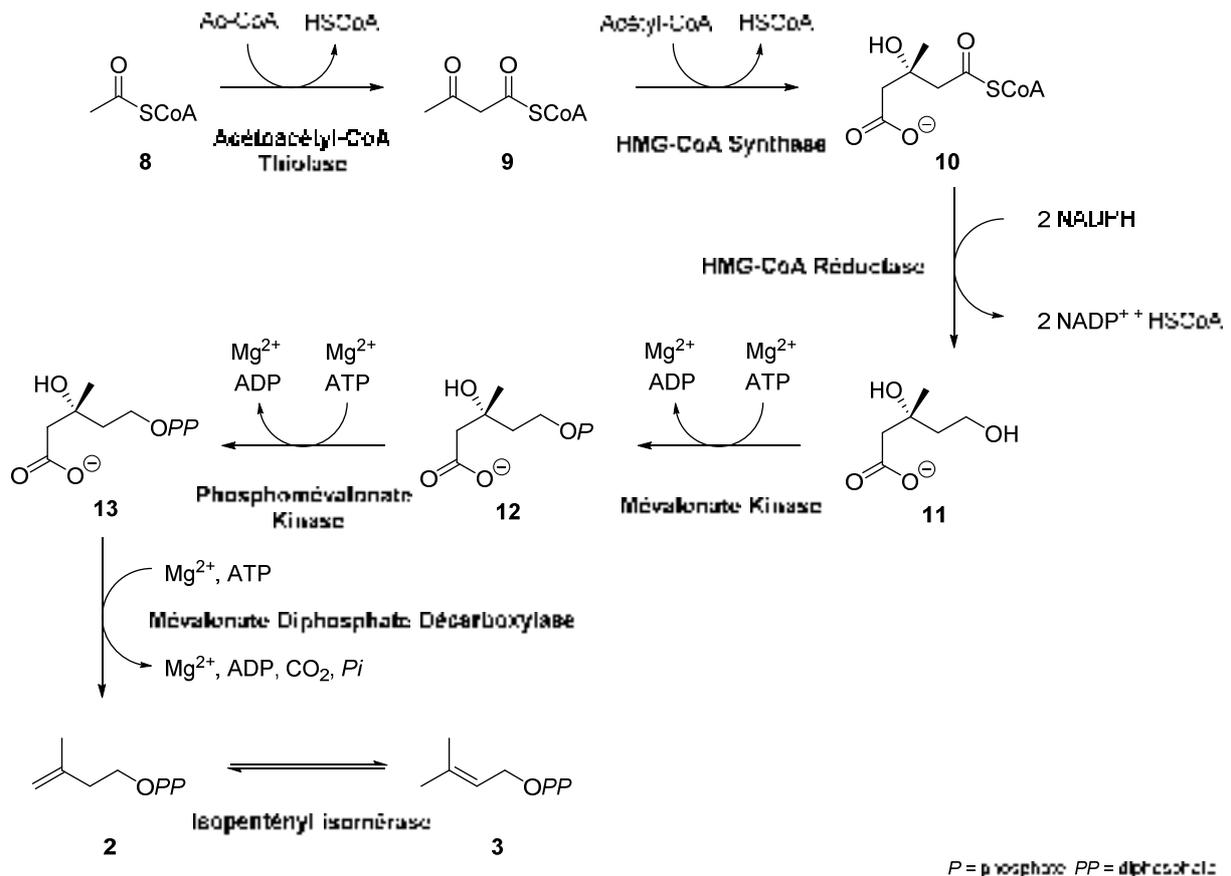
Figure 3 : Répartition voie du MVA et du MEP.

Cette répartition des deux voies (Fig. 3) met en avant l'absence de la voie du MEP chez les animaux et sa présence chez de nombreuses bactéries pathogènes ce qui en fait une cible de choix pour la synthèse de nouveaux antimicrobiens pouvant inhiber les enzymes de cette voie et qui seront développés plus loin.

3. La voie du mévalonate MVA

Suite à la cristallisation du cholestérol vers la fin du 18^{ème} siècle, cette molécule qui joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du corps humain a reçu beaucoup d'attrait.⁹ Les travaux de Bloch et Rittenberg sur celle-ci ont permis de démontrer le rôle du MVA dans la biosynthèse du cholestérol. Notamment suite à l'obtention de cholestérol marqué chez la souris à partir d'acétate marqué au deutérium, conduisant au postulat que les stérols sont construits à partir d'une entité en C₅.^{19,20} Les travaux réalisés par Lynen^{21, 22} et Cornforth⁷ au cours des décennies suivantes ont permis de mieux comprendre la voie du mévalonate.

Ainsi, la première partie de la voie de biosynthèse du mévalonate débute par la synthèse du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA **10** (HMG-CoA) à partir de trois molécules d'acétyl-CoA **8** (Fig. 4). La première condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétyl-CoA **8** donne accès à l'acétoacétyl-CoA **9** via l'acétoacétyl-CoA thiolase. Une seconde condensation entre l'acétoacétyl-CoA **9** et la troisième molécule d'acétyl-CoA **8** catalysée par la HMG-CoA synthase conduit au HMG-CoA **10**. L'HMG-CoA **10** précédemment obtenu est alors réduit en acide mévalonique **11** (MVA) en présence de NADPH, le tout catalysé par l'HMG-CoA réductase (HMGR). L'acide mévalonique **11** est ensuite converti en mévalonate 5-phosphate **12** via la mévalonate kinase qui utilise l'ATP comme un donneur de phosphate et une source d'énergie. Puis le mévalonate 5-phosphate **12** est converti via la phosphomévalonate kinase en mévalonate 5-diphosphate **13** de nouveau en utilisant l'ATP. Pour finir, l'IPP **2** est obtenu via la mévalonate diphosphate décarboxylase qui convertit le mévalonate-5-diphosphate **13** en diphosphate d'isopentényle **2** (IPP), produit final de cette voie de biosynthèse et précurseur pour la synthèse des isoprénoïdes. Cette dernière enzyme catalyse en premier lieu la phosphorylation de l'alcool tertiaire qui est converti en un bon groupement partant, favorisant ainsi la décarboxylation conduisant à l'IPP.²³

Figure 4 : Biosynthèse de l'IPP **2** selon la voie du mévalonate.

4. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

La voie du MEP a été mise en évidence de façon inattendue à la suite d'expériences d'incorporation d'acétate marqué au ^{13}C chez différentes bactéries.^{24,12} Le marquage obtenu ne correspondait en rien à celui attendu pour la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MVA.²⁵ Par la suite, des expériences d'incorporation de glucose, du pyruvate et du glycérol marqués au ^{13}C sur différentes souches de bactéries a permis d'identifier les précurseurs d'une seconde voie.²⁶ Ceux-ci sont le pyruvate **14** et le glycéraldéhyde 3-phosphate **15**, tous deux issus du métabolisme du glucose.¹⁰ Parallèlement à ces études sur les hopanoïdes bactériens, la voie du MEP a également été mise en évidence par incorporation de glucose marqué chez *Ginkgo biloba*, montrant que cette voie est également présente chez les plantes supérieures.^{18,27}

a. Une cible pour de nouveaux antimicrobiens

Depuis la découverte de cette nouvelle voie dans les années 1990, l'identification de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes chez les organismes vivants a pu être réalisée. En 1993, Rohmer et son équipe ont tout d'abord rapporté la présence de cette nouvelle voie dans sept bactéries différentes qui sont : *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium organophilum*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Rhodoblastus acidiphila*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Escherichia coli* et *Alicyclobacillus*

acidoterrestris dont le choix avait été dicté par la facilité d'isolement de leurs polyterpénoïdes et/ou leurs capacités métaboliques et non pour leurs relations phylogéniques ou taxonomiques, le but premier étant l'élucidation de cette nouvelle voie de biosynthèse.¹² Par la suite, grâce à l'identification des gènes impliqués et à l'analyse bioinformatique des génomes, la distribution de la voie du MEP a pu être établie (Tab. 1).

Tableau 1 : Répartition de la voie du MVA et du MEP chez les bactéries pathogènes et le parasite du paludisme.

Pathogènes	MEP	Mévalonate	Pathogénicités
Pathogènes Gram positifs			
<i>Bacillus anthracis</i> str. Sterne	+	-	Anthrax
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168	+	-	
<i>Clostridium difficile</i> 630	+	-	Diarrhées infectieuses
<i>Clostridium botulinum</i> B1 str. Okra	+	-	Botulisme
<i>Clostridium perfringens</i> E str. JGS1987	+	-	Intoxication alimentaire/ gangrène
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	Infections
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	+	+	Listériose
<i>Listeria innocua</i> Clip 11262	-	+	Non pathogènes
<i>Listeria seeligeri</i>	-	+	Pathogènes pour les animaux
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	-	Tuberculose
<i>Mycobacterium avium</i>	+	-	Infection chez immunodéprimés
<i>Mycobacterium leprae</i>	+	-	Lèpre
<i>Nocardia terpenica</i>	+	-	Maladies pulmonaire, cutanée et sous cutanée
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	Infections et intoxications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	+	Pneumonies
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	Infections superficielles/invasives
Pathogènes Gram négatifs			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	Infections nosocomiales
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+	-	Endocardites, abcès cérébraux
<i>Brucella abortus</i>	+	-	Brucellose

<i>Bordetella pertussis</i> Tahoma I	+	-	Coqueluche
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	+	Maladie de Lyme
<i>Burkholderia mallei</i>	+	-	Morve
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	Mélioïdose
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81116	+	-	Gastro-entérite
<i>Chlamydia trachomatis</i> 434/Bu	+	-	Infections à Chlamydia
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	+	-	Infections respiratoires
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	Infections nosocomiales néonatales
<i>Citrobacter koseri</i>	+	-	Infections nosocomiales néonatales
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	+	-	Colite hémorragique, Syndrome hémolytique et urémique, etc.
<i>Escherichia coli</i> O127 : H6	+	-	Infections
<i>Francisella tularensis</i>	+	-	Tularémie
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	-	Infections sphère ORL, méningite, etc.
<i>Helicobacter pylori</i>	+	-	Gastrite chronique, cancer
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	+	-	Infections nosocomiales
<i>Legionella pneumophila</i>	-	+	Légionellose
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA	+	-	Gonococcie
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	-	Méningites
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	Infections nosocomiales
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	-	Parodontites
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	Diarrhées
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	+	-	Dysenterie
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	+	-	Fièvre typhoïde
<i>Treponema pallidum</i>	+	-	Syphilis
<i>Vibrio cholerae</i>	+	-	Choléra
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	Yersiniose
<i>Yersinia pestis</i>	+	-	Peste
Protozoaire parasite			
<i>Plasmodium falciparum</i>	+	-	Malaria

Grâce aux efforts qui ont été menés pour décrire la répartition des deux voies, il est aisé de voir que cette seconde voie est présente chez de nombreux pathogènes, même si elle est absente de certains pathogènes importants, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*.^{28, 29, 30} De plus, cette voie étant absente des animaux, les enzymes de cette voie peuvent être considérées comme des cibles potentielles et intéressantes dans la recherche de nouveaux antibiotiques, d'autant plus que malgré le développement grandissant de la résistance aux antibiotiques de souches pathogènes et malgré la compréhension croissante de leurs mécanismes d'actions, peu de préventions ont été faites. En effet, nous vivons actuellement sur nos acquis et ce domaine ne semble pas être d'un intérêt assez important pour les industriels, car le nombre d'antimicrobiens efficaces diminue et il n'y a pas eu de nouvelles familles d'antibiotiques découvertes au cours des 30 dernières années. De plus, avec la migration des populations qui est devenue plus facile au cours des dernières décennies, certaines bactéries qui semblaient être sous contrôle dans les pays développés, comme *Mycobacterium tuberculosis*, font de nouveaux leur apparition dans ces pays. Cette voie présente donc un intérêt certain. Concernant l'impossibilité de toucher certaines souches pathogènes comme *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, ce problème pourrait être contourné suite à la récente découverte d'une IPP isomérase II qui ne serait présente que dans ces bactéries et qui aurait des propriétés différentes des IPP isomérases connues, mais ce sujet ne sera pas développé.³¹

b. Voie de biosynthèse

La voie du MEP débute donc par la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **16** (DXP) suite à une condensation thiamine diphosphate (TDP) dépendante entre une molécule de pyruvate **14** et une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate **15**, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) (Fig. 5). Le DXP **16** est ensuite converti en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **17** (MEP) par un réarrangement intramoléculaire en un aldéhyde non isolable en présence d'un cation divalent (comme Mg^{2+} , Mn^{2+}) suivi d'une réduction concomitante réalisée par le cofacteur NADPH. Ces réactions sont catalysées par la seconde enzyme de la voie qui est la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR). Ensuite, trois réactions successives conduisent à trois nouveaux intermédiaires de la voie du MEP. Ainsi, le MEP est premièrement converti en 4-(cytidyl 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **18** (CDP-ME) via l'IspD. Ensuite, l'IspE, une enzyme ATP dépendante permet la phosphorylation de l'hydroxyle tertiaire du CDP-ME **18** pour donner le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **19** (CDP-MEP). Puis la troisième réaction, conduit à la cyclisation par l'IspF du dernier intermédiaire en 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **20** (MEcPP). Deux réactions sont encore nécessaires avant l'obtention des intermédiaires IPP **2** et DMAPP **3**. Ainsi, l'avant-dernière, catalysée par l'IspG qui est une enzyme à cluster [4Fe-4S], conduit à la réduction du MEcPP **20** en (E)-4-hydroxy-3-méthyl-butényl 1-diphosphate **21** (HMBPP). Enfin, la dernière étape fait

également appel à une enzyme à cluster [4Fe-4S], l'IspH, réduisant l'HMBPP **21** soit en IPP **2**, soit en DMAPP **3**.

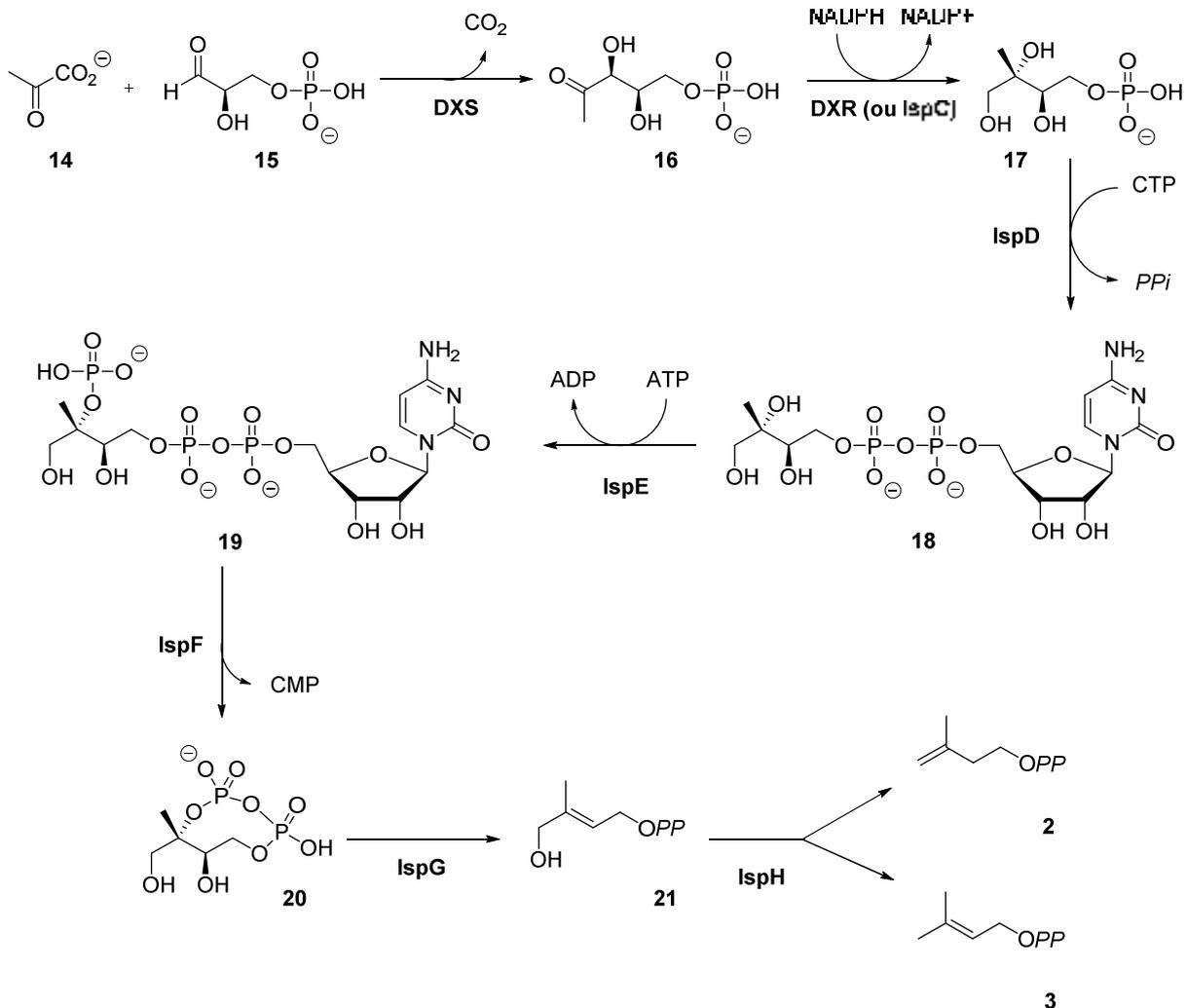


Figure 5 : Biosynthèse de l'IPP **2** et du DMAPP **3** selon la voie du MEP.

Cette voie de biosynthèse fait donc appel à sept enzymes qui peuvent toutes être des cibles dans la quête vers de nouveaux antimicrobiens.³²

c. Première enzyme de la voie du MEP : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

La première enzyme mise en jeu dans la voie du MEP est donc la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) dont le gène *dxs* codant cette enzyme a été en premier lieu cloné à partir d'*E. coli*. Cette enzyme, de type transcétolase, catalyse la synthèse du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **16** (DXP) à partir du pyruvate **14** et D-glycéraldéhyde 3-phosphate **15** (D-GAP) (Fig. 6).^{33, 34} Elle est ainsi incluse dans la voie de synthèse des isoprénoïdes mais également dans la biosynthèse de la thiamine et du pyridoxal qui sont respectivement les précurseurs de la vitamine B1 et vitamine B6 et qui découlent du DXP.

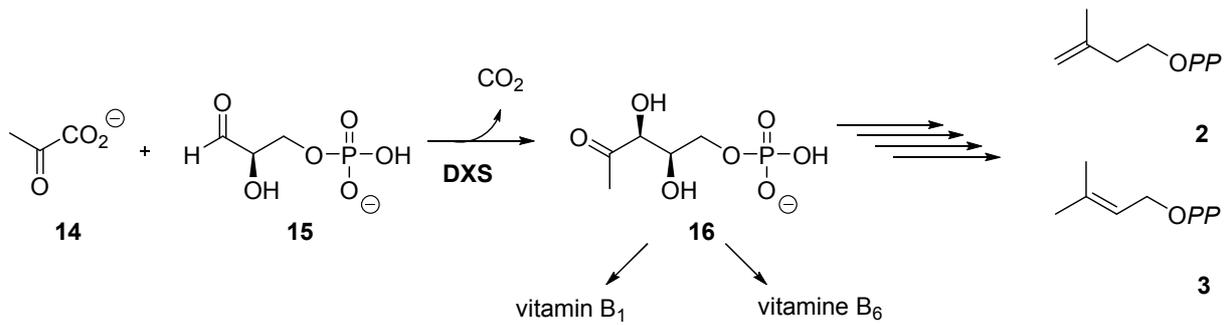


Figure 6 : Biosynthèse du DXP via la DXS.

Cette enzyme est un homodimère, composé de deux sous-unités de 67 kDa, possédant un motif liant de thiamine et ayant besoin à la fois de diphosphate de thiamine (TPP) et d'un cation divalent tel que Mg²⁺ ou Mn²⁺ pour fonctionner (Fig. 7). Chaque monomère est découpé en trois domaines et chacun possède un site actif, ce qui la différencie des autres enzymes diphosphate de thiamine dépendantes, dont les transcétolases, où le site actif est positionné à l'interface entre les dimères.³⁵

Figure 7 : Représentation cristallographique de la DXS d'*E. coli*.³⁵

Les trois domaines d'un monomère sont représentés en trois couleurs différentes. Le second monomère est représenté en gris, les cations métalliques sont représentés par des sphères jaunes et les cofacteurs TPP par des bâtonnets.

La réaction enzymatique débute par l'addition du TPP sur le pyruvate **14** (Fig. 8). S'en suit une décarboxylation conduisant à la formation de l'hydroxyéthylthiamine **22** (intermédiaire de Breslow). Cet intermédiaire réagit ensuite par une attaque nucléophile sur le carbonyle du D-GAP **15** pour former un adduit DXP-cofacteur qui se dissocie ensuite pour régénérer le cofacteur TPP et libérer le DXP **16**.³⁶

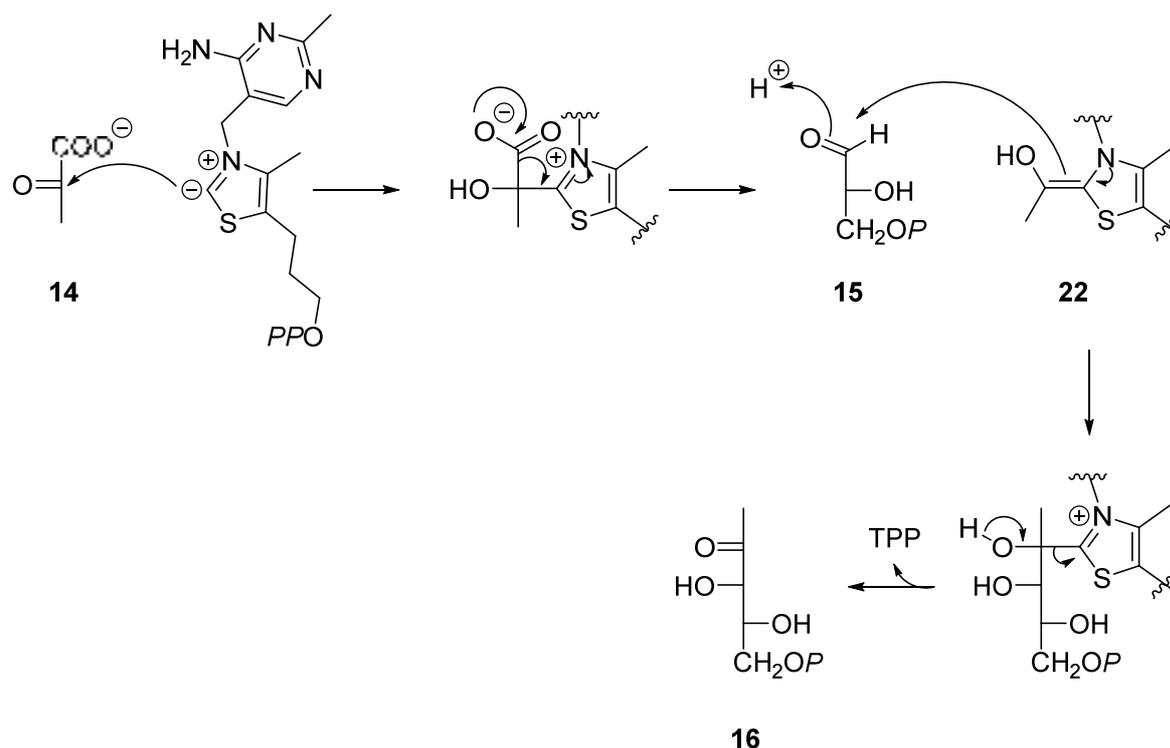


Figure 8 : Réaction enzymatique catalysée par la DXS.

A l'heure actuelle, il existe peu d'inhibiteurs de cette enzyme. L'équipe de Mao a rapporté en 2008 la synthèse de deux composés dérivés du 3-(4-chloro-phényl)-5-benzyle-4*H*-pyrazolo[1,5]pyrimidine-7-one ayant des IC_{50} de l'ordre du micromolaire envers la DXS de *Mycobacterium tuberculosis*.³⁸ Cependant, malgré le fait que ces composés aient une activité *in vivo* intéressante, ils se sont également révélés être des inhibiteurs des transcétolases des cellules humaines.

Dans les années 2000, le groupe de Muller a démontré le potentiel en tant qu'inhibiteur de la DXS de la clomazone déjà connue et utilisée comme herbicide (Fig. 9).³⁹ Cette dernière est transformée par les plantes en oxoclomazone qui s'avère être l'espèce active. Par la suite, l'équipe de Matsue a montré que l'oxoclomazone, inhibe les bactéries pathogènes d'*Haemophilus influenzae* et de *E. coli*.⁴⁰ Son pouvoir d'inhibition n'est pas aussi bon que d'autres antibactériens connus mais la synthèse de dérivé de celui-ci pourrait améliorer son activité. Cela a en partie été réalisé par l'équipe d'Ohkanda qui a synthétisé le *N*-(2-chlorobenzyle)-hydroxamate substitué qui a donné une IC_{50} de 1.0 μ M contre la DXS d'*Haemophilus influenzae*, montrant que cette piste ainsi que l'utilisation d'hydroxamate peuvent être prometteuses.⁴¹

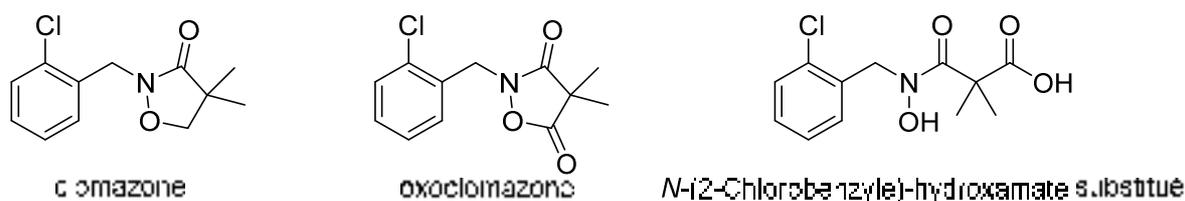


Figure 9 : Inhibiteurs de la DXS.

D'autres études sont en cours sur la recherche de probables inhibiteurs. Ainsi, par exemple, l'équipe de Meyers a montré que des aldéhydes aliphatiques peuvent être acceptés en tant que substrat de la DXS, confirmant la flexibilité de l'enzyme vis-à-vis de composés non phosphorylés.⁴² En effet, cette capacité avait été observée par l'équipe de Rohmer en 1998.⁴³ Le remplacement de l'aldéhyde par un groupement nitroso a également été réalisé par l'équipe de Meyers.⁴⁴ Les études menées ont permis d'étudier la capacité de la DXS à catalyser la formation de liaison C-N pour générer des acides hydroxamiques aromatiques ou des amides à partir de substrat nitroso (Fig. 10).

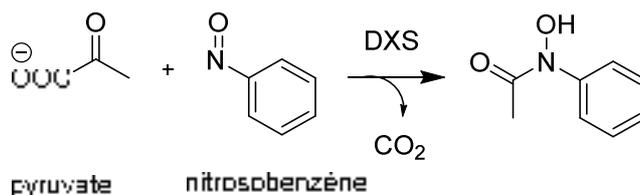


Figure 10 : Synthèse d'acide hydroxamique catalysé par la DXS.

Le comparatif des données obtenues avec un aldéhyde ou un nitroso a permis d'étudier la spécificité du substrat et de montrer que les substrats aromatiques ont une bonne affinité pour l'enzyme. Par ailleurs, l'étude a démontré que ces derniers adoptent un mode de fixation distinct par rapport à celui du D-GAP, dans un site relativement large.

En parallèle, la synthèse d'analogues de l'acétylphosphonate de méthyle (MAP), qui est un inhibiteur connu des enzymes TPP dépendantes a conduit à l'acétylphosphonate de butyle (BAP) qui démontre une activité comparable au MAP (Fig. 11).⁴⁵ L'acétylphosphonate permet de mimer le site du pyruvate

14.

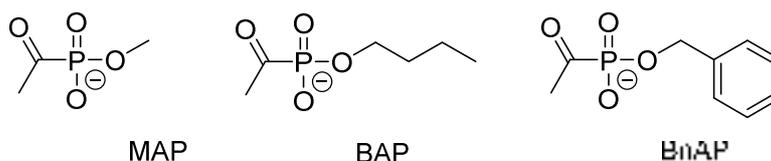


Figure 11 : Inhibiteurs BAP et BnAP de la DXS.

Avec ces différents résultats, la synthèse de l'acétylphosphonate de benzyle (BnAP) a ainsi été entreprise et celui-ci est en effet un inhibiteur compétitif de la DXS. Le BAP a fait l'objet d'études plus poussées concernant son activité inhibitrice, et il a été montré qu'il possède une activité antibactérienne modeste, ce qui pourrait être attribué à une faible absorption cellulaire. En revanche, en synergie avec la fosmidomycine, un inhibiteur de la seconde enzyme de la voie du MEP qui sera développé plus tard, son activité antimicrobienne est augmentée de manière intéressante.⁴⁶

D'autres molécules ont été envisagées, notamment par BASF à la suite d'un programme de criblage à haut débit, mais les résultats escomptés n'ont pas été obtenus.³² De même, l'équipe de Hirsch travaille actuellement sur l'utilisation d'une nouvelle méthode qui est la STI qui regroupe l'utilisation de trois techniques de RMN qui sont STD (Saturation-Transfer Difference), trNOE (Transfer-NOE) et INPHARMA. La combinaison de ces trois techniques permet de déterminer le mode de fixation de ligands ou fragments, contournant la nécessité de réaliser des études de cristallographie qui est la méthode généralement utilisée.⁴⁷ La méthode INPHARMA détermine le mode de fixation relatif de deux ligands, ciblant le même site de fixation.

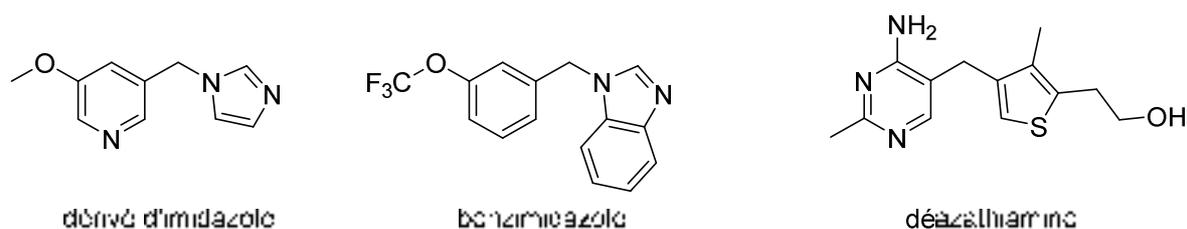


Figure 12 : Inhibiteurs de la DXS.

Ils ont ainsi obtenu en premier lieu un dérivé d'imidazole qui a ensuite été amélioré et a conduit au benzimidazole (Fig. 12). Ce dernier a démontré un bon IC_{50} comparable à celui de la déazathiamine qui est un analogue non sélectif de la thiamine, sur la DXS de *Deinococcus radiodurans*.

Malgré son potentiel et importance dans le métabolisme des bactéries, la DXS est peu ciblée. Cela est dû au défi qui est de réussir à cibler la DXS sans toucher aux autres enzymes dépendantes du cofacteur TPP comme la pyruvate déshydrogénase ou la transcétolase. Même si cependant les récents résultats montrent que, d'après la structure cristallisée de la DXS de *Deinococcus radiodurans*, le site actif est plus large que dans les autres enzymes et qu'il a été démontré que dans le cas de la DXS, pour que l'étape catalytique se fasse, il est nécessaire d'avoir un complexe tertiaire alors qu'en général, la réaction enzymatique suit un mécanisme de type ping-pong.⁴⁸ Tout cela montre donc que l'inhibition sélective devrait être possible.

- d. Seconde enzyme de la voie du MEP : la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase

Cette enzyme aussi connue sous le nom d'*ispC* ou *yaeM* catalyse le réarrangement du DXP **16** en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **17** (MEP) (Fig. 13). C'est l'équipe de Seto qui l'identifia pour la première fois en 1998.⁴⁹ Cette enzyme promeut deux étapes qui sont une isomérisation et une réduction, d'où son nom de DXP réductoisomérase.

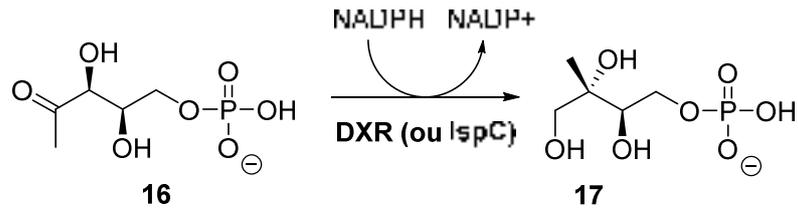
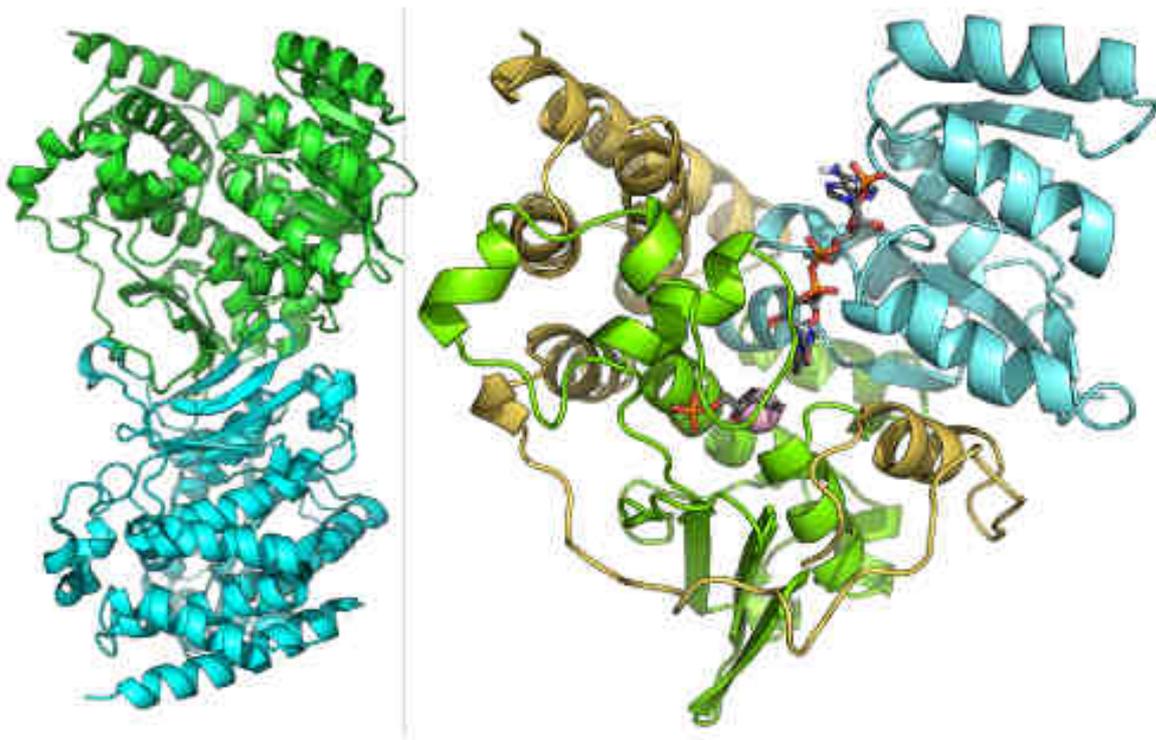


Figure 13 : Etape catalysée par la DXR.

La DXR est un homodimère, composé de deux sous-unités de 42-45 kDa, possédant une structure en « V » et possédant un site actif dans chaque sous-unité. Cette enzyme nécessite la présence de plusieurs facteurs pour fonctionner. En effet, elle a besoin d'un cofacteur qui est le NADPH, agissant comme un donneur d'hydrure ; d'un cation divalent, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , nécessaire pour faciliter le transfert d'hydrure du NADPH par coordination sur le carbonyle du substrat. Enfin, d'un groupement 5-phosphate car il a été montré que le désoxyxylulose (DX) n'est pas un substrat de la DXR, montrant que ce groupement est nécessaire pour l'ancrage dans l'enzyme. Il a aussi été montré que d'un point de vue mécanistique, le NADPH s'attache en premier, suivi par le DXP.⁵⁰

Figure 14 : Représentation cristallographique de la DXR d'*E. coli*.

A gauche est représenté l'homodimère, avec chaque monomère dans une couleur différente. A droite est représenté un monomère en présence du substrat naturel (DXP), du cation métallique en sphère violette et du cofacteur (NADPH).⁵¹

Les structures cristallines de plusieurs DXR sont décrites dans la littérature dont celles d'*E. coli*,^{52,53} de *Zymomonas mobilis*⁵⁴, de *Mycobacterium tuberculosis*.^{55,56} Chacune des structures d'*E. coli* a fourni d'importantes informations sur la DXR et a permis d'élucider la structure de chaque monomère qui sont composés de trois domaines :

- Le premier est le domaine N-terminal (bleu turquoise, Fig. 14), qui est le domaine d'ancrage du NADPH. Il englobe le repliement de Rossmann et correspond aux résidus 1 à 150. Ce repliement peut se retrouver dans les protéines impliquant l'utilisation de cofacteurs tels que le NADPH. Dans le cas de la DXR, il est composé de 7 feuillets β parallèles encadrés par 7 hélices α .

- Le second domaine, dit central (vert), s'étend des résidus 160 à 285. Il est désigné comme connecteur car il assure la connexion entre les deux autres domaines et contient le site actif de la protéine ainsi que le site de fixation du métal. Il est important de noter qu'on y retrouve également une boucle catalytique dont la région recouvre les résidus allant de 206 à 216. Celle-ci s'ouvre et se referme en fonction de la présence des cofacteurs dans le site actif (Fig. 15). Dans le cas de l'apoenzyme, cette boucle est ouverte alors qu'en présence du substrat naturel **16** (DXP), celle-ci se referme tel un couvercle et favorise le rapprochement entre le NADPH et le substrat pour conduire à la formation du MEP.

- Le dernier domaine dit C-terminal (jaune-or) participe au maintien du site actif et correspond aux résidus 312 à 398.⁵²

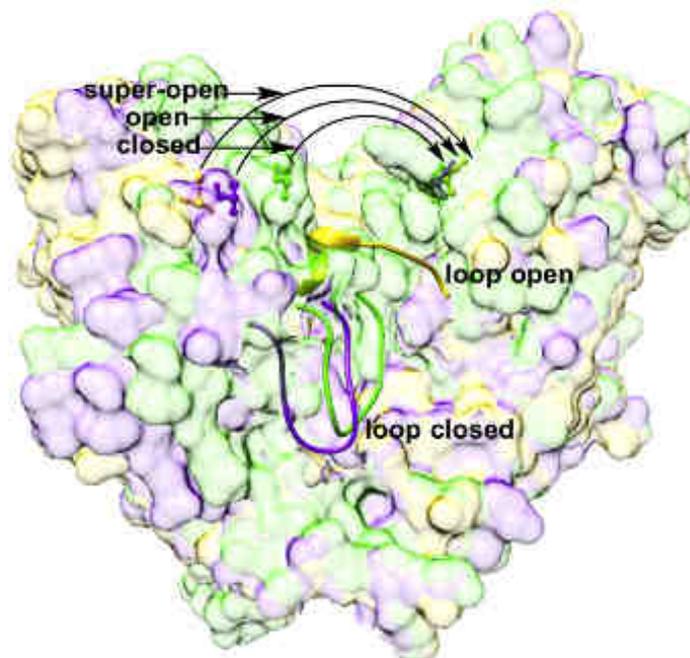


Figure 15 : Conformation ouverte et fermée de la boucle⁵⁷

Le site actif peut lui-même être découpé en trois régions, dont l'étude a été réalisée en présence de la fosmidomycine qui est un inhibiteur naturel connu. Il y a ainsi, une poche chargée positivement, une région hydrophobe autour du squelette carboné et une région amphipathique. Ce site actif contient plusieurs résidus fortement conservés dont Asp150, Glu152, Glu231, Glu234, His209 et His257 mis en évidence d'après les différentes structures cristallisées de la DXR (Fig. 16).

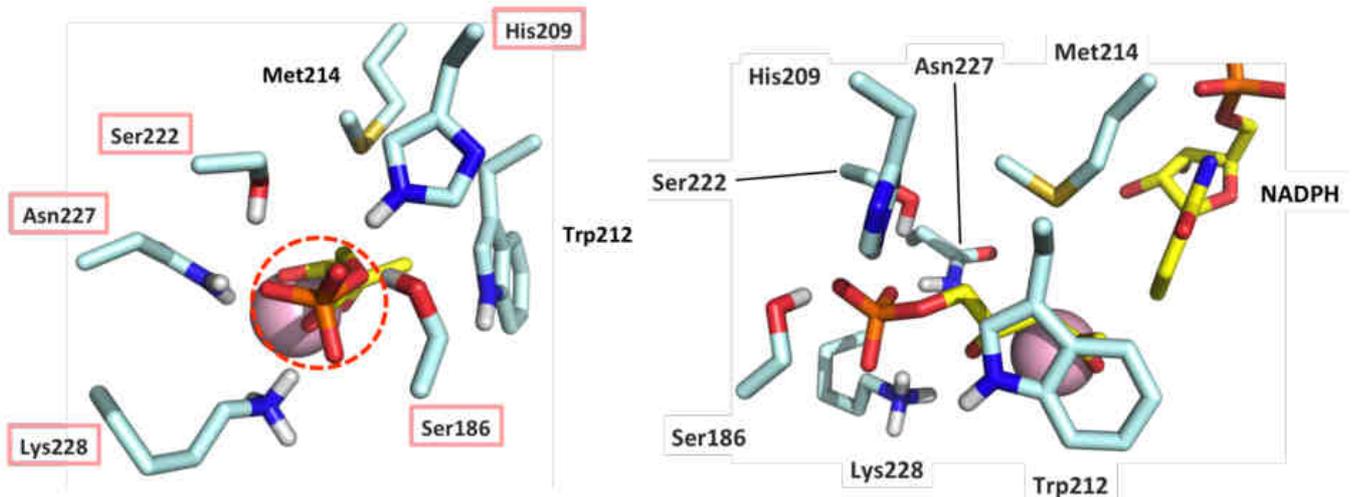


Figure 16 : Résidus hautement conservés.

Les résidus d'intérêt impliqués dans le maintien du substrat et cofacteur sont représentés en bâtonnets. Le cation métallique est représenté en sphère rose.⁵¹

La première poche chargée permet la fixation du groupement phosphate qui est maintenu par des interactions hydrogènes avec les résidus hautement conservés de Ser186, Ser222, Asn227, Lys228 et His209. Ce dernier résidu ayant montré un rôle essentiel dans l'orientation du substrat naturel (DXP).

Dans la seconde région hydrophobe, le squelette carboné est maintenu à l'aide du Trp212. Il a en revanche été observé que la Met214 maintient le substrat naturel mais pas la fosmidomycine et forme dans le cas de cette dernière une interaction hydrophobe avec la Met276.

Dans la dernière région amphipathique, le métal est maintenu à l'intérieur du site actif par les oxygènes des trois résidus suivants : Asp150, Glu152 et Glu231.^{52, 58} Le métal est lié au substrat par chélation avec les oxygènes en position C2 et C3 du DXP ou via l'hydroxamate de la fosmidomycine.

La résolution de la structure de la DXR chez différents organismes a permis d'avancer dans la modélisation d'inhibiteur. D'autre part, d'un point de vue mécanistique, il a été démontré que la DXR agit en deux étapes, une première incluant un réarrangement du DXP **16** en un supposé intermédiaire non isolable qui est le 2-C-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **23** suivi par la réduction de l'aldéhyde en présence de NADPH en MEP **17** (Fig. 17).⁵⁹

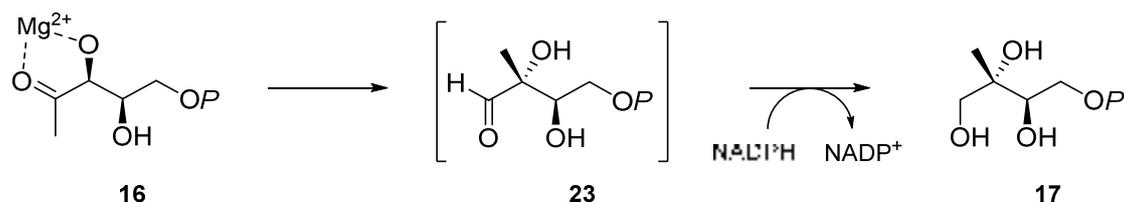


Figure 17 : Réaction catalysée par la DXR

Cette première étape a conduit à de nombreuses études pour élucider le type de réarrangement opérant lors du passage du DXP à l'intermédiaire **23**. Il en ressortit trois propositions de mécanisme réactionnel (Fig. 18). La première proposition était un réarrangement successif 1,2-hydrure puis 1,2-méthyle (mécanisme 1). La seconde était de type réarrangement acido catalysé d' α -céto (mécanisme 2). Le troisième était un réarrangement de type rétro-aldol/aldol (mécanisme 3).^{59,57}

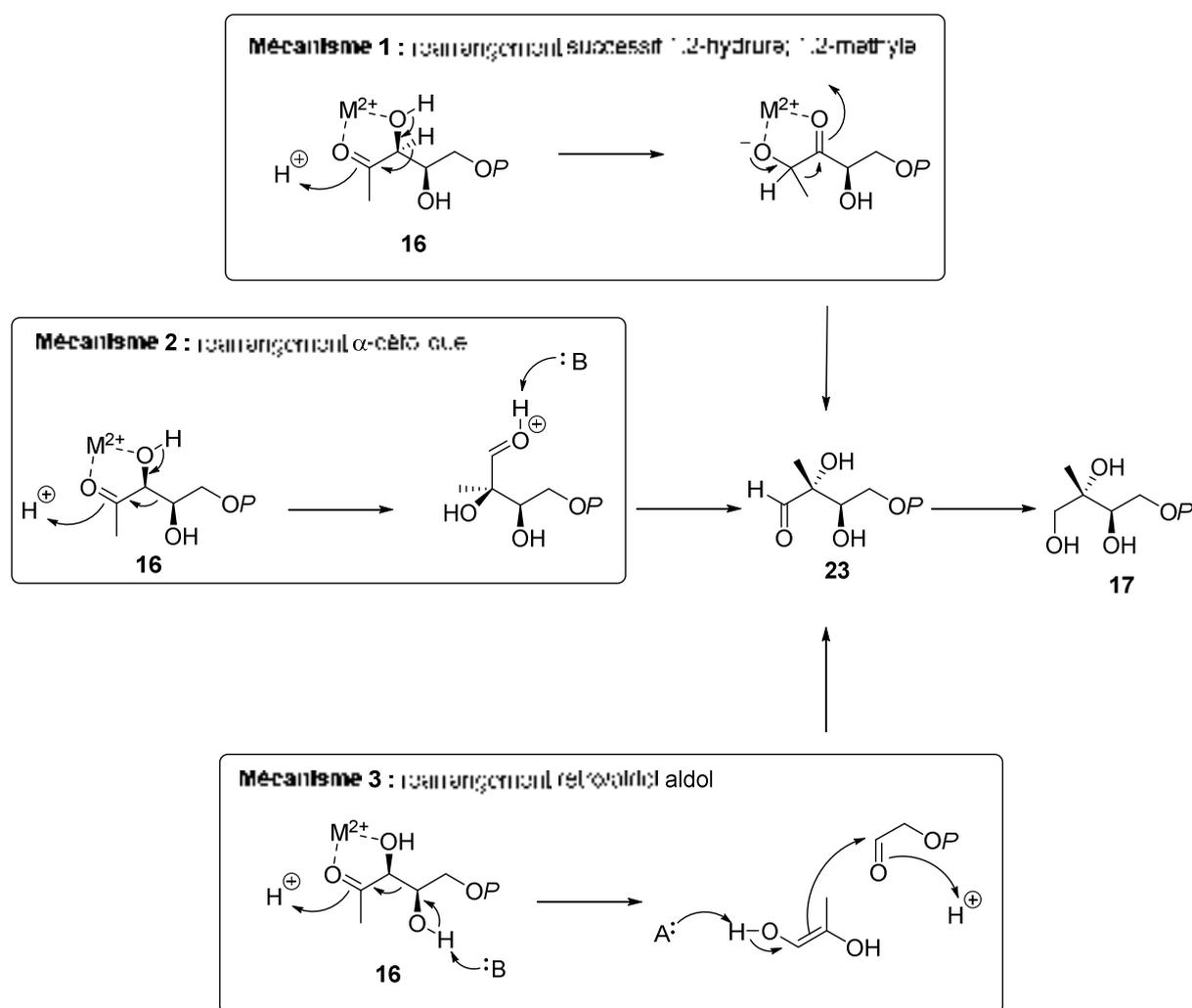


Figure 18 : Mécanismes réactionnels proposés pour la biosynthèse du MEP.

La première hypothèse a rapidement été éliminée suite aux analyses de l'incorporation de glucose marqué au ^{13}C . Les deux dernières ont donné lieu à de nombreux travaux. Ainsi, Poulter et Fox ont

travaillé sur la synthèse d'analogues du DXP, en remplaçant les protons en C1 par un ou plusieurs atomes de fluor (Fig. 19). Leur hypothèse de travail est que le fluor déstabiliserait la formation du carboxonium intermédiaire tandis que cela favoriserait la formation de l'énolate et ainsi la rupture de la liaison C-C.^{60,61} Parmi les inhibiteurs, seuls le monofluoré **26** est substrat de l'enzyme, tandis que les autres ne le sont pas et se sont révélés être de faibles inhibiteurs. Par étude cinétique entre l'incubation avec le DXP ou avec le composé **26**, en présence des cofacteurs sur la DXR, il en est ressorti que le réarrangement intramolécule de **26** se produit plus rapidement qu'avec le DXP, ce qui est en faveur d'un mécanisme rétro-aldol/aldol.

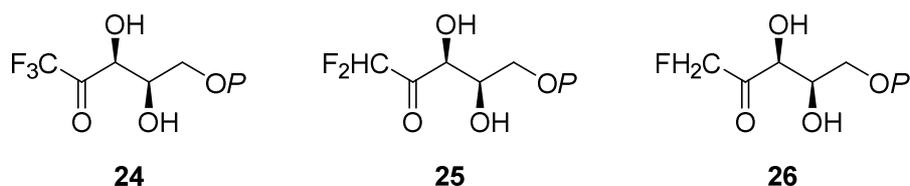
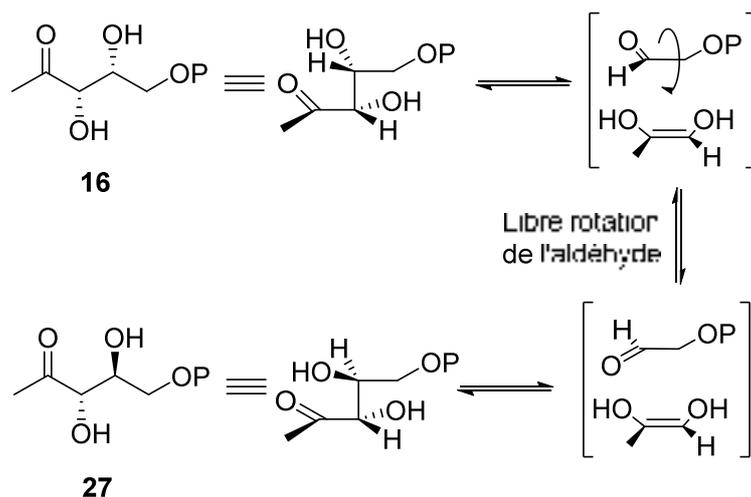


Figure 19 : Analogues fluorés du DXP.

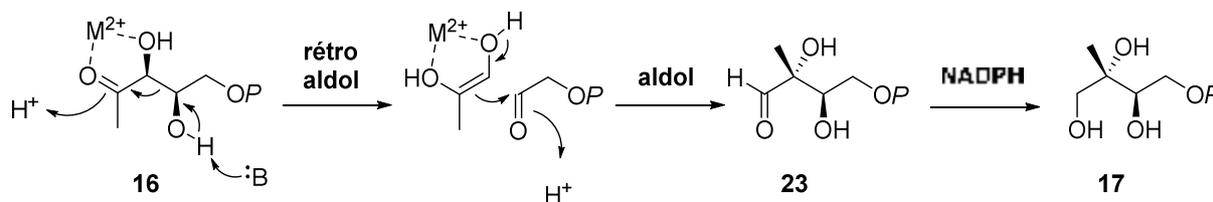
En parallèle, les équipes de Cox et Liu se sont intéressées à l'incorporation de marqueurs isotopiques et au développement d'une étude cinétique sur la DXR, en utilisant des protéines recombinées, obtenues à partir d'*E. coli*. Ils ont ainsi incorporé ²H en position C3 et C4 du DXP. Ces études sont basées sur le fait que les deux mécanismes diffèrent en termes de rupture de liaison, formation, et réhybridation des carbones. Ainsi, dans le cas d'un mécanisme de type α-cétol, les carbones C2 et C3 sont réhybridés tandis que C4 reste inchangé. Au contraire, dans le cas d'un réarrangement de type rétro-aldol/aldol, les carbones C3 et C4 sont réhybridés. Les observations des effets cinétiques isotopiques ont montré qu'il se produit un effet isotopique cinétique secondaire, ce qui va dans le sens d'un mécanisme rétro-aldol/aldol.^{62,63}

Ces résultats ont été confirmés par la formation du L-désoxyribulose 5-phosphate **27** en faibles quantités, qui a été observée lors de l'incubation du DXP avec la DXR purifiée c'est à dire en l'absence de NADPH et de son métal. L'obtention de ce produit ne peut être expliquée que par un mécanisme de type rétro-aldol/aldol car, en présence de Mg²⁺, l'aldéhyde formé (glycoaldéhyde phosphate) ne peut pas tourner librement dans le site actif, conduisant à l'unique formation du 2-C-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **17**. Alors qu'en l'absence de celui-ci, l'aldéhyde peut effectuer une rotation de 180° et conduire au composé **27** (Fig. 20).⁶²

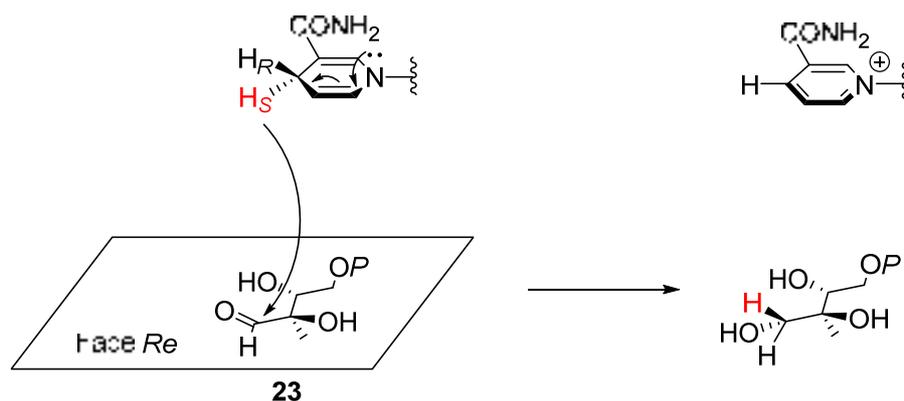
Figure 20 : Mécanisme pour la formation du L-désoxyribulose 5-phosphate **27**.

Ainsi, par rotation, ce n'est plus seulement la face *Si* qui est disponible pour l'aldolisation par l'énol, mais également la face *Re*.

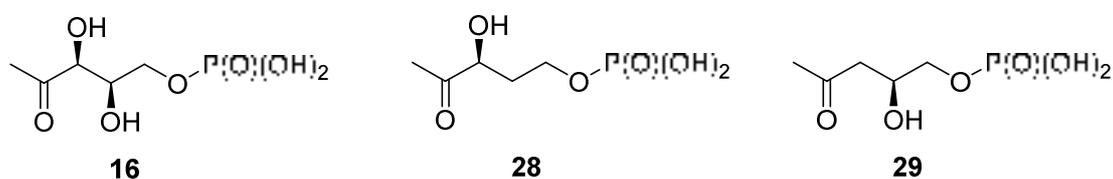
C'est donc un réarrangement de type rétro-aldol/aldol qui a été prouvé (Fig. 21). Le DXP **16** se fixe en premier lieu dans le site actif par chélation des oxygènes en C2 et C3. Il s'en suit un clivage au niveau de la liaison C3-C4 de manière rétro-aldolique pour générer deux intermédiaires, l'énolate d'hydroxyacétone et le glycoaldéhyde phosphate. Ces deux molécules sont ensuite réunies par une réaction aldolique pour former une nouvelle liaison C-C conduisant à l'aldéhyde **23**. La réduction consécutive de l'aldéhyde en présence de NADPH conduit au MEP **17**.

Figure 21 : Mécanisme de type rétro aldol/aldol pour la formation du MEP **17**.

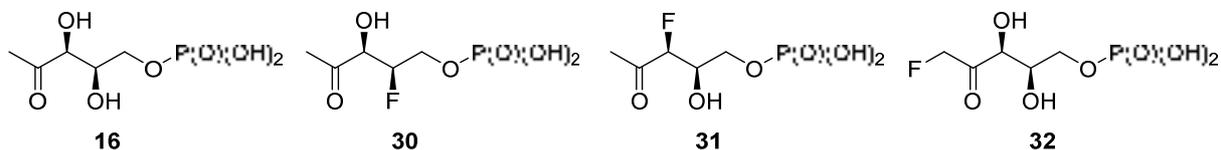
Cette réduction se fait via une stéréochimie particulière. Les équipes de Proteau et Arigoni ont étudiés celle-ci chez *Synechocystis* sp. PCC6803, *Liriodendron tulipifera* et *E. coli*.^{64, 65, 66} Les différentes études ont permis de montrer que le proton *pro-S* en C1 du MEP dérive du C3 du DXP, indiquant que l'attaque de l'hydrure se produit sur la face *Re* de l'intermédiaire aldéhyde **23** (Fig. 22). Ainsi, le proton *pro-R* porté par le carbone C1 du MEP provient de l'hydrure *pro-S* de NADPH. Cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénases de la classe B.

Figure 22 : Stéréochimie de la réduction de l'aldéhyde **23** en MEP **17**.

Dans l'optique de compléter les données obtenues grâce aux structures cristallographiques et d'envisager la synthèse d'inhibiteurs de la DXR, des chercheurs se sont intéressés au mode de fixation du DXP dans l'enzyme. Pour cela, d'un point de vue synthétique, il a ainsi été envisagé de créer des analogues du DXP. L'équipe de Rohmer a rapporté en 2002 la synthèse de deux analogues **28** et **29** qui se sont révélés ne pas être des substrats de l'enzyme mais plutôt des inhibiteurs de la DXR ayant des K_i respectivement de 120 et 800 μM sur la DXR d'*E. coli* et 30 et 150 μM sur la DXR de *Synechocystis* sp (Fig. 23).^{59,67}

Figure 23 : Analogues du DXP **16** synthétisés par l'équipe de Rohmer.

Ce sont par ailleurs deux inhibiteurs réversibles de type mixte. Leurs potentiels en tant qu'inhibiteurs a ainsi révélé l'importance des groupements hydroxyles en position C3 et C4.⁵⁹ Pour poursuivre dans ce sens, l'équipe de Wong a remplacé les fonctions hydroxyles par des atomes de fluor.

Figure 24 : Analogues du DXP **16** synthétisés par l'équipe de Wong.

Les deux composés **30** et **31** se sont révélés être des inhibiteurs non compétitifs avec des K_i respectifs de 733 et 444 μM sur la DXR d'*E. coli*, alors que le composé **32** est un substrat de la DXR (Fig. 24). Tout cela a confirmé une nouvelle fois l'importance des deux groupements hydroxyles.⁶⁸

De même, l'équipe de Proteau a rapporté la synthèse de quatre composés avec différentes modifications qui sont le remplacement du groupement méthyle par un éthyle, le remplacement de la méthylcétone par un amide, la modification de la stéréochimie du carbone C4 et enfin, la substitution du phosphate en phosphonate (Fig. 25).⁶⁷

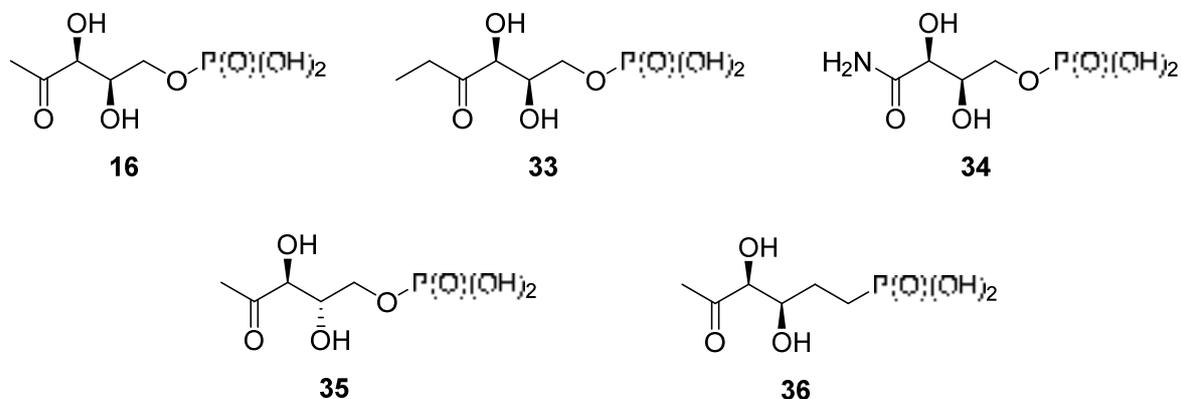
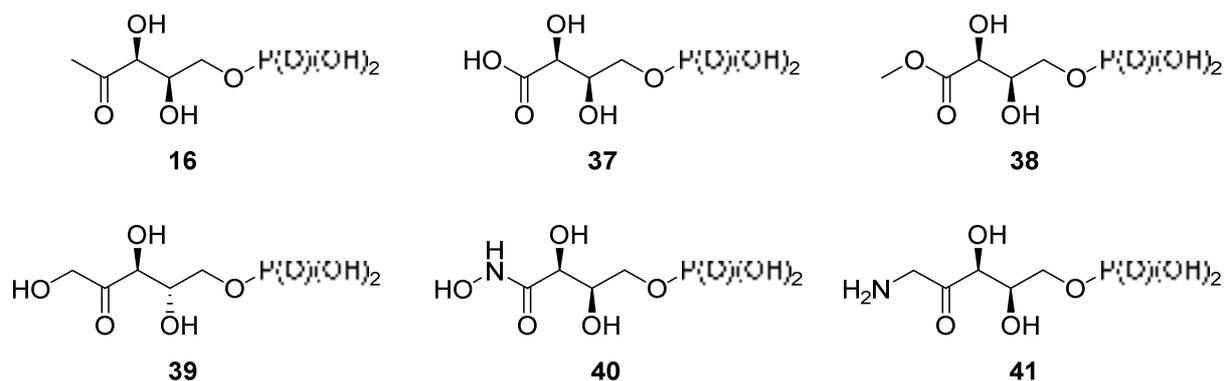


Figure 25 : Analogues du DXP **16** synthétisés par l'équipe de Proteau.

Les trois premiers n'ont pas montré de rôle en tant que substrat alternatif sur la DXR de *Synechocystis*, au contraire du dérivé phosphonate. Ainsi, les trois premiers ont été testés en tant qu'inhibiteurs, ce qui est en effet le cas avec des K_i de 630 μM pour le composé **33**, 90 μM pour le **34** et 180 μM pour le **35**. L'inversion de la stéréochimie pour le composé **35** a montré que celle-ci n'est pas critique pour l'attachement mais est en revanche essentielle pour la catalyse. De même, l'équipe de Rohmer avait étudié le potentiel du composé contenant un phosphonate à la place du phosphate dont la synthèse avait été décrite une année auparavant par rapport à celle de Proteau.⁶⁹ Ils avaient également mis en évidence le fait que ce composé est un substrat de l'enzyme chez *E. coli* mais que celle-ci est moins efficace avec ce composé.⁷⁰

Poulter et son équipe ont également investigué le potentiel des composés **33** et **34** ainsi que le remplacement du méthyle par un hydroxyle, un méthoxy, un hydroxyméthyle, un hydroxyamino et un aminométhyle (Fig. 26).⁷¹

Figure 26 : Analogues du DXP **16** synthétisés par l'équipe de Poulter.

Les trois premiers (**37**, **38**, **39**) se sont révélés être des inhibiteurs, leurs valeurs d' IC_{50} étant de l'ordre du micro molaire mais en revanche les deux derniers (**40**, **41**) ne sont pas des inhibiteurs.

Les valeurs de K_i ou d' IC_{50} de tous ces composés sont intéressantes mais restent très en dessous de ceux de la fosmidomycine et de son analogue méthylé, le FR-900098 qui ont un K_i de l'ordre du nanomolaire sur les DXR d'*E. coli* et *Zymomonas mobilis*. Ces deux composés ont été isolés en 1980 par le groupe d'Imanaka et ont été l'objet de nombreuses études et modifications de leurs structures dans le but de synthétiser de nombreux inhibiteurs. Toutes ces transformations feront le sujet d'un chapitre qui sera développé plus tard.

e. Troisième enzyme de la voie du MEP : IspD

La 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate/MEP cytidyltransférase (IspD) catalyse la conversion du MEP et de la cytidine triphosphate (CTP) en 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol **18** (CDPME) (Fig. 27).

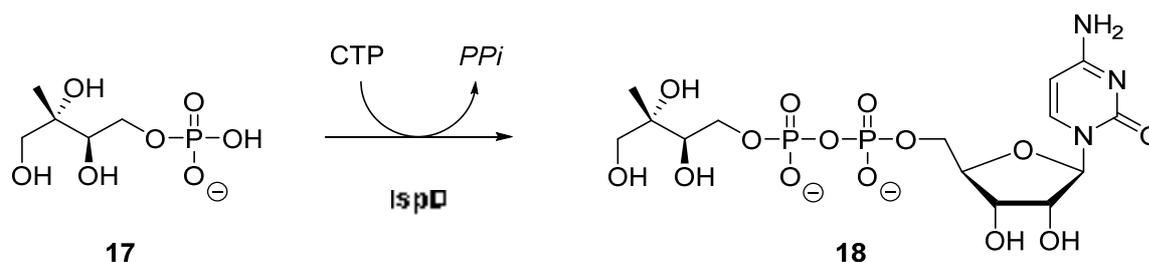


Figure 27 : Etape catalysée par l'IspD.

Cette enzyme est un homodimère dont chaque sous-unité est composée de deux domaines distincts (Fig. 28). Chez *E. coli*, le premier domaine allant des résidus 1 à 136 et 160 à 260 est le plus large et possède une structure α/β , ressemblant à un repliement de Rossmann. Le second domaine, plus petit, allant des résidus 137 à 159, ressemble à un bras incurvé qui s'imbrique avec son symétrique pour conduire au dimère. Au niveau des acides aminés, allant de Pro13 à Arg20, on retrouve une boucle qui séquestre le CTP dans le site actif. La catalyse enzymatique nécessite également la présence du Mg^{2+} .⁷²

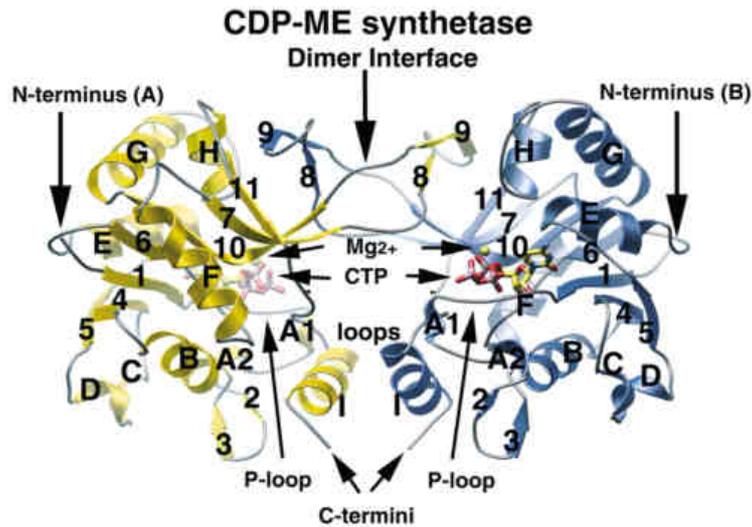
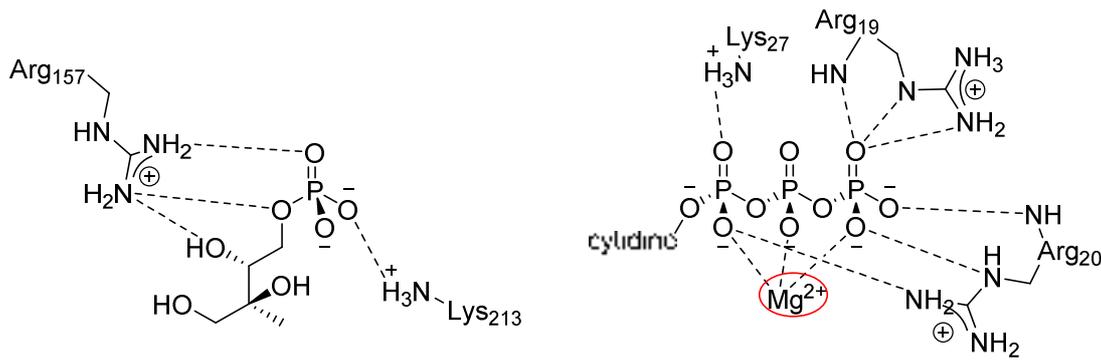


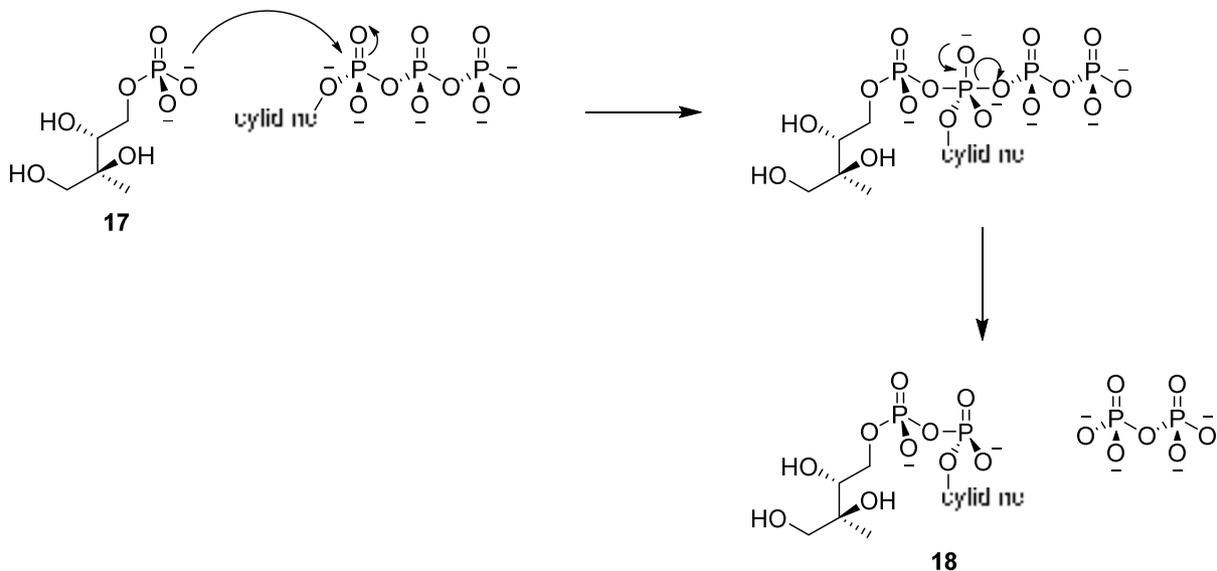
Figure 28 : Représentation cristallographique de l'IspD de *E. coli*.⁷²

Deux molécules de CTP sont représentées en bâtonnets. Un premier domaine est symbolisé en jaune et le second en bleu.

Par comparaison de l'alignement des séquences chez neuf espèces (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* et *Clostridium perfringens*), il a été observé une forte conservation des séquences avec notamment près de 120 acides aminés considérés comme très fortement conservés et 22 strictement conservés.⁷³ Parmi ces 22 acides aminés, 21 participent au niveau du site actif et de l'interface de dimérisation tandis que le dernier est positionné au niveau de la boucle qui est éloigné du site catalytique. Il est à noter que le site actif se trouve à l'interface des dimères, ce qui le rend assez exposé aux solvants. Quatre acides aminés ont particulièrement été mis en évidence pour leurs fortes contributions dans le mécanisme de la réaction enzymatique. Il s'agit de l'Arg20, la Lys27, l'Arg157 et la Lys213 (Fig. 29). Les deux premiers se lient aux groupements phosphate du CTP, positionnant la CTP pour subir l'attaque nucléophile et stabilisant la charge négative du complexe penta-coordonné de l'état de transition. Les deux derniers, se lient au phosphate du MEP et le positionnent près du phosphate α du CTP pour l'attaque nucléophile.⁷³ En même temps, Mg^{2+} assiste dans la neutralisation de la charge négative se développant au sein du complexe penta-coordonné et facilite le départ du groupement diphosphate.⁷⁴

Figure 29 : Contributions des acides aminés dans le mécanisme catalysé par l'IspD.⁷²

D'un point de vue réactionnel, c'est donc le cation divalent qui se fixe en premier au niveau de l'enzyme, suivi par la CTP puis le MEP (Fig. 30).

Figure 30 : Mécanisme pour la formation du CDPME **18**.

Un organisme a cependant montré de grandes différences d'un point de vue séquence. En effet, chez *Plasmodium falciparum*, elle est trois fois plus longue avec pas loin de 734 acides aminés. De plus, parmi les 22 acides aminés précédemment cités, seuls 17 sont conservés.⁷⁵

La synthèse d'inhibiteurs de cette enzyme n'est pas chose aisée. En effet, le faible caractère lipophile de la poche de fixation du CTP et le fait que le site actif soit plutôt exposé aux solvants rendent la conception d'inhibiteurs difficile. L'utilisation du logiciel DoGSiteScorer a par ailleurs montré que dans l'optique de trouver de nombreux inhibiteurs de l'IspD, il serait plus judicieux de se concentrer sur des inhibiteurs allostériques plutôt que sur des inhibiteurs compétitifs du substrat comme cela fut le cas

pour le L-érythritol-4-phosphate **42** qui est le seul décrit et induisant une faible inhibition sur l'enzyme d'*E. coli* avec une IC_{50} de 1.36 mM (Fig. 31).^{76, 77}

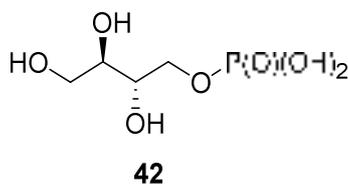


Figure 31 : Inhibiteurs compétitifs du substrat.

En 2011, l'équipe de Diederich a mis en évidence une poche allostérique suite au criblage à haut débit de près de 100 000 composés de la librairie de la BASF. Le composé **43** a montré qu'il ne se fixait pas au niveau du site actif mais dans une nouvelle poche allostérique proche du site actif (Fig. 32).⁷⁸

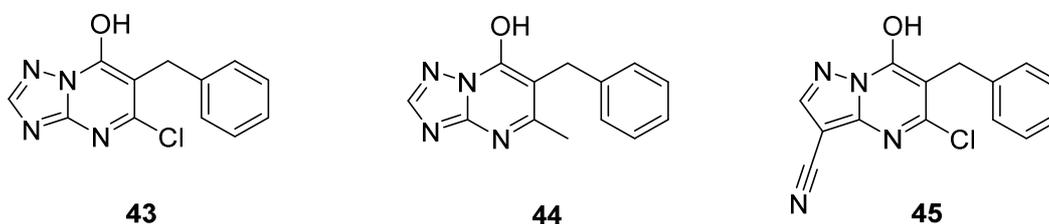


Figure 32 : Inhibiteurs de l'IspD ciblant une poche allostérique.

Ce composé a présenté une IC_{50} de 140 nM, ce qui est fortement amélioré par rapport à celles des précédents inhibiteurs qui étaient de l'ordre du mM. L'optimisation de la structure a mis en évidence deux autres composés, **44** et **45**, ayant de bonnes IC_{50} de respectivement 20 μ M et 35 nM sur l'IspD d'*Arabidopsis thaliana*. Des dérivés sont actuellement à l'étude pour leur potentiel en tant qu'herbicide.⁷⁹

En parallèle, le potentiel des pseudilines, qui avait été mis en évidence par Witschel,⁸⁰ a été étudié par l'équipe de Diederich qui a démontré que ces composés ciblent également une poche occupée par les azolopyrimidines. Cependant, le mode d'action des deux familles de molécules ainsi que leurs structures sont différentes, montrant le haut degré d'adaptabilité de cette poche. D'autre part, les pseudilines ont une inhibition variable suivant les organismes, or elles sont connues pour avoir d'autres cibles biologiques, ce qui semble indiquer que leur efficacité est différente selon les espèces.⁸¹

Cibler cette enzyme semble assez ardu, mais pas impossible, d'autant plus qu'il a été montré que la fosmidomycine serait également efficace contre l'IspD de *Plasmodium falciparum*.⁸² Les premières hypothèses indiquent que l'IspD pourrait être inhibée par le 2-C-méthylérythrose 4-phosphate **23** qui s'accumule du fait de la non-formation du MEP. Autre alternative : cette inhibition serait due à un autre mécanisme encore inconnu.

Le parasite *Plasmodium falciparum* est assez unique et est le principal pathogène responsable du paludisme avec *Plasmodium vivax* qui est significativement moins virulent et bénin dans la majorité des cas mais peut tout de même être mortel. Les données recueillies pour les homologues de *Plasmodium falciparum* ne peuvent être extrapolées dans le cas de l'IspD, notamment d'un point de vue de la cristallographie et de l'efficacité des inhibiteurs précédemment cités. Récemment, un composé, le **MMV-08138**, a été identifié comme inhibiteur de l'IspD de l'apicoplaste de *P. falciparum* (Fig. 33).⁸³ Il présente une IC₅₀ de 7.1 nM, ce qui l'a rapidement placé en tant que leader dans la course pour la découverte de nouveaux antipaludéens. Il présente également une activité d'inhibition à l'encontre de l'enzyme de *P. vivax* (IC₅₀ de 310 nM) bien que l'IspD de *P. falciparum* reste l'orthologue testé le plus sensible à ce composé.⁸⁴

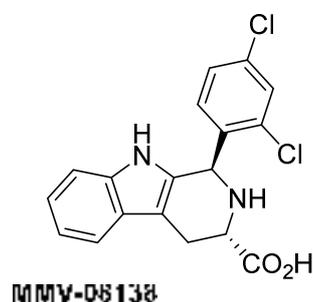


Figure 33 : Inhibiteur de l'IspD chez *P. falciparum*.

Plus récemment, une autre famille de composés a été mise en avant : il s'agit des benzoisothiazolones (BITZ) (Fig. 34).⁸⁵ Sept composés ont été synthétisés et ont présenté une IC₅₀ de l'ordre du nM, le plus probant ayant une valeur de 73 nM (composé **46**) contre l'IspD de *Plasmodium falciparum*. Par docking du composé **47**, l'importance de la Cys 202 a été mise en évidence. Elle forme un pont disulfure via son groupement thiol et l'atome de soufre du BITZ, ce qui bloque le site actif et empêche le substrat naturel de venir se fixer, rendant l'enzyme inactive. Cependant, les composés synthétisés se sont avérés être inefficaces chez *E. coli*, ce qui s'explique par l'absence de cette cystéine. D'autre part, ces inhibiteurs n'auraient pas seulement une activité contre l'IspD, ce qui reste à investiguer.

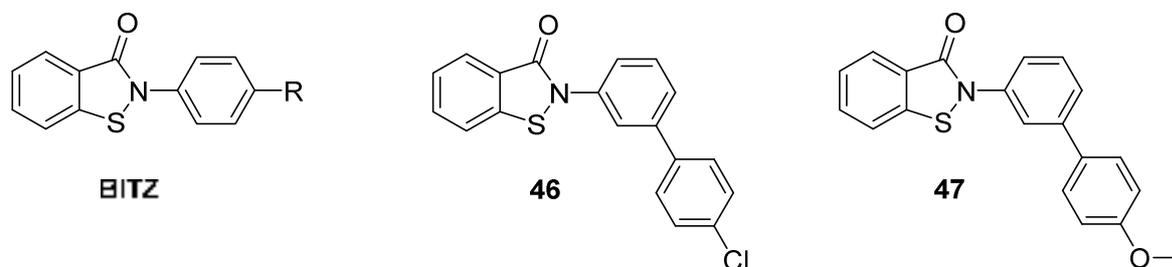


Figure 34 : Inhibiteurs de l'IspD, issus de la famille des benzoisothiazolones.

Malgré la difficulté apparente pour cibler cette enzyme et imaginer des inhibiteurs efficaces du fait de la particularité du site actif, cet objectif semble tout de même possible. L'ensemble des résultats présentés ici vis-à-vis des inhibiteurs n'est qu'un résumé des cas les plus probants. Une autre famille de molécules est actuellement à l'étude, celle du bromure de domiphène (DMB), qui a montré de bons résultats sur des souches de *M. smegmatis*. L'activité inhibitrice du DMB a été observée sur l'IspD par criblage à haut débit et par test enzymatique mais le mécanisme d'action doit encore être démontré (Fig. 35).⁸⁶

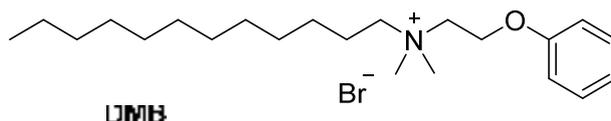


Figure 35 : Inhibiteur de l'IspD.

L'ensemble de ces résultats est encourageant, et, malgré la particularité de l'enzyme de *P. falciparum*, cette enzyme reste une cible de choix dans la recherche de nouveaux antibactériens et antipaludéens.

f. Quatrième enzyme de la voie du MEP : IspE

La 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (IspE) catalyse la phosphorylation du 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol **18** (CDPME) par l'ATP en 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol 2-phosphate **19** (CDP-ME2P) et ADP (Fig. 36). C'est la seule enzyme de la voie du MEP, ATP dépendante. L'alignement des séquences a démontré que l'IspE appartient à la superfamille des galactose/homosérine/mévalonate/phosphomévalonate (GHMP) kinases.^{87, 88}

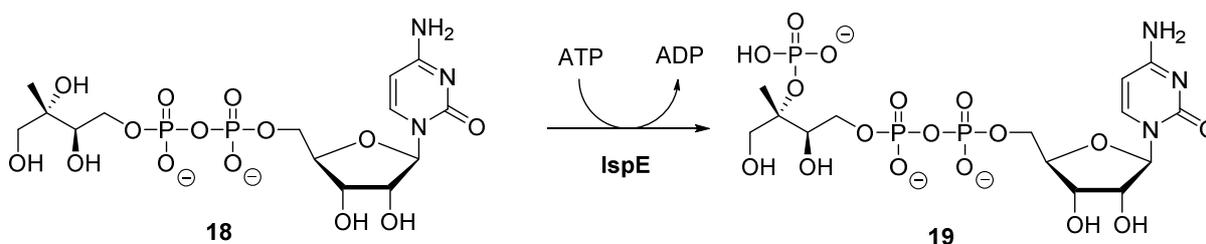


Figure 36 : Etape catalysée par l'IspE.

Cette enzyme est un homodimère dont chaque sous-unité est composée de deux domaines distincts positionnés à chaque extrémité (Fig. 37). Un domaine correspond au site de fixation du substrat (CDPME, **18**), et l'autre au site de fixation de l'ATP. Chez *E. coli*, le premier domaine comprend les résidus 11-33 et 151-274 tandis que le second comprend les résidus 1-10, 34-150 et 275-283. Ces deux domaines sont aussi caractéristiques des GHMP kinases, ce qui peut poser des problèmes pour cibler sélectivement cette enzyme. Néanmoins, des différences significatives au niveau du site actif d'IspE et des GHMP kinases existent, laissant entrevoir la possibilité d'être sélectif.⁸⁹ Cette enzyme a besoin de l'ATP et d'un cation Mg^{2+} pour fonctionner. La purine de l'ATP forme des interactions hydrogènes qui

la stabilisent dans une conformation *syn*, ce qui est en contradiction avec son positionnement habituel vis-à-vis des autres kinases. Le centre catalytique est localisé dans une cavité profonde à l'interface des domaines de fixation du cofacteur et du substrat.

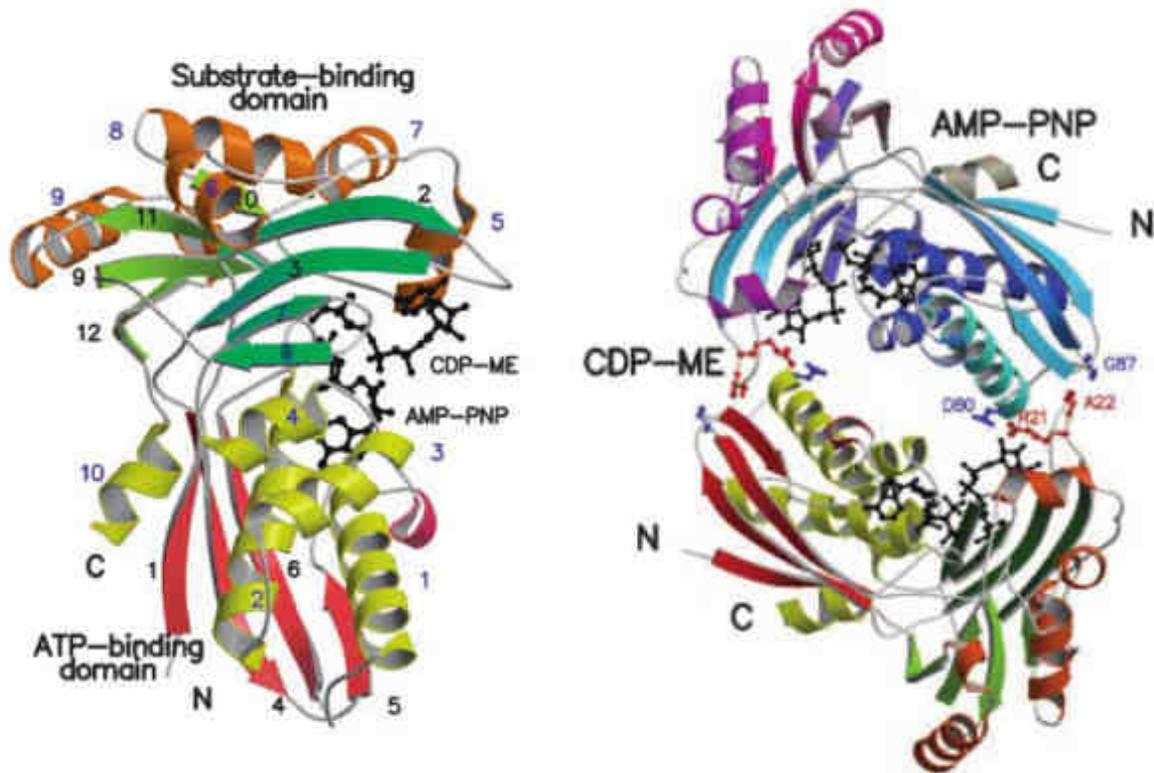


Figure 37 : Représentation cristallographique de l'IspE chez *E. coli*.

A gauche est représenté un monomère, avec le substrat ainsi que l'analogue non hydrolysable de l'ATP, l'adénosine 5'-(β , γ -imino)triphosphate (AMP-PNP) en bâtonnets noirs. A droite est représenté le dimère, où les résidus impliqués dans la formation du dimère sont représentés en bâtons rouges et bleus et le substrat et le cofacteur en noir.⁸⁹

La séquence chez huit espèces (*S. typhi*, *Vibrio cholera*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *M. tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* et *Clostridium perfringens*) a été comparée avec celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les séquences sont particulièrement bien conservées au niveau des sites actifs. Notamment, 16 acides aminés importants dans le mécanisme sont présents chez les neuf espèces et 9 dans au moins six.

D'un point de vue mécanistique, cette enzyme catalyse la phosphorylation du groupement -OH en position C2 du CDPME pour conduire au CDPME2P (Fig. 38).

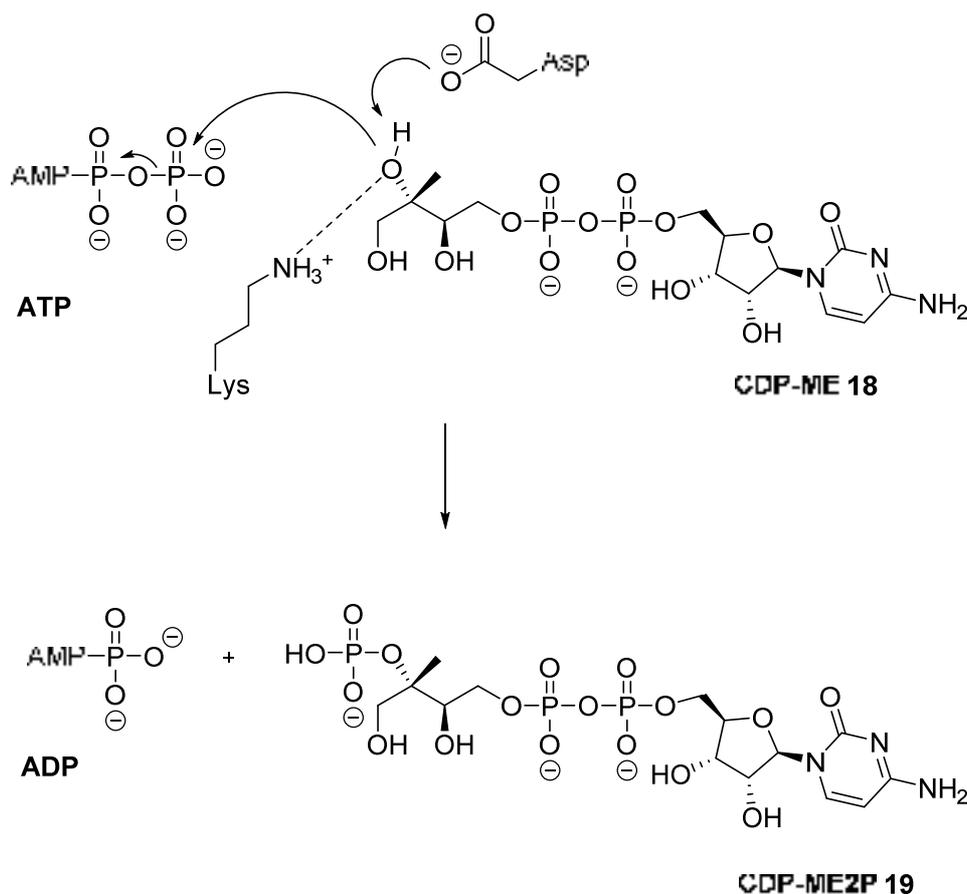


Figure 38 : Mécanisme proposé pour la transformation du CDP-ME **18** en CDP-ME2P **19**.⁹⁰

La première équipe à avoir rapporté la synthèse d'inhibiteurs de cette enzyme est celle de Diederich. Partant du principe que cibler la poche de l'ATP pourrait conduire à un problème de sélectivité par rapport aux autres kinases, ils ont choisi de cibler le site de fixation du substrat et ont mis en évidence la présence d'une poche hydrophobe non occupée par le substrat et proche du site de fixation de la cytidine.^{91, 92} Il a par ailleurs été observé que cette poche est conservée, notamment chez *M. tuberculosis* et *P. falciparum*, confirmant son potentiel. Le meilleur inhibiteur mis en évidence est le composé **48** possédant un sulfonamide propargylique pour vectoriser le cyclopropane dans la poche et un groupement tétrahydrothiophène pour mimer le ribose. Sur l'enzyme d'*E. coli*, ce composé a une IC₅₀ de 1.7 μM (Fig. 39).

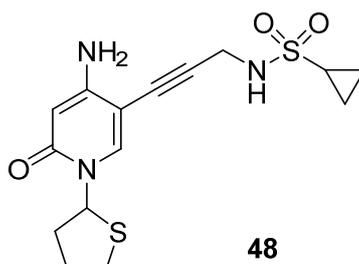


Figure 39 : Inhibiteurs de l'IspE ciblant une poche proche du site de fixation de la cytidine.

Plus récemment, la même équipe a souhaité remplacer le cyclopropane par des groupements plus polaires dans le but de cibler le site de fixation du substrat.⁹³ Cependant, aucun des composés synthétisés n'a montré un réel gain par rapport au composé **48** avec des valeurs d'IC₅₀ supérieures à 500 µM chez l'enzyme d'*Aquifex aeolicus*, qui a été choisie pour son homologie avec les enzymes correspondantes d'organismes pathogènes, et supérieures à 30 µM chez *E. coli* dans le meilleur des cas. Cela démontre ainsi les différences d'affinité suite à la variation d'un seul acide aminé, car la différence entre les enzymes d'*E. coli* et d'*A. aeolicus* vient du remplacement d'une phénylalanine (Phe185) par une tyrosine (Tyr175), cette dernière étant présente chez *M. tuberculosis* et *P. falciparum*. Ils ont également essayé de remplacer le tétrahydrothiophène par différents groupements dans le but d'augmenter la solubilité et la polarité, mais aucun des dérivés n'a été aussi bon que le composé **48**.⁹⁴ Toujours dans l'optique d'augmenter la solubilité, ils ont travaillé sur la conception de transporteur poly(éthylène oxyde)-peptide dont les premiers résultats sont encourageants.⁹⁵ Dans une autre publication, ils rapportent la synthèse de nouveaux dérivés du composé **48** pour optimiser le ciblage de la poche hydrophobe et cibler le site de fixation du phosphate où se trouve une boucle riche en glycines. Ils ont ainsi remplacé le sulfonamide et le cyclopropane par un imidazole tri-substitué ou par un benzimidazole. Les deux meilleurs composés **49** et **50** (Fig. 40) ont des IC₅₀ de 9.9 et 13 µM sur l'IspE d'*E. coli*. L'incapacité de descendre en dessous d'une concentration micromolaire malgré les prédictions de modélisation montre la difficulté de cibler le site de fixation très polaire avec des ligands synthétiques.⁹⁶

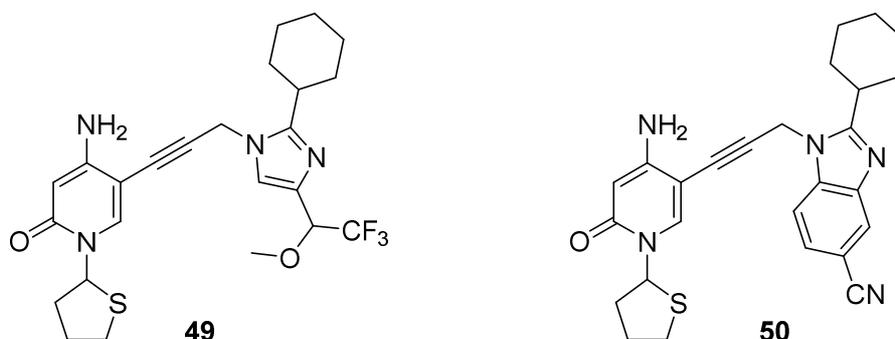


Figure 40 : Inhibiteurs de l'IspE.

La même équipe a également travaillé sur des composés de type diiminoisoindoline (**51**) de dérivés de cytidine (Fig. 41). Ces composés ont été découverts à la suite d'un screening d'une librairie de composés de la BASF mise en évidence dans leur quête vers de nouveaux herbicides et qui ont montré une activité antipaludéenne. Les meilleurs présentent une IC₅₀ de l'ordre d'une concentration nanomolaire à l'encontre de l'IspE de *P. falciparum* NF54 et ont démontré l'importance des isoindolines contre ce même pathogène.⁹⁷ D'autres dérivés n'ont pas montré un réel intérêt en tant qu'inhibiteurs mais ont permis de mettre en évidence des différences entre quatre organismes (*E. coli*,

M. tuberculosis, *A. aeolicus* et *P. falciparum*) au niveau de la poche de fixation de la cytidine, ce qui pourra probablement aider dans la conception de nouveaux inhibiteurs.⁹⁸

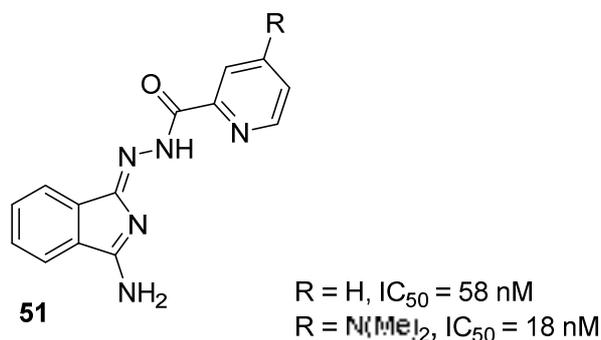


Figure 41 : Inhibiteurs de type diiminoisoindoline.

Dernièrement, toujours au sein de la même équipe, la synthèse de dérivés d'adénosine substitués en position C8 a été rapportée dans le but d'obtenir des dérivés de conformation *syn*.⁹⁹ Cependant, aucun de ces composés n'a montré une activité inhibitrice.

Bien que l'équipe de Diederich ait rapporté de nombreux inhibiteurs, d'autres équipes travaillent aussi sur ce même sujet. Par exemple, l'équipe de Lai travaille sur l'utilisation de petites molécules existantes, connues en tant qu'inhibiteurs des GHMP kinases.¹⁰⁰ Ils ont ainsi mis en évidence le potentiel de deux nouvelles structures (**52**, **53**) qui ont été sélectionnés, car les noyaux aromatiques se lient via des interactions π - π stacking au niveau de la poche de fixation de la cytidine avec des IC₅₀ respectivement de 18 et 5.5 μ M (Fig. 42).

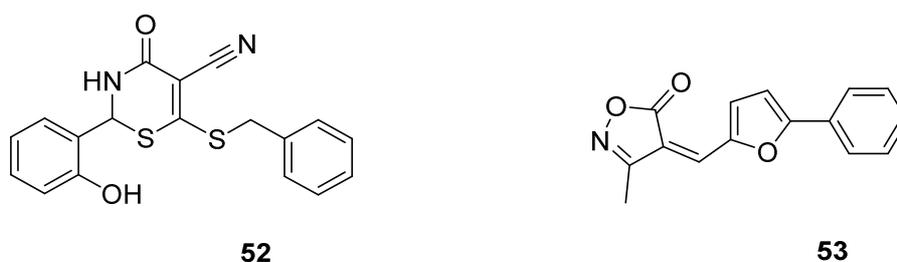


Figure 42 : Inhibiteurs des GHMP kinases, employés pour inhiber l'IspE.

De plus, ces composés n'ont pas montré d'activité inhibitrice envers la galactokinase 1 humaine, montrant la possibilité de sélectivement cibler l'IspE sans toucher aux kinases GHMP.

L'équipe de Brent a rapporté l'identification de nouveaux composés via la combinaison de criblage *in silico* et *in vivo* contre l'IspE d'*Aquifex aeolicus*.¹⁰¹ Trois composés ont montré une activité de l'ordre du micromolaire et des dérivés de ceux-ci ont été testés mais n'ont pas montré d'amélioration. L'équipe de Hagen a également relaté la synthèse d'analogues de pyrazolopyrimidine et plus particulièrement du composé **FOL7185**, dont l'étude doit être poursuivie avec un composé dont le

pouvoir d'inhibition est semblable à celui de la kanamycine sur des souches de *Burkholderia thailandensis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 43).⁹⁰

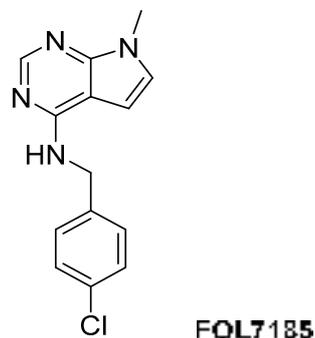


Figure 43 : FOL7185.

Malgré les efforts conséquents réalisés par les différentes équipes dont celle de Diederich, la course vers l'obtention d'inhibiteurs de cette enzyme semble difficile. En effet, le nombre de molécules ayant une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire est faible, et ce but semble difficile à atteindre. Cependant, les différentes études ont démontré la possibilité d'être sélectif vis-à-vis des autres kinases et la récente description de la structure cristallographique d'IspE de *M. tuberculosis* qui a un rôle essentiel dans la croissance de cette bactérie, permettra peut-être d'améliorer la conception d'inhibiteurs.^{102, 103}

g. Cinquième enzyme de la voie du MEP : IspF

La 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) catalyse la cyclisation du CDP-ME2P **19** en 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **20** (MECP) avec libération de cytidine monophosphate (CMP) (Fig. 44).^{104, 105}

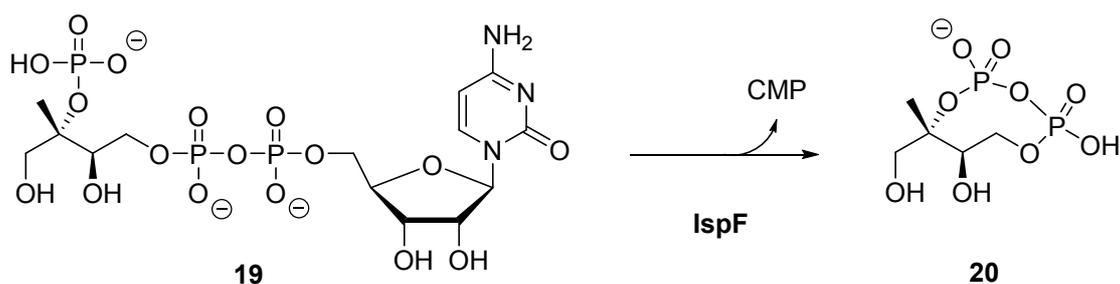


Figure 44 : Etape catalysée par l'IspF.

Cette enzyme est un homotrimer, dont chaque monomère fait 17 kDa.^{106, 107, 108} Au sein de chaque monomère, on retrouve un site actif situé entre chaque monomère adjacent (Fig. 45).

La structure cristallographique de l'IspF d'*E. coli* a permis de mettre en évidence la présence d'un site de fixation du zinc. Ce cation se chélate dans une géométrie tétraédrique avec l'Asp8, l'His10 et l'His42 qui font partie des acides aminés fortement conservés. Le site actif lui-même est situé aux alentours de ce cation, où se trouve le β -phosphate.

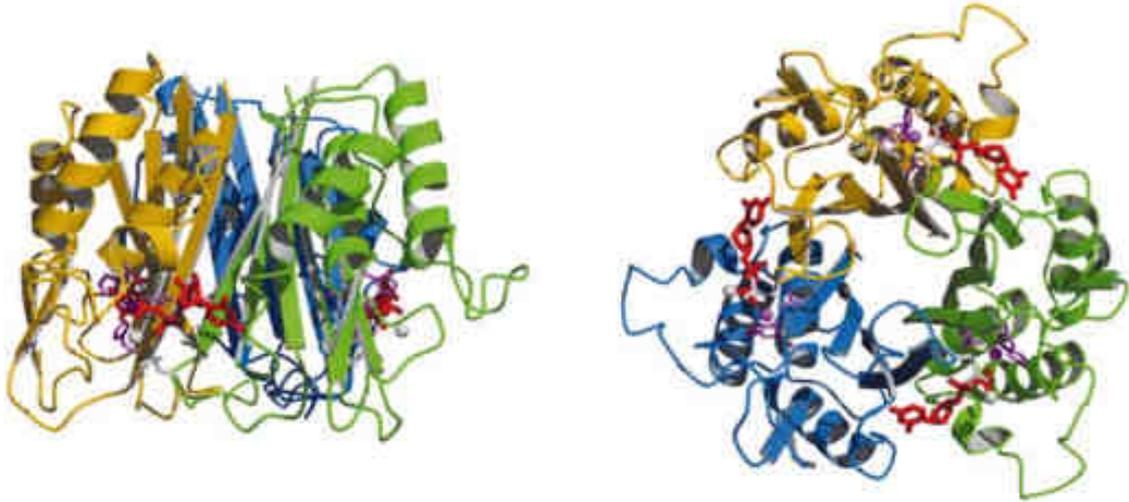


Figure 45 : Représentation cristallographique du trimère de l'IspF d'*E. coli*. A gauche, représentation de côté, avec le CMP signalisé par des bâtonnets rouges, le métal Mg en gris et le zinc et les résidus liés en violet. A droite, représentation du dessus, avec site de fixation de la cytidine à l'interface de deux monomères.¹⁰⁶

Le site de fixation du substrat peut être divisé en trois poches : une centrale qui encercle le groupement ribosyl-5'-diphosphate, une seconde où le 2C-méthyl-D-érythritol 2-phosphate se fixe, puis une troisième, où se lie le fragment cytidine. La seconde est plafonnée par une boucle flexible comprenant les résidus Pro62 à Ala71. De plus, elle permet l'orientation du 2C-méthyl-D-érythritol 2-phosphate de manière à ce que celui-ci puisse subir l'attaque du fragment de diphosphate de cytidine sur le β -phosphate.^{109, 110}

Richard et Kemp ont rapporté la présence d'une cavité hydrophobe qui se situe au cœur de l'enzyme (Fig. 46).^{107,108,111} L'alignement des séquences de plusieurs organismes a démontré que celle-ci est fortement conservée, présumant de son importance d'un point de vue biologique. L'environnement chimique et la répartition de la densité électronique concorde avec la séquestration d'une molécule possédant à la fois une chaîne hydrophobe et une tête négativement chargée semblable aux diphosphates d'isoprénoïdes tels que l'IPP, le DMAPP, le GPP et le FPP.

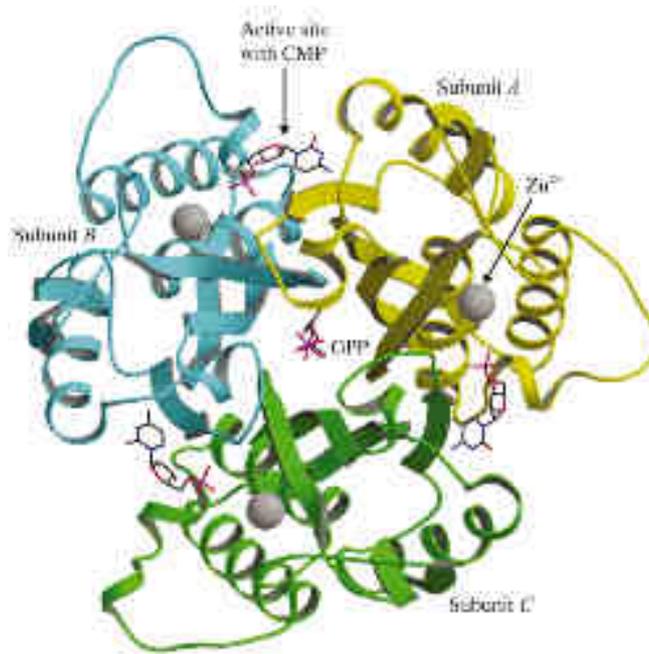


Figure 46 : Structure cristallographique avec le diphosphate de géranyle représenté au centre.¹¹²

Par cristallisation de l'enzyme d'*E. coli*, analyse RMN du ^{31}P et spectrométrie de masse, Kemp a mis en évidence la présence de l'IPP, du GPP et du FPP dans un ratio 1:4:2.^{112,111} Pour expliquer cette présence, il avait été supposé que ces diphosphates d'isoprénoïdes joueraient le rôle de régulateurs de l'activité de l'enzyme par inhibition de celle-ci.¹¹³ Cependant, il a récemment été démontré qu'ils n'inhibent pas l'enzyme.

Une investigation visant à déterminer si les intermédiaires de la voie du MEP pourraient jouer un rôle de modulateur de l'activité de l'IspF, a révélé que la présence du MEP augmente d'environ deux fois la production CMP et cette augmentation est maintenue pendant 24 h. En revanche, le complexe IspF-MEP est lui inhibé, par le FPP. Ainsi, en l'absence du MEP, l'enzyme serait insensible aux quatre diphosphates d'isoprénoïdes, mais une fois en place, le MEP entraînerait un changement de conformation qui induirait une sensibilisation de l'enzyme au FPP. La régulation de l'activité de l'enzyme se ferait donc à ce niveau-là. Si ce rôle est avéré, il semblera donc intéressant de cibler à la fois la DXR, ainsi que l'IspF dans le but d'être le plus efficace.

D'un point de vue mécanistique, l'IspF catalyse la formation intramoléculaire du 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **20** suite à l'attaque du 2-phosphate sur le groupement β -phosphate du fragment diphosphate de cytidine (Fig. 47). Tout cela se déroule en présence d'un cation divalent Zn^{2+} , qui en se chélatant au groupement β -phosphate, décroît sa charge négative et favorise l'attaque nucléophile du

2-phosphate. Un autre cation divalent Mg^{2+} ou Mn^{2+} fixe les phosphates α et β de manière à limiter les torsions d'angles. L'attaque conduit à la libération du CMP, et du diphosphate cyclisé **20**.

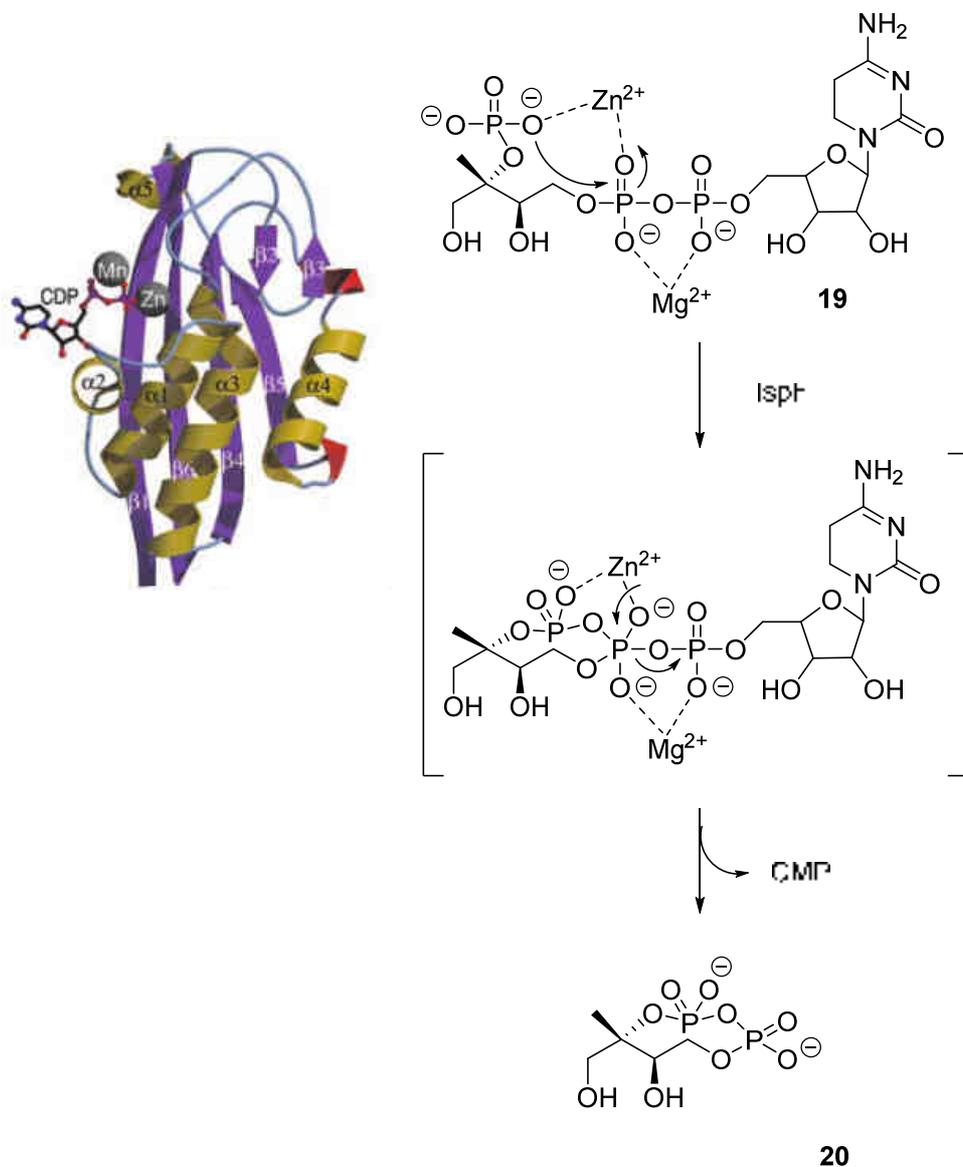


Figure 47 : A gauche, structure cristallographique d'un monomère avec le CDP représenté en bâtonnets et les deux métaux en sphère.¹⁰⁸ A droite, mécanisme de la réaction catalysé par l'IspF.

La forte similitude des séquences et structures chez différents orthologues d'IspF a été établie. La conservation des résidus impliqués dans le site de fixation du zinc, ainsi que ceux impliqués dans la reconnaissance du fragment cytidine du substrat, ont notamment permis d'envisager une approche de conception structurelle pour la découverte de nouveaux inhibiteurs.¹¹⁴

Les premiers inhibiteurs rapportés datent de 2005 et ont été décrits par l'équipe de Diederich.¹¹⁵ Le plus probant **54**, fonctionnalisé avec un groupement dansyle, a présenté une IC_{50} de 3 mM (Fig. 48). Cet inhibiteur a permis de mettre en évidence la possibilité de cibler la région hydrophobe dans la poche du 2C-méthyl-D-érythritol avec des cycles aromatiques.

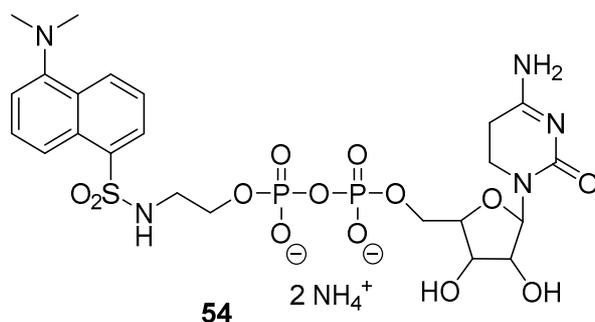


Figure 48 : Inhibiteurs de type dansyle.

Dans la même équipe, en collaboration avec celle de Bacher, des dérivés de cytosine sélectionnés d'après des analyses de modélisation moléculaire et ne comportant pas de phosphate ont été synthétisés (Fig. 49).¹¹⁶ Par rapport aux premiers inhibiteurs, le but était de modifier la cytosine et d'éviter la poche du ribose ainsi que celle très polaire du site de fixation du diphosphate.

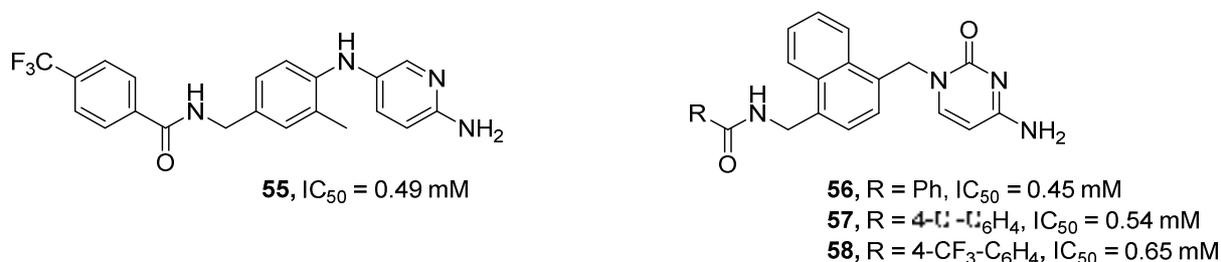


Figure 49 : Inhibiteurs de l'IspF.

Quatre dérivés se sont révélés prometteurs avec des IC_{50} en dessous du millimolaire. De plus, ils ont permis de mettre en avant la présence d'une poche où se loge le cycle aromatique central qui est le connecteur entre le dérivé de cytosine et l'autre cycle qui se fixe dans la région hydrophobe de la poche du 2C-méthyl-D-érythritol.

Toujours au sein des deux mêmes équipes, le criblage d'une bibliothèque de près de 40 000 composés a été réalisé.¹¹⁷ Pour cela, il aurait été souhaitable d'utiliser l'IspF de *M. tuberculosis*, mais cette enzyme s'est trouvée peu appropriée pour cette étude du fait des limitations induites par sa stabilité et solubilité. C'est donc l'IspF d'*A. thaliana* qui a été employée pour les études de criblage. Cela a permis d'identifier des dérivés de thiazolopyrimidine capables d'inhiber l'enzyme. Parmi les dérivés, trois se sont révélés être de bons inhibiteurs avec des IC_{50} comprises entre 1.4 et 1.6 μ M sur la souche NF54 de *P. falciparum*. La corrélation entre le criblage et les activités inhibitrices permet d'envisager d'appliquer cette méthode sur de plus grandes bibliothèques.

Bitok et Meyers, qui ont mis en évidence le rôle du MEP dans la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes via l'IspF évoquée précédemment, ont par la suite étudié le potentiel de plusieurs analogues du substrat en tant que potentiel modulateur de l'activité de l'enzyme seule ou complexant

du MEP.¹¹⁸ Ils ont pour cela choisi trois biphosphonates qui sont des homologues du substrat naturel de l'IspE (CDP-ME, **18**), du substrat naturel de l'IspF (CDP-ME2P, **19**) et le dernier étant aussi un homologue du CDP-ME mais pour lequel il manque le groupement cytidine (Fig. 50). Ils ont été nommés CBPME, CBPME2P et MEBP. Le choix s'est porté sur ces biphosphonates, car l'incorporation d'une liaison stable P-C-P empêchera la cyclisation de se produire, tout en conservant un maximum de similarité pour faciliter leur reconnaissance dans le site actif.

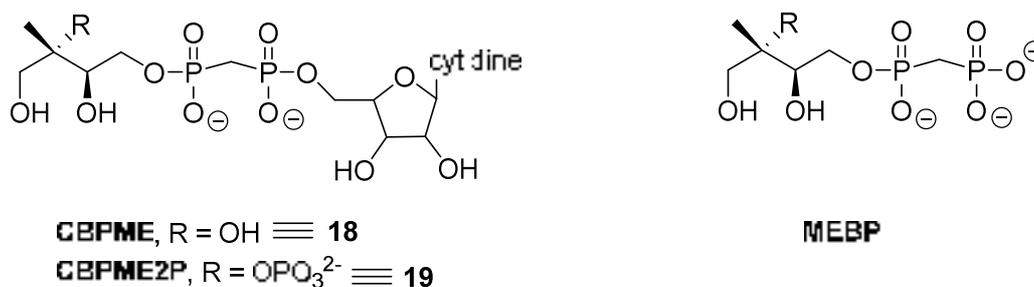


Figure 50 : Homologues des substrats naturels sous forme de biphosphonate.

Cependant, aucun des analogues n'a montré d'activité inhibitrice intéressante. CBPME, augmente l'activité de l'IspF, ainsi que celle du complexe IspF-MEP. De même, CBPME2P n'inhibe pas l'enzyme mais inhibe faiblement le complexe IspF-MEP. Enfin, MEBP augmente et maintient l'activité de l'enzyme mais ne module pas l'activité du complexe. Tout cela montre les différences de comportement de l'enzyme et du complexe en présence des analogues de substrat, confirmant la nécessité de comprendre l'importance du rôle du MEP dans le fonctionnement de l'enzyme pour pouvoir concevoir des inhibiteurs. En effet, il semblerait que la présence du MEP induirait une modification de la conformation de l'enzyme qui altérerait sa susceptibilité vis-à-vis de potentiels inhibiteurs.

Dans la continuité, l'équipe de Poulter a relaté la synthèse d'analogues du MEP et leur évaluation en tant que possibles substrats pour l'IspDF fusionné et l'IspE d'*Agrobacterium tumefaciens*.¹¹⁹ Quatre d'entre eux se sont révélés être des substrats des trois enzymes consécutives. Ainsi la capacité de ces trois enzymes à poursuivre leurs activités enzymatiques sur des analogues, laisse entrevoir la possibilité d'avoir des produits qui inhiberont par la suite les autres enzymes de par leurs modifications acquises au fur et à mesure de leur transformation.

Malgré la nécessité de comprendre le rôle du MEP dans le fonctionnement de l'IspF, le criblage de bibliothèques de composés démontre encore son efficacité par la découverte dernièrement d'une famille d'inhibiteurs ayant des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. Diederich a relevé l'efficacité des bis-sulfonamides aryles avec des valeurs d'IC₅₀ allant jusqu'à 1.4 μM sur l'IspF de *P. falciparum* et de 240 nM sur celle d'*A. thaliana*.¹²⁰

Cependant, en dépit des dernières avancées, peu d'inhibiteurs ont été rapportés dans la littérature. Il reste donc beaucoup de travail pour cibler cette enzyme et la complexité du rôle du MEP pourrait être un frein dans la quête d'inhibiteurs efficaces. Par ailleurs, Rohdich en 1999 puis Lehmann en 2002 avaient déjà rapporté la probable nécessité de cibler en priorité l'IspF avant l'IspE car l'IspF convertit le CDPME en un produit indésirable qui est le 2C-méthyl-D-érythritol 3,4-cyclodiphosphate.^{105,110}

h. Sixième enzyme de la voie du MEP : IspG/GcpE

La (*E*)-1-hydroxy-2-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase (GcpE/IspG) catalyse la conversion du MECP **20** en (*E*)-1-hydroxy-2-méthylbut-2-ényl 4-diphosphate **21** (HMBPP) (Fig. 51).¹²¹

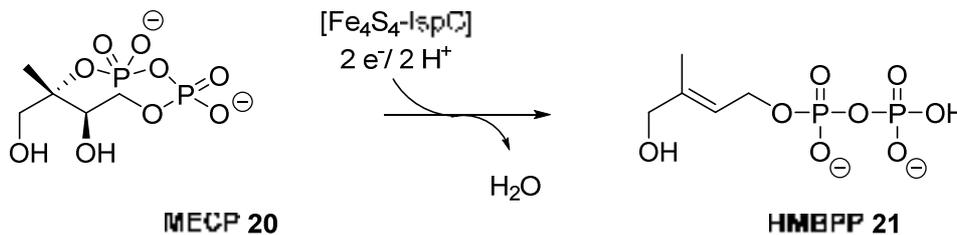


Figure 51 : Etape catalysée par l'IspG.

Il a été observé que cette enzyme nécessite la présence d'un cluster $[4\text{Fe-4S}]$.^{122, 123} Ce cluster, doit être couplé avec un système permettant la réduction de la forme oxydée $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Chez *E. coli*, ce système comprend la flavodoxine, la flavodoxine réductase et le NADPH déjà présent chez la bactérie. Cependant, ce système est inefficace chez certaines bactéries et surtout la flavodoxine est absente chez les plantes. L'équipe de Rohmer a ainsi démontré que la chaîne de transfert d'électron présente dans la photosynthèse est capable de transférer des électrons au cluster des deux dernières enzymes de la voie du MEP via la ferrédoxine présente dans les thylakoïdes des chloroplastes. Ceci est possible car la voie du MEP est étroitement liée à la photosynthèse de par sa localisation dans les chloroplastes. Ainsi, en présence de lumière, et de ferrédoxine, le cluster peut être réduit sans la présence de la ferrédoxine réductase et du NADPH. Ce système est en revanche nécessaire dans le noir.¹²⁴

Cette enzyme est un homodimère avec une masse d'environ 40-45 kDa par monomère (Fig. 52).

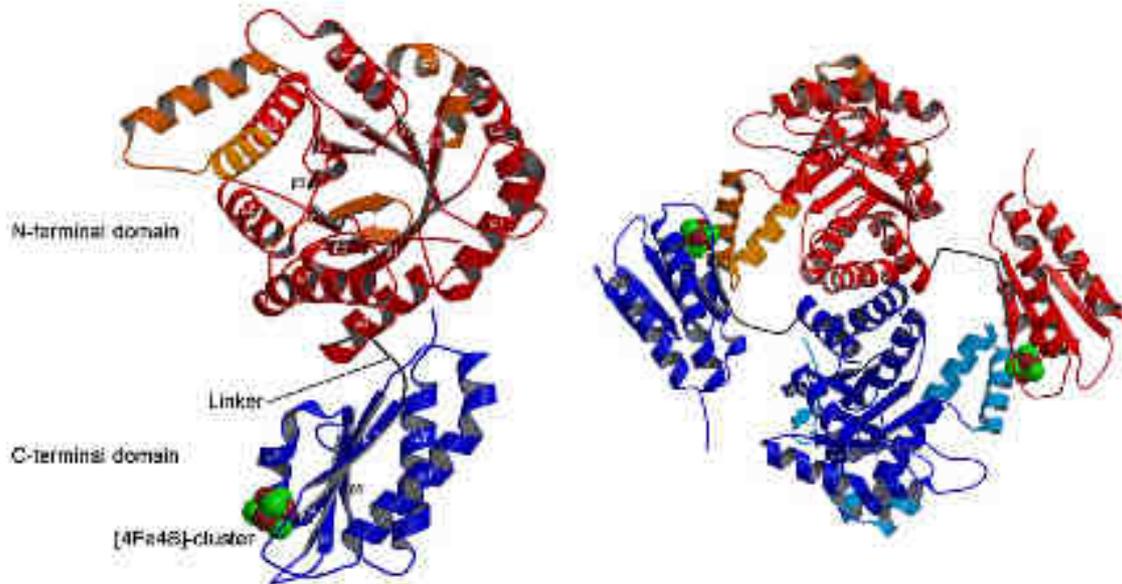


Figure 52 : Représentation cristallographique de l'IspG de *Thermus thermophilus*.
A gauche est représenté le monomère et à droite le dimère avec le cluster représenté par des sphères bordeaux et vert.¹²⁵

Chaque sous-unité est composée d'un domaine C et N terminal, relié par un connecteur assez court, comprenant les résidus 255 à 258. Le domaine N-terminal s'étend des résidus 1 à 254 et consiste en un tonneau TIM (Triose Phosphate Isomérase) qui contient typiquement en alternance, huit feuillets β et huit feuillets α . Le domaine C-terminal, dit domaine α,β , qui commence à partir du résidu 259 et englobe le reste, est le lieu de fixation du cluster [4Fe-4S], via trois cystéines, Cys265, Cys268 et Cys300, et un glutamate, Glu307, qui sont strictement conservés chez les différents organismes (Fig. 53).¹²⁶

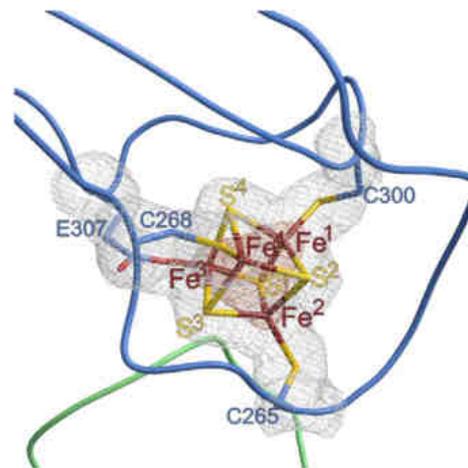


Figure 53 : Représentation du cluster, lié aux trois cystéines et au glutamate.¹²⁶

Le substrat se fixe lui au niveau du domaine N-terminal, qui semble favorable pour la fixation des phosphates chargés négativement et se lie au cluster en remplacement du glutamate.

Chez *Thermus thermophilus*, les deux domaines sont connectés via cinq résidus (286 à 290) qui sont très exposés aux solvants.¹²⁵ Chaque monomère est orienté l'un par rapport à l'autre dans un arrangement de type tête-à-queue donnant lieu à trois points de contact dont le plus important se situe au niveau des hélices 7 et 8 de chaque sous-unités. Le site actif étant localisé à l'interface des deux domaines, cet arrangement permet au substrat et au cluster de réagir ensemble.

Par comparaison des structures en présence du substrat et en son absence, il a été mis en évidence, un état ouvert et fermé. On retrouve ainsi, une certaine flexibilité au niveau du site catalytique ou la fixation du substrat induit une rotation de 64° du domaine C-terminal (Fig. 54).¹²⁷ Le chargement du substrat et la libération du produit se produisant dans un état ouvert alors que la réaction se fait dans un état fermé dans lequel, le site actif est protégé du solvant.

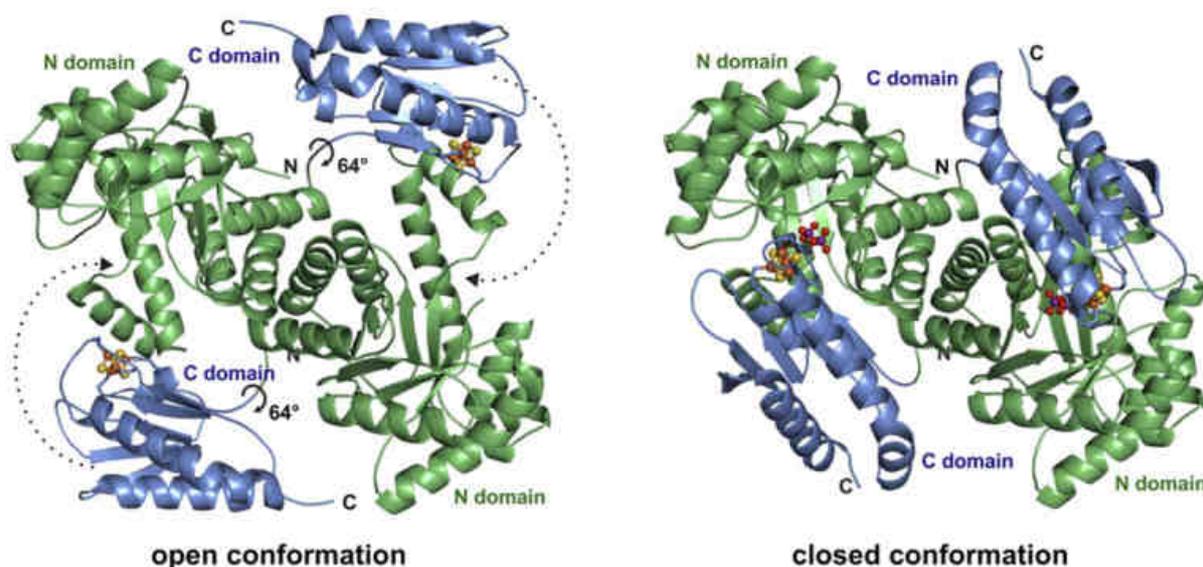


Figure 54 : IspG alternant entre une conformation ouverte et fermée suite à une rotation de 64°.¹²⁸

L'inhibiteur le plus efficace rapporté à ce jour est le diphosphate propargylique **59** ayant une IC_{50} de 750 nM sur l'enzyme d'*E. coli* dont le système de réduction du cluster est méthylviologène/ dithionite à pH 8.0.¹²⁹ Le potentiel inhibiteur des alcènes et alcynes avait été mis en évidence par plusieurs études indiquant que ceux-ci pourraient se fixer au cluster.^{130, 131}

L'élucidation du mécanisme de la réaction catalysée par cette enzyme a conduit à plusieurs spéculations, mais ce n'est que dernièrement que l'identification des intermédiaires a permis de décrire l'ensemble du mécanisme réactionnel, impliquant des intermédiaires ferraoxétanes contenant des liaisons Fe-C et Fe-O.¹²⁸ De plus, l'étude du mode de fixation de l'inhibiteur précédemment cité et de son analogue rallongé d'un carbone a permis d'apporter des informations précieuses pour l'élaboration de nouveaux inhibiteurs. Cependant, ces récentes découvertes doivent encore être validées dans le cas des plantes et de *Plasmodium sp.*, où l'enzyme est constituée de trois domaines.¹³²

L'efficacité des inhibiteurs a toutefois été démontrée *in silico* chez *Plasmodium vivax*, mais des études complémentaires doivent être mises en place pour étudier en détail leurs effets et potentiels *in vitro*.¹³³ Cette enzyme semble donc être une cible potentielle dans la recherche de nouveaux antimicrobiens d'autant qu'elle peut être ciblée simultanément avec l'IspH qui est la dernière enzyme de cette voie.

i. Septième enzyme de la voie du MEP : IspH/LytB

Cette dernière enzyme, la (*E*)-1-hydroxy-2-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase (IspH), catalyse la réduction du HMBPP **21** en diphosphate d'isopentényle **1** ou en diphosphate de diméthylallyle **2** (Fig. 55).

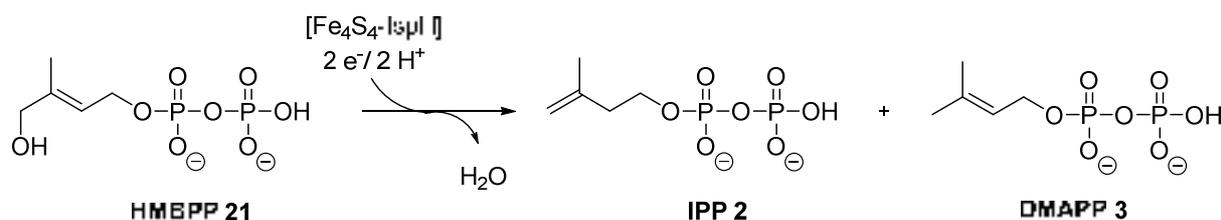


Figure 55 : Etape catalysée par l'IspH.

Tout comme l'IspG, elle possède un cluster [4Fe-4S], qui peut être réduit par le système flavodoxine/flavodoxine réductase et NADPH.¹³⁴ La mise en évidence de ce cluster a conduit à plusieurs études car sa détermination fut plutôt difficile. En effet, plusieurs publications, rapportent la présence d'un cluster de type [3Fe-4S] dans les structures cristallines.^{135, 136} Il s'agit en réalité d'un artefact de dégradation du cluster [4Fe-4S] dont la dégradation oxydative conduit à cet autre cluster.^{134, 137}

Cette enzyme est un monomère d'environ 72 kDa, découpé en trois domaines, D1, D2 et D3 (Fig. 56). Le cluster est situé au centre de la cavité et y est maintenu grâce à trois cystéines totalement conservées (Cys12, 96 et 197 chez *E. coli* et Cys13, 96 et 193 chez *A. aeolicus*), chacune appartenant à un domaine distinct.^{136,135} On retrouve également deux histidines (His42 et His124) qui sont extrêmement conservées. La première jouerait un rôle dans la fixation du substrat en se fixant au diphosphate. La seconde en partenariat avec E126 serait impliquée dans le transfert de proton conduisant à la protonation de l'anion allylique en position C1 ou C3 et ainsi, à la formation de l'IPP ou du DMAPP dans un rapport d'environ 5:1.¹³⁸

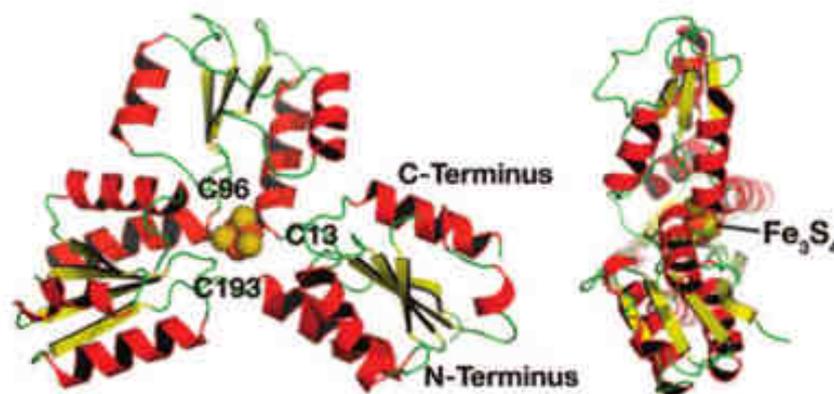


Figure 56 : Représentation cristallographique de l'IspH d'*A. aeolicus*.¹³⁶

A gauche, le monomère représentant un trèfle à trois lobes avec le cluster au centre. A droite, vue de l'ensemble de côté.

L'enzyme est dans un état ouvert en l'absence de substrat et fermé en présence du diphosphate. Cette ouverture est due à l'inclinaison du domaine D3 d'environ 20° pour permettre l'accès du substrat au site actif qui, une fois à l'intérieur, par l'interaction du diphosphate, induit à nouveau un mouvement du domaine D3 et conduit à la fermeture du site actif. Une fois la réaction enzymatique réalisée, la formation de charge négative au niveau du résidu E126 suite au transfert de proton et à la présence de diphosphate chargé conduit à une répulsion entre la protéine et le produit, permettant l'ouverture du site actif.¹³⁹

Comme dans le cas de l'IspG, il s'avère que les alcynes peuvent aussi être de potentiels inhibiteurs du fait de la présence du cluster. Cependant, le diphosphate propargylique **59**, qui était l'un des meilleurs inhibiteurs dans le cas de l'IspG, est moins efficace contre l'IspH avec une IC₅₀ de 6.7 μM sur *Aquifex aeolicus* (Fig. 57). Sa baisse d'efficacité a été expliquée par une longueur de chaîne trop courte dans le cas de l'IspG pour interagir avec le cluster.¹⁴⁰ Cependant, son analogue ayant une chaîne rallongée d'un carbone, soit le diphosphate de 3-butynyle **60**, présente une IC₅₀ de 450 nM sur l'enzyme d'*A. aeolicus*, où le système de réduction du cluster est méthylviologène/dithionite à pH 8.0.¹⁴¹

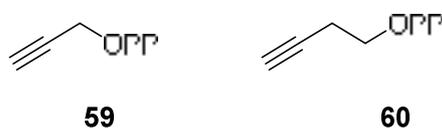


Figure 57 : Inhibiteurs de l'IspG et IspH.

C'est de nouveau l'équipe de Oldfield, qui la même année avait rapporté le potentiel du diphosphate propargylique sur l'IspG, qui a décrit cet inhibiteur.¹⁴¹ Dans le cas de l'IspH d'*A. aeolicus*, la synthèse d'une trentaine de composés a été décrite, et un seul, le composé **60**, a montré une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire, en présence du système de réduction méthylviologène/dithionite à pH 8.0, confirmant

le potentiel des alcynes. Cette étude a cependant également révélé le potentiel des diphosphates de pyridine ayant pour certains une IC₅₀ dans la fourchette basse du micromolaire.¹⁴²

La synthèse d'analogues d'HMBPP ne possédant pas de groupement phosphate a été conduite par l'équipe de Van Calenbergh.¹⁴³ Cependant, aucun des composés n'a démontré d'activité biologique, démontrant le rôle essentiel du diphosphate.

En 2011, les équipes de Poulter, Schünemann et Rohmer ont confirmé l'importance du groupement hydroxy du HMBPP qui dans une première étape se lie au cluster via le dernier atome de fer libre.¹⁴⁴ L'importance de ce groupement a suggéré la synthèse de deux composés **l'AMBPP** et le **TMBPP**, portant respectivement une amine et un thiol à la place de l'hydroxyle (Fig. 58). Ces deux groupements ont été choisis pour leur capacité à se lier à l'atome de fer et leur faible aptitude en tant que groupement partant.

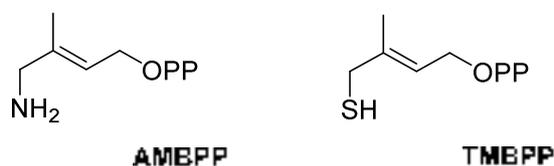


Figure 58 : Inhibiteurs de l'IspH.

Ces deux composés ont montré sur l'enzyme d'*E. coli* une activité supérieure à celle du diphosphate de 3-butynyle **60** avec des IC₅₀ de 150 et 210 nM en présence du système de réduction méthylviologène/dithionite à pH 8.0. Il a été démontré que l'AMBPP se lie de manière réversible et lente tandis que le TMBPP se lie fortement de manière réversible.¹⁴⁵ Il s'avère que ces deux composés inhibent également l'IspG dans une gamme de 0.8 à 2.5 µM sur les IspG de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *A. thaliana* ou le système de réduction du cluster est méthylviologène/ dithionite à un pH de 7.6. Une récente investigation concernant leur mode de fixation au sein de l'enzyme montre un comportement différent chez l'IspH et chez l'IspG, ce qui devra être pris en compte lors de la synthèse d'inhibiteurs ciblant les deux enzymes simultanément.¹⁴⁶ En revanche, le remplacement de l'hydroxyle par un atome de fluor conduit à la formation de l'IPP et du DMAPP.¹⁴⁷

Au sujet du mécanisme d'action de cette enzyme, son éclaircissement est toujours plus ou moins en cours. Celui-ci requière trois étapes qui sont, la perte du groupement hydroxy, le transfert de deux électrons provenant du cluster et la protonation d'entité intermédiaire organométallique possédant la réactivité d'un anion allylique. Pas loin de sept mécanismes ont été proposés pour expliquer le fonctionnement de cette enzyme, mais les avancées récentes convergent toutes vers un mécanisme impliquant la formation de complexes organométalliques.^{138,139, 148, 149, 150} Dans le cas de l'IspH, ce

dernier ne passe pas par la formation d'intermédiaire ferraoxétane comme dans le cas de l'IspG, mais via la formation d'un complexe π suivi d'un complexe η^3 -allyle.

L'élucidation des structures et des mécanismes des deux dernières enzymes a été difficile et nécessite encore de nombreux éclaircissements. Chacune d'entre elles possèdent un cluster [4Fe-4S] lié via trois cystéines et avec un atome de fer lié à un glutamate dans le cas de l'IspG ou une molécule d'eau dans le cas de l'IspH. Les deux enzymes agissent vraisemblablement via un mécanisme impliquant des intermédiaires organométalliques, mais il se pose encore beaucoup d'énigmes non résolues. Par exemple, quel est le système réducteur mis en jeu dans des conditions de croissance normales car ceux décrits pour le moment sont ceux mis en évidence sur l'enzyme purifiée. Ainsi, dans quelle mesure les résultats obtenus sont-ils pertinents car, en fonction du système réducteur utilisés, les données sont variables. Dans le cas des valeurs des IC_{50} déterminées pour le **AMBPP** et le **TMBPP**, celles-ci sont différentes lorsque le système est NADPH/flavodoxin/flavodoxin reductase et méthylviologène/dithionite.^{151, 152,145}

L'avantage de cibler ces deux voies est donc qu'elles catalysent toutes les deux des réactions impliquant la formation de composés organométalliques. Ainsi, la possibilité de cibler les deux enzymes via un seul composé est très intéressante, car cela devrait limiter les résistances dans le sens où ce n'est pas une seule enzyme qui devrait muter mais les deux pour outrepasser l'effet d'une drogue. Cependant, d'un autre côté, d'autres métalloprotéines possèdent ce cluster [4Fe-4S] et il sera donc nécessaire d'être sélectif. Par ailleurs, cibler uniquement l'IspH ne semble pas être un choix réaliste car l'accumulation d'HMBPP qui en découlerait, conduirait à l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$. Or ceux-ci, qui ont un rôle de régulateur dans la réponse immunitaire, en cas d'inhibition de l'enzyme pourraient avoir un effet néfaste.^{153,154}

j. Cible de choix : DXR

L'équipe de Hirsch, grâce à l'utilisation du logiciel DoGSiteScorer, a mis en évidence le potentiel thérapeutique de chaque enzyme.⁷⁶ Certaines s'avèrent être plus prometteuses tandis que d'autres semblent plus difficiles à cibler, même si cela reste toutefois possible avec, par exemple, l'IspD qui possède le site actif le plus lipophile mais pour laquelle il a tout de même été décrit plusieurs inhibiteurs. La présence de poche allostérique pourrait faire partie des points clés dans la synthèse d'inhibiteurs.

La DXR qui est la seconde enzyme de la voie du MEP est l'enzyme la plus largement étudiée avec pas moins de 30 structures cristallographiques de différents organismes dont d'importants pathogènes tels que *M. tuberculosis*, et *P. falciparum*. Avec près de 2 millions de décès chaque année et un tiers de la population infectée, l'incidence de la tuberculose en fait une des maladies les plus sérieuses de

notre époque. De même, la malaria dont l'agent pathogène est *P. falciparum* est un problème de santé mondiale avec environ 500 millions de nouveaux cas chaque année et une mortalité de 1 à 3 millions. L'Organisation Mondiale de la Santé a adopté différentes stratégies concernant ces deux maladies dans le but de réduire d'au moins 90% leur incidence.^{155, 156}

Cibler cette enzyme est donc un choix judicieux de par la connaissance de son mécanisme réactionnel et de par la possession de nombreuses structures d'enzymes d'organismes pathogènes. De plus, il existe déjà deux inhibiteurs, la fosmidomycine et son analogue méthylé le FR900098, utilisés dans des tentatives expérimentales de traitement du paludisme, qui n'ont cependant pas abouti.

II. Fosmidomycine et FR-900098

1. Découverte, activité antibactérienne et limite

La fosmidomycine **61** présente une activité antibactérienne envers de nombreuses bactéries à Gram négatif et également contre certaines bactéries à Gram positif (Fig. 59).¹⁵⁷ Cette molécule ainsi que son analogue méthylé **62** ont été isolés et caractérisés dans les années 1980 par l'équipe d'Imanaka, respectivement à partir de souches de *Streptomyces lavendulae* et de *Streptomyces rubellomurinus*.^{158, 159, 160, 161} Chez *E. coli*, la fosmidomycine entraîne une diminution de la quantité en ménaquinones et ubiquinones et inhibe la biosynthèse des ménaquinones et caroténoïdes chez *Micrococcus luteus* mais elle n'a cependant aucun effet sur *Staphylococcus aureus*.¹⁶² L'équipe de Seto a démontré en 1998 que la fosmidomycine inhibe la biosynthèse des isoprénoïdes chez les organismes possédant la voie du MEP, et que c'est un inhibiteur spécifique de la seconde enzyme de cette voie qui est la DXR avec une IC₅₀ de 8.2 nM sur la DXR d'*E. coli*.¹⁶³ De plus, il a été démontré que la fixation de la fosmidomycine au sein de l'enzyme se fait de manière lente mais forte.¹⁶⁴



Figure 59 : Fosmidomycine **61** et son analogue méthylé le FR-900098 **62**.

Dans la fin des années 1990, après avoir fourni la preuve que *P. falciparum* utilise la voie du MEP, l'équipe de Jomaa a démontré le potentiel de la fosmidomycine ainsi que du FR-900098 dans le traitement de la malaria.^{165,166} Cependant, chez certains patients, guéris après sept jours de traitement, ils observèrent ensuite une recrudescence de la maladie. Il fut alors émis l'idée d'utiliser la fosmidomycine en synergie avec d'autres médicaments. C'est ainsi qu'utiliser celle-ci en association avec la clindamycine apporte de nombreuses améliorations.^{167, 168}

La fosmidomycine est transportée dans les cellules grâce au transporteur du glycérol 3-phosphate (GlpT).^{158, 169} Certaines bactéries comme les mycobactéries ne possédant pas ce transporteur ont développé de ce fait une résistance innée.¹⁷⁰ D'autres ont développé une résistance acquise, via l'incorporation, dans leur génome, du gène *fsr* de résistance à la fosmidomycine codant pour des pompes à efflux situées dans la membrane plasmique et rejetant l'antibiotique dans le milieu extracellulaire.^{171, 172}

Depuis sa découverte et à la vue de sa forte capacité d'inhibition, la fosmidomycine a fait l'objet de nombreuses variations dans le but de conceptualiser de nouveaux inhibiteurs. En effet, même si elle a démontré un réel potentiel, elle a tout de même certaines limites. Tout d'abord concernant son incorporation inexistante chez les bactéries déficientes en transporteurs ou mutées. Ensuite vis-à-vis de son temps de demi-vie assez faible d'environ 1,5 h dans le plasma et de sa faible biodisponibilité nécessitant une administration répétée et à des dosages relativement hauts et enfin, au sujet du caractère très polaire du phosphonate.

2. Fosmidomycine, tête de série pour la conception de nouveaux inhibiteurs

La fosmidomycine ainsi que le FR-900098 font partie des molécules ayant obtenu le plus d'attrait dans la synthèse de nouveaux inhibiteurs. Ceux-ci ont fait l'objet de nombreuses variations à la fois de l'acide rétro-hydroxamique, du bras espaceur et du phosphonate qui sont les trois fonctions jouant un rôle essentiel dans la fixation dans le site actif (Fig. 60).

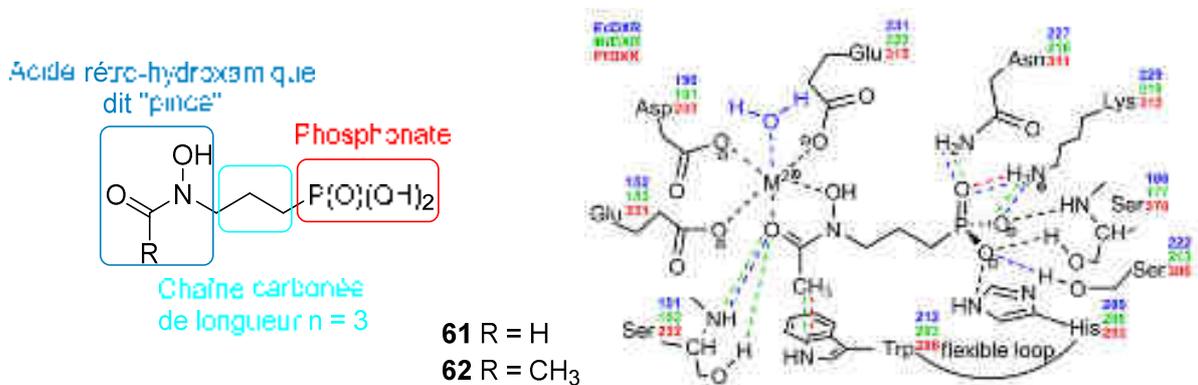


Figure 60 : Fonctions importantes de la Fosmidomycine. A gauche, schématisation de ces trois fonctions. A droite, représentation des résidus et interactions importants vis-à-vis de la pince et du phosphonate chez trois organismes.⁵⁷

En effet, l'acide rétro-hydroxamique chélate le cation divalent, le bras espaceur hydrophobe cible une région du même type et le phosphonate, se fixe au point d'ancrage dans l'enzyme via des liaisons hydrogènes.

a. Modification de l'acide rétro-hydroxamique

Dans l'optique de trouver de nouveaux inhibiteurs, la modification de la pince semble intéressante car les composés comportant un acide hydroxamique souffrent d'une faible biodisponibilité orale, peuvent rapidement être dégradés *in vivo* par hydrolyse, glucuronidation, ou sulfatation et possèdent en général de mauvais profils pharmacocinétiques et toxicologiques.

Au sein de notre laboratoire, de nombreux analogues de la fosmidomycine et du FR-900098 ont été synthétisés. Les plus probants concernant la modification de la pince sont deux analogues portant un acide hydroxamique en remplacement de l'acide rétro-hydroxamique.¹⁷³ Ces deux composés **63** et **64** ont un comportement similaire à celui de la fosmidomycine, c'est-à-dire que ce sont deux inhibiteurs se fixant de manière lente et forte à l'enzyme (Fig. 61).¹⁶⁴ Ils ont cependant une activité un peu inférieure à celle de la fosmidomycine avec des IC₅₀ de 170 et 48 nM sur la DXR d'*E. coli*, mais de manière intéressante, les deux composés et en particulier le second sont efficaces sur des souches d'*E. coli* résistantes à la fosmidomycine.

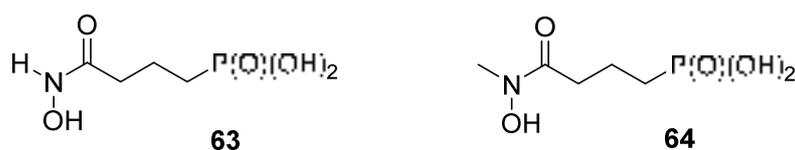


Figure 61 : Inhibiteurs dit en pince inversée de la fosmidomycine et du FR-900098.

Le remplacement de l'acide rétro-hydroxamique par d'autres groupements tels que le catéchol **65**, un hydrazide **66**, un dithiocarbamate **67** ou par un O-méthylhydroxamate **68** n'a pas apporté d'amélioration (Fig. 62).¹⁷⁴

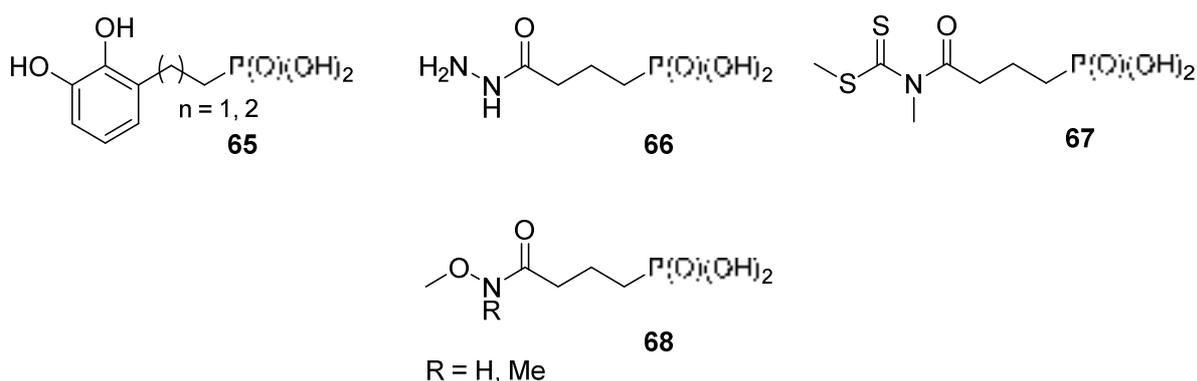


Figure 62 : Analogues de la fosmidomycine modifiés au niveau de la pince.

L'emploi d'un catéchol à la place de la pince avait été précédemment envisagé par les équipes de Deng et Larehd. Le premier a rapporté l'utilisation de groupements lipophiles tel que le catéchol, mais c'est un produit en particulier, la 1-hydroxy-5-phénylpyridin-2-one, qui a obtenu les meilleurs résultats **69**.¹⁷⁵ Cet inhibiteur n'est pas aussi efficace sur la DXR que la fosmidomycine mais est plus actif sur les

bactéries Gram positives, et de manière surprenante, inhibe davantage la croissance de *P. aeruginosa* qui est responsable d'infections d'origine nosocomiale et résistant aux deux antibiotiques ampicilline et kanamycine. En ce qui concerne le second inhibiteur **70**, le catéchol comportant un acide phosphonique, celui-ci possède une bonne IC₅₀ de 41 μM sur *M. tuberculosis* (Fig. 63).¹⁷⁶

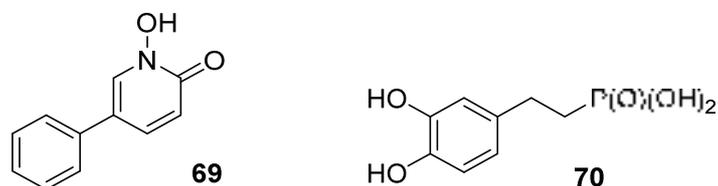


Figure 63 : Inhibiteurs de la DXR de type catéchol et pyridone.

Dans la continuité, l'équipe de Cox a publié la synthèse de différents analogues avec pour principal but d'étudier le mode de fixation de la fosmidomycine dans le site actif de l'enzyme. Des analogues ont été synthétisés en remplaçant la pince par une amine, une amine acétylée, une oxazolidine-2-one et une *N*-hydroxy-oxazolidin-2-one ou encore un groupement alkyle.¹⁷⁷ Aucun des composés ne s'est cependant avéré être un bon inhibiteur avec des IC₅₀ sur l'enzyme d'*E. coli* de l'ordre du micromolaire.

L'équipe de Proteau a rapporté la synthèse de plusieurs analogues testés sur la DXR de *Synechocystis*, en se focalisant sur la modification de la pince chélatante et du phosphonate. Les modifications concernant le phosphonate seront développées dans une autre sous-partie.¹⁷⁸ Ils ont ainsi synthétisé deux dérivés de la fosmidomycine **71** et du FR-900098 **72** *N*-méthylé ainsi que le composé **63** (Fig. 64).

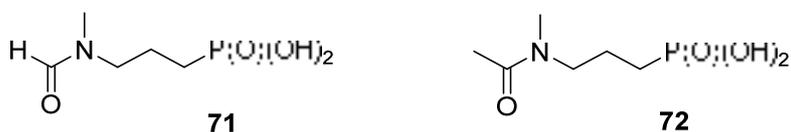


Figure 64 : Inhibiteurs de la DXR de type *N*-méthylé.

Les deux premiers se sont révélés être de faibles inhibiteurs, ce qui est en accord avec les résultats attendus, car en l'absence d'un groupement capable de chélater le métal, la capacité d'inhibition devrait diminuer. En revanche, le dernier a montré un *K_i* bien meilleur que celui de la fosmidomycine dans le cas de *Synechocystis*, ce qui n'était pas si flagrant chez *E. coli*, laissant présager une différence au niveau du site actif des enzymes des deux espèces.

Deng en plus du travail sur le catéchol, a rapporté la synthèse de 41 phosphonates lipophiles et mis en évidence trois composés particulièrement intéressants (Fig. 65).¹⁷⁹

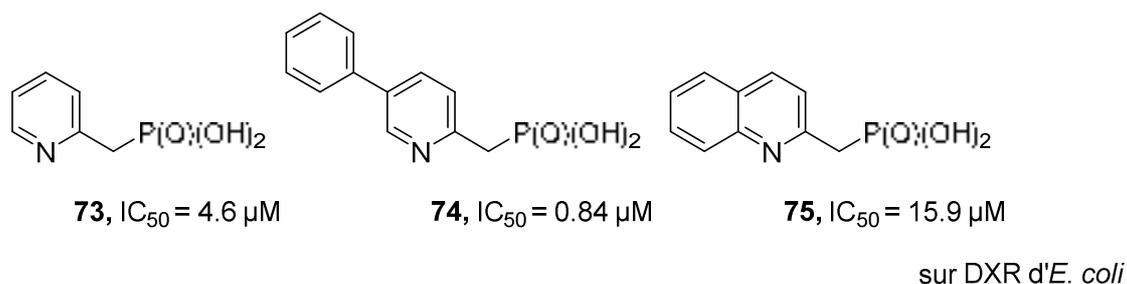


Figure 65 : Inhibiteurs de la DXR de type pyridine.

Ces inhibiteurs présentent un nouveau mode de liaison, entraînant un déplacement de l'indole du Trp211, ouvrant l'accès vers une poche hydrophobe où les cycles pyridines et quinoléines des inhibiteurs (**73**, **74**, **75**) se fixent via de fortes interactions de type π - π stacking et transfert de charges.¹⁸⁰ D'autre part, ils ont observé que malgré leur bonne inhibition sur la DXR d'*E. coli*, ils perdent en général de leur activité sur la DXR de *M. tuberculosis*, du fait d'une perte d'affinité avec l'enzyme contrairement au DXP qui se lie deux fois plus fermement à la MtDXR qu'à la EcDXR.

L'équipe de Kurz qui a largement contribué à la synthèse d'analogues modifiés en position α du phosphonate et dont la grande majorité des résultats seront développés dans une autre sous-partie, a également modifié la pince avec un acide phosphonique **76** ou avec le 2-aminophénol **77** (Fig. 66).¹⁸¹

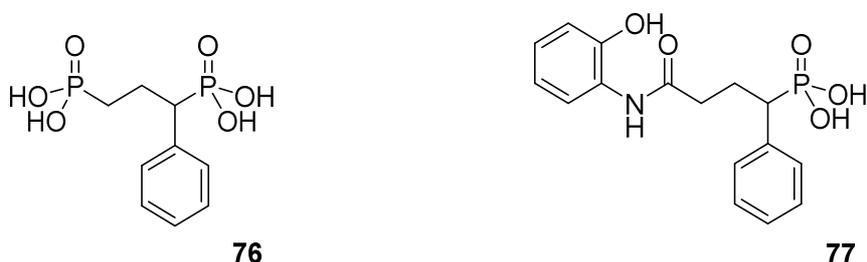


Figure 66 : Inhibiteurs de la DXR possédant une pince modifiée.

La modification de la pince par ces deux groupements a conduit à la perte de l'activité inhibitrice.

Tous ces résultats sont en accord avec la difficulté de trouver un mime de cette pince, chélatant aussi bien le métal que le substrat naturel. Cela illustre donc le rôle prédominant de l'acide rétro-hydroxamique/hydroxamique comme étant le groupement le plus efficace dans la fixation du métal. McCammon, a cependant par des études bio-informatiques, mis en évidence la possibilité d'envisager l'utilisation de pyrone, thiopyrone et hydroxypyridinone, démontrant que ces groupements auraient une affinité similaire avec le métal à celle des acides hydroxamiques.¹⁸²

L'équipe de Virieux a également travaillé sur la modification de la pince avec une famille de composés possédant pour échafaudage commun un acide phosphanyl-phosphonate, ainsi que des analogues *N*-hydroxyimidazole et *N*-hydroxyimidazolone (Fig. 67).

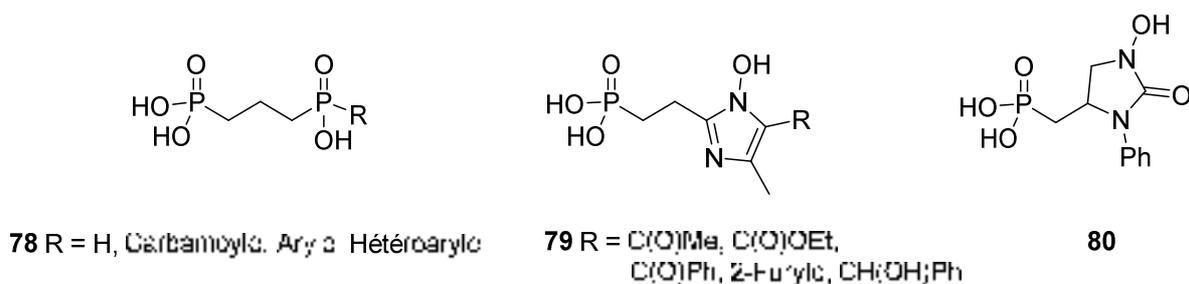


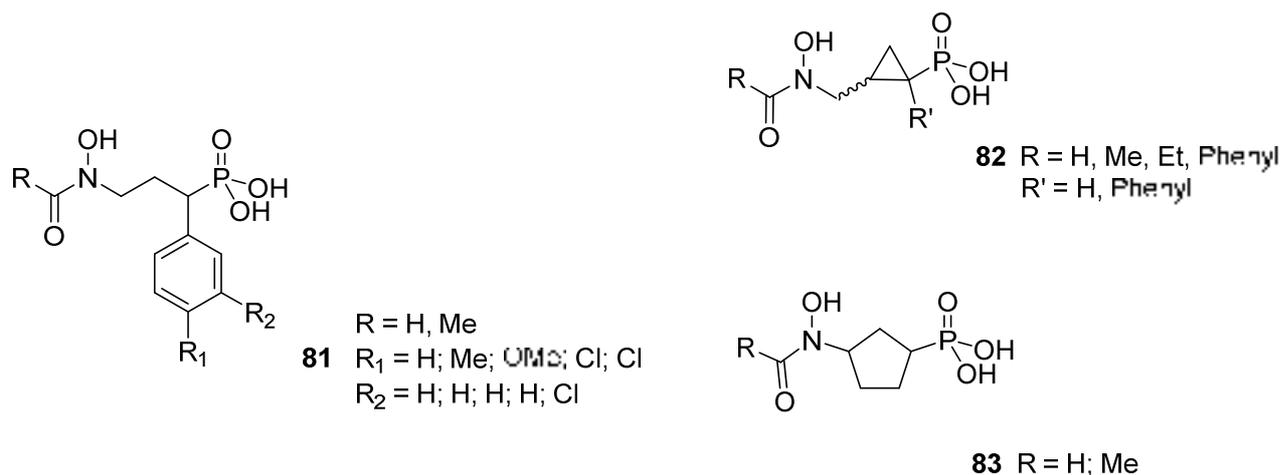
Figure 67 : Inhibiteurs de la DXR de type acide phosphanyl-phosphonate, *N*-hydroxyimidazole et *N*-hydroxyimidazolone.

La première série a été testée *in vivo* sous serre sur des plants de mauvaises herbes mais aucune activité n'a été observée. Les deux suivantes, ont été testées sur des cultures de cotylédons et de nouveau aucune activité biologique n'a été mesurée mais d'autres analogues devraient être évalués.^{183,184}

b. Modification de la chaîne carbonée

La première modification de la longueur de chaîne a été rapportée très tôt par Kamiya en 1982.¹⁸⁵ Les études initiales concernant le rôle d'antibiotique avaient mis en avant le fait que le raccourcissement de la chaîne à deux carbones est défavorable.

Par la suite, la modification de la chaîne par la fonctionnalisation de celle-ci ou la modification des carbones a fait l'objet de nombreuses études. L'équipe de Van Calenbergh a largement participé dans ce sens avec la synthèse de nombreux dérivés. En tout premier lieu ont été synthétisés des analogues fonctionnalisés en α du phosphonate à l'aide de groupement aryle **81** ou incluant les trois carbones de la chaîne dans un cyclopropane **82** ou un cyclopentane **83** (Fig. 68).^{186,187} L'incorporation d'un groupement aromatique électrodéficient en α du phosphonate devait induire une diminution de pK_{a2} de l'acide phosphonique et ainsi augmenter l'interaction de celui-ci avec le point d'ancrage. De plus, de tels groupements pourraient permettre d'augmenter le caractère lipophile des composés, ce qui faciliterait leur pénétration passive à travers la membrane plasmique des bactéries.

Figure 68 : Inhibiteurs de la DXR de type α -aryle, cyclopropane et cyclopentane.

L'ensemble des composés α -aryles se sont révélés être de faibles inhibiteurs de la DXR d'*E. coli* en comparaison avec la fosmidomycine, mais ; en revanche, ils surpassent son activité dans l'inhibition de la croissance de *P. falciparum*.¹⁸⁸ En particulier, le dérivé 3,4-dichlorophényle où la pince est méthylée ou non méthylée (Tab. 2) est très intéressant si on le compare au FR-900098 qui est plus efficace que la fosmidomycine sur *P. falciparum*. Il est à noter que la majorité des composés qui seront décrits ont été synthétisés sous une forme *N*-acétylée sur la pince comme chez le FR-900098, car ce dernier est deux fois plus efficace sur *P. falciparum in vitro* et *P. vinckei in vivo*.¹⁶⁵

Tableau 2 : Valeurs des IC₅₀ des dérivés 3,4-dichlorophényle méthylé et non-méthylé sur la DXR de deux souches de *P. falciparum*.

	IC ₅₀ (μ M) Dd2	IC ₅₀ (μ M) 3D7
Fosmidomycine	0.36	1.1
FR-900098	0.18	0.32
	0.028	0.090
	0.090	0.25

Concernant, les cyclopropanes, le composé ayant montré la meilleure inhibition est le dérivé *trans*-cyclopropyle *N*-acétylée avec une inhibition comparable à celle induite par la fosmidomycine chez *E. coli*

et *P. falciparum*. Au contraire, dans le cas du cyclopentane, c'est le dérivé *trans*-formylé et non acétylé qui a montré la meilleure inhibition. Cependant, dans les deux cas, la rigidification du bras espaceur préfère une géométrie *trans*.

Au vu de ces résultats, ces principes ont été combinés en rigidifiant le bras avec une insaturation en α,β du phosphonate **84** et en ajoutant un groupement aryle en α du phosphonate **85** (Fig. 69).¹⁸⁹

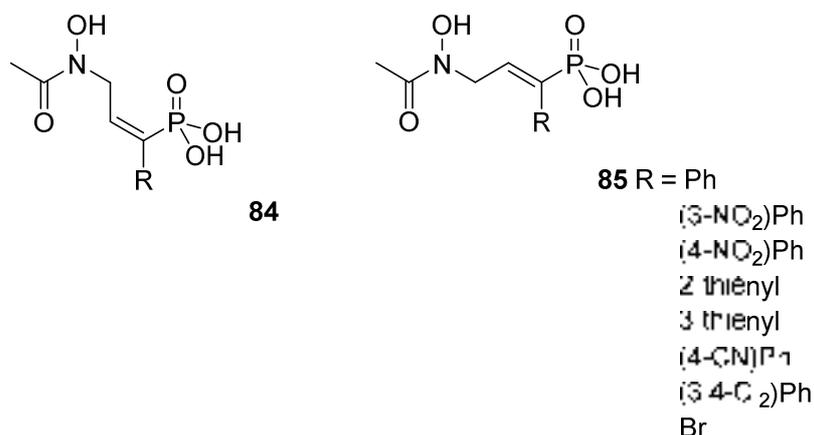


Figure 69 : Inhibiteurs de la DXR possédant une insaturation et une fonctionnalisation en α du phosphonate.

Etonnamment, aucun de ces composés, à l'exception du dérivé bromé, n'a montré d'activité en dessous d'une concentration micromolaire.

Dans la continuité de leur travaux, de nouveaux analogues uniquement fonctionnalisés en α du phosphonate ont été synthétisés.¹⁹⁰ A nouveau, seuls deux composés **86** et **87** ont montré chez *P. falciparum* une activité surpassant celle de la fosmidomycine et proche de celle du FR-900098 (Fig. 70).

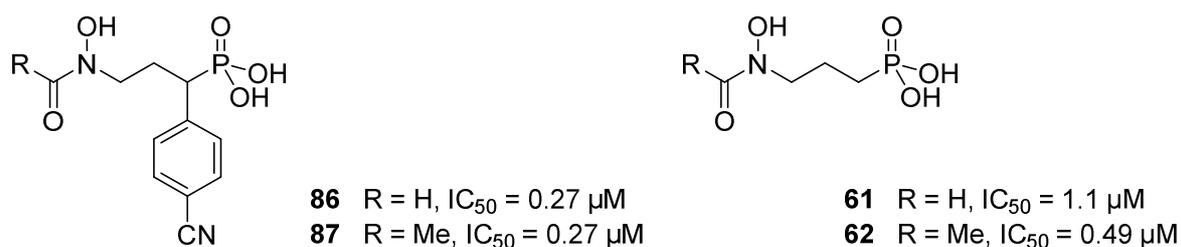


Figure 70 : Inhibiteurs de la DXR avec un groupement α -aryle.

Hormis la substitution en α du phosphonate, l'équipe de Van Calenbergh a également travaillé sur le remplacement des atomes de carbone de la chaîne par des hétéroatomes. Les β - et γ -méthylène ont été échangés par un atome d'oxygène.¹⁹¹ Pour le premier échange, le but était de voir si l'incorporation d'un atome électro-négatif pourrait avoir une influence sur l'acidité du phosphonate et ainsi, réduire son pKa et permettre sa double déprotonation à pH physiologique, ce qui est le cas du phosphate du substrat naturel. En effet, lors de précédents travaux, l'équipe de Proteau avait mis en évidence le fait que la présence d'un groupement doublement ionisable tel qu'un phosphate ou phosphonate jouerait

un rôle important dans la fixation du substrat et des inhibiteurs dans le site de fixation. En ce qui concerne le second échange, le but était d'introduire un oxygène à cette position pour voir si celui-ci pourrait mimer le groupement hydroxy en C4 du substrat qui se lie à trois acides aminés (Glu152, Asn227 et Lys228).

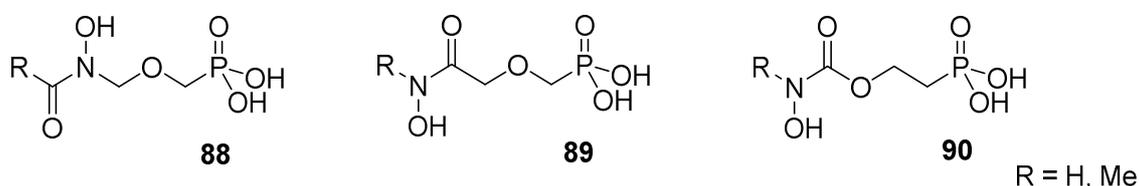


Figure 71 : Inhibiteurs β - et γ -oxa.

Les résultats ont montré que l'incorporation d'un atome d'oxygène est plus favorable en position β avec un seul composé **89** méthylé ayant une activité comparable à celle du FR-900098 (fig. 71).

Proteau et son équipe avaient par ailleurs précédemment décrit la synthèse de l'analogue phosphate de la fosmidomycine. Ce dernier est connu en tant que produit naturel sous le nom de fosfoxacine **91a** et a été isolé à partir de *Pseudomonas fluorescens* PK-52 dans les années 1990 (Fig. 72).¹⁹² Il possède une activité antibiotique et montre un meilleur pouvoir inhibiteur sur la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803 que la fosmidomycine.¹⁷⁸

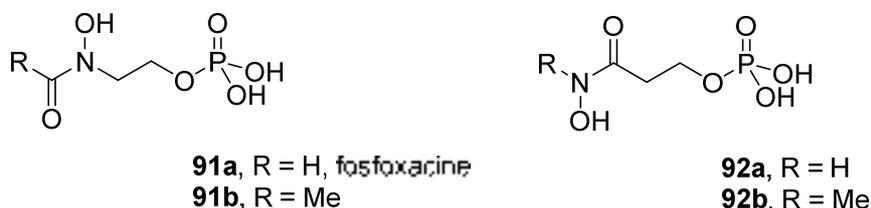


Figure 72 : Fosfoxacine et son analogue méthylé à gauche et leurs analogues en pince dite inversée.

Proteau avait cependant fait la remarque qu'en dépit de son potentiel, le développement de nouveaux antimicrobiens sous forme phosphate pourraient souffrir de leurs propriétés défavorables, car le groupement phosphate pourrait rapidement être hydrolysé par des phosphatases, le rendant biologiquement labile.

Néanmoins, au sein de notre équipe, malgré la faible exploitation des phosphates en tant que potentiels antibiotiques, la synthèse de dérivés de la fosfoxacine en pince dite inversée ainsi que la fosfoxacine, méthylée et non méthylée dans les deux cas a été réalisée et leur activité biologique sur *E. Coli* et *M. smegmatis* a été conduite récemment.¹⁹³ De façon surprenante, et contrairement aux résultats de Proteau, la fosfoxacine **91a** et ses dérivés **91b** et **92a** ont des valeurs d'IC₅₀ supérieures comparés à la fosmidomycine, ce qui est étonnant car nous pourrions nous attendre à une meilleure fixation du phosphate au sein de l'enzyme. En revanche, le composé **92b** est semblable à la

fosmidomycine sur *E. coli* et meilleur sur *M. smegmatis*. Ce qui montre donc que les conclusions apportées par Proteau ne peuvent pas être appliquées à toutes les DXR.

Toutefois, du fait de l'exclusion du groupement phosphate mais de son potentiel, l'équipe de Van Calenbergh a souhaité mimer la nature électronique du phosphate en modifiant la chaîne carbonée. En effet, Nieschalk et son équipe avait démontré qu'un phosphonate de monofluorométhylène serait un bon mime car l'atome de fluor, de par son électronégativité, permet d'augmenter l'acidité du phosphonate de manière à avoir un pKa semblable au phosphate.¹⁹⁴ De plus, les phosphonates α -fluorés substitués ont un angle de liaison C-C-P proche du phosphate, ce qui en fait de très bons isostères géométriques (Fig. 73).

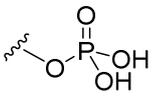
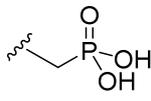
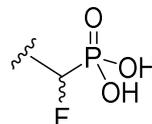
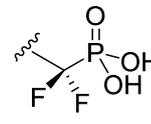
				
Angles C-X-P	118.7	112.1	113.2	116.5

Figure 73 : Angles C-X-P de phosphate et phosphonate déterminés à partir de structures cristallographiques.¹⁹⁴

Ils ont ainsi synthétisé trois analogues α -halogénés avec un atome de fluor ou de chlore (fig. 74).¹⁹⁵

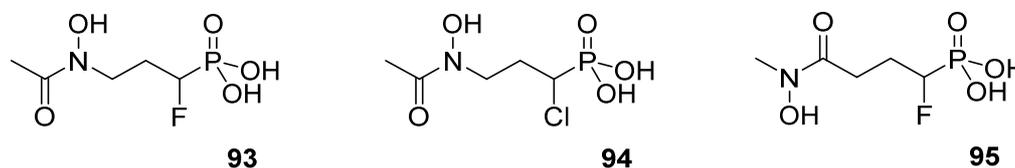


Figure 74 : Inhibiteurs α -fluorés.

Par estimation du pKa des deux premières espèces, ils ont pu en conclure que l'introduction d'un halogène en α décroît en effet la valeur du pKa jusqu'à une valeur semblable à celle du phosphate et qu'ainsi, à pH physiologique, ils seront sous forme doublement déprotonée. De plus, leur évaluation *in vivo* sur deux souches de *P. falciparum* et *in vitro* sur des souris porteuses de *P. berghei* a montré qu'ils égalent voire surpassent la fosmidomycine. Dans une approche semblable, l'équipe de Virieux a souhaité étudier le potentiel de composés difluorés pour leur activité en tant qu'herbicide.¹⁹⁶ Ils ont ainsi réussi à synthétiser la fosmidomycine en pince inversée difluorée, ainsi que l'intermédiaire FR-900098 difluoré sous forme de phosphonate de diéthyle, n'ayant pas réussi à obtenir le produit pur suite à la dernière étape de déprotection du phosphonate. Malheureusement, les deux composés se sont avérés inactifs en tant qu'herbicide.

Du fait des résultats encourageants quant à la fonctionnalisation en position α obtenus par l'équipe et d'autres groupes, l'équipe de Van Calenbergh a continué dans ce sens et a rapporté la synthèse d'une nouvelle série de molécules, possédant un azote ou oxygène en α , de manière à fonctionnaliser facilement avec différents substituants de type azoture **96**, amide **97a**, urée **97b**, éther **98** et triazole **99** (Fig. 75).¹⁹⁷

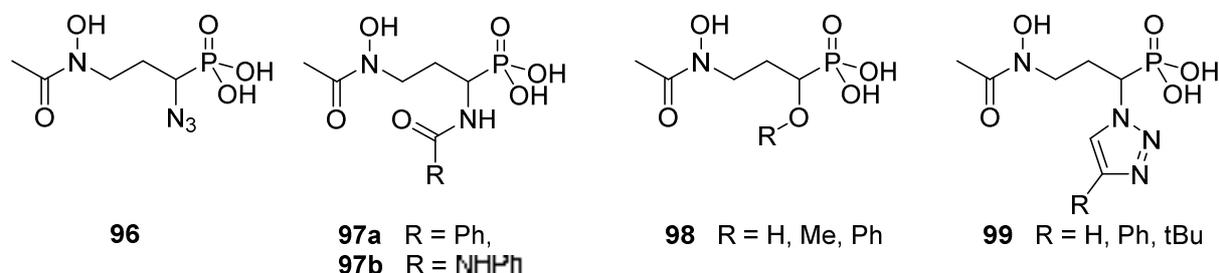


Figure 75 : Inhibiteurs fonctionnalisés avec différents substituants.

Les plus prometteurs, sont les analogues possédant de petits substituants tels que l'azoture et l'hydroxy. De plus, aucun des triazoles n'a démontré une inhibition notable.

L'équipe de Van Calenbergh a également investigué la fonctionnalisation d'analogue en position β , qui a reçu moins d'attention, par l'introduction d'aromatiques (Fig. 76).¹⁹⁸

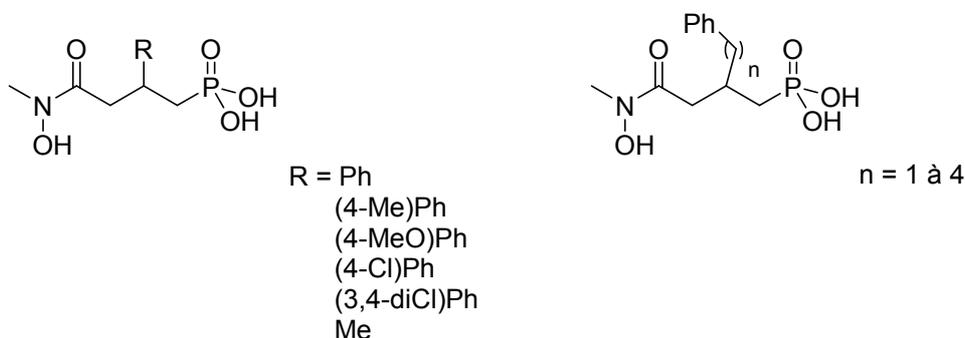


Figure 76 : Inhibiteurs fonctionnalisés en β .

L'ensemble des composés synthétisés n'a pas montré de réelle amélioration avec une faible inhibition, mais ceux portant un groupement phényle avec une longueur de chaîne variable ont démontré une meilleure fixation. Cette étude a toutefois mis en avant une différence de comportement entre les enzymes d'*E. coli*, *M. tuberculosis* et *P. falciparum* ou cette dernière est en général plus sensible aux inhibiteurs synthétisés. De plus, l'étude cristallographique a mis en évidence des modes de fixation différents où dans le cas des composés ayant la plus grande longueur de chaîne, un résidu de la boucle, le tryptophane (Trp211 chez EcDXR, Trp203 chez MtDXR et Trp296 chez PfDXR) est déplacé par le phényle et où celui-ci se retrouve entre ce tryptophane et l'hydroxamate. La modification de ce tryptophane, essentiel pour l'activité de l'enzyme, a déjà été rapportée dans le cas des analogues

pyridine et quinoléine synthétisés par Deng et son équipe. Des études complémentaires visant à étudier les propriétés lipophiles, électroniques et stériques de nouvelles chaînes latérales a permis de mettre en évidence de nouveaux composés dont l'efficacité se rapproche de la fosmidomycine et du FR-90098 sur *P. falciparum* (Fig. 77).¹⁹⁹

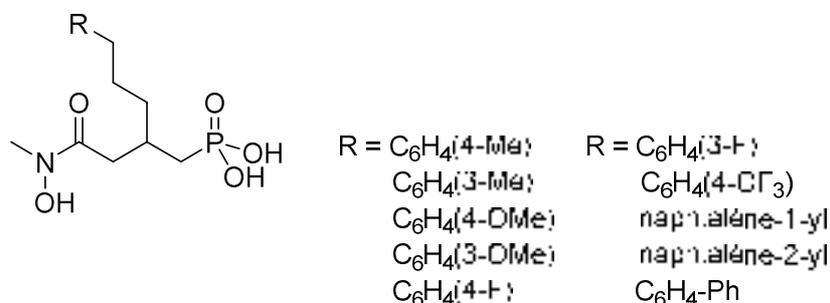
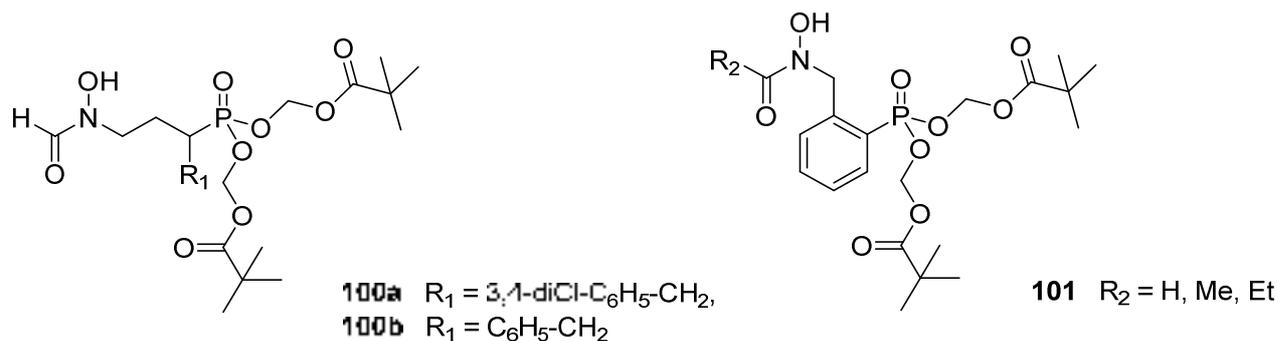


Figure 77 : Inhibiteurs fonctionnalisés en β .

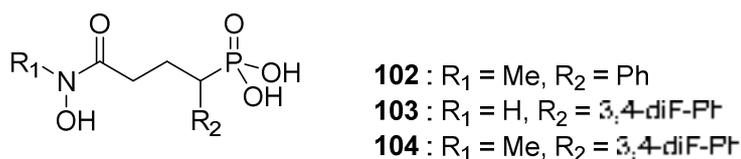
D'un point de vue global, les phényles substitués en *meta* sont de meilleurs inhibiteurs et plus le groupement est petit, meilleure est l'inhibition. Les larges groupements lipophiles du type biphenyle et naphthyle entraînent pour leur part une diminution de l'efficacité. Tous ces résultats permettent de confirmer le potentiel de fonctionnaliser en β et d'orienter les futures recherches vers des groupements plus petits.

En parallèle des travaux de Van Calenbergh, qui s'étalent sur près d'une décennie, les travaux de Kurz ont aussi largement participé à la fois à la compréhension de l'apport de certains composés dans la fixation dans l'enzyme et à l'enrichissement du nombre d'inhibiteurs. Ils furent les premiers à rapporter en 2005 le potentiel des α -phénylfosmidomycine à travers un brevet, confirmé ensuite par Van Calenbergh. Lors de leurs travaux, Kurz et ses collègues ont cherché à travailler sur des analogues α -substitués, tout en cherchant à masquer l'acide phosphonique dans le but d'étudier la relation structure-activité, et d'augmenter la lipophilie. Ils ont ainsi synthétisé des prodrogues de type pivaloyloxyméthyle où l'acide phosphonique est libéré par une estérase non spécifique.²⁰⁰ De tous les composés testés, le plus actif est la fosmidomycine fonctionnalisée par le 3,4-dichlorobenzyle **100a** (Fig. 78).²⁰¹ De plus, l'incorporation de la chaîne dans un noyau aromatique de type phényle **101**, mène à une perte significative de l'activité de la fosmidomycine.²⁰²

Figure 78 : Inhibiteurs α -substitués sous forme de prodrogues.

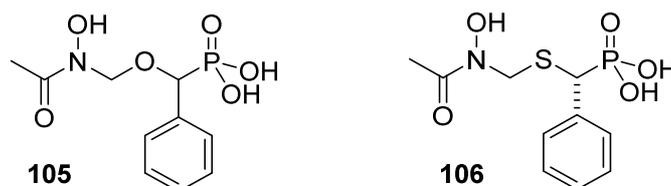
Par contraste avec les résultats obtenus sans groupement masquant de l'acide phosphonique, ce sont les analogues formylés qui se sont avérés être les plus actifs.

Ils se sont ensuite principalement focalisés sur des analogues de la fosmidomycine en pince inverse, tout en reprenant certains groupements ayant démontré leur efficacité tels que le phényle et le 3,4-diF-phényle, et ce, tout en jouant sur la *N*-alkylation de la pince.^{203, 204}

Figure 79 : Inhibiteurs α -substitués et *N*-alkylés.

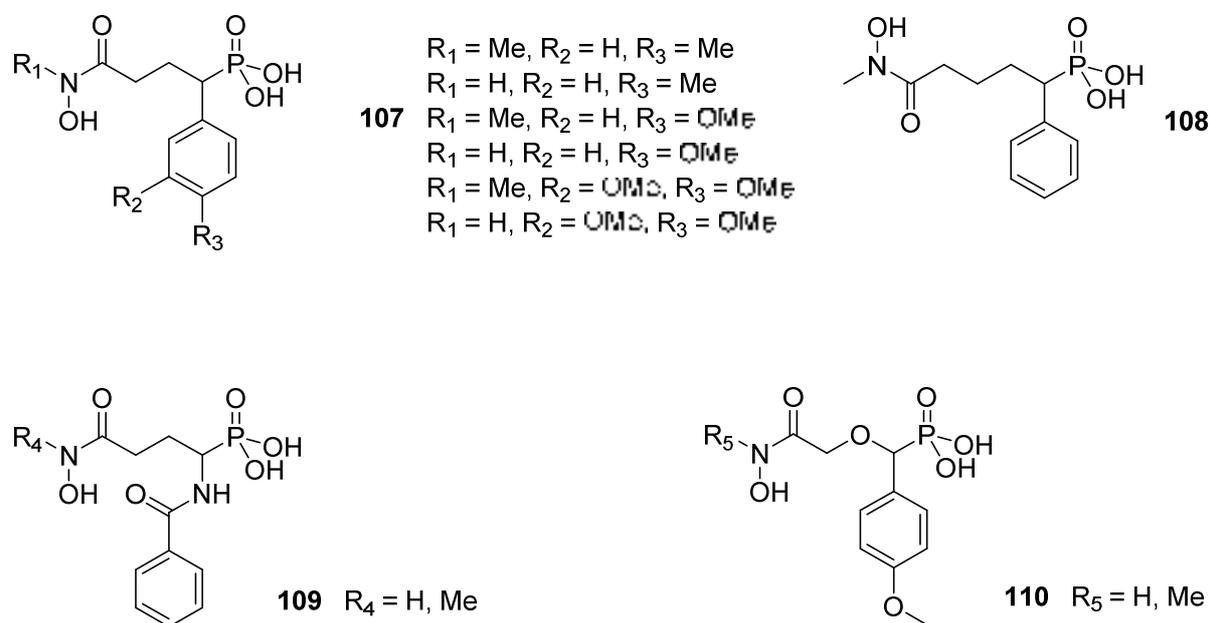
Plusieurs composés (**102**, **103**, **104**, Fig. 79) se sont révélés être de bons inhibiteurs avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre du bas nano-molaire sur la DXR de *P. falciparum* telles que 3 nM pour les trois composés ci-dessus, ce qui est bien inférieur par rapport à la fosmidomycine et au FR-900098. Par étude *in vivo* sur des souris infectées par *P. berghei*, des deux inhibiteurs **103** et **104**, le premier a montré une efficacité similaire à la fosmidomycine tandis que le second avait moins d'effet sur la survie des souris. Malgré les résultats très prometteurs *in vitro*, les essais réalisés *in vivo* sur une autre souche, ont été plus décevants. Cependant, ces trois composés restent de bons candidats pour des études plus approfondies.

L'équipe de Kurz a également travaillé sur le remplacement des atomes de carbone de la chaîne par un atome d'oxygène **105** ou un atome de soufre **106** en β sur des analogues de la fosmidomycine en pince inverse et fonctionnalisés en α avec un phényle (Fig. 80).^{205, 206}

Figure 80 : Inhibiteurs β -oxa et β -thia.

Par comparaison des isostères carba, oxa et thia α -phénylés chez *EcDXR*, *MtDXR* et *PfDXR*, ils ont remarqué que l'introduction d'un atome de soufre conduit à une amélioration des valeurs des IC_{50} dans le cas d'*EcDXR* et de *MtDXR*. Par ailleurs, auparavant, les différents analogues étaient testés en mélange racémique mais ici, l'importance de la chiralité a été mise en avant sur l'isostère thia α -phénylé avec l'énantiomère S-(+) (9.4 nM sur *PfDXR*) dont l'inhibition est 1250 fois supérieure à celle de l'énantiomère R-(-) (1200 nM). Ainsi, la séparation des énantiomères pourra conduire à de meilleurs résultats, par élimination de l'énantiomère le moins actif.

Parmi les derniers analogues de la fosmidomycine en pince inverse synthétisés par l'équipe de Kurz, on retrouve de nouveau des analogues α -phénylés avec des groupements donneurs **107**, des analogues où la longueur de chaîne est rallongée d'un carbone **108**, des analogues de type benzoylamino **109**, et des β -oxa isostères avec un groupement méthoxy en *para* **110** (Fig. 81).¹⁸¹

Figure 81 : Inhibiteurs avec différents groupements en α .

Les meilleurs résultats sont de nouveau obtenus dans le cas des analogues α -phénylés portant des groupements donneurs. En revanche, l'élongation de la chaîne a conduit à une importante perte d'activité. D'autre part, l'étude cristallographique des meilleurs analogues a permis de mettre en avant le rôle de certains résidus dans la fixation des inhibiteurs.

La variation de la longueur de chaîne avait déjà été envisagée par notre équipe. En effet, en 2010, les travaux de Zinglé décrivent une perte dramatique de l'inhibition pour des analogues en pince inversée **111** ayant une chaîne raccourcie d'un carbone, et une inhibition modérée pour une chaîne rallongée d'un carbone (Fig. 82).²⁰⁷ La perte dramatique est sans doute due au fait que l'inhibiteur devient incapable de se fixer aux deux points d'ancrage en même temps. Plus récemment, Dowd et son équipe ont rapporté la synthèse d'analogues cette fois-ci en pince rétro-hydroxamique **112** avec une chaîne variant de 2 à 5 carbones, ainsi qu'un dérivé du FR-900098, portant une insaturation en α du phosphonate **113**.²⁰⁸

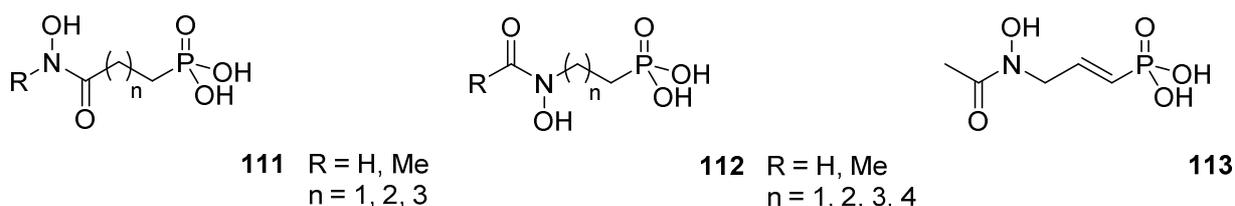


Figure 82 : Inhibiteurs avec une longueur de chaîne variable et portant une insaturation.

Les composés de l'équipe de Dowd, testés sur la DXR de *M. tuberculosis* et dont la longueur de chaîne varie, ont tous montré une faible inhibition à l'exception de la fosmidomycine et du FR-900098. Concernant l'incorporation d'une insaturation avec le composé **113**, celle-ci a révélé une activité supérieure à celle du FR-900098, qui sous forme de prodrogue, se révèle être l'un des inhibiteurs des plus prometteurs.

La remplacement du phényle par un groupement pyridine a été réalisé par l'équipe de Song.²⁰⁹ Les quatre composés (substitués en *mé*ta **114** ou *para* **115** et formylés ou acétylés) se sont révélés être de bons inhibiteurs avec des IC_{50} allant de 170 à 460 nM sur la souche Dd2 de *P. falciparum* et l'étude cristallographique du composé **115p** a permis de confirmer que la boucle s'adapte à ces molécules via une modification de sa conformation (Fig. 83). De plus, chez *PfDXR*, il a été observé que la Cys338 crée une liaison hydrogène avec l'azote de la pyridine, ce qui contribue fortement à l'augmentation de son efficacité.

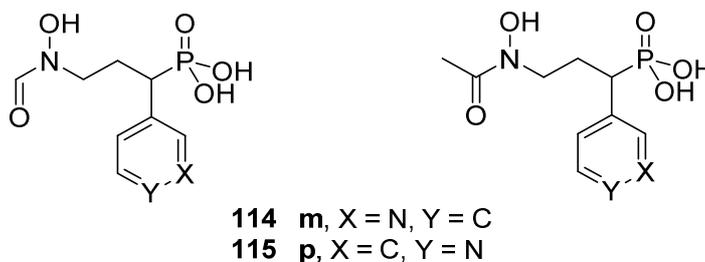


Figure 83 : Inhibiteurs de type pyridine.

Le groupe de Larhed a également apporté sa contribution à la synthèse d'analogues α -substitués de la fosmidomycine en explorant le potentiel des biaryles, et de différents hétérocycles fusionnés comme le 2-benzofurane.²¹⁰ Tous les composés inhibent la *MtDXR* avec des IC_{50} variant de 0.8 à 27.3 μ M. Le meilleur est comparable à l'analogue 3,4-dichloro substitué.

c. Modification du point d'ancrage

i. Remplacement du phosphonate

Pour rappel, Proteau a rapporté la synthèse de plusieurs analogues testés sur *Synechocystis*, dont l'un était prometteur. Il a également modifié le phosphonate en le remplaçant par un carboxylate et un sulfamate. La synthèse du premier avait été rapportée peu de temps avant Proteau par l'équipe de Kurz mais le composé n'avait pas fait l'objet d'un test biologique sur la DXR.²¹¹ Ainsi, par analyse sur la DXR de *Synechocystis*, a été mise en évidence la perte d'affinité de ces deux dérivés vis-à-vis de l'enzyme, mettant en avant l'importance du phosphate ou du phosphonate qui peuvent se fixer en tant que mono- ou dianions, alors que le carboxylate peut seulement le faire en tant que mono-anion et que le sulfamate est neutre.¹⁷⁸ De même, le test sur la DXR d'*E. coli* du carboxylate a conduit aux mêmes conclusions.²⁰⁷

Plusieurs équipes ont également échoué dans le remplacement du phosphonate par un sulfonamide,^{212, 213} une sulfone,²¹² un sulfonate,²⁰⁷ ou encore un tétrazole,^{214, 176} ce qui a conduit à chaque fois à une perte de l'inhibition sur la DXR d'*E. coli* et de *Synechocystis* sp.

Ces différents échecs dans le remplacement du phosphonate de la fosmidomycine démontrent son rôle essentiel dans la fixation de l'inhibiteur au niveau du point d'ancrage, de par sa charge et de par une certaine rigidité du site de fixation qui, en présence d'un autre groupement, ne s'accommoderait pas à celui-ci.

ii. Modification sous forme de prodrogue

L'impossibilité de remplacer le phosphonate a conduit de nombreux groupes à chercher à le masquer pour permettre le passage d'une prodrogue neutre du phosphonate au travers des membranes, comme dans le cas de *M. tuberculosis*, ou dans le but d'augmenter la biodisponibilité de certains composés, à l'exemple de la fosmidomycine. Ainsi, en 2001, l'équipe de Jomaa a rapporté la synthèse du FR-900098 sous forme d'une prodrogue d'ester de phosphonate phénolique.²¹⁵

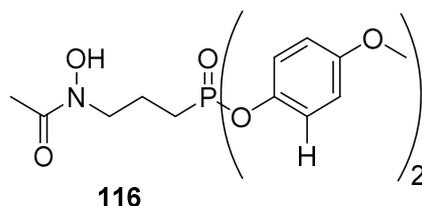


Figure 84 : Prodrogue sous forme d'ester de phosphonate phénolique.

Le composé **116** (Fig. 84), testé sur des souris infectées par *P. vinckei*, a montré une efficacité supérieure à celle du FR-900098, lorsqu'il est introduit par injection, et semblable à celle du FR-900098 si administré par voie orale. Cependant, la libération de dérivés phénoliques, connus pour leur cytotoxicité, a ensuite conduit vers la synthèse de prodrogues de type acyloxyalkylester et alkoxy-carbonyloxyethylester.^{216, 217} La première série de type acyloxyalkylester (Fig. 85) a conduit à la synthèse de sept prodrogues, testées de nouveau sur des souris infectées par *P. vinckei* et tous les composés ont montré une bonne activité antipaludéenne, qui pour deux en particulier surpassent celle du FR-900098 (composés **117** et **118**, Fig. 85).

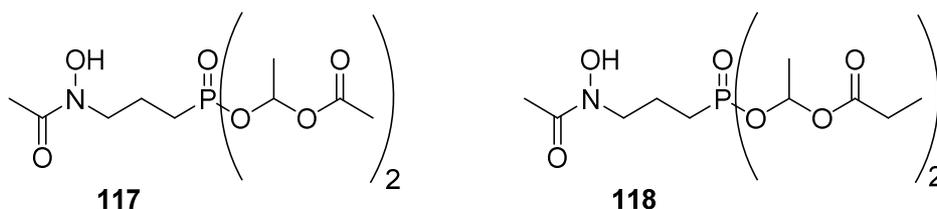


Figure 85 : Prodrogues sous forme d'acyloxyalkylester et d'alkoxy-carbonyloxyethylester.

L'aspect huileux des différents acyloxyalkylesters n'étant pas favorable pour la formulation de comprimés, une seconde série de type alkoxy-carbonyloxyethylester a été envisagée. Deux d'entre eux, **119** et **120**, se sont révélés être meilleurs que le FR-900098, induisant un retard de deux jours dans le développement du parasite (Fig. 86).

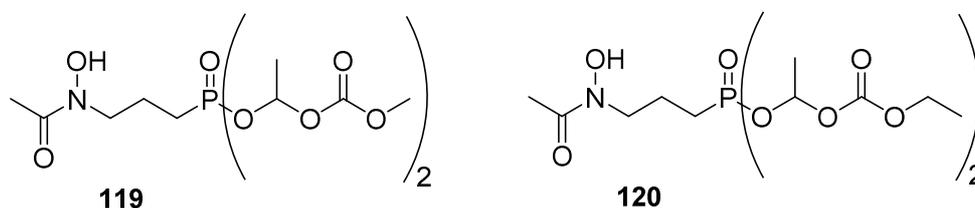


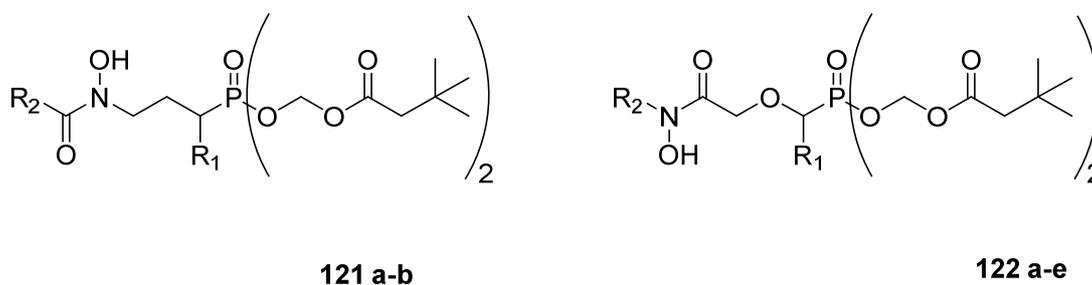
Figure 86 : Prodrogues du FR-900098.

Le potentiel du dérivé pivaloyloxyméthylester a fait l'objet d'une étude plus poussée, démontrant que l'utilisation de molécules de ce type, masquées par deux esters, augmente l'activité antipaludéenne du FR-900098.²¹⁸ En effet, la concentration plasmatique du FR-900098 libre passe de 1.2 μM après 30 min d'administration par voie orale à 3 μM lorsqu'il est ingéré sous forme de prodrogue, et, sous cette forme, l'inhibition de la DXR de deux souches de *P. falciparum* est 2 à 5 fois supérieure à l'inhibition

induite par l'inhibiteur libre, ce qui pourrait être dû à son caractère lipophile qui faciliterait son passage dans le parasite par diffusion passive.

L'équipe de Kurz, qui a beaucoup travaillé sur la modification de la chaîne, a combiné cette modification avec le masquage du phosphonate. En 2006, cette équipe a tout d'abord rapporté la synthèse d'analogues de la fosmidomycine et du FR-900098 fonctionnalisés en α - du phosphonate, ce dernier étant masqué sous forme de pivaloyloxyméthylester.^{200, 201} Puis en 2012, une deuxième modification a été rajoutée en remplaçant la chaîne β -carba par une chaîne β -oxa.²⁰⁵ De nouveau, plusieurs composés ont été mis en avant par cette étude sur la DXR de *P. falciparum*. Les meilleurs de chaque publication sont rapportés dans le tableau 3.

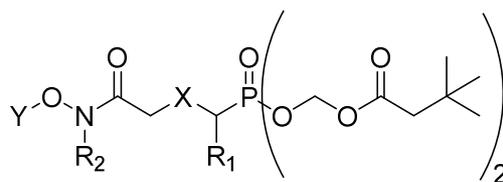
Tableau 3 : Prodrogues d'analogues β -aryle et β -oxa α -aryle du FR-900098.



	R ₁	R ₂	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ (μM)
Prodrogue du FR-900098	H	CH ₃	0.4
121a	3,4-F-Ph	H	0.3
121b	3,4-Cl-C ₆ H ₅ -CH ₂ -	H	0.9
122a	Naphthyl-1-yl	CH ₃	0.52
122b	4-F-Ph	CH ₃	0.48
122c	3,4-F-Ph	CH ₃	0.54
122d	3,4-Cl-Ph	CH ₃	0.24
122e	4-CH ₃ -Ph	CH ₃	0.18

Outre l'ensemble de ces modifications, ont également été synthétisées des prodrogues dites doubles, pour lesquelles, le groupement phosphonate est masqué, ainsi que l'hydroxamate qui est estérifié et doit être activé et libéré par hydrolyse *in vivo*.^{205, 219}

Tableau 4 : Prodrogues du FR-900098 de type double.

**123 a-d**

	R ₁	R ₂	X	Y	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ (μM)
Prodrogue du FR-900098	H	CH ₃	CH ₂	H	0.4
123a	3,4-F-Ph	CH ₃	O	H	0.013
123b	3,4-F-Ph	CH ₃	O	CO ₂ C ₂ H ₅	0.023
123c	3,4-F-Ph	CH ₃	O	CONHC ₂ H ₅	0.031
123d	3,4-F-Ph	CH ₃	CH ₂	CONHC ₂ H ₅	0.045

Les résultats obtenus *in vitro* ont été plus que prometteurs guidant vers l'étude *in vivo* sur des souris infectées par *P. berghei* des composés **104** et **123d** (Tab. 4).²¹⁹ Les conclusions ont cependant été décevantes suggérant une instabilité chimique ou métabolique et/ou un possible manque de bio-activation.

Dowd et son équipe ont mis en avant suite à la synthèse de différentes prodrogues le fait qu'elles n'utilisent pas le transporteur glpT, entre autres du fait de leur activité inhibitrice sur certaines souches comme *M. tuberculosis*.^{220,221} Or la résistance vis-à-vis de la fosmidomycine de certaines bactéries dont fait partie *M. tuberculosis* a été imputée à l'absence de ce transporteur et à la présence d'une paroi cellulaire extrêmement lipophile qui limite la diffusion passive, rendant les bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques. Ainsi, la synthèse de molécules plus lipophiles en masquant le caractère très polaire du phosphonate semble être d'un grand intérêt.

Au sein de notre équipe, la synthèse de prodrogues a également été conduite. Le potentiel des acyloxyalkylesters a été testé (Fig. 87).²²² L'ensemble des composés synthétisés n'inhibent pas la croissance de *M. smegmatis* en série N-H, mais leur dérivés *N*-méthylés **124b**, **125b** et **126b** ont montré une meilleure activité.

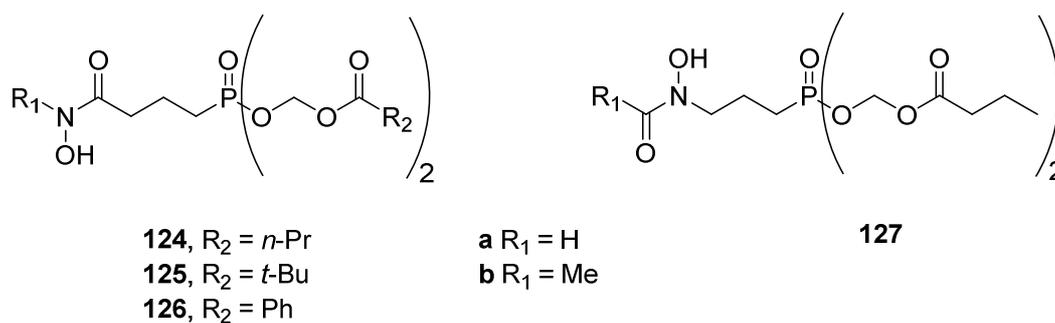


Figure 87 : Prodrogues de type acyloxyalkylester.

De manière surprenante, les prodrogues **122a** de la fosmidomycine et **122b** du FR-900098 sous la forme *n*-propyloxyméthyl ester ayant donné de bons résultats sur des souches 3D7 et Dd2 de *P. falciparum* n'ont pas permis de bloquer la croissance de *M. smegmatis* alors que la fosmidomycine et le FR-900098 inhibent *P. falciparum*.^{218,191} Cela a conduit à plusieurs hypothèses : les molécules **127a** et **127b**, ne passeraient pas la membrane de *M. smegmatis* par diffusion passive contrairement aux molécules **124b**, **125b** et **126b**. Ou les prodrogues **127a** et **127b** ou leurs composés parents **61** et **62** pourraient être expulsés de la cellule par des pompes à efflux ou encore être inactivés.

Dernièrement, l'équipe de Barros a travaillé sur la synthèse de prodrogues d'un autre style, en incluant les deux extrémités phosphonate et acide hydroxamique dans un cycle en espérant que cette démarche pourrait conduire à de nouveaux analogues contraints possédant des propriétés nouvelles (Fig. 88).²²³

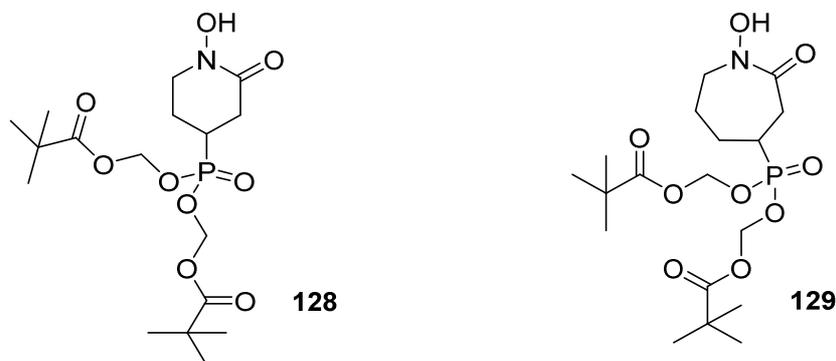


Figure 88 : Analogues contraints, sous forme prodrogue.

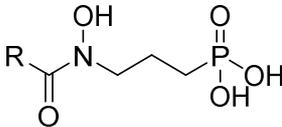
Le cycle à 6 chaînons (**128**) a montré une activité meilleure par rapport à celles de la fosmidomycine et du FR-900098 sur *P. falciparum* contrairement au cycle à 7 chaînons (**129**). Cela est en accord avec la nécessité de conserver une longueur de chaîne de trois carbones entre le phosphonate et l'acide hydroxamique.

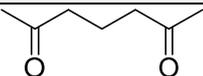
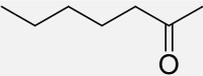
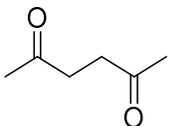
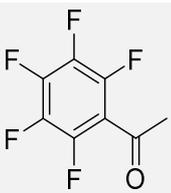
L'utilisation de prodrogues contre *P. falciparum* a donc montré un fort potentiel avec une amélioration de l'activité de la fosmidomycine et du FR-900098 contre ce même pathogène. Ces résultats sont prometteurs dans leur utilisation contre *M. tuberculosis* qui représente un problème de santé mondial.

- d. Augmentation du caractère lipophile par élongation au niveau de l'acide hydroxamique /
approche bisubstrat

Une dernière approche a été envisagée pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs par plusieurs équipes. Elle consiste à remplacer le groupement formyle ou acétyle de la fosmidomycine ou du FR-900098 par différents fragments. Jomaa et ses collaborateurs les ont ainsi remplacés par différents acyles fonctionnalisés dans le but d'augmenter le caractère lipophile des inhibiteurs.²²⁴ L'évaluation biologique des différents composés a conduit à la mise en évidence d'une perte significative d'activité inhibitrice comparée à celles de la fosmidomycine et de son analogue méthylé. Cependant, par étude de docking, il a été mis en avant la possibilité de retrouver cette activité en positionnant de manière adéquate un accepteur de liaison hydrogène de manière à former une liaison de ce type avec la fonction NH de la Met214 qui fait partie de la boucle et qui recouvre le site actif. Cette idée a été vérifiée avec le composé **130a** dont l'activité est deux fois supérieure à celle du composé **130b**.

Tableau 5 : Inhibiteurs acylés, au niveau de la pince.



Composé	R-CO-	IC ₅₀ DXR d' <i>E. coli</i> (μM)
130a		5.4
130b		10
130c		20
130d		1.3

De plus, l'importance de la longueur de chaîne a été confirmée avec le composé **130c** où l'interaction avec la Met214 est moins favorisée, le meilleur composé est celui substitué par un groupement le pentafluorobenzoyl **130d** (Tab. 5).

A nouveau, Van Calenbergh en association avec plusieurs équipes a synthétisé une série possédant la fosmidomycine comme structure commune, prolongée par une glycine puis, par un fragment variable de manière à explorer la présence d'autres sites de fixation.²²⁵ Le remplacement de l'acide hydroxamique par une liaison stable de type amide simple qui pourrait contribuer à la formation de liaison hydrogène a été mis en œuvre mais a entraîné une perte d'activité non négligeable, également observée par Woo lors du remplacement de la liaison N-OH par N-CH₃.¹⁷⁸ Ainsi, la conservation de la liaison N-OH est nécessaire. La majorité des composés possédant un fragment aryle ou alkyle n'a pas montré d'efficacité en dessous d'une micromolaire, à l'exception du composé **131** (Fig. 89) avec une IC₅₀ de 1 μM sur la DXR d'*E. coli* et de 0.4 μM sur la DXR de *P. falciparum*.

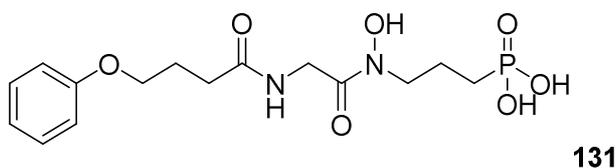


Figure 89 : Inhibiteur rallongé au niveau de la pince.

L'introduction d'une liaison amide simple, en complément d'une variation de la longueur de chaîne sous la forme de *N*-aryle et *N*-hétéroarylcaboxamides **132**, avait également été envisagée par l'équipe de Kaye, permettant de mettre en avant plusieurs éléments clés concernant la relation structure activité et notamment la découverte d'une nouvelle poche (Fig. 90).^{226, 227}

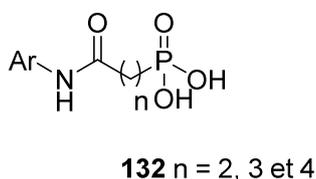


Figure 90 : Inhibiteurs de type *N*-aryle

La présence d'une poche a également été mise en évidence par l'équipe de Dowd qui a travaillé sur la synthèse d'inhibiteurs via une approche bisubstrat. Cette approche consiste à cibler deux sites distincts de l'enzyme à l'aide d'une seule molécule. Ainsi, en souhaitant cibler à la fois le site de fixation du DXP et la poche du NADPH via cette approche, il a en réalité été démontré, par étude de l'inhibiteur le plus probant, que celui-ci est non compétitif vis-à-vis du NADPH et cible donc une autre poche.²²⁸ Pour ce faire, ils avaient conceptualisés des composés dits O-liés **133** et des ligands amides **134**, fonctionnalisés avec différents aromatiques pour mimer le cycle du nicotinamide du NADPH (Fig. 91).

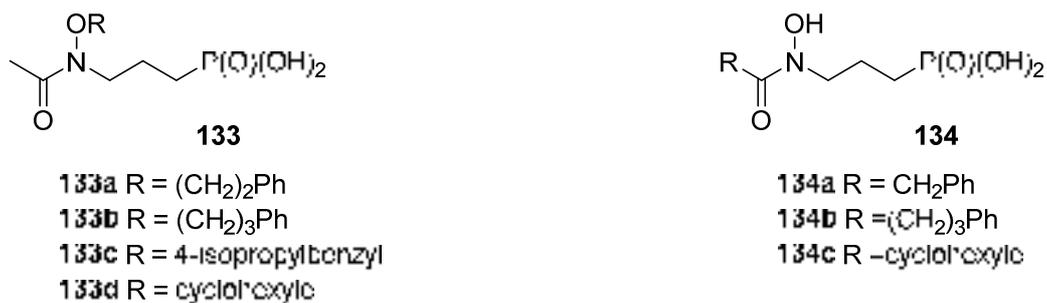


Figure 91 : Inhibiteurs de type bisubstrat.

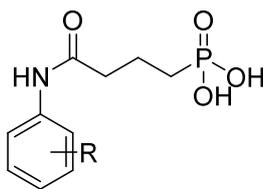
Pour la première série, seul le composé fonctionnalisé avec le groupe 4-isopropylbenzyle **133c** a montré une inhibition dans la gamme du bas micromolaire. Pour la seconde, c'est le dérivé **134b** qui a été le meilleur et qui a servi aux expérimentations de compétitivité pour étudier son mode de fixation. A noter que **133d** et **134c** sont de faibles inhibiteurs, démontrant le rôle de l'aromaticité. Par ces études, l'équipe de Dowd a ainsi montré que les composés de type amide peuvent tout de même se lier au niveau du site actif via un mode de fixation différent. La synthèse et l'évaluation d'une nouvelle série de composés *N*-acylés et *O*-liés plus large a permis cette fois-ci de déceler deux composés **135** et **136** qui possèdent les meilleurs résultats d'inhibition (Tab. 6).²²⁹

Tableau 6 : Inhibiteurs *N*-acylés et *O*-fonctionnalisés sur la DXR de *Mycobacterium tuberculosis*.

	R ₁	R ₂	IC ₅₀ DXR de Mtb (μM)	IC ₅₀ DXR de Mtb (μM)	
	135	Ph	H	70% à 100 μM	4.75
	136	CH ₃	CH ₂ -(2-naphthyl)	1.45	0.33

De plus, ceux-ci se lient de façon compétitive envers le DXP et NADPH, contrairement aux analogues des séries précédentes. Ils se lient via un mécanisme de type « flip-and-lock » où le mime du NADPH se lie, induisant un changement de conformation de la DXR (Flip) suivi en deuxième lieu par la fixation du mime du DXP, conservant l'enzyme dans un état bloqué (lock). Au premier abord, il avait été prédit que les composés *O*-liés, seraient moins actifs du fait de la substitution du groupement hydroxyle de l'acide rétro-hydroxamique, empêchant la formation de l'anion qui se chélate au métal. Mais ces résultats montrent que la présence d'un anion qui se chélate au métal n'est pas nécessaire.

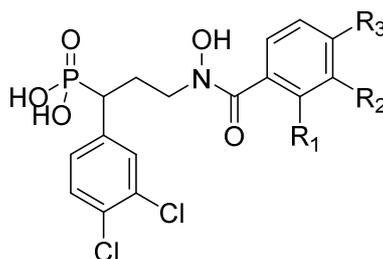
Dans la poursuite de ce projet, Dowd et Van Calenbergh ont ensuite souhaité étudier la contribution que pourraient apporter des groupements aromatiques substitués en *ortho* de l'amide.²³⁰ Ils ont ainsi synthétisé une série de 14 nouveaux analogues de la fosmidomycine (fig. 92).

Figure 92 : Inhibiteurs amide *ortho*-substitués.

L'ensemble des analogues se sont révélés être inactifs sur les DXR de *E. coli* et *M. tuberculosis*, ainsi que sur la croissance de la souche K1 de *P. falciparum*, émettant l'hypothèse que la flexibilité relativement limitée autour de la liaison amide pourrait être responsable de cette inactivité. L'introduction d'un espaceur entre la liaison amide et le noyau aromatique pourrait permettre l'adoption d'une meilleure conformation pour occuper le site actif ou une autre poche alternative.

Mowbray et son équipe, ont rapporté la synthèse de composés mêlant une première substitution en α du phosphonate et une deuxième au niveau de l'hydroxamate, tout en réussissant à cibler la poche du NADPH (Tab. 7).²³¹

Tableau 7 : Inhibiteurs disubstitués.



131

Entrée	R ₁	R ₂	R ₃	MtDXR IC ₅₀ (μM)
137a	H	H	H	0.32
137b		H	H	19
137c		H	H	13
137d	H		H	0.14
137e	H	H		1.2

Au sein du laboratoire, la synthèse de bisubstrats a également été envisagée avec la synthèse de molécules possédant à la fois un catéchol capable de se chélater au métal, ainsi qu'un autre groupe capable d'occuper le site de fixation du NADPH ou la poche hydrophobe située aux abords du site actif (Fig. 93).²³² Pour cela, l'emploi de dérivés catéchol-rhodanine a été décidé, suite aux travaux de Sem.^{233,}

234

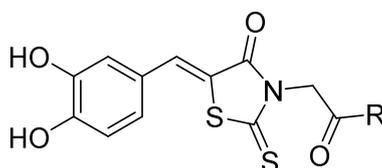


Figure 93 : Inhibiteurs du type catéchol-rhodanine.

Les résultats ont laissé entrevoir le potentiel de tels composés et leur développement reste à faire.

La modification du phosphonate, hormis sous forme de prodrogues ou la pince chélatante, n'a pu être réalisée sans observer une perte importante de l'activité inhibitrice. En revanche, la modification de la chaîne carbonée par l'introduction d'un substituant en α du phosphonate a permis l'obtention d'inhibiteurs qui surpassent la fosmidomycine et le FR-900098. De même, la poche du NADPH semble être une cible accessible. Les travaux de Hirsch imputés à l'utilisation du logiciel DoGSiteScorer montrent que cette poche peut être visée, mais cibler uniquement celle-ci n'est pas d'un grand intérêt du fait de sa petite taille et de son caractère peu lipophile.⁷⁶

Dans la course vers de nouveaux antimicrobiens, un travail de longue haleine reste encore à venir avec la compréhension grandissante de cette enzyme et la nécessité avec le temps qui passe de trouver de nouveaux inhibiteurs.

- (1) Bach, T. J. Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants-A Review. *Lipids* **1995**, *30* (3), 191–202.
- (2) Wallach, O. Zur Kenntniss der Terpene Und Ätherischen Oele. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *238*, 78–89.
- (3) Ruzicka, L. The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia* **1953**, *9* (10), 357–367.
- (4) Ruzicka, L. History of the Isoprene Rule. *Proc. Chem. Soc.* **1959**, 341–376.
- (5) Schramek, N.; Wang, H.; Römisch-Margl, W.; Keil, B.; Radykewicz, T.; Winzenhörlein, B.; Beerhues, L.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Gershenzon, J.; et al. Artemisinin Biosynthesis in Growing Plants of *Artemisia annua*. A ¹³C₂ Study. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 179–187.
- (6) Ogura, K.; Koyama, T. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (4), 1263–1276.
- (7) Clifford, K.; Cornforth, J. W.; Mallaby, R.; Phillips, G. T. Stereochemistry of Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1971**, 1599–1600.
- (8) Ramos-Valdivia, A. C.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. Isopentenyl Diphosphate Isomerase: A Core Enzyme in Isoprenoid Biosynthesis. A Review of Its Biochemistry and Function. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14* (6), 591–603.
- (9) Bloch, K. Sterol Molecule: Structure, Biosynthesis, and Function. *Steroids* **1992**, *57*, 378–383.
- (10) Rohmer, M. The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574.
- (11) Bach, T. J.; Lichtenthaler, H. K. Inhibition by Mevinolin of Plant Growth, Sterol Formation and Pigment Accumulation. *Physiol. Plant.* **1983**, *59*, 50–60.
- (12) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahn, H. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517–524.
- (13) Eisenreich, W.; Schwarz, M.; Cartayrade, A.; Arigoni, D.; Zenk, M. H.; Bacher, A. The Deoxyxylulose Phosphate Pathway of Terpenoid Biosynthesis in Plants and Microorganisms. *Chem. Biol.* **1998**, *5* (9), 221–233.
- (14) Boucher, Y.; Doolittle, W. F. The Role of Lateral Gene Transfer in the Evolution of Isoprenoid Biosynthesis Pathways. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37* (4), 703–716.
- (15) Rohmer, M. Mevalonate-Independent Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis. Elucidation and Distribution. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75* (2–3), 375–388.
- (16) Seto, H.; Watanabe, H.; Furihata, K. Simultaneous Operation of the Mevalonate and Non-Mevalonate Pathways in the Biosynthesis of Isopentenyl Diphosphate in *Streptomyces Aeriouvifer*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (44), 7979–7982.
- (17) Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. Biosynthesis of Isoprenoids in Higher Plant Chloroplasts Proceeds via a Mevalonate-Independent Pathway. *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 271–274.
- (18) Schwarz, M. Terpen-Biosynthese in *Ginkgo Biloba* : Eine Überraschende Geschichte, PhD thesis, ETH Zürich, 1994.

- (19) Bloch, K.; Rittenberg, D. The Biological Formation of Cholesterol from Acetic Acid. *J. Biol. Chem.* **1942**, *143*, 297–299.
- (20) Bloch, K. E. Nobel Lecture: The Biological Synthesis of Cholesterol". **1964**.
- (21) Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. Biosynthesis of Terpenes : Isopentenyl Pyrophosphates Isomerase. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235* (2), 326–333.
- (22) Henning, U.; Lynen, F. Biosynthesis of Terpenes. V. Formation of 5-Pyrophosphomevalonic Acid by Phosphomevalonic Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *83*, 259–267.
- (23) Miziorko, H. M. Enzymes of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *505*, 131–143.
- (24) Flesch, G.; Rohmer, M. Prokaryotic Hopanoids: The Biosynthesis of the Bacteriohopane Skeleton. Formation of Isoprenic Units from Two Distinct Acetate Pools and a Novel Type of Carbon/carbon Linkage between a Triterpene and D-Ribose. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 405–411.
- (25) Rohmer, M. A Mevalonate-Independent Route to Isopentenyl Diphosphate. *Compr. Nat. Prod. Chem. Isoprenoids Incl. steroids carotenoids*, Pergamon **1999**, *2* (2), 45–68.
- (26) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2564–2566.
- (27) Schwarz, M.; Arigoni, D. Ginkgolide Biosynthesis. *Compr. Nat. Prod. Chem. Isoprenoids Incl. steroids carotenoids*, Pergamon **1999**, 367–400.
- (28) Heuston, S.; Begley, M.; Gahan, C. G.; Hill, C. Isoprenoid Biosynthesis in Bacterial Pathogens. *Microbiology* **2012**, *158*, 1389–1401.
- (29) Rosa Putra, S.; Disch, A.; Bravo, J. M.; Rohmer, M. Distribution of Mevalonate and Glyceraldehyde 3-Phosphate/pyruvate Routes for Isoprenoid Biosynthesis in Some Gram-Negative Bacteria and Mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *164*, 169–175.
- (30) Kuzuyama, T.; Seto, H. Diversity of the Biosynthesis of the Isoprene Units. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 171–183.
- (31) Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C.; Seemann, M.; Tritsch, D. Isoprenoid Biosynthesis as a Novel Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2004**, *5* (2), 154–162.
- (32) Masini, T.; Hirsch, A. K. H. Development of Inhibitors of the 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate (MEP) Pathway Enzymes as Potential Anti-Infective Agents. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9740–9763.
- (33) Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; De Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Identification of a Thiamin-Dependent Synthase in *Escherichia Coli* Required for the Formation of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Precursor to Isoprenoids, Thiamin, and Pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12857–12862.
- (34) Lois, L. M.; Campos, N.; Putra, S. R.; Danielsen, K.; Rohmer, M.; Boronat, A. Cloning and Characterization of a Gene from *Escherichia coli* Encoding a Transketolase-like Enzyme That Catalyzes the Synthesis of D-1-Deoxyxylulose 5-Phosphate, a Common Precursor for Isoprenoid, Thiamin, and Pyridoxol Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1998**, *95*, 2105–2110.

- (35) Xiang, S.; Usunow, G. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (4), 2676–2682.
- (36) Cane, D. E.; Hsiung, Y.; Cornish, J. A.; Robinson, J. K.; Spenser, I. D. Biosynthesis of Vitamin B6: The Oxidation of 4-(Phosphohydroxy)-L-Threonine by PdxA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1936–1937.
- (37) Cane, D. E.; Du, S.; Robinson, J. K.; Hsiung, Y.; Spenser, I. D. Biosynthesis of Vitamin B6: Enzymatic Conversion of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate to Pyridoxol Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7722–7723.
- (38) Mao, J.; Eoh, H.; He, R.; Wang, Y.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Crick, D. C.; Kozikowski, A. P. Structure-Activity Relationships of Compounds Targeting *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5320–5323.
- (39) Mueller, C.; Schwender, J.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K. Properties and Inhibition of the First Two Enzymes of the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28* (6), 792.
- (40) Matsue, Y.; Mizuno, H.; Tomita, T.; Asami, T.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. The Herbicide Ketoclozazole Inhibits 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase in the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway and Shows Antibacterial Activity against *Haemophilus influenzae*. *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 583–588.
- (41) Hayashi, D.; Kato, N.; Kuzuyama, T.; Sato, Y.; Ohkanda, J. Antimicrobial N-(2-Chlorobenzyl)-Substituted Hydroxamate Is an Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (49), 5535–5537.
- (42) Brammer, L. A.; Meyers, C. F. Revealing Substrate Promiscuity of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *Org. Lett.* **2009**, *11* (20), 4748–4751.
- (43) Rosa, S.; Charon, L.; Danielsen, K.; Pale-Grosdemange, C.; Lois, L.; Campos, N.; Boronat, A.; Rohmer, M.; Cnrs, P.; Bel, I. Le; et al. 5-Hydroxypentane-2,3-Dione (Laurencione), a Bacterial Metabolite of 1-Deoxy-D-Threo-Pentulose. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6185–6188.
- (44) Chalovich, J. M.; Eisenberg, E. NIH Public Access. *ChemBioChem* **2013**, *14* (11), 1309–1315.
- (45) Smith, J. M.; Vierling, R. J.; Meyers, C. F. Selective Inhibition of *E. coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase by Acetylphosphonates. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3* (1), 65.
- (46) Smith, J. M.; Warrington, N. V.; Vierling, R. J.; Kuhn, M. L.; Anderson, W. F.; Koppisch, A. T.; Freel Meyers, C. L. Targeting DXP Synthase in Human Pathogens: Enzyme Inhibition and Antimicrobial Activity of Butylacetylphosphonate. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 77–83.
- (47) Masini, T.; Pilger, J.; Kroezen, B. S.; Illarionov, B.; Lottman, P.; Fischer, M.; Griesinger, C.; Hirsch, A. K. H. Chemical Science DXS Guided by Spin-Diffusion-Based NMR spectroscopy. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3543–3551.
- (48) Eubanks, L. M.; Poulter, C. D. *Rhodobacter Capsulatus* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase: Steady-State Kinetics and Substrate Binding. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1140–1149.
- (49) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Catalyzing the Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate in an Alternative Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9879–9884.

- (50) Yajima, S.; Hara, K.; Iino, D.; Sasaki, Y.; Kuzuyama, T.; Ohsawa, K.; Seto, H. Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in a Quaternary Complex with a Magnesium Ion, NADPH and the Antimalarial Drug Fosmidomycin. *Acta Cryst.* **2007**, *63*, 466–470.
- (51) Krebs, F. Etudes in Silico et Expérimentale de La DXR et Synthèse de D- et L-GAP Énantiofériquement Purs. PhD thesis, Université de Strasbourg, 2016.
- (52) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E.coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345* (1), 115–127.
- (53) Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T. Crystal Structure of 1-Deoxy- D -Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase , a Crucial Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *J. Biol.* **2002**, *277* (7), 5378–5384.
- (54) Ricagno, S.; Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9-Å Resolution. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1698*, 37–44.
- (55) Henriksson, L. M.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T. The 1.9 Å Resolution Structure of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a Potential Drug Target. *Acta Cryst.* **2006**, *62*, 807–813.
- (56) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Provide New Insights into Catalysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (27), 19905–19916.
- (57) Murkin, A. S.; Manning, K. A.; Kholodar, S. A. Mechanism and Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Chem.* **2014**, *57*, 171–185.
- (58) Yajima, S. Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose Reductoisomerase Complexed with Cofactors : Implications Flexible Loop Movement upon Substrate. *J. Biochem.* **2002**, *131*, 313–317.
- (59) Hoeffler, J. F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway. Mechanistic Investigations of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446–4457.
- (60) Fox, D. T.; Poulter, C. D. Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphoric Acid Analogues as Alternate Substrates for Methylerythritol Phosphate Synthase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1978–1985.
- (61) Fox, D. T.; Poulter, C. D. Mechanistic Studies with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8360–8368.
- (62) Wong, U.; Cox, R. J. The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (26), 4926–4929.
- (63) Munos, J. W.; Pu, X.; Mansoorabadi, S. O.; Kim, H. J.; Liu, H. W. A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-D-Xylulose-5- Phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction: Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2048–2049.

- (64) Proteau, P. J.; Woo, Y. H.; Williamson, R. T.; Phaosiri, C. Stereochemistry of the Reduction Step Mediated by Recombinant 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Isomeroeductase. *Org. Lett.* **1999**, *1* (6), 921–923.
- (65) Arigoni, D.; Giner, J. L.; Sagner, S.; Wungsintaweekul, J.; Zenk, M. H.; Kis, K.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Stereochemical Course of the Reduction Step in the Formation of 2-C-Methylerythritol from the Terpene Precursor 1-Deoxyxylulose in Higher Plants. *Chem. Commun.* **1999**, 1127–1128.
- (66) Radykewicz, T.; Rohdich, F.; Wungsintaweekul, J.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; Y, D. A. Biosynthesis of Terpenoids: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli* Is a Class B Dehydrogenase. *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157–160.
- (67) Phaosiri, C.; Proteau, P. J. Substrate Analogs for the Investigation of Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Inhibition: Synthesis and Evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5309–5312.
- (68) Wong, A.; Munos, J. W.; Devasthali, V.; Johnson, K. A.; Liu, H. W. Study of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase: Synthesis and Evaluation of Fluorinated Substrate Analogues. *Org. Lett.* **2004**, *6* (20), 3625–3628.
- (69) Hirsch, G.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D.; Rohmer, M. (3R,4S)-3,4,5-Trihydroxy-4-Methylpentylphosphonic Acid, an Isosteric Phosphonate Analogue of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate, a Key Intermediate in the New Pathway for Isoprenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (3), 519–521.
- (70) Meyer, O.; Grosdemange-billiard, C.; Tritsch, D.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the MEP Pathway. Synthesis of (3R,4S)-3,4-Dihydroxy-5-Oxohexylphosphonic Acid, an Isosteric Analogue of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate, the Substrate of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reducto-Isomerase. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4367–4372.
- (71) Walker, J. R.; Poulter, C. D. Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Analogues as Chelation-Based Inhibitors of Methylerythritol Phosphate Synthase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9955–9959.
- (72) Richard, S. B.; Bowman, M. E.; Kwiatkowski, W.; Kang, I.; Chow, C.; Lillo, A. M.; Cane, D. E.; Noel, J. P. Structure of 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methylerythritol Synthetase Involved in Mevalonate-Independent Isoprenoid Biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (7), 641–648.
- (73) Kemp, L. E.; Bond, C. S.; Hunter, W. N. Structure of a Tetragonal Crystal Form of *Escherichia coli* 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *D59*, 607–610.
- (74) Richard, B.; Lillo, A. M.; Tetzlaff, C. N.; Bowman, M. E.; Noel, J. P.; Cane, D. E. Kinetic Analysis of *Escherichia coli* 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate Cytidyltransferase, Wild Type and Mutants, Reveals Roles of Active Site Amino. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12189–12197.
- (75) Bjo, C.; Henriksson, L. M.; Stern, A. L.; Unge, T. Structural and Functional Studies of Mycobacterial IspD Enzymes. *Acta Crystal.* **2011**, 403–414.
- (76) Masini, T.; Kroezen, B. S.; Hirsch, A. K. H. Druggability of the Enzymes of the Non-Mevalonate-Pathway. *Drug Discov. Today* **2013**, 1–7.
- (77) Lillo, A. M.; Tetzlaff, C. N. Functional Expression and Characterization of EryA, the Erythritol Kinase of *Brucella abortus*, and Enzymatic Synthesis of L-Erythritol-4-Phosphate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 737–739.

- (78) Witschel, M. C.; Höffken, H. W.; Seet, M.; Parra, L.; Mietzner, T.; Thater, F.; Niggeweg, R.; Röhl, F.; Illarionov, B.; Rohdich, F.; et al. Inhibitors of the Herbicidal Target IspD : Allosteric Site Binding. *Angew. Chem.* **2011**, *50*, 7931–7935.
- (79) Clough, J. M.; Dale, R. P.; Elsdon, B.; Hawkes, T. R.; Hogg, B. V.; Howell, A.; Kloer, D. P.; Lecoq, K.; Mclachlan, M. M. W.; Milnes, P. J.; et al. Synthesis and Evaluation of Hydroxyazolopyrimidines as Herbicides ; the Generation of Amitrole in Planta. *Pest. Manag. Sci.* **2016**, *72*, 2254–2272.
- (80) Witschel, M.; Rottmann, M.; Marcel, K.; Reto, B. Agrochemicals Against Malaria, Sleeping Sickness, Leishmaniasis and Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (10), 1805.
- (81) Kunfermann, A.; Witschel, M.; Illarionov, B.; Martin, R.; Rottmann, M.; Höffken, H. W.; Seet, M.; Eisenreich, W.; Knölker, H.; Fischer, M.; et al. Pseudilins : Halogenated , Allosteric Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway Enzyme IspD. *Angew. Chem.* **2014**, *53*, 2235–2239.
- (82) Zhang, B.; Watts, K. M.; Hodge, D.; Kemp, L. M.; Hunstad, D. A.; Hicks, L. M.; Odom, A. R. A Second Target of the Antimalarial and Antibacterial Agent Fosmidomycin Revealed by Cellular Metabolic Profiling. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3570–3577.
- (83) Wu, W.; Herrera, Z.; Ebert, D.; Baska, K.; Cho, S. H.; Derisi, J. L.; Yeh, E. A Chemical Rescue Screen Identifies a *Plasmodium falciparum* Apicoplast Inhibitor Targeting MEP Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (1), 356–364.
- (84) Imlay, L. S.; Armstrong, C. M.; Masters, M. C.; Li, T.; Price, K. E.; Edwards, R. L.; Mann, K. M.; Li, L. X.; Stallings, C. L.; Berry, N. G.; et al. Plasmodium IspD (2-C-Methyl -D-erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase), an Essential and Druggable Antimalarial Target. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 157–167.
- (85) Price, K. E.; Armstrong, C. M.; Imlay, L. S.; Hodge, D. M.; Pidathala, C.; Roberts, N. J.; Park, J.; Mikati, M.; Sharma, R.; Lawrenson, A. S.; et al. Molecular Mechanism of Action of Antimalarial Benzoisothiazolones : Species-Selective Inhibitors of the *Plasmodium Spp.* MEP Pathway Enzyme , IspD. *Nat. Publ. Gr.* **2016**, 1–12.
- (86) Gao, P.; Yang, Y.; Xiao, C.; Liu, Y.; Gan, M.; Guan, Y.; Hao, X.; Meng, J.; Zhou, S.; Chen, X.; et al. Identification and Validation of a Novel Lead Compound Targeting 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methylerythritol Synthetase (IspD) of Mycobacteria. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *694*, 45–52.
- (87) Andreassi, J. L.; Leyh, T. S. Molecular Functions of Conserved Aspects of the GHMP Kinase Family. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14594–14601.
- (88) Timson, D. J. GHMP Kinases – Structures, Mechanisms and Potential for Therapeutically Relevant Inhibition. *Curr. Enzym. Inhib.* **2007**, *3*, 77–94.
- (89) Miallau, L.; Alphey, M. S.; Kemp, L. E.; Leonard, G. A.; Mcsweeney, S. M.; Hecht, S.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Hunter, W. N. Biosynthesis of Isoprenoids : Crystal Structure of 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (16), 1–6.
- (90) Goshu, G. M.; Ghose, D.; Bain, J. M.; Pierce, P. G.; Begley, D. W.; Hewitt, S. N.; Udell, H. S.; Myler, P. J.; Meganathan, R.; Hagen, T. J. Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazolopyrimidines as Potential Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5699–5704.
- (91) Hirsch, A. K. H.; Lauw, S.; Gersbach, P.; Schweiser, W. B.; Bacher, A.; Diederich, F. Non phosphonate Inhibitors of the IspE Protein, a Kinase in the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis and a Potential Target for Antimalarial Therapy. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 806–810.
- (92) Hirsch, A. K. H.; Alphey, M. S.; Lauw, S.; Seet, M.; Barandun, L.; Eisenreich, W.; Rohdich, F.;

- Hunter, W. N. Inhibitors of the Kinase IspE : Structure – Activity Relationships and Co-Crystal Structure Analysis. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2719–2730.
- (93) Schütz, A. P.; Locher, S.; Bernet, B.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Bacher, A.; Diederich, F. 5-Substituted (1-Thiolan-2-Yl) Cytosines as Inhibitors of *A. aeolicus* and *E. coli* IspE Kinases : Very Different Affinities to Similar Substrate-Binding Sites. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 880–887.
- (94) Schütz, A. P.; Osawa, S.; Mathis, J.; Hirsch, A. K. H.; Bernet, B.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Bacher, A.; Diederich, F. Exploring the Ribose Sub-Pocket of the Substrate-Binding Site in *Escherichia coli* IspE : Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Cytosines and Cytosine Analogues. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3278–3287.
- (95) Hirsch, A. K. H.; Hans, G. B. Bioconjugates to Specifically Render Inhibitors Water-Soluble. *Soft Matter* **2010**, *6*, 88–91.
- (96) Mombelli, P.; Chapelain, L.; Munzinger, N.; Joliat, E.; Illarionov, B.; Schweizer, W. B.; Hirsch, A. K. H.; Fischer, M.; Bacher, A.; Diederich, F. Imidazole- and Benzimidazole-Based Inhibitors of the Kinase IspE: Targeting the Substrate-Binding Site and the Triphosphate-Binding Loop of the ATP Site. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1068–1079.
- (97) Mombelli, P.; Witschel, M. C.; Zijl, A. W. Van; Geist, J. G.; Rottmann, M.; Freymond, C.; Rçhl, F.; Kaiser, M. Identification of 1, 3-Diiminoisoindoline Carbohydrazides as Potential Antimalarial Candidates. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 151–158.
- (98) Crane, C. M.; Hirsch, A. K. H.; Alpey, M. S.; Sgraja, T.; Lauw, S.; Illarionova, V.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Hunter, W. N.; Bacher, A.; et al. Synthesis and Characterization of Cytidine Derivatives That Inhibit the Kinase IspE of the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 91–101.
- (99) Harder, M.; Schäfer, E.; Kümin, T.; Illarionov, B.; Bacher, A.; Fischer, M.; Diederich, F.; Bernet, B. 8-Substituted , Syn -Configured Adenosine Derivatives as Potential Inhibitors of the Enzyme IspE from the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7276–7286.
- (100) Tang, M.; Odejinmi, S. I.; Allette, Y. M.; Vankayalapati, H.; Lai, K. Bioorganic & Medicinal Chemistry Identification of Novel Small Molecule Inhibitors of 4-Diphosphocytidyl-2- C - Methyl- D -Erythritol (CDP-ME) Kinase of Gram-Negative Bacteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5886–5895.
- (101) Tidten-luksch, N.; Grimaldi, R.; Torrie, L. S.; Frearson, J. A.; Hunter, W. N.; Brenk, R. IspE Inhibitors Identified by a Combination of In Silico and In Vitro High-Throughput Screening. *PLoS One* **2012**, *7* (4), 1–16.
- (102) Eoh, H.; Narayanasamy, P.; Brown, A. C.; Parish, T.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. Expression and Characterization of Soluble Kinase from Bacterial Pathogens. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1230–1239.
- (103) Shan, S.; Chen, X.; Liu, T.; Zhao, H.; Rao, Z.; Lou, Z. Crystal Structure of 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D- Erythritol Kinase (IspE) from *Mycobacterium tuberculosis*. *FASEB J.* **2017**, *25* (5), 1577–1584.
- (104) Takagi, M.; Kuzuyama, T.; Kaneda, K.; Watanabe, H.; Dairi, T.; Seto, H. Studies on the Nonmevalonate Pathway : Formation of 2-C-Methyl- D-Erythritol 2, 4-Cyclodiphosphate from 2-Phospho-4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3395–3398.

- (105) Herz, S.; Wungsintaweekul, J.; Schuhr, C. A.; Hecht, S.; Luttgen, H.; Sagner, S.; Fellermeier, M.; Eisenreich, W.; Zenk, M. H.; Bacher, A.; et al. Biosynthesis of Terpenoids: YgbB Protein Converts 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol 2-Phosphate to 2C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2000**, *97* (6), 2486–2490.
- (106) Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Wungsintaweekul, J.; Hecht, S.; Eisenreich, W.; Gerhardt, S.; Bacher, A.; Rohdich, F. Structure of 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase Involved in Mevalonate-Independent Biosynthesis of Isoprenoids. *J. Mol. Biol.* **2001**, *316* (1), 79–88.
- (107) Richard, S. B.; Ferrer, J. L.; Bowman, M. E.; Lillo, A. M.; Tetzlaff, C. N.; Cane, D. E.; Noel, J. P. Structure and Mechanism of 2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase: An Enzyme in the Mevalonate-Independent Isoprenoid Biosynthetic Pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (10), 8667–8672.
- (108) Kemp, L. E.; Bond, C. S.; Hunter, W. N. Structure of 2C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase: An Essential Enzyme for Isoprenoid Biosynthesis and Target for Antimicrobial Drug Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99* (10), 6591–6596.
- (109) Kishida, H.; Wada, T.; Unzai, S.; Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Tame, J. R. H.; Park, S. Y. Structure and Catalytic Mechanism of 2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate (MECDP) Synthase, an Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Synthesis. *Acta Crystal.* **2003**, *D59*, 23–31.
- (110) Lehmann, C.; Lim, K.; Toedt, J.; Krajewski, W.; Howard, A.; Eisenstein, E.; Herzberg, O. Structure of 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase from *Haemophilus influenzae*: Activation by Conformational Transition. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *49*, 135–138.
- (111) Ni, S.; Robinson, H.; Marsing, G. C.; Bussiere, D. E.; Kennedy, M. A. Structure of 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase from *Shewanella oneidensis* at 1.6 Å: Identification of Farnesyl Pyrophosphate Trapped in a Hydrophobic Cavity. *Acta Crystal.* **2004**, *D60*, 1949–1957.
- (112) Kemp, L. E.; Alpey, M. S.; Bond, C. S.; Ferguson, M. A. J.; Hecht, S.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Hunter, W. N. The Identification of Isoprenoids That Bind in the Intersubunit Cavity of *Escherichia coli* 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase by Complementary Biophysical Methods. *Acta Crystal.* **2005**, *D61*, 45–52.
- (113) Bitok, J. K.; Meyers, C. F. 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Enhances and Sustains Cyclodiphosphate Synthase IspF Activity. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1702–1710.
- (114) O'Rourke, P. E.; Kalinowska-Tłuścik, J.; Fyfe, P. K.; Dawson, A.; Hunter, W. N. Crystal Structures of IspF from *Plasmodium falciparum* and *Burkholderia cenocepacia*: Comparisons Inform Antimicrobial Drug Target Assessment. *BMC Struct. Biol.* **2014**, *14* (1), 1–12.
- (115) Crane, C. M.; Kaiser, J.; Ramsden, N. L.; Lauw, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Hunter, W. N.; Bacher, A.; Diederich, F. Fluorescent Inhibitors for IspF, an Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis and a Potential Target for Antimalarial Therapy. *Angew. Chem.* **2006**, *45*, 1069–1074.
- (116) Baumgartner, C.; Eberle, C.; Diederich, F.; Lauw, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Bacher, A. Structure-Based Design and Synthesis of the First Weak Non-Phosphate Inhibitors for IspF, an Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 1043–1068.

- (117) Geist, J. G.; Lauw, S.; Illarionova, V.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Gräwert, T.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Kaiser, J.; Groll, M.; et al. Thiazolopyrimidine Inhibitors of 2-Methylerythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase (IspF) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1092–1101.
- (118) Bitok, J. K.; Meyers, C. F. Synthesis and Evaluation of Stable Substrate Analogs as Potential Modulators of Cyclodiphosphate Synthase IspF. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 130–134.
- (119) Krasutsky, S. G.; Urbansky, M.; Davis, C. E.; Lherbet, C.; Coates, R. M.; Poulter, C. D. Synthesis of Methylerythritol Phosphate Analogues and Their Evaluation as Alternate Substrates for IspDF and IspE from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9170–9178.
- (120) Thelemann, J.; Illarionov, B.; Barylyuk, K.; Geist, J.; Kirchmair, J.; Schneider, P.; Anthore, L.; Root, K.; Trapp, N.; Bacher, A.; et al. Aryl Bis-Sulfonamide Inhibitors of IspF from *Arabidopsis thaliana* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem* **2015**, 2090–2098.
- (121) Seemann, M.; Rohmer, M.; Campos, N.; Rodr, M.; Y, A. B. Identification of gcpE as a Novel Gene of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **2001**, *488*, 170–173.
- (122) Seemann, M.; Bui, B. T. S.; Wolff, M.; Tritsch, D.; Campos, N.; Boronat, A.; Marquet, A.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis through the Methylerythritol Phosphate Pathway: The (E)4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphate Synthase (GcpE) Is a [4Fe-4S] Protein. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2002**, *41* (22), 4337–4339.
- (123) Beinert, H.; Holm, R. H.; Münck, E. Iron-Sulfur Clusters : Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* **2007**, *277*, 653–659.
- (124) Seemann, M.; Tse Sum Bui, B.; Wolff, M.; Miginiac-Maslow, M.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis in Plant Chloroplasts via the MEP Pathway: Direct Thylakoid/ferredoxin-Dependent Photoreduction of GcpE/IspG. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1547–1552.
- (125) Rekitke, I.; Nonaka, T.; Wiesner, J.; Demmer, U.; Warkentin, E.; Jomaa, H.; Ermler, U. Structure of the E-1-Hydroxy-2-Methyl-but-2-Enyl-4-Diphosphate Synthase (GcpE) from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 447–451.
- (126) Lee, M.; Gräwert, T.; Quitterer, F.; Rohdich, F.; Eppinger, J.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Groll, M. Biosynthesis of Isoprenoids: Crystal Structure of the [4Fe-4S] Cluster Protein IspG. *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 600–610.
- (127) Rekitke, I.; Warkentin, E.; Jomaa, H.; Ermler, U. Structure of the GcpE (IspG)-MEcPP Complex from *Thermus thermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 246–250.
- (128) Quitterer, F.; Frank, A.; Wang, K.; Rao, G.; O'Dowd, B.; Li, J.; Guerra, F.; Abdel-Azeim, S.; Bacher, A.; Eppinger, J.; et al. Atomic-Resolution Structures of Discrete Stages on the Reaction Coordinate of the [Fe₄S₄] Enzyme IspG (GcpE). *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2220–2228.
- (129) Wang, W.; Li, J.; Wang, K.; Huang, C.; Zhang, Y.; Oldfield, E. Organometallic Mechanism of Action and Inhibition of the 4Fe-4S Isoprenoid Biosynthesis Protein GcpE (IspG). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (25), 11189–11193.
- (130) McMillan, R. S.; Renaud, J.; Reynolds, J. G.; Holm, R. H. Biologically Related Iron-Sulfur Clusters as Reaction Centers. Reduction of Acetylene to Ethylene in Systems Based on [Fe₄S₄(SR)₄]³⁻. *J. Inorg. Biochem.* **1979**, *11*, 213–227.

- (131) Tanaka, K.; Nakamoto, M.; Tsunomori, M.; Tanaka, T. Raman Spectra of the Adducts of Reduced Species of $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ and $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_8(\text{SPh})_9]^{3-}$ with Acetylene. *Chem. Lett.* **1987**, 613–616.
- (132) Liu, Y.; Guerra, F.; Wang, K.; Wang, W.; Li, J.; Huang, C.; Zhu, W.; Houlihan, K. Structure, Function and Inhibition of the Two- and Three-Domain 4Fe-4S IspG Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109* (22), 8558–8563.
- (133) Singh, G.; Garg, S.; Rajeshkumar, Z.; Kumar, S.; Kumar, S.; Kumar, D.; Saxena, V. Characterization of 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-En-1-Yl Diphosphate Synthase (IspG) from *Plasmodium vivax* and It 's Potential as an Antimalarial Drug Target. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *96*, 466–473.
- (134) Wolff, M.; Seemann, M.; Tse Sum Bui, B.; Frapart, Y.; Tritsch, D.; Garcia Estrabot, A.; Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A.; Marquet, A.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: The (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphate Reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* Is a [4Fe-4S] Protein. *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115–120.
- (135) Gräwert, T.; Rohdich, F.; Span, L.; Backer, A.; Eisenreich, W.; Eppinger, J.; Groll, M. Structure of Active IspH Enzyme from *Escherichia coli* Provides Mechanistic Insights into Substrate Reduction. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756–5759.
- (136) Rekitke, I.; Wiesner, J.; Ro, R.; Demmer, U.; Warkentin, E.; Xu, W.; Hintz, M.; No, J. H.; Duin, E. C.; Oldfield, E.; et al. Structure of (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-but-2-Enyl Diphosphate Reductase, the Terminal Enzyme of the Non-Mevalonate Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17206–17207.
- (137) Gräwert, T.; Kaiser, J.; Zepeck, F.; Laupitz, R.; Hecht, S.; Amslinger, S.; Schramek, N.; Schleicher, E.; Weber, S.; Haslbeck, M.; et al. IspH Protein of *Escherichia coli*: Studies on Iron-Sulfur Cluster Implementation and Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12847–12855.
- (138) Wang, W.; Wang, K.; Liu, Y.-L.; No, J.-H.; Li, J.; Nilges, M. J.; Oldfield, E. Bioorganometallic Mechanism of Action, and Inhibition, of IspH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (10), 4522–4527.
- (139) Span, I.; Gräwert, T.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Groll, M. Crystal Structures of Mutant IspH Proteins Reveal a Rotation of the Substrate's Hydroxymethyl Group during Catalysis. *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 1–9.
- (140) Span, I.; Wang, K.; Wang, W.; Zhang, Y.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Li, K.; Schulz, C.; Oldfield, E.; Groll, M. Discovery of Acetylene Hydratase Activity of the Iron-sulphur Protein IspH. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1–8.
- (141) Wang, K.; Wang, W.; No, J.; Zhang, Y.; Zhang, Y. Inhibition of the 4Fe-4S -Cluster-Containing Protein IspH (LytB): Electron Paramagnetic Resonance , Metallacycles , and Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719–6727.
- (142) Span, I.; Wang, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zhang, Y.; Oldfield, E.; Groll, M. Insights into the Binding of Pyridines to the Iron-Sulfur Enzyme IspH. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7926–7932.
- (143) Van Hoof, S.; Lacey, C. J.; Röhrich, R. C.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of Analogues of (E)-1-Hydroxy-2-Methylbut-2-Enyl 4-Diphosphate, an Isoprenoid Precursor and Human $\gamma\beta$ T Cell Activator. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1365–1370.
- (144) Ahrens-Botzong, A.; Janthawornpong, K.; Wolny, J. A.; Tambou, E. N.; Rohmer, M.; Krasutsky, S.; Poulter, C. D.; Schünemann, V.; Seemann, M. Biosynthesis of Isoprene Units: Mössbauer Spectroscopy of Substrate and Inhibitor Binding to the [4Fe-4S] Cluster of the LytB/IspH

- Enzyme. *Angew. Chem.* **2011**, *50*, 11976–11979.
- (145) Janthawornpong, K.; Krasutsky, S.; Chaignon, P.; Rohmer, M.; Poulter, C. D.; Seemann, M. Inhibition of IspH, a [4Fe-4S]²⁺ Enzyme Enzyme Involved in the Biosynthesis of Isoprenoids via the Methylerythritol Phosphate Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1816–1822.
- (146) Guerra, F.; Wang, K.; Li, J.; Wang, W.; Liu, Y.-L.; Amin, S.; Oldfield, E. Inhibition of the 4Fe–4S Proteins IspG and IspH: An EPR, ENDOR and HYSCORE Investigation. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1642–1649.
- (147) Span, I.; Wang, K.; Wang, W.; Jauch, J.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Oldfield, E.; Groll, M. Structures of Fluoro, Amino, and Thiol Inhibitors Bound to the [Fe₄S₄] Protein IspH. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2013**, *52*, 2118–2121.
- (148) Wang, W.; Wang, K.; Span, I.; Jauch, J.; Bacher, A.; Groll, M.; Oldfield, E. Are Free Radicals Involved in IspH Catalysis? An EPR and Crystallographic Investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11225–11234.
- (149) Li, J.; Wang, K.; Smirnova, T. I.; Khade, R. L.; Zhang, Y.; Oldfield, E. Isoprenoid Biosynthesis : Ferraoxetane or Allyl Anion Mechanism for IspH Catalysis ? *Angew. Chem.* **2013**, *52*, 6522–6525.
- (150) Faus, I.; Reinhard, A.; Rackwitz, S.; Wolny, J. A.; Schlage, K.; Wille, H. C.; Chumakov, A.; Krasutsky, S.; Chaignon, P.; Poulter, C. D.; et al. Isoprenoid Biosynthesis in Pathogenic Bacteria: Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy Provides Insight into the Unusual [4Fe-4S] Cluster of the *E. coli* LytB/IspH Protein. *Angew. Chem.* **2015**, *54*, 12584–12587.
- (151) Seemann, M.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: GcpE and LytB, Two Novel Iron-Sulphur Proteins. *Comptes Rendus Chim.* **2007**, *10*, 748–755.
- (152) Wang, W.; Oldfield, E. Bioorganometallic Chemistry with IspG and IspH: Structure, Function, and Inhibition of the [Fe₄S₄] Proteins Involved in Isoprenoid Biosynthesis. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *53*, 4294–4310.
- (153) Eberl, M.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Kollas, A.-K.; Wiesner, J.; Jomaa, H. Microbial Isoprenoid Biosynthesis and Human $\gamma\delta$ T Cell Activation. *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 4–10.
- (154) Davey, M. S.; Lin, C.-Y.; Roberts, G. W.; Heuston, S.; Brown, A. C.; Chess, J. A.; Toleman, M. A.; Gahan, C. G. M.; Hill, C.; Parish, T.; et al. Human Neutrophil Clearance of Bacterial Pathogens Triggers Anti-Microbial $\gamma\delta$ T Cell Responses in Early Infection. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (5), 1–13.
- (155) OMS. Stratégie de l’OMS pour mettre fin à la tuberculose <http://www.who.int/tb/strategy/fr/> (accessed Apr 21, 2017).
- (156) OMS. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/> (accessed Apr 21, 2017).
- (157) Mine, Y.; Kamimura, T.; Nonoyama, S.; Nishida, M.; Goto, S.; Kuwahara, S. In Vitro and in Vivo Antibacterial Activities of FR-31564, a New Phosphonic Acid Antibiotic. *J. Antibiot.* **1980**, *33* (1), 36–43.
- (158) Kojo, H.; Shigi, Y.; Nishida, M. FR-31564, A New Phosphonic Acid Antibiotic: bacterial Resistance and Membrane Permeability. *J. Antibiot.* **1980**, *33* (1), 44–48.
- (159) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. III. Isolation and Characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 24–28.

- (160) Kuroda, Y.; Okuhara, M.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Structure Determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863. *J Antibiot* **1980**, *33* (1), 29–35.
- (161) 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.* **1980**, *33* (1), 13–17.
- (162) Shigi, Y. Inhibition of Bacterial Isoprenoid Synthesis by Fosmidomycin, a Phosphonic Acid-Containing Antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, *24*, 131–145.
- (163) Kuzuyama, T.; Tomohiro, S.; Takahashi, S.; Seto, H. Fosmidomycine, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913–7916.
- (164) Koppisch, a T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S. J.; Poulter, C. D. *E-coli* MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding. *Biochemistry* **2002**, *41*, 236–243.
- (165) Ian, V. I.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science* **1999**, *285*, 1573–1575.
- (166) Missinou, M. A.; Borrmann, S.; Schindler, A.; Issifou, S.; Adegnika, A. A.; Matsiegui, P. B.; Binder, R.; Lell, B.; Wiesner, J.; Baranek, T.; et al. Fosmidomycin for Malaria. *Lancet.* **2002**, *360*, 1941–1942.
- (167) Wiesner, J.; Henschker, D.; B, D.; Hutchinson, D. B.; Beck, E.; Jomaa, H. In Vitro and In Vivo Synergy of Fosmidomycin , a Novel Antimalarial Drug , with Clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (9), 2889–2894.
- (168) Borrmann, S.; Issifou, S.; Esser, G.; Adegnika, A. a; Ramharter, M.; Matsiegui, P.-B.; Oyakhirome, S.; Mawili-Mboumba, D. P.; Missinou, M. a; Kun, J. F. J.; et al. Fosmidomycin-Clindamycin for the Treatment of *Plasmodium Falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190* (9), 1534–1540.
- (169) Sakamoto, Y.; Furukawa, S.; Ogihara, H. Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (Cya) Mutants of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67* (9), 2030–2033.
- (170) Brown, A. C.; Parish, T. Dxr Is Essential in *Mycobacterium tuberculosis* and Fosmidomycin Resistance Is due to a Lack of Uptake. *BMC Microbiol.* **2008**, *8* (78), 1–9.
- (171) Fujisaki, S.; Ohnuma, S. ichi; Horiuchi, T.; Takahashi, I.; Tsukui, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Kitabatake, M.; Inokuchi, H. Cloning of a Gene from *Escherichia coli* That Confers Resistance to Fosmidomycin as a Consequence of Amplification. *Gene* **1996**, *175*, 83–87.
- (172) Messiaen, A. S.; Verbrugghen, T.; Declerck, C.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Nelis, H.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. Resistance of the *Burkholderia cepacia* Complex to Fosmidomycin and Fosmidomycin Derivatives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38* (3), 261–264.
- (173) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (174) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Modifications around the Hydroxamic Acid Chelating Group of Fosmidomycin, an Inhibitor of the Metalloenzyme 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6563–

- 6567.
- (175) Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z. Z.; Song, Y. Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6539–6542.
- (176) Andaloussi, M.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Suresh, S.; Wieckowska, A.; Iyer, H.; Karlén, A.; Larhed, M. Substitution of the Phosphonic Acid and Hydroxamic Acid Functionalities of the DXR Inhibitor FR900098: An Attempt to Improve the Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5403–5407.
- (177) Mercklé, L.; De Andrés-Gómez, A.; Dick, B.; Cox, R. J.; Godfrey, C. R. A. A Fragment-Based Approach to Understanding Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1866–1874.
- (178) Woo, Y. H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the *Synechocystis Sp.* PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375–2385.
- (179) Deng, L.; Diao, J.; Chen, P.; Pujari, V.; Yao, Y.; Cheng, G.; Crick, D. C.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase by Lipophilic Phosphonates: SAR, QSAR, and Crystallographic Studies. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4721–4734.
- (180) Deng, L.; Endo, K.; Kato, M.; Cheng, G.; Yajima, S.; Song, Y. Structures of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase/lipophilic Phosphonate Complexes. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 165–170.
- (181) Konzuch, S.; Umeda, T.; Held, J.; Hähn, S.; Brücher, K.; Lienau, C.; Behrendt, C. T.; Gräwert, T.; Bacher, A.; Illarionov, B.; et al. Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8827–8838.
- (182) Williams, S. L.; De Oliveira, C. A. F.; Vazquez, H.; McCammon, J. A. From Zn to Mn: The Study of Novel Manganese-Binding Groups in the Search for New Drugs against Tuberculosis. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 117–123.
- (183) Montel, S.; Midrier, C.; Volle, J.; Braun, R.; Haaf, K.; Willms, L.; Pirat, J.; Virieux, D. Functionalized Phosphanyl-Phosphonic Acids as Unusual Complexing Units as Analogues of Fosmidomycin. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3237–3248.
- (184) Midrier, C.; Montel, S.; Braun, R.; Haaf, K.; Willms, L.; van der Lee, A.; Volle, J.-N.; Pirat, J.-L.; Virieux, D. Fosmidomycin Analogues with N-Hydroxyimidazole and N-Hydroxyimidazolone as a Chelating Unit. *RSC Adv.* **2014**, *4* (45), 23770.
- (185) Hemmi, K.; Takeno, H.; Hashimoto, M.; Kamiya, T. Studies on Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Synthesis and Antibacterial Activity of Analogs of 3-(N-Acetyl-N-Hydroxyamino)-Propylphosphonic Acid (FR-900098). *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30* (1), 111–118.
- (186) Haemers, T.; Wiesner, J.; Van Poecke, S.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of Alpha-Substituted Fosmidomycin Analogues as Highly Potent *Plasmodium Falciparum* Growth Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1888–1891.
- (187) Devreux, V.; Wiesner, J.; Goeman, J. L.; Van Der Eycken, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl Analogues of Fosmidomycin as Potent *Plasmodium Falciparum* Growth Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2656–2660.
- (188) Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of α -Aryl-Substituted and Conformationally Restricted Fosmidomycin Analogues as Promising

- Antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3856–3863.
- (189) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α,β -Unsaturated α -Aryl-Substituted Fosmidomycin Analogues as DXR Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4920–4923.
- (190) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Rozenski, J.; Eycken, J. Van Der; Calenbergh, S. Van. Divergent Strategy for the Synthesis of α -Aryl-Substituted Fosmidomycin Analogues. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3783–3789.
- (191) Haemers, T.; Wiesner, J.; Gießmann, D.; Verbrugghen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S. Synthesis of β - and α -Oxa Isosteres of Fosmidomycin and FR900098 as Antimalarial Candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3361–3371.
- (192) Katayama, N.; Tsubotani, S.; Nozaki, Y.; Harada, S.; Ono, H. Fosfadecin and Fosfocytocin, New Nucleotide Antibiotics Produced by Bacteria. *J. Antibiot.* **1990**, *43* (3), 238–246.
- (193) Munier, M.; Tritsch, D.; Krebs, F.; Esque, J.; Hemmerlin, A.; Rohmer, M.; Stote, R. H.; Grosdemange-billiard, C. Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Isosteres of Fosmidomycin and Analogs as Inhibitors of *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerases. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 684–689.
- (194) Nieschalk, J.; Batsanov, A. S.; Hagan, D. O.; Howard, J. A. K. Synthesis of Monofluoro- and Difluoro- Methylene phosphonate Analogues of Sn-Glycerol-3-Phosphate as Substrates for Glycerol-3- Phosphate Dehydrogenase and the X-Ray Structure of the Fluoromethylene phosphonate Moiety. *Tetrahedron* **1996**, *52* (1), 165–176.
- (195) Verbrugghen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α -Halogenated Analogues of 3-(Acetylhydroxyamino)propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5342–5346.
- (196) Volle, J.; Midrier, C.; Blanchard, V.; Braun, R.; Haaf, K.; Willms, L.; Pirat, J.-L.; Virieux, D. Preparation of Gem-Difluorinated Retrohydroxamic-Fosmidomycin. *Arkivoc* **2015**, *4*, 117–126.
- (197) Verbrugghen, T.; Vandurm, P.; Pouyez, J.; Maes, L.; Wouters, J.; Calenbergh, S. Van. Alpha-Heteroatom Derivatized Analogues of FR900098 as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 376–380.
- (198) Chofor, R.; Sooriyaarachchi, S.; Risseeuw, M. D. P.; Bergfors, T.; Pouyez, J.; Johny, C.; Haymond, A.; Everaert, A.; Dowd, C. S.; Maes, L.; et al. Synthesis and Bioactivity of β -Substituted Fosmidomycin Analogues Targeting 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2988–3001.
- (199) Sooriyaarachchi, S.; Chofor, R.; Risseeuw, M. D. P.; Bergfors, T.; Pouyez, J.; Dowd, C. S.; Maes, L.; Wouters, J.; Jones, T. A.; Van Calenbergh, S.; et al. Targeting an Aromatic Hotspot in Plasmodium Falciparum 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase with β -Arylpropyl Analogues of Fosmidomycin. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1–14.
- (200) Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D.; Geffken, D. Synthesis and Antimalarial Activity of Chain Substituted Pivaloyloxymethyl Ester Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121–5135.
- (201) Schlüter, K.; Walter, R. D.; Bergmann, B.; Kurz, T. Arylmethyl Substituted Derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and Antimalarial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1385–1397.
- (202) Kurz, T.; Schlüter, K.; Pein, M.; Behrendt, C.; Bergmann, B.; Walter, R. D. Conformationally Restrained Aromatic Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 339–

- 344.
- (203) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheussen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; et al. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1673–1676.
- (204) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheussen, A.; Pein, M. K.; Gr, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; et al. Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6796–6802.
- (205) Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; et al. α -Substituted β -Oxa Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566–6575.
- (206) Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C. T.; Werner, P.; Hähn, S.; Eisenreich, W.; Riederer, U.; et al. IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery: Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmidomycin Thia Isosters. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8151–8162.
- (207) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3203–3207.
- (208) Jackson, E. R.; San Jose, G.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Sheldon, Z.; Haymond, A.; Johny, C.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; Dowd, C. S. The Effect of Chain Length and Unsaturation on Mtb Dxr Inhibition and Antitubercular Killing Activity of FR900098 Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 649–653.
- (209) Xue, J.; Diao, J.; Cai, G.; Deng, L.; Zheng, B.; Yao, Y.; Song, Y. Antimalarial and Structural Studies of Pyridine-Containing Inhibitors of 1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 278–282.
- (210) Nordqvist, A.; Björkelid, C.; Andaloussi, M.; Jansson, A. M.; Mowbray, S. L.; Karlén, A.; Larhed, M. Synthesis of Functionalized Cinnamaldehyde Derivatives by an Oxidative Heck Reaction and Their Use as Starting Materials for Preparation of *Mycobacterium Tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8986–8998.
- (211) Kurz, T.; Geffken, D.; Wackendorff, C. Carboxylic Acid Analogues of Fosmidomycin. *J. Chem. Sci.* **2003**, *58*, 457–461.
- (212) Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkämper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. Studies Addressing the Importance of Charge in the Binding of Fosmidomycin-like Molecules to Deoxyxylulosephosphate Reductoisomerase. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1232–1241.
- (213) Gadakh, B.; Pouyez, J.; Wouters, J.; Venkatesham, A.; Cos, P.; Van Aerschot, A. N-Acylated Sulfonamide Congeners of Fosmidomycin Lack Any Inhibitory Activity against DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1577–1579.
- (214) Nguyen-Trung, A. T.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Synthesis of Tetrazole Analogues of Phosphonohydroxamic Acids: An Attempt to Improve the Inhibitory Activity against the DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1643–1647.
- (215) Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. Diaryl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *in vivo*

- Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833–835.
- (216) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Acyloxyalkyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved in Vivo Antimalarial Activity. *Arch. Pharm.* **2003**, *13*, 2163–2166.
- (217) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Alkoxy-carbonyloxyethyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved in Vivo Antimalarial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, *338*, 305–314.
- (218) Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Double Ester Prodrugs of FR900098 Display Enhanced in-Vitro Antimalarial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 667–669.
- (219) Brücher, K.; Gräwert, T.; Konzuch, S.; Held, J.; Lienau, C.; Behrendt, C.; Illarionov, B.; Maes, L.; Bacher, A.; Wittlin, S.; et al. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2025–2035.
- (220) Uh, E.; Jackson, E. R.; San Jose, G.; Maddox, M.; Lee, R. E.; Lee, R. E.; Boshoff, H. I.; Dowd, C. S. Antibacterial and Antitubercular Activity of Fosmidomycin, FR900098, and Their Lipophilic Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6973–6976.
- (221) McKenney, E. S.; Sargent, M.; Khan, H.; Uh, E.; Jackson, E. R.; Jose, G. S.; Couch, R. D.; Dowd, C. S.; van Hoek, M. L. Lipophilic Prodrugs of FR900098 Are Antimicrobial against *Francisella Novicida* In Vivo and In Vitro and Show GlpT Independent Efficacy. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–12.
- (222) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium Smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285.
- (223) Faisca Phillips, A. M.; Nogueira, F.; Murtinheira, F.; Barros, M. T. Synthesis and Antimalarial Evaluation of Prodrugs of Novel Fosmidomycin Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2112–2116.
- (224) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Silber, K.; Klebe, G.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Novel Deoxyxylulosephosphate-Reductoisomerase Inhibitors: Fosmidomycin Derivatives with Spacious Acyl Residues. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 483–490.
- (225) Gießmann, D.; Heidler, P.; Haemers, T.; Van Calenbergh, S.; Reichenberg, A.; Jomaa, H.; Weidemeyer, C.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Link, A. Towards New Antimalarial Drugs: Synthesis of Non-Hydrolyzable Phosphate Mimics as Feed for a Predictive QSAR Study on 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 643–656.
- (226) Bodill, T.; Conibear, A. C.; Blatch, G. L.; Lobb, K. A.; Kaye, P. T. Synthesis and Evaluation of Phosphonated N-Heteroarylcarboxamides as DOXP-Reductoisomerase (DXR) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1321–1327.
- (227) Bodill, T.; Conibear, A. C.; Mutorwa, M. K. M.; Goble, J. L.; Blatch, G. L.; Lobb, K. A.; Klein, R.; Kaye, P. T. Exploring DOXP-Reductoisomerase Binding Limits Using Phosphonated N-Aryl and N-Heteroarylcarboxamides as DXR Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4332–4341.
- (228) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Uh, E.; Johnny, C.; Haymond, A.; Lundberg, L.; Pinkham, C.; Kehn-Hall, K.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; et al. Design of Potential Bisubstrate Inhibitors against *Mycobacterium Tuberculosis* (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr)-Evidence of a Novel Binding Mode. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 1099–1104.

- (229) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Haymond, A.; Johnny, C.; Edwards, R. L.; Wang, X.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Odom, A. R.; Boshu, H. I.; et al. Structure – Activity Relationships of the MEPicides: N-Acyl and O-Linked Analogs of FR900098 as Inhibitors of Dxr from *Mycobacterium Tuberculosis* and *Yersinia Pestis*. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 923–935.
- (230) Chofor, R.; Risseuw, M. D. P.; Pouyez, J.; Johnny, C.; Wouters, J.; Dowd, C. S.; Couch, R. D.; Van Calenbergh, S. Synthetic Fosmidomycin Analogues with Altered Chelating Moieties Do Not Inhibit 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase or *Plasmodium Falciparum* Growth in Vitro. *Molecules* **2014**, *19*, 2571–2587.
- (231) Jansson, A. M.; Więckowska, A.; Björkelid, C.; Yahiaoui, S.; Sooriyaarachchi, S.; Lindh, M.; Bergfors, T.; Dharavath, S.; Desroses, M.; Suresh, S.; et al. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6190–6199.
- (232) Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Catechol – Rhodanine Derivatives : Specific and Promiscuous Inhibitors of *Escherichia coli* Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3713–3719.
- (233) Sem, D. S.; Bertolaet, B.; Baker, B.; Chang, E.; Costache, A. D.; Coutts, S.; Dong, Q.; Hansen, M.; Hong, V.; Huang, X.; et al. Systems-Based Design of Bi-Ligand Inhibitors of Oxidoreductases : Filling the Chemical Proteomic Toolbox. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 185–194.
- (234) Ge, X.; Wakim, B.; Sem, D. S. Chemical Proteomics-Based Drug Design: Target and Antitarget Fishing with a Catechol-Rhodanine Privileged Scaffold for NAD(P)(H) Binding Proteins. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4571–4580.

Cadre général et stratégies

Le but de cette thèse est de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de la voie du MEP et plus précisément de la DXR. Trois éléments clés sont ressortis pour orienter les modifications de la fosmidomycine et les synthèses de ses analogues. Premièrement, le phosphonate joue un rôle essentiel dans l'ancrage de la fosmidomycine dans le site actif, mais masquer ses charges négatives permettrait d'augmenter la lipophilie des molécules et ainsi favoriser leur passage passif au travers de la membrane plasmique. Synthétiser des prodrogues électriquement neutres s'avère nécessaire, par exemple dans le cas de *M. tuberculosis* qui ne possède pas le transporteur à GlpT permettant le passage de la fosmidomycine chez *E. coli*. Il faut noter que le DXP, le substrat naturel de la DXR, possède un phosphate à la place du phosphonate de la fosmidomycine, mais ces deux groupements sont les seuls reconnaissables par l'enzyme. Deuxièmement, la longueur de chaîne idéale est de trois méthylènes entre le phosphonate et la pince chélatante, mais cette chaîne peut être fonctionnalisée en α du phosphonate par un groupement aryle qui a un effet favorable sur l'inhibition. Finalement, l'enzyme accepte pour pince chélatante un hydroxamate dans ses deux orientations, mais le remplacement de cette fonction par un autre groupement fonctionnel conduit dans la majorité des cas à une perte importante de l'activité inhibitrice. Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré qu'une extension au niveau de l'hydroxamate avec des composés *N*-substitués permet de conserver une activité inhibitrice et ainsi, d'envisager de cibler d'autres poches, et éventuellement augmenter l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

Parmi les inhibiteurs les plus prometteurs synthétisés au cours des dernières décennies, ceux ciblant une autre poche se sont avérés être des plus efficaces, notamment les inhibiteurs ciblant une cavité présente sous la fonction phosphonate.

Ces travaux de thèse se sont ainsi orientés vers la synthèse d'inhibiteurs conservant ces différents points clés et ciblant deux sites distincts, à savoir le site du substrat naturel et celui du NADPH. Pour ce faire, deux approches ont été envisagées : une approche biligand et une approche bisubstrat. La première consiste à cibler les deux sites avec deux molécules distinctes tandis que la seconde à cibler les sites avec une seule molécule. Pour mener à bien ce projet, des travaux de modélisation moléculaire ont été réalisés par le Dr. Fanny Krebs et le Dr. Jérémy Esque de l'équipe du Dr. Roland Stote. Ces travaux de modélisation nous ont permis d'évaluer la capacité des composés à se fixer au sein de l'enzyme, dans les sites ciblés et à sélectionner des mimes du NADPH.

La première approche, dite biligand consiste à synthétiser des ligands bioorthogonaux appropriés et complémentaires qui réagiront par une réaction « click » *in situ* de manière à former à l'intérieur du

site actif une liaison covalente entre les deux ligands (Fig. 94). Cette réaction devrait être favorisée lors de la fermeture de la boucle située au-dessus du site actif de la DXR consécutive à l'occupation des sites par les inhibiteurs. En effet, la fermeture de la boucle en temps normal permet un rapprochement entre le DXP et le NADPH pour permettre la réduction du DXP en MEP. Deux molécules adaptées l'une au site de fixation du substrat de la DXR et l'autre à celui du cofacteur NADPH porteront respectivement un groupement azoture et une fonction alcyne se faisant face afin de réaliser une réaction click. Si ces fonctions sont positionnées de manière adéquate, la boucle pourrait induire le rapprochement nécessaire pour que la réaction de click se face. Cette approche sera développée dans le chapitre 1 et des exemples de chimie click *in situ* rapportés dans la littérature, seront présentés dans les introductions des chapitres 1 et 3.

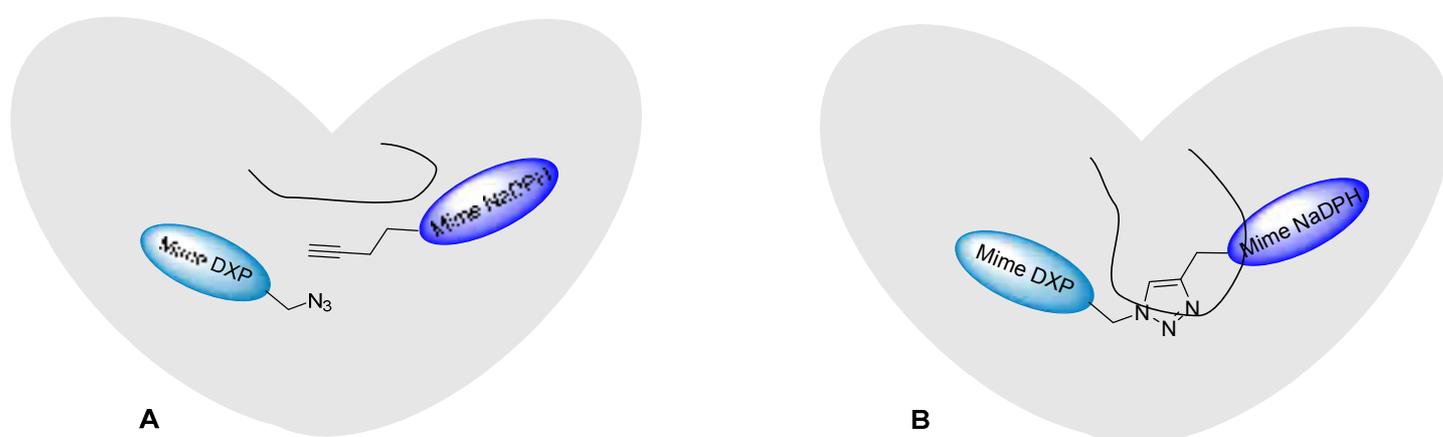


Figure 94 : Approche biligand. Mimes du DXP et NADPH respectivement fonctionnalisés par un azoture et alcyne dans la DXR. A. Boucle ouverte et mise en place des mimes du DXP et NADPH. B. Fermeture de la boucle favorisant la réaction de click *in situ* par rapprochement des deux fonctionnalisations.

La seconde approche, dite bisubstrat, déjà évoquée auparavant (Introduction, II.2.d), consiste en la synthèse d'une molécule unique ciblant simultanément le site actif de la DXR et celui du cofacteur NADPH permettant ainsi d'augmenter la spécificité de l'inhibition (Fig. 95). Peu d'équipes dont le but premier était de cibler ces deux poches ont réussi ; elles ont en revanche mis en avant la présence d'autres poches pouvant être ciblées. Cette approche bisubstrat sera développée dans les chapitres 2, 3.

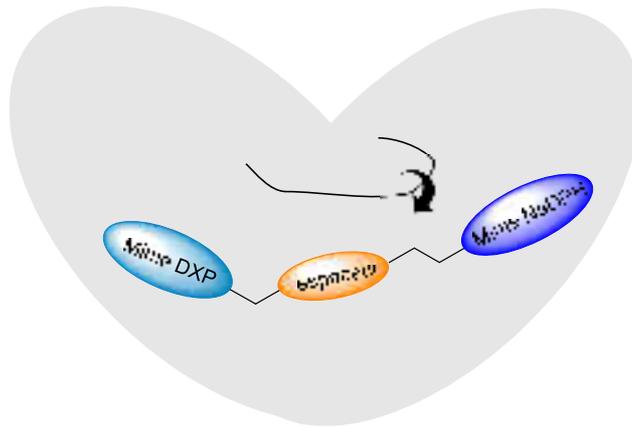


Figure 95 : Approche bisubstrat.

Une molécule unique ciblant les deux sites de fixation du DXP et NADPH et induisant la fermeture de la boucle.

Enfin, au cours de ces travaux, une dernière approche a ainsi été mise en œuvre, visant à cibler la poche hydrophobe située à proximité des sites du DXP et du NADPH. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec la fonction dansyle. Cette dernière approche sera développée au chapitre 4.

Chapitre 1 : Stratégie biligand

labo;Dreneau Aurore Chapitre 1 : Stratégie Biligand

I. Introduction

1. Chimie click

La chimie click se réfère selon Sharpless à des réactions qui sont rapides, simples à réaliser, adaptables, stéréospécifiques, donnant un très bon rendement et produisant uniquement des sous-produits non toxiques pouvant être éliminés par une méthode autre que la chromatographie.^{1,2} Par le terme simple à réaliser, cela sous-entend, la mise en place d'un procédé insensible à l'oxygène et à l'eau, car dans la limite du possible, le solvant de référence sera l'eau et la réaction est réalisée à partir de produits facilement accessibles ne nécessitant pas d'étapes de protection.

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture (dipôle) et un alcyne (dipolarophile) conduisant à la formation du 1,2,3-triazole est apparue comme idéale dans le cadre de la chimie click,³ au point que, par abus de langage, le terme chimie click fait souvent uniquement référence à cette réaction 1,3-dipolaire. Celle-ci met en jeu des dipôles qui possèdent quatre électrons π , répartis sur trois atomes voisins, conduisant à la formation de deux triazoles régio-isomères (Fig. 96).

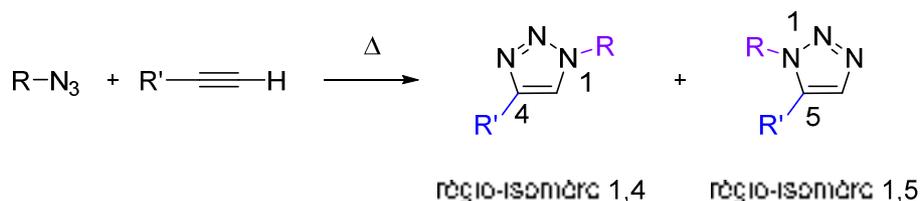


Figure 96 : Cycloaddition 1,3-dipolaire, entre un azoture et un alcyne.

L'avantage de ces deux groupements est qu'étant non réactifs vis-à-vis de beaucoup d'autres fonctions, cela rend la réaction click sélective et inerte vis-à-vis des molécules biologiques.

La chimie click a été introduite par Bertozzi et Saxon au début des années 2000 dans des réactions bio-orthogonales. Pour que la réaction soit qualifiée de bio-orthogonale, les réactifs doivent être abiotiques, mutuellement et sélectivement réactifs, mais non réactifs avec les fonctions biologiques et réagir en milieu physiologique. Du point de vue de la chimie, la réaction doit conduire à la formation d'au moins une liaison covalente stable entre les deux groupements sélectionnés, et la cinétique doit être relativement bonne même à des concentrations faibles. Bertozzi a utilisé ce concept via une réduction de Staudinger modifiée, appelé ligation de Staudinger. La réduction de Staudinger, décrite en 1919, consiste à faire réagir un azoture avec la triphénylphosphine (Fig. 97).⁴ Cette réaction est apparue comme un prototype adéquat pour des réactions bio-orthogonales, avec un bémol concernant la perte de la liaison covalente du composé **132** par hydrolyse.

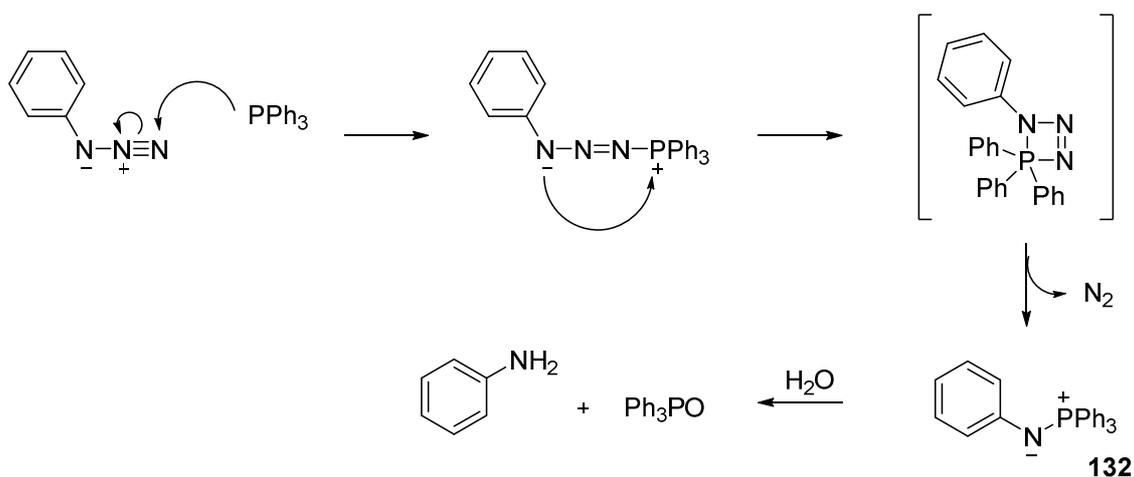
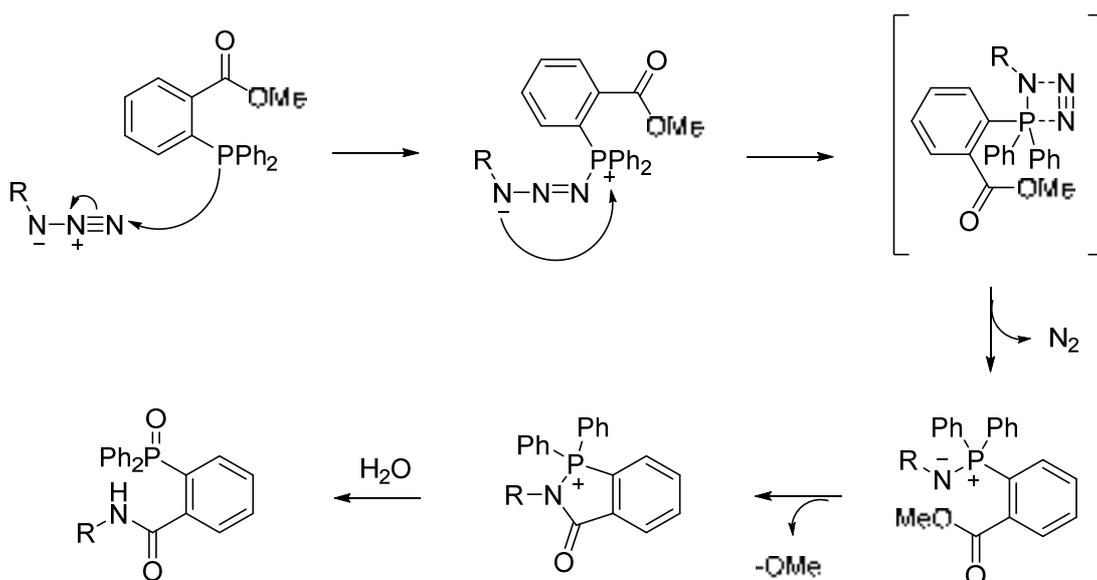


Figure 97 : Réduction de Staudinger.

Bertozzi a ainsi réalisé un ajustement en ajoutant sur l'un des aryles, un ester en position ortho par rapport à l'atome de phosphore, de manière à conduire à un réarrangement de l'aza-ylure instable vers une liaison covalente stable (Fig. 98).^{5,6}

Figure 98 : Ligation de Staudinger.⁷

Cependant, les dérivés de phosphine souffrent d'une oxydation lente en milieu biologique et sont par exemple métabolisés par les cytochromes P450. De plus, comme la cinétique est relativement lente, il est nécessaire d'utiliser des quantités importantes de phosphine pour améliorer la vitesse de la réaction. Les excès de dérivés de phosphine étant difficiles à éliminer, cette ligation ne peut être utilisée pour des marquages par fluorescence.⁷

Tout en conservant le fort potentiel des azotures, Bertozzi et son équipe se sont orientés en 2004 vers la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.⁸ Ces réactions de cycloaddition sont toutefois relativement lentes à cause d'une barrière d'activation relativement élevée de 26 kcal/mol nécessitant des

températures très élevées. Cette lenteur peut être outrepassée grâce à l'utilisation d'un cycle contraint, méthode explorée par Bertozzi notamment. De plus, du fait des similarités aux niveaux des LUMO et HOMO des deux substrats, ces réactions peuvent conduire à des mélanges de régio-isomères (1,4 et 1,5) souvent dans un rapport 1 :1. Toutefois, l'emploi d'un catalyseur, permet de rendre cette réaction régiosélective.

2. Réaction click catalysée au cuivre ou au ruthénium

a. Catalyse au cuivre

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne, longtemps ignorée à cause de la nécessité de fortes températures et de pression, a pris son essor en 2001 grâce à Meldal et Sharpless.^{9,10} Ils ont au cours de la même année, indépendamment rapporté la possibilité de catalyser la réaction en présence de Cuivre (I), donnant accès à l'unique régio-isomère 1,4-disubstitué (Fig. 99). Nommée CuAAC pour Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, cette réaction catalysée se fait de manière bien plus rapide et permet d'éliminer l'utilisation de hautes températures. Elle passe par la formation d'un acétylure de cuivre activant l'alcyne pour permettre la réaction avec l'azoture.^{11,12}

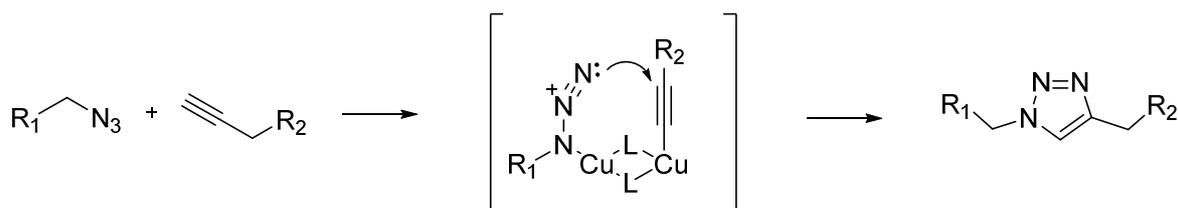


Figure 99 : Cycloaddition 1,3-dipolaire donnant accès au régio-isomère 1,4. (L = ligand)

Il existe plusieurs méthodes pour préparer le catalyseur. Une des plus utilisées consiste en la réduction d'un sel de Cu (II), tel que $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pour former *in situ* le sel de Cu(I). L'ascorbate de sodium utilisé en tant que réducteur est en général employé en large excès (3 à 10 fois) mais d'autres agents peuvent être envisagés comme par exemple l'hydrazine ou la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP). L'avantage de cette méthode est qu'elle est peu chère, peut-être mise en place dans l'eau et ne requiert pas d'atmosphère inerte.¹³ La CuAAC a joué un rôle important dans la synthèse rapide de nombreuses molécules. Pour exemple, elle a permis de lier des lipides aux protéines, de synthétiser des sondes fluorescentes à ADN, ou encore des macrocycles.¹⁴

b. Catalyse au ruthénium

En 2005, Sharpless et ses collaborateurs ont découvert le potentiel du ruthénium pour catalyser la réaction de click.¹⁵ Contrairement au cuivre, la catalyse au ruthénium conduit majoritairement au régio-isomère 1,5 (Fig. 100). Cette méthode est nommée RuAAC pour ruthenium-catalyzed azide-alkyne.

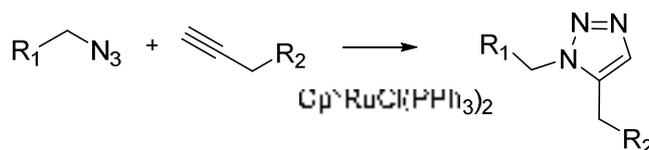


Figure 100 : Cycloaddition 1,3-dipolaire donnant accès au régio-isomère 1,5.

Les catalyseurs particulièrement efficaces et donnant une bonne régio-sélectivité sont les complexes de type ruthénium pentaméthylcyclopentadiényle ([Cp**RuCl*]), avec par exemple, Cp**RuCl*(PPh₃) et Cp**RuCl*(COD).^{16,17} Toutefois, cette réaction étant plus sensible aux solvants et aux substituants portés par l'azoture, elle est moins utilisée que la catalyse au cuivre.

Ces variations de la réaction de Huisgen catalysée au cuivre et au ruthénium ont entre autres permis d'accéder à une bibliothèque de composés,¹⁸ de participer à la construction de mimes peptidiques,¹⁹ ainsi qu'au marquage de biomolécules.^{20, 21, 22}

3. Réaction click *in situ*

De manière générale, l'approche conventionnelle en chimie médicinale consiste en la synthèse d'une bibliothèque de composés suivie par un criblage biologique. Or tout cela pourrait être optimisé si le système biologique pouvait choisir son modèle idéal pour produire le meilleur « hit ». De ce fait, grâce à la chimie click et à la bio-orthogonalité, il est envisageable de synthétiser deux molécules qui s'ajusteront correctement dans le site actif de l'enzyme et qui seront placées à proximité de manière à franchir la barrière énergétique permettant ainsi à la réaction click de se produire et conduire à la synthèse de son inhibiteur. Dans ce cas, l'enzyme agira comme une chambre catalytique, et l'on parle dans ce cas de « target guided synthesis » (TGS).

4. Chimie click sans cuivre (« Copper free click chemistry »)

L'utilisation de cuivre est limitante car même si le corps humain en a besoin dans une certaine mesure, son ingestion excessive pourrait conduire notamment à des désordres neurologiques ou rénaux.

Il a été montré que les alcynes cycliques sont de bons substrats pour la chimie click et plus particulièrement, les cycloalcynes contraints, qui réagissent sans catalyse avec les azotures. Le plus efficace est le cyclooctyne. Plusieurs équipes ont travaillé à la fonctionnalisation de ceux-ci, pour chercher à abaisser la barrière d'activation. Ce point sera développé ultérieurement lors du choix de nos molécules cibles.

Ce type de cycloaddition se réfère au terme de SPAAC pour strain promoted azide alkyne cycloaddition et a largement été utilisé pour le marquage dans des systèmes biologiques.²³

5. Le groupe triazole en milieu biologique

Le groupement triazole est intéressant par plusieurs points. Il est soluble dans l'eau, ses propriétés électroniques sont proches de celles des amides mais ne sont pas sujettes aux mêmes conditions d'hydrolyse et, il est stable en milieu biologique. De plus, les atomes d'azote 2 et 3 agissent comme de faibles accepteurs de liaison hydrogène et contrairement aux hétérocycles aromatiques, il est quasiment impossible de les oxyder ou de les réduire.

Au vu de ses propriétés en milieu biologique, la synthèse de triazole via la réaction 1,3 dipolaire de Huisgen a conduit à un nombre conséquent de molécules entrant dans la structure d'antibiotiques, d'anti-cancéreux, d'anti-VIH, etc. ^{14 24, 25, 26} Dans ces différents composés, le triazole peut jouer soit un rôle soit d'espaceur ou soit de bio-isostère, pouvant, entre autre, mimer une liaison peptidique.^{27, 28}

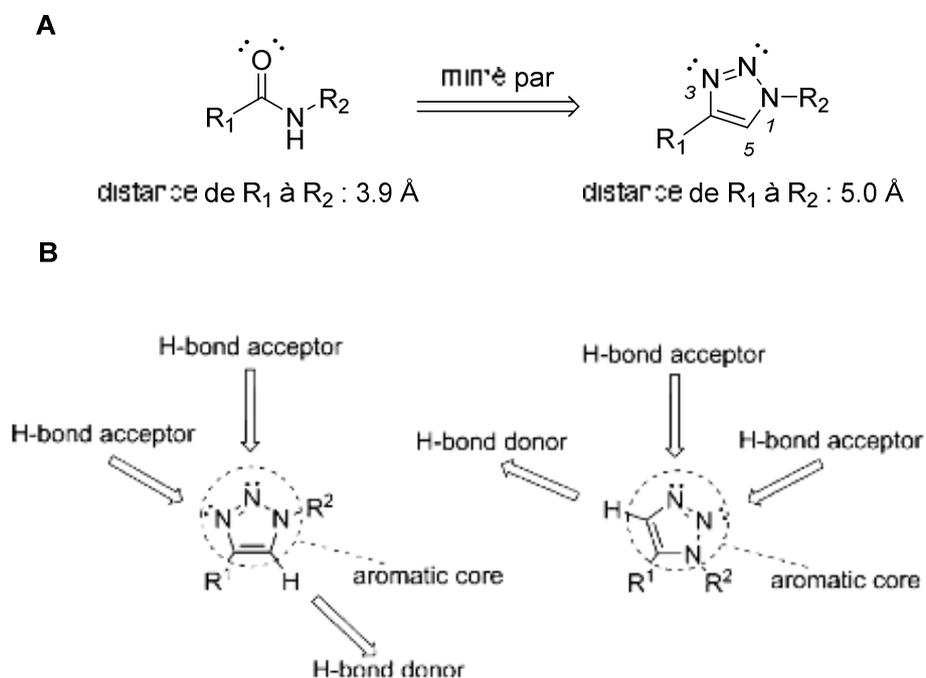


Figure 101 : **A** Triazole, mime d'une liaison peptidique.¹³
B Résumé des interactions potentielles du groupement 1,2,3-triazole.²⁹

Il existe toutefois des différences car la présence d'un atome supplémentaire au niveau de l'enchaînement des azotes, induit une augmentation de la distance entre les substituants R1 et R2 (**A**, Fig. 101). De plus, comme il possède un moment dipolaire plus élevé que la liaison amide, les caractères donneur et accepteur de liaison hydrogène sont augmentés (**B**, Fig. 101).¹³

Dans le cadre de notre première approche biligands, et du fait des nombreux avantages de la chimie click, nous avons fait le choix de fonctionnaliser l'analogue de la fosmidomycine et le mime du NADPH, soit par un cyclooctyne ou soit par un groupement azoture.

II. Groupement azoture

En règle générale, les azotures étaient utilisés en synthèse organique en tant que groupements masquant d'une amine mais une attention particulière doit être portée sur ces groupements. Leur instabilité peut être un facteur limitant, car si le rapport du nombre d'atome d'azote est supérieur ou égal au nombre d'atomes de carbone, la molécule pourrait être considérée comme explosive et de ce fait dangereuse. L'azoture de méthyle peut se décomposer et exploser suite à l'expansion du volume de gaz N_2 produit.

Cependant, les azotures sont bien tolérés par les cellules de l'organisme. En effet, leur profil toxicologique a déjà été étudié avec l'utilisation des azidothymidine (**AZT**) dans le traitement du SIDA (Fig. 102).

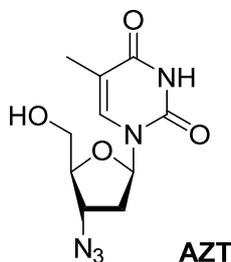


Figure 102 : AZT utilisé dans le traitement du VIH.

L'utilisation de ce groupement en milieu biologique présente plusieurs avantages : il est absent du milieu biologique, il peut être facilement introduit et est sélectivement réactif.³⁰ De plus, l'azoture, peut être fonctionnalisé avec des groupements plus ou moins volumineux sans que cela n'interfère sur sa réactivité.

1. Choix des azotures à synthétiser

Pour l'approche biligand (voir schéma page 94), deux fragments distincts sont à synthétiser : le premier portant le groupement azoture et le second un cyclooctyne dont le choix sera explicité ultérieurement. Nous avons choisi de greffer l'azoture sur un dérivé de la fosmidomycine qui possède, d'une part un acide hydroxamique se chélatant au métal, d'autre part un phosphonate qui se fixe au niveau du point d'ancrage du site actif. Pour conserver une activité inhibitrice, ces deux fonctions doivent être séparées par une chaîne de trois carbones. Compte tenu de ces éléments, nous avons choisi de fonctionnaliser la pince chélatante avec l'azoture.

Comme le nicotinamide du NADPH se situe à approximativement 3.5 Å de l'atome de carbone du groupement formyle de la fosmidomycine et que la longueur d'une liaison C-C étant de 1.54 Å, nous avons choisi d'introduire un espaceur allant d'un à quatre atomes de carbones entre le carbonyle et l'azoture.

Etude de modélisation moléculaire

L'un des avantages de la DXR est qu'à ce jour, près de 60 structures cristallographiques pour des enzymes de différents organismes existent. Les structures de la DXR, soit sous la forme apo, soit en présence du NADPH, soit de la fosmidomycine ou du dication métallique Mn^{2+} , sont relativement similaires et l'architecture est fortement conservée.

Pour étudier le mode de fixation des inhibiteurs ciblés, des études de modélisation moléculaire ont été réalisées par Fanny Krebs et Jérémie Esque au sein de l'équipe du Pr. Roland Stote. Les analyses de docking ont été réalisées sur la structure 1Q0Q issue de la Protein Data Bank qui résulte de la cristallisation de la DXR en présence du DXP et du cofacteur NADPH ou l'enzyme est sous sa conformation dite fermée. Les logiciels utilisés par nos confrères sont Autodock 4.2 et Autodock Vina, à l'aide de l'interface graphique Raccoon2 et les conformations des molécules ont été élaborées à l'aide du logiciel Avogadro1.1.0. Les études préliminaires ont permis de décomposer le site actif de la DXR en quatre parties (point d'ancrage, boucle flexible, cation divalent et zone hydrophobe) et de déterminer les acides aminés essentiels chez l'enzyme d'*E. coli*. Ces informations ont été utilisées en tant que filtres de manière à écarter les conformations non conformes qui posséderaient tout de même de bonnes énergies. Par exemple, pour les molécules possédant un groupement phosphonate, celles possédant une conformation de basse énergie ne se fixant pas au niveau du point d'ancrage de l'inhibiteur seront écartées. Il en est de même pour les acides hydroxamique et rétro-hydroxamique connus pour chélater le métal.

Le docking des azotures a été effectué en l'absence du cofacteur afin de ne pas bloquer l'orientation de l'azoture. Dix conformations pour lesquelles l'azoture semble le plus accessible possédant des énergies libres de fixation estimées pour la meilleure à -7,64 et pour la moins bonne à 6.42 kcal/mol, ont été retenues (Fig. 103).

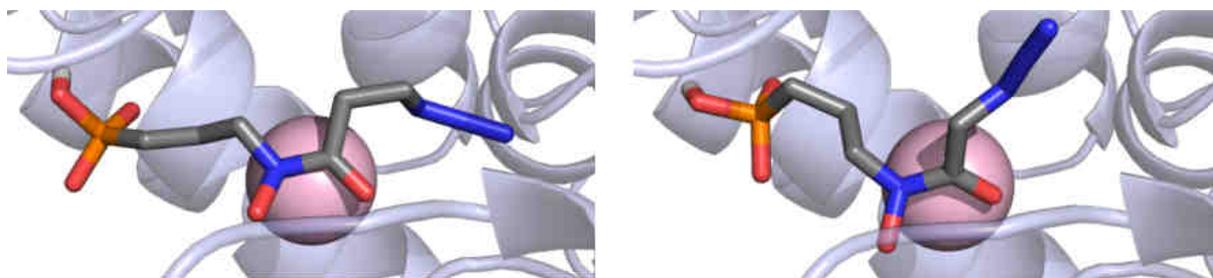


Figure 103 : Représentation à gauche de la conformation possédant la meilleure estimation d'énergie (n = 2) et à droite, de celle possédant la moins bonne estimation d'énergie (n = 1).

Ces conformations ont servi par la suite à construire des complexes DXR-ligands qui ont eux-mêmes été utilisés comme récepteur pour le docking de cyclooctyne. Les résultats concernant les azotures

montrent que **138b** et **138c** possèderaient une longueur de chaîne adéquate pour interagir avec un partenaire (Fig. 104).

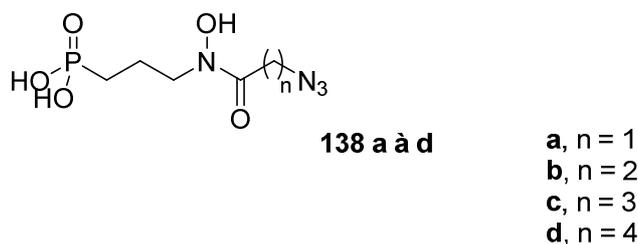


Figure 104 : Azotures cibles.

Les produits résultant des couples azotures/cyclooctynes, ayant montrés les meilleurs résultats d'énergie de fixation et des conformations intéressantes en modélisation moléculaire montrent qu'un cyclooctyne pourrait se loger au sein de l'enzyme entre le site de fixation du DXP et du NADPH.

2. Synthèse des azotures fonctionnalisés avec un acide phosphono rétro-hydroxamique

Pour préparer ces azotures, plusieurs voies de synthèse ont été envisagées (Fig. 105). La voie **A** consiste à former les phosphono azotures protégés **150a-d**, de différentes longueurs de chaînes (n = 1 à 4) par substitution de l'azoture de sodium sur les mésylates **149a-d** correspondants. Ceux-ci pourraient être obtenus selon deux voies : soit par un couplage de type peptidique entre le phosphono-benzylhydroxylamine **143** et les acides **146a-d** (voie **A1**), soit par substitution nucléophile des hydroxamate *O*-benzylé **153b-d** sur le 3-bromopropylphosphonate de diéthyle **140** commercial (voie **A2**).

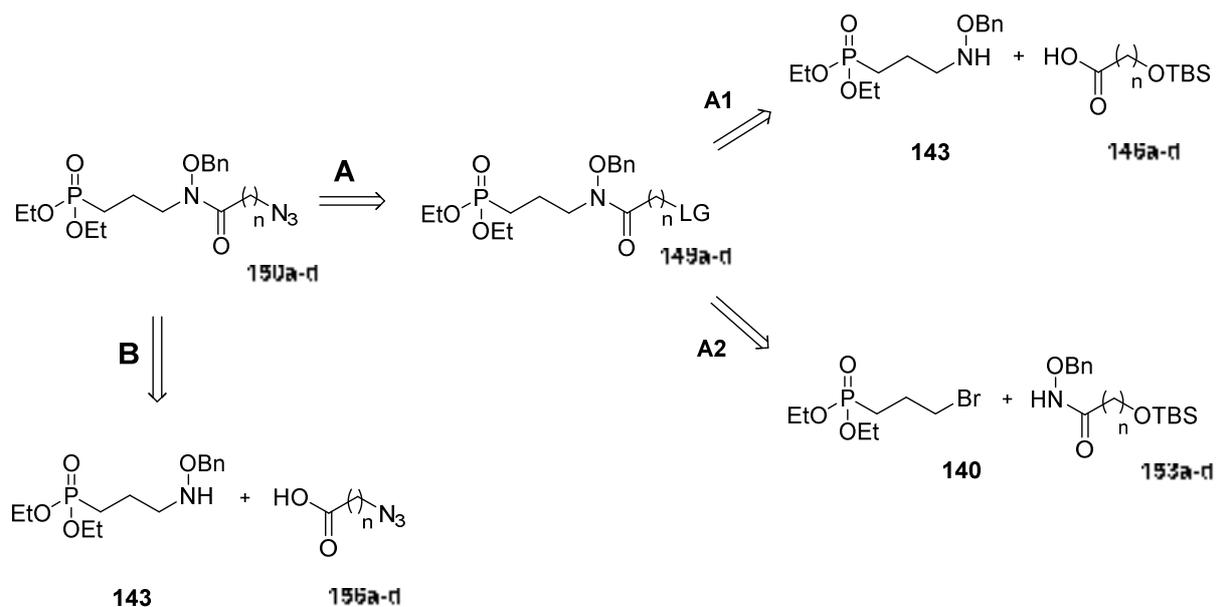


Figure 105 : Nouvelles voies de synthèse des azotures 133a-d.

La particularité de la voie **B** serait d'incorporer la fonction azoture dès le début de la synthèse. Dans ces conditions, un couplage de type peptidique entre l'acide **156a-d** et le phosphono benzylhydroxylamine **143**, pourrait être réalisé.

a. Synthèse du phosphono benzylhydroxylamine **143**

Le (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate de diéthyle **143** est préparé selon la méthode décrite par Suresh *et al.* (Fig. 106).³¹ Il est obtenu par une réaction de condensation entre le 3-bromopropylphosphonate de diéthyle **140** commercial et le *t*-butyl benzyloxycarbamate **141** conduisant à l'intermédiaire **142** avec un rendement quantitatif. Le *t*-butyl benzyloxycarbamate **141** est lui-même préparé par protection de la benzylhydroxylamine **139** avec un groupement Boc. S'ensuit une réaction de déprotection du groupement Boc, conduisant au composé **143** avec un rendement de 99%.

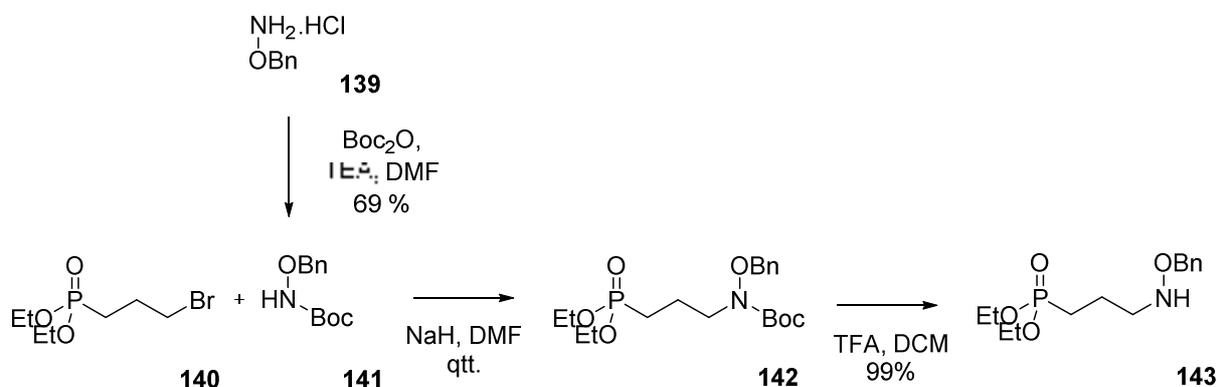


Figure 106 : Synthèse du phosphono-benzylhydroxylamine **143**.

b. Synthèse de l'azoture **150b** ($n = 2$) à partir du 1,3-propanediol et du phosphono benzylhydroxylamine (voie **A1**)

L'alcool **145** est préparé par monoprotection sous forme d'éther silylé du 1,3-propanediol **144** avec un faible rendement de 17% (Fig. 107). L'alcool libre **145** est ensuite oxydé en aldéhyde par le réactif de Dess-Martin suivi par une seconde oxydation avec NaClO_2 et NaH_2PO_4 pour conduire à l'acide carboxylique **146**.³²

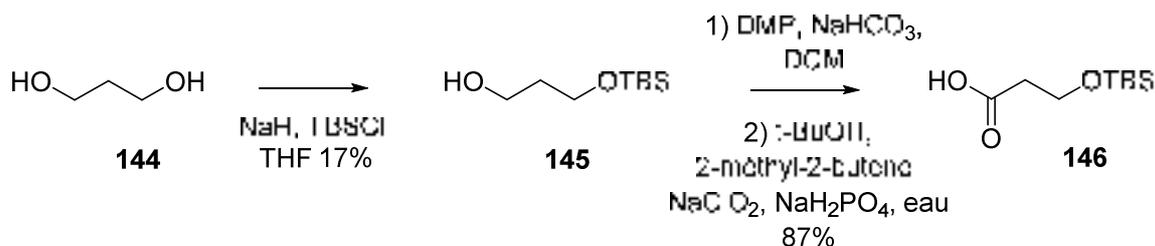


Figure 107 : Mono-oxydation de 1,3-propanediol en acide.

Le couplage de 3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate de diéthyle **143** avec l'acide **146b** en présence de DCC/HOBt, a conduit à l'obtention du composé **147b** avec un rendement de 24% (Fig. 108). L'alcool est déprotégé puis activé sous forme de mésylate **148b** avec un rendement de 91%.³³ La substitution du mésylate **149b** par l'azoture de sodium conduit au composé **150b** avec un rendement de 94%.

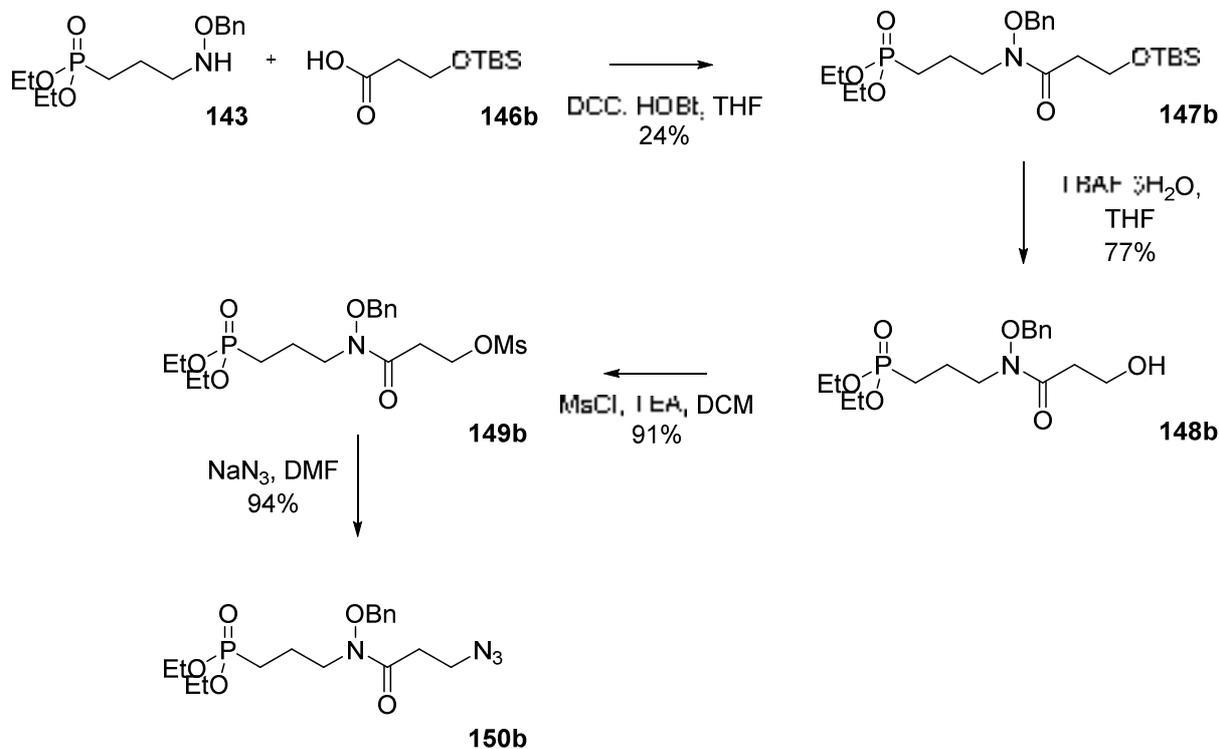
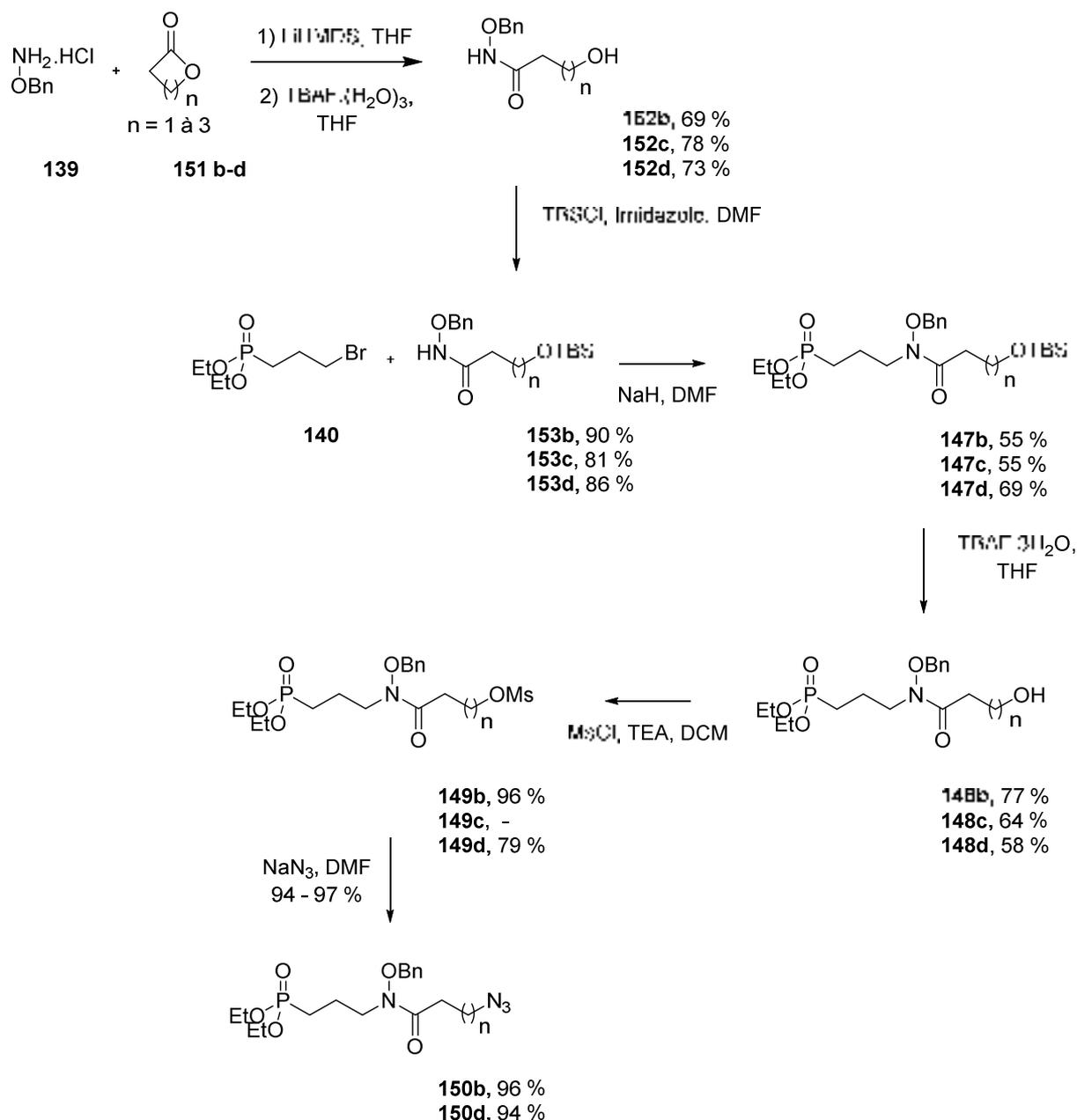


Figure 108 : Synthèse de l'azoture protégé **150b** selon voie **A1**.

Au vu du faible rendement de la première étape de formation de l'acide probablement dû à la forte hygroscopicité du propylène glycol, nous avons choisi de privilégier la voie **A2**, réalisée en parallèle.

c. Synthèse des azotures à partir de lactone et bromo-phosphonate **140** (voie **A2**)

Les hydroxamates benzylé **153b-d** sont préparés par traitement des lactones **151b-d** commerciales appropriées avec du chlorhydrate de *O*-benzylhydroxylamine **139** en présence d'un large excès de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS) d'après la méthode décrite par Gissot *et al* (Fig. 109).³⁴ Dans notre cas, quatre équivalents de LiHMDS sont nécessaires : un premier pour la neutralisation du chlorhydrate, un second pour la formation de l'anion de l'hydroxylamine, un troisième qui sert à déprotomer le proton acide de l'hydroxamate formé et un dernier pour déprotomer le proton énolisable en α du carbonyle. Cette étape conduit à la formation en faible quantité de l'éther de triméthylsilyle qui est de suite traité avec du fluorure de tétrabutylammonium trihydraté (TBAF·3H₂O) de manière à obtenir les composés **152b-d** avec un rendement allant de 69 à 78 % sur deux étapes en fonction de la longueur de chaîne.

Figure 109 : Synthèse des azotures protégés selon la voie **A2**.

Les alcools primaires **152b-d** sont ensuite protégés sous forme d'éther de *t*-butyldiméthylsilyle, permettant d'obtenir les composés **153b-d** avec des rendements variant de 81 à 90 %. Les hydroxamates *O*-benzylés **153b-d** sont déprotonés en présence de NaH et réagissent par substitution nucléophile sur le 3-bromopropylphosphonate de diéthyle **140** commercial pour conduire respectivement aux composés **147b-d** avec des rendements de 55 à 69%. La suite réactionnelle est ensuite identique à celle de la voie **A1**, passant par la déprotection des alcools **148b-d**, suivie par l'activation de ces derniers sous forme de mésylate (**149b,d**), qui par substitution nucléophile de l'azoture de sodium conduisent avec succès aux composés **149b,d**, possédant des longueurs de chaînes de 2 et 4 avec des rendements de 96 et 94 % respectivement.

d. Synthèse des azotures à partir d'ester bromé (voie B)

Pour une longueur de chaîne raccourcie à un carbone, une dernière voie a été envisagée (Fig. 110). La substitution nucléophile de l'azoture sur les dérivés bromés **154a-d** commerciaux, conduit aux produits souhaités **155a-d** avec des rendements variant de 34 à 87%.³⁵ Après saponification, en milieu basique, les acides **156a-d**, sont obtenus avec des rendements allant de 16 à 91%. Les composés **150a,c,d**, sont obtenus par un couplage de type peptidique entre les acides **156a,c,d** et le (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate de diéthyle **143**, synthétisé préalablement avec des rendements allant de 55 à 65%.

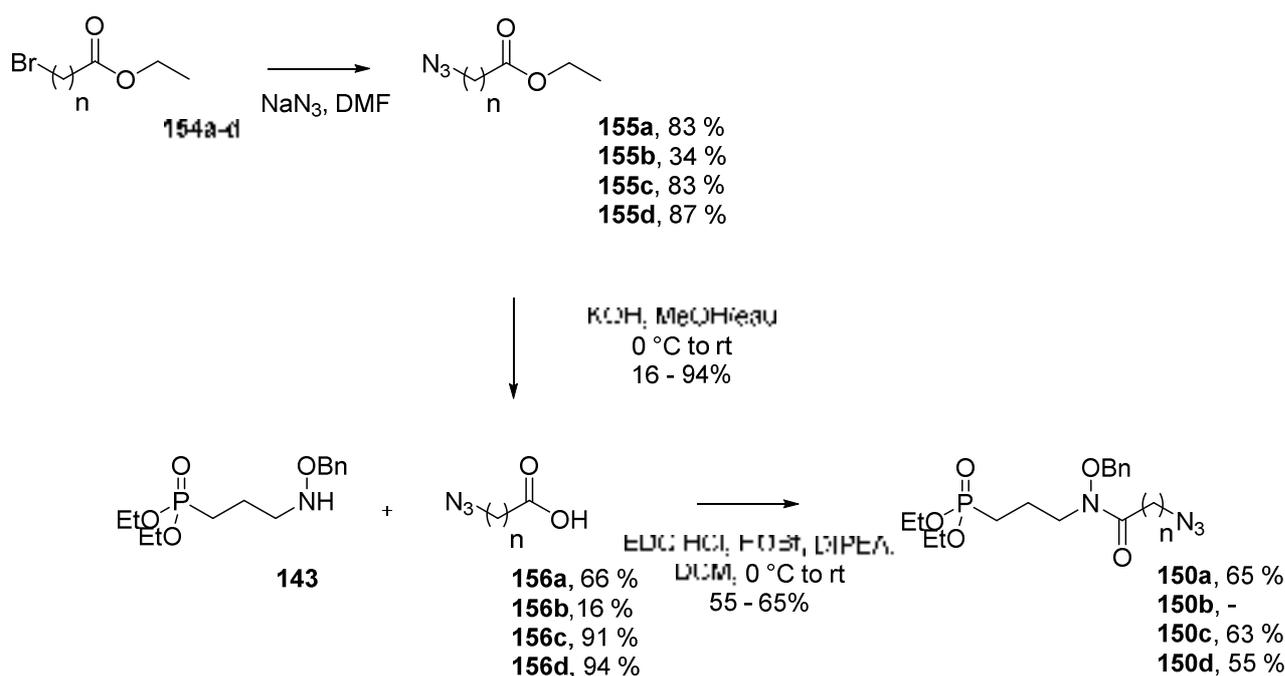


Figure 110 : Synthèse des azotures protégés selon la voie B.

Il faut noter que les voies **A2** et **B** sont les plus efficaces, conduisant à la synthèse des azotures protégés **150a-d**. En effet, la première voie de synthèse **A1** a permis de synthétiser l'intermédiaire protégé de longueur $n = 2$ en 9 étapes avec un rendement global de 2%. En revanche, les deux autres voies n'ont nécessité que 6 étapes et les produits sont obtenus avec de meilleurs rendements. Pour la voie **A2**, les rendements globaux sont de 24 % et 18 % pour **150b** et **150d** respectivement. Pour la voie **B**, les rendements globaux sont respectivement de 24 %, 33 % et 31 % pour **150a**, **150c** et **150d**.

Les dernières étapes consistent à déprotéger l'hydroxy en enlevant le groupement benzyle et les éthyles portés par le phosphonate selon le même protocole pour tous les composés (Fig. 111). L'hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon communément utilisée, n'a pu être utilisée pour la déprotection du groupement benzyle, dû à la présence de l'azoture. La débenzylation des acides rétro-hydroxamique **150a-d** a été réalisé en présence de trichlorure de bore en solution dans le THF,

et purifié sur silice désactivée, par rinçage de la silice avec une solution à 5 % de triéthylamine dans l'hexane.³⁶ Les rendements varient de 7 à 70 %. Le faible rendement observé pour le composé **157a** peut être dû à une difficulté de détection de celui-ci par CCM lors de la purification.

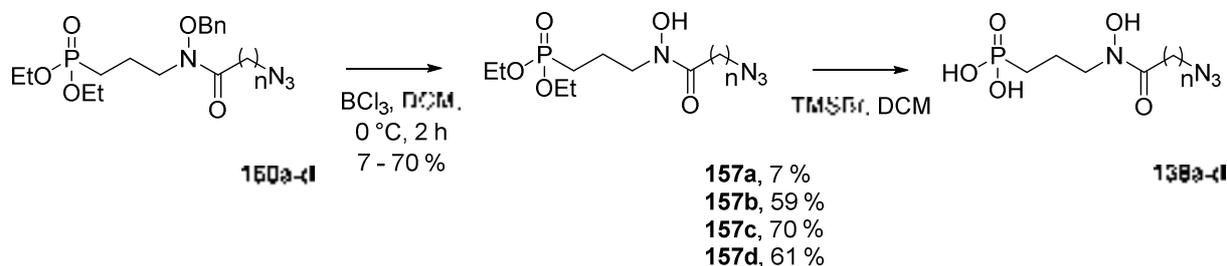


Figure 111 : Déprotection finale pour conduire aux molécules cibles.

La déprotection des groupements éthyles du phosphonate est réalisée en présence de bromure de triméthylsilyle. L'acide est obtenu suite à l'hydrolyse des éthers silylés. A noter que, du fait de cette hydrolyse, aucun rendement n'a pu être déterminé tout au long de ces travaux lorsque cette étape de déprotection est réalisée. Cependant, pour les tests biologiques, la concentration en inhibiteur est déterminée par dosage du phosphore du phosphonate. Ces composés étant très polaires, aucune purification n'a été réalisée. Il est donc important d'avoir des intermédiaires d'une grande pureté avant la déprotection du phosphonate.

L'ensemble des azotures a été testé sur la DXR d'*E. coli*. Les résultats obtenus seront décrits ultérieurement. Auparavant, nous allons présenter les analyses spectroscopiques de RMN.

3. Analyse spectroscopique en RMN des azotures en pince rétro-hydroxamique, dite pince naturelle

En règle générale, après l'introduction d'un hydroxamate, les spectres RMN du proton deviennent plus complexes et montrent la présence de plusieurs signaux. En effet, pour les protons des deux groupements méthylènes en α de la benzylhydroxylamine et du carbonyle, deux signaux à des déplacements chimiques différents sont observés. Les acides hydroxamiques *N*-substitués, *N*- et *O*-substitués ou non substitués peuvent être présents en solution sous la forme de conformères *Z* et *E* provenant de la rotation restreinte autour de la liaison C-N (Fig. 112).^{37, 38}

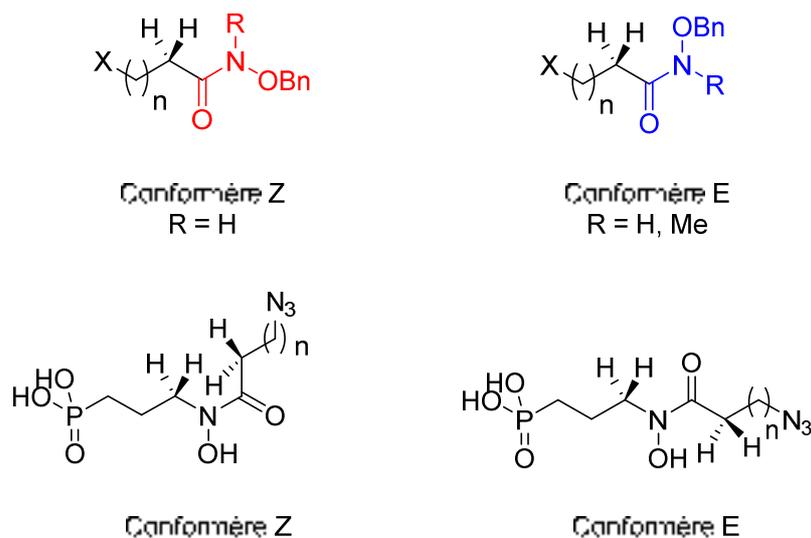


Figure 112 : Conformations Z et E de l'acide rétro-hydroxamique.

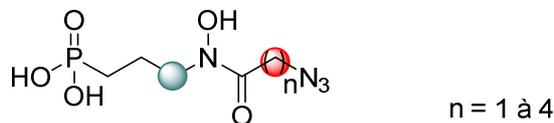
D'autre part, la proportion relative des conformères dépend de facteurs stériques et structuraux (taille des substituants), mais également de la nature du solvant utilisé et de la température.^{39, 40}

Brown *et al*, ont fortement participé à l'étude du comportement d'acides hydroxamiques dans le chloroforme deutérié. Ils ont ainsi montré que les protons en α du carbonyle résonnent à champ plus fort pour le conformère Z que pour le conformère E. La même observation est visible pour le déplacement du carbonyle en RMN ^{13}C . D'autre part, le conformère majoritaire en solution lorsque l'acide hydroxamique possède un groupement N-H libre est le conformère Z. En revanche, lorsque celui-ci est N-substitué, c'est la conformation E qui est majoritaire car elle minimise la gêne stérique entre les protons en α du carbonyle et les groupements N-substitués.

Dans le cas des azotures, ce n'est pas un acide hydroxamique mais un acide rétro-hydroxamique, ce qui laisse à penser que les deux conformères E et Z seront également présents en solution. Ayant peu de données dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que les déplacements chimiques des conformères Z et E, suivent ces résultats observés avec un acide hydroxamique. Ainsi les protons en α de l'azote seraient plus déblindés pour le conformère E, que pour le conformère Z.⁴⁰

Tous les spectres RMN des composés avant déprotection des éthyles portés par le phosphonate réalisés dans le CDCl_3 , montrent la présence d'un seul conformère, qui serait selon nos hypothèses, le conformère E.

Les spectres RMN des quatre azotures totalement déprotégés **138 a-d**, réalisés dans le D₂O, montrent la présence de plusieurs signaux correspondant à la présence plusieurs conformères. Les valeurs sont reportées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Analyses spectroscopiques des composés **138a-d** dans le D₂O

ENTREE	Composé	n	$\delta(\text{CH}_2\text{N})$ en ppm (Z/E/autre)	$\delta(\text{CH}_2\text{CO})$ en ppm (Z/E/autre)	Proportions (%) Z/E/autre
1	138a	n = 1	3,23/3,69/3,04	3,78/4,05/3,52	39/40/21
2	138b	n = 2	--	--	--
3	138c	n = 3	3,35/3,73/3,68	2,45/2,49/2,59	45/15/40
4	138d	n = 4	-/3,71/3,66	-/2,44/2,54	0/25/75

Pour le composé **138a** (entrée 1), les signaux correspondant aux protons en α de l'azote et les protons en α du carbonyle apparaissent sous la forme de trois triplets (3,69 ; 3,23 et 3,04 ppm) et sous forme de trois singulets (4,05 ; 3,78 et 3,52 ppm) dans des proportions 40/39/21 respectivement. Ayant émis l'hypothèse que le conformère *E* est plus déblindé, nous avons attribué les déplacements chimiques à environ 3,69 ppm pour les protons en α de l'azote et à 4,05 ppm pour les protons en α du carbonyle. Par analogie avec tous les conformères étudiés au cours de ces travaux, nous observons un triplet à environ 3,30 ppm, correspondant aux protons en α de l'azote, que nous avons attribué au conformère *Z*. Dans le cas de ce composé **138a**, nous notons, la présence de signaux supplémentaires $\delta(\text{N-CH}_2) = 3,04$ ppm et $\delta(\text{CH}_2\text{C(O)}) = 3,52$ ppm, qui correspondraient à un conformère supplémentaire. Il ne nous a pas été possible d'identifier la structure de celui-ci mais nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait correspondre à des conformations cycliques. L'une résulterait de la formation d'une liaison hydrogène entre le N-OH et l'atome d'azote terminal du groupement azoture, formant un cycle à huit chaînons (**A**, Fig. 113).⁴¹ L'autre pourrait résulter de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre les hydroxyles libres du phosphonate et le carbonyle aboutissant à une autre conformation cyclique (**B**, Fig. 113).

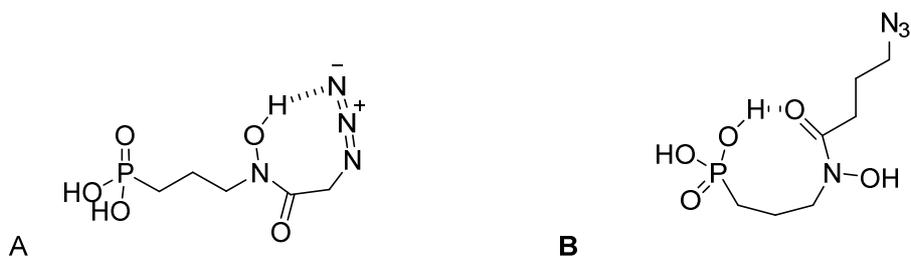


Figure 113 : A. Structure hypothétique du troisième conformère présent dans le cas du composé **138a**.
 B. Structure hypothétique du troisième conformère dans le cas des composés **138a**, **138c** et **138d**

Dans le cas du composé **138b** (entrée 2), les signaux étant confondus, les attributions n'ont pu être réalisées. Il semblerait cependant qu'il y ait à nouveau trois conformères.

Concernant le composé **138c** de longueur $n = 3$ (entrée 3), là encore, nous observons trois conformères. Les signaux correspondant aux protons en α de l'azote et les protons en α du carbonyle apparaissent respectivement sous la forme de trois triplets (3,73 ; 3,68 et 3,35 ppm) et sous forme de trois singulets (2,59 ; 2,49 et 2,45 ppm) dans des proportions 40/39/21. Les déplacements chimiques seraient de 3,73 ppm ($\delta(\text{N-CH}_2)$) et 2,59 ppm ($\delta(\text{CH}_2)$) dans le cas du conformère *E* et de 3,35 ppm ($\delta(\text{N-CH}_2)$) et 2,45 ppm ($\delta(\text{CH}_2)$) pour le *Z*. Ainsi, les protons résonnant à 3,68 ppm et 2,59 ppm correspondent probablement à une troisième forme. Celui-ci n'a pas pu être identifié avec précision mais il pourrait correspondre à une conformation cyclique résultant d'une liaison hydrogène entre les hydroxyles libres du phosphonate et le carbonyle de la pince (**B**, Fig. 113).

Pour le composé **138d** (entrée 4), seulement deux conformères sont observables. Les protons en α de l'azote apparaissent sous la forme de deux triplets, à 3,66 et 3,71 ppm. Conformément aux hypothèses précédentes, les protons à 3,71 ppm correspondraient au conformère *E*. En revanche, le conformère *Z* ne serait pas présent (absence de protons à 3,35 ppm). Par analogie avec les hypothèses formulées précédemment, le déplacement chimique à 3,68 ppm correspondrait à une conformation cyclique. Cette troisième forme serait majoritaire avec des proportions de 25/75 (*E*/autre). Cette troisième forme n'a pu être identifiée mais nous pourrions de nouveau émettre l'hypothèse qu'une liaison hydrogène intramoléculaire se forme entre un hydroxyle porté par le phosphonate et le carbonyle (**B**, Fig. 113).

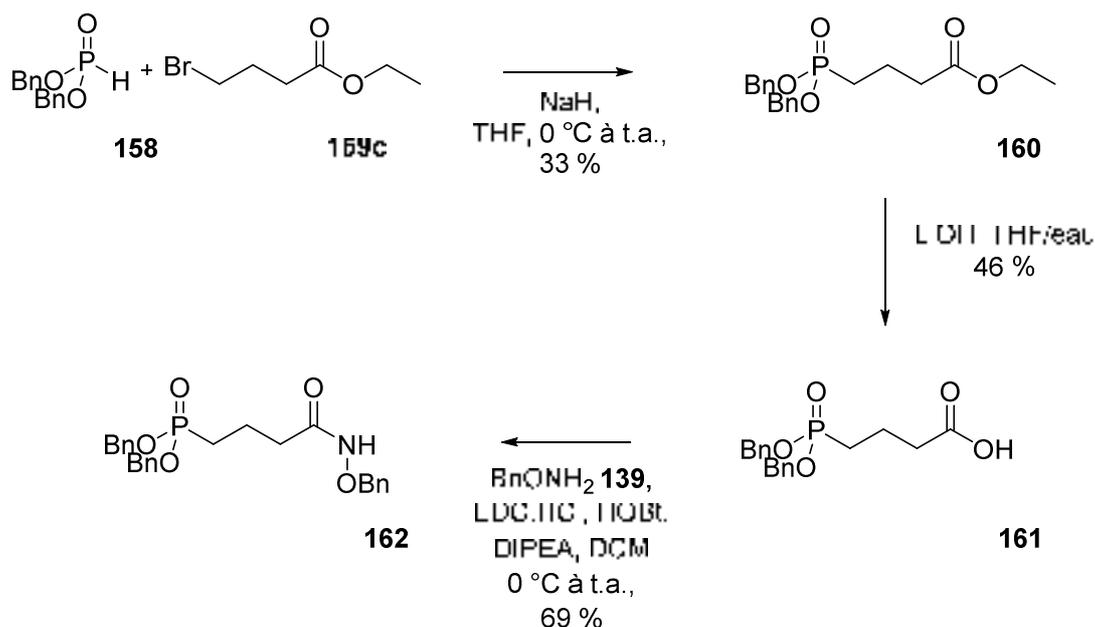
4. Synthèse d'azotures fonctionnalisés avec un acide hydroxamique, dite pince inversée
 Comme indiqué en introduction, deux dérivés de la fosmidomycine, **63** et **64**, synthétisés au sein de notre laboratoire ont démontré une activité inhibitrice proche de celle de la fosmidomycine et sont efficaces sur des souches d'*E. coli* résistantes à la fosmidomycine (Fig. 114). Ces deux composés, ont la particularité de posséder une pince chélatante de type acide hydroxamique.



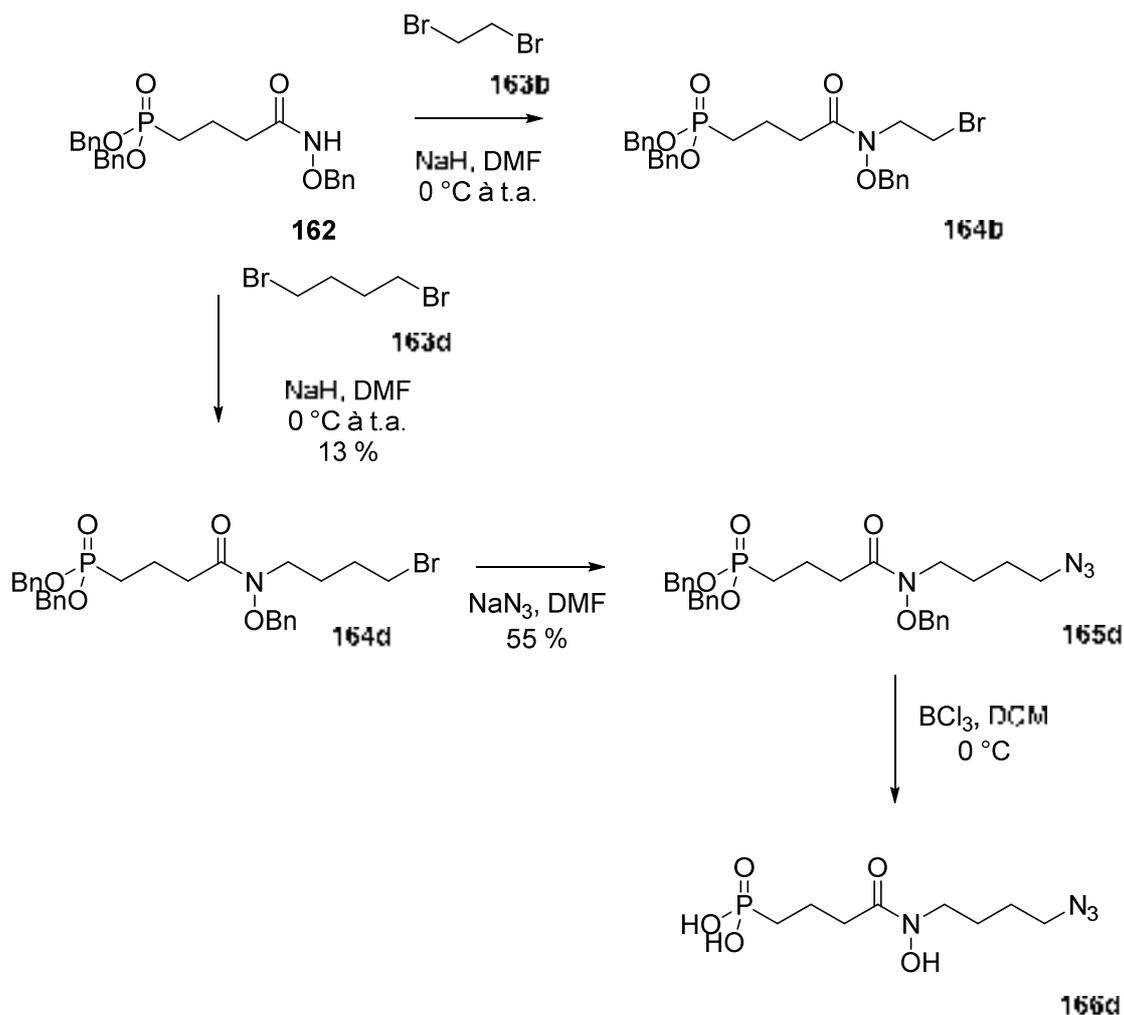
Figure 114 : Inhibiteurs en pince dite inversée.

Compte tenu de ces bons résultats, il a été envisagé de synthétiser les azotures sous cette forme. Pour ce faire, une nouvelle voie de synthèse a été entreprise, pour une longueur de chaîne $n = 2$.⁴²

La première étape consiste en l'introduction du groupement phosphonate par substitution nucléophile de l'anion du dibenzylphosphite **158** formé *in situ* sur le 4-bromobutyrate d'éthyle **159c** commercial par une réaction de Michaelis-Becker (Fig. 115). L'ester attendu **160** est obtenu avec un rendement de 33 %. Celui-ci est ensuite hydrolysé en présence de LiOH de manière à fournir l'acide **161** avec un rendement de 46 %. Une réaction de couplage de type peptidique est réalisée entre l'acide **161** et la *O*-benzylhydroxylamine **139** en présence de l'agent de couplage EDC, ainsi que de l'agent activateur HOBT dans le DCM. Le couplage permet d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 69 %.

Figure 115 : Synthèse du phosphono hydroxamate **162**.

L'étape suivante est une réaction de substitution nucléophile de l'anion **162** sur le dibromoalcane **163** commercial (Fig. 116). Cette réaction a conduit à la formation de plusieurs produits qui n'ont pu être identifiés. Cependant, en RMN du proton, le CH_2 benzylique porté par l'hydroxylamine n'étant plus présent, il est probable que le produit attendu, déprotégé au niveau de l'hydroxylamine **164b**, se soit formé au cours de cette étape. La spectrométrie de masse n'a pas permis de confirmer cette hypothèse. La synthèse n'a donc pas été poursuivie pour cette longueur de chaîne.

Figure 116 : Synthèse des azotures en pince inversée **166d**.

Bien que la réaction ne soit pas totale, l'anion **162** réagit sur le dibromobutane **163d**, pour conduire au produit **164d** avec un rendement de 13 %. Le brome est ensuite substitué par le groupement azoture en présence de NaN_3 dans le DMF, permettant de conduire au produit **165d** avec un rendement de 55 %. Les différents groupements benzyles sont finalement déprotégés en présence de BCl_3 et conduit au produit attendu **166d**, sous la forme de deux conformères *Z/E* dans des proportions 60/40. A ce jour, il n'a pas été testé.

Pour synthétiser les azotures en pince dite inversée pour des longueurs de 2, 3, 4 carbones, une autre méthode a été entreprise en parallèle (Fig. 117).

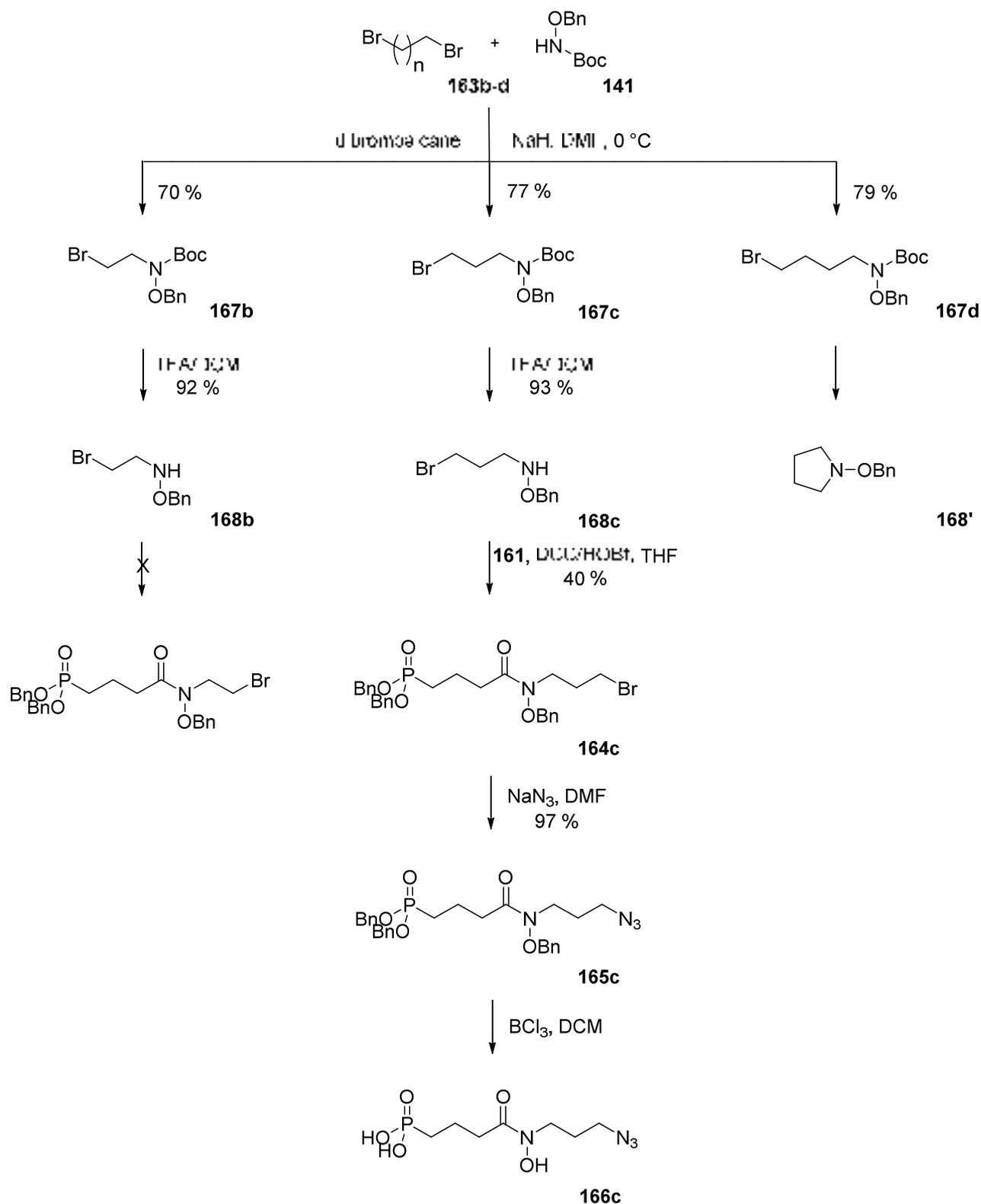


Figure 117 : Synthèse des azotures en pince dite inversée pour des longueurs de 2, 3 et 4.

Cette synthèse débute par la substitution de la benzylhydroxylamine **141** protégée par un groupement Boc, sur le dibromoalcane **163** désiré.⁴³ Cette première étape a conduit avec succès aux trois intermédiaires **167 b-d** avec des rendements variant de 70 à 79 %. La déprotection consécutive de

ceux-ci dans un mélange TFA/DCM permet d'accéder aux composés **168 b-c** avec des rendements de 92 et 93 %. Pour une longueur de quatre carbones **168d**, nous observons la formation d'un sous-produit. En effet, l'analyse des spectres RMN montrent l'apparition de deux massifs larges à 3,07 et 1,82 ppm intégrant tous les deux pour quatre protons, et la disparition du signal à 33,3 ppm, caractéristique du CH₂Br. Le sous-produit formé pourrait correspondre à la benzyloxy pyrrolidine **168'**.

Une réaction de couplage du composé **168c** à l'acide **161** en présence de DCC/HOBt, permet d'obtenir le dérivé bromé **164c** avec un rendement de 40 %. Le brome est substitué par le groupement azoture en présence de NaN₃ dans le DMF, permettant de conduire au produit **165c** avec un rendement de 97 %. Finalement, les différents groupements benzyles sont finalement déprotégés en présence de BCl₃. Le produit final est observé par RMN, mais n'est pas pur.

Concernant l'espaceur n = 2, plusieurs essais de couplage du dérivé **168b** (n = 2) avec l'acide **161**, ont été réalisés avec le DCC en présence de HOBt mais sans succès.

5. Evaluation biologique des azotures sur la DXR purifiée et par la méthode de diffusion en gélose sur une souche d'*E. coli*

Les quatre dérivés de la fosmidomycine fonctionnalisés avec un azoture **138 a-d** ont été testés sur la DXR d'*E. coli*. Le principe du test repose sur les différences d'absorption en UV/visible du NADPH et du NADP⁺. En effet, comme indiqué en introduction, la DXR transforme le DXP en MEP via deux étapes (Fig. 118). Une première correspond à un réarrangement intramoléculaire de type rétro-aldolisation et conduit à l'aldéhyde non isolable **23**. Une seconde passe par la réduction de l'aldéhyde en alcool primaire par le NADPH qui s'oxyde en NADP⁺.

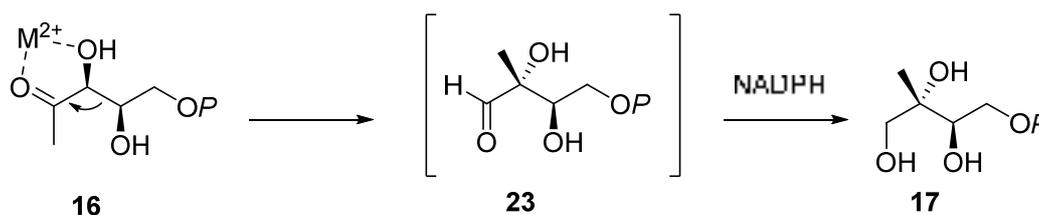


Figure 118 : Etapes catalysées par la DXR.

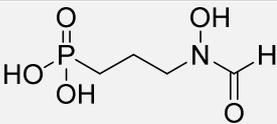
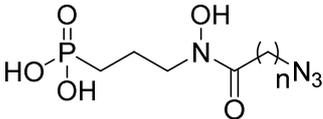
Ainsi, comme la partie nicotinamide réduite du NADPH absorbe à une longueur d'onde de 340 nm tandis que la forme oxydée du nicotinamide n'absorbe pas à cette longueur d'onde, mais à 260 nm, il est possible de déterminer la vitesse de la réaction enzymatique en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm. De ce fait, si les composés synthétisés et testés se comportent comme des inhibiteurs de la DXR, ils vont se fixer à la place du DXP dans le site actif et induire une diminution de la vitesse de transformation du DXP en MEP. L'activité inhibitrice pourra alors être déterminée par comparaison des vitesses de la réaction enzymatique en présence ou non des dérivés. La vitesse de

transformation du DXP en MEP a été mesurée en absence (V_0) et en présence d'inhibiteur à des concentrations différentes (V_i). Pour chaque concentration en inhibiteur, un pourcentage d'activité résiduelle est calculé, qui est le rapport entre la vitesse de réaction en présence d'inhibiteur et la vitesse de réaction en absence d'inhibiteur multiplié par 100 ($\% = V_i / V_0 \times 100$). L' IC_{50} peut alors être déterminée en traçant le pourcentage d'activité en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur. Celle-ci correspond à la concentration nécessaire en inhibiteur pour conduire à la réduction de 50 % de l'activité enzymatique.

Avant toutes comparaisons, les valeurs d' IC_{50} doivent faire l'objet d'une attention particulière, car les conditions expérimentales peuvent être différentes. En effet, celles-ci dépendent de la concentration en substrat utilisée ainsi que de la réalisation d'une pré-incubation ou non de l'inhibiteur avec la DXR. Une pré-incubation est réalisée, car la fosmidomycine est un inhibiteur de type slow-binding. Considérant que nos composés le sont également, ils doivent donc être préincubés pendant deux minutes en présence de NADPH avant d'initier la réaction enzymatique par l'ajout de DXP. Les résultats seront comparés avec la fosmidomycine qui est utilisée comme témoin positif et dont l' IC_{50} est d'environ 32 nM. Il est donc important de comparer les valeurs d' IC_{50} mesurées dans les mêmes conditions expérimentales.

L'ensemble des tests biologiques qui seront présentés dans ce manuscrit ont été réalisés par le Dr. Denis Tritsch. Par ailleurs, toutes les IC_{50} mesurées sont ensuite corrigées suite à un dosage du phosphore pour connaître la concentration des inhibiteurs testés. Les valeurs d' IC_{50} déterminées pour les azotures sont indiquées dans le tableau 9.

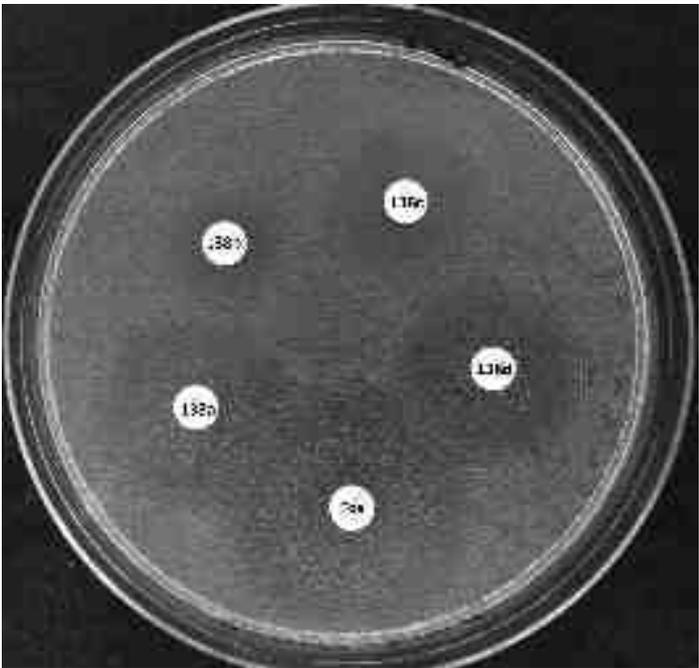
Tableau 9 : Valeurs des IC_{50} des azotures **138 a-d**.

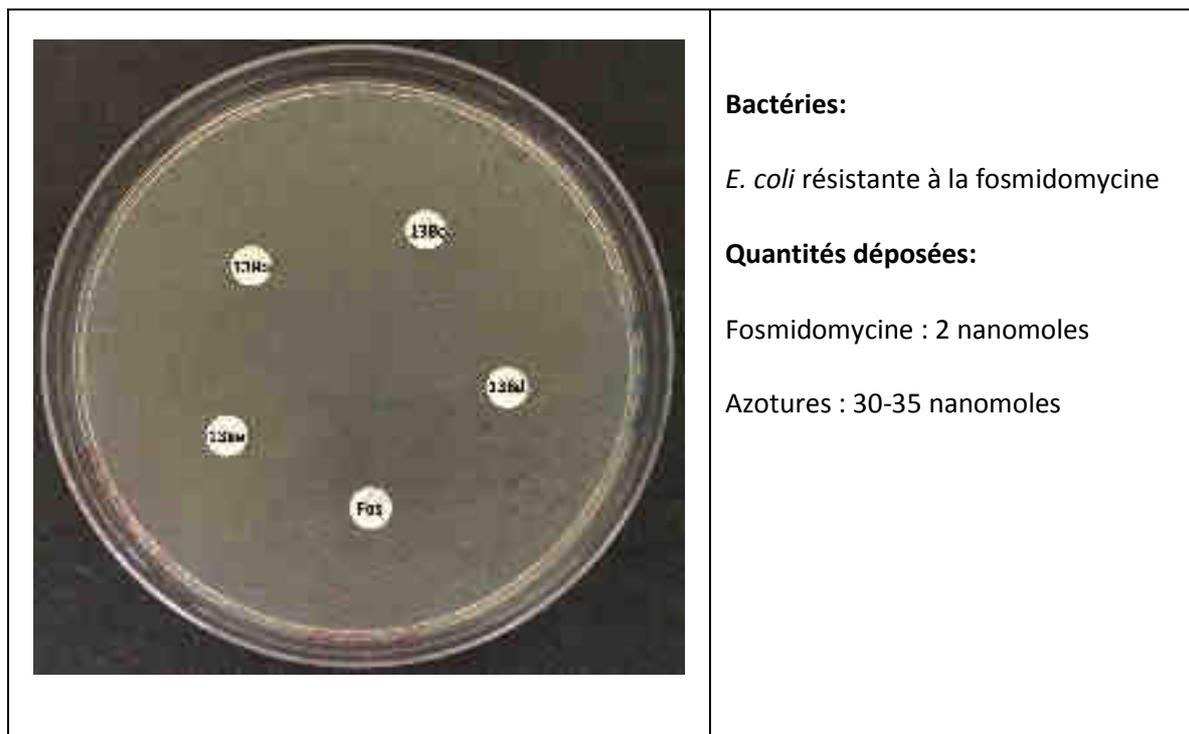
Composés	IC_{50} (μ M)
	Fosmidomycine 0.032
	138a , n = 1 17
	138b , n = 2 13
	138c , n = 3 4.8
	138d , n = 4 1.2

Les résultats obtenus sont intéressants, car même s'ils n'égalent pas ceux de la fosmidomycine, il y a inhibition, démontrant que l'inhibiteur se fixe au niveau du site actif de l'enzyme. Cette fixation est

nécessaire pour poursuivre l'approche biligand, car sans inhibition, la réaction de chimie click ne pourrait pas être envisagée au sein de l'enzyme.

L'ensemble des composés synthétisés a également pu être testé *in vitro* sur des souches d'*E. coli* avec la méthode de diffusion en milieu solide gélosé. Le test repose sur la diffusion de l'inhibiteur déposé, à une concentration donnée sur un disque de papier (antibiogramme), en présence d'une culture de bactérie déposée sur une boîte de Pétri. L'inhibition de la division cellulaire se traduit par l'apparition d'une zone circulaire dépourvue de bactéries, dont le diamètre traduit le pouvoir inhibiteur du composé testé. De manière à avoir un élément de comparaison, la fosmidomycine est déposée comme témoin (2 nanomoles) avec les inhibiteurs (30 nanomoles).

<p>Bactéries:</p> <p><i>E. coli</i> souche sauvage</p> <p>Quantités déposées:</p> <p>Fosmidomycine : 2 nanomoles</p> <p>Azotures : 30-35 nanomoles</p> <p>Diamètres:</p> <p>Fos 34 mm</p> <p>138a 26 mm</p> <p>138b 15 mm</p> <p>138c 20 mm</p> <p>138d 25 mm</p>	
--	---

Figure 119 : Antibiogramme des azotures sur *E. coli* et sur une souche résistante.

L'analyse des antibiogrammes montre que tous les inhibiteurs sont capables d'inhiber une souche sauvage d'*E. coli* (Fig. 119). Les inhibiteurs **138a** et **138d**, possédant le plus petit ($n = 1$) et le plus long ($n = 4$) espaceur sont les plus efficaces (Tab. 10). Bien qu'il y ait des différences au niveau de l'inhibition, les quatre inhibiteurs ont été retenus pour l'approche biligand.

Tableau 10 : Diamètre de la zone d'inhibition des inhibiteurs **138a-d**.

Composés	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Fosmidomycine	34
	138a , $n = 1$	26
	138b , $n = 2$	15
	138c , $n = 3$	20
	138d , $n = 4$	25

Toutefois, aucun des composés n'a été en mesure d'inhiber une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine par mutation des transporteurs du glycérol 3-phosphate et du glucose 6-phosphate. Ils semblent donc tous utiliser les mêmes transporteurs que la fosmidomycine pour passer la membrane bactérienne.

III. Synthèse d'analogues bromés et hydroxylés de la fosmidomycine

Ayant eu des résultats intéressants avec les azotures, il a été envisagé de synthétiser des inhibiteurs fonctionnalisés avec un groupement brome et hydroxyle.

1. Synthèse des dérivés bromés en pince naturelle

Pour synthétiser ces produits, nous avons utilisé une stratégie qui consiste à condenser les bromoacides **169a-d** commerciaux de différentes longueurs sur un phosphono hydroxylamine **143** (Fig. 120). L'acide α -bromobutyrique **169e**, a également été condensé. Après plusieurs essais de couplage avec différents agents de couplage, le DCC s'est révélé être le réactif de choix. Les produits **163a-e** ont été obtenus avec des rendements variant de 37 à 70 %. Le groupement benzyle est déprotégé par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif, donnant accès aux composés **171b** et **171d** avec des rendements respectifs de 50 et 28 %.

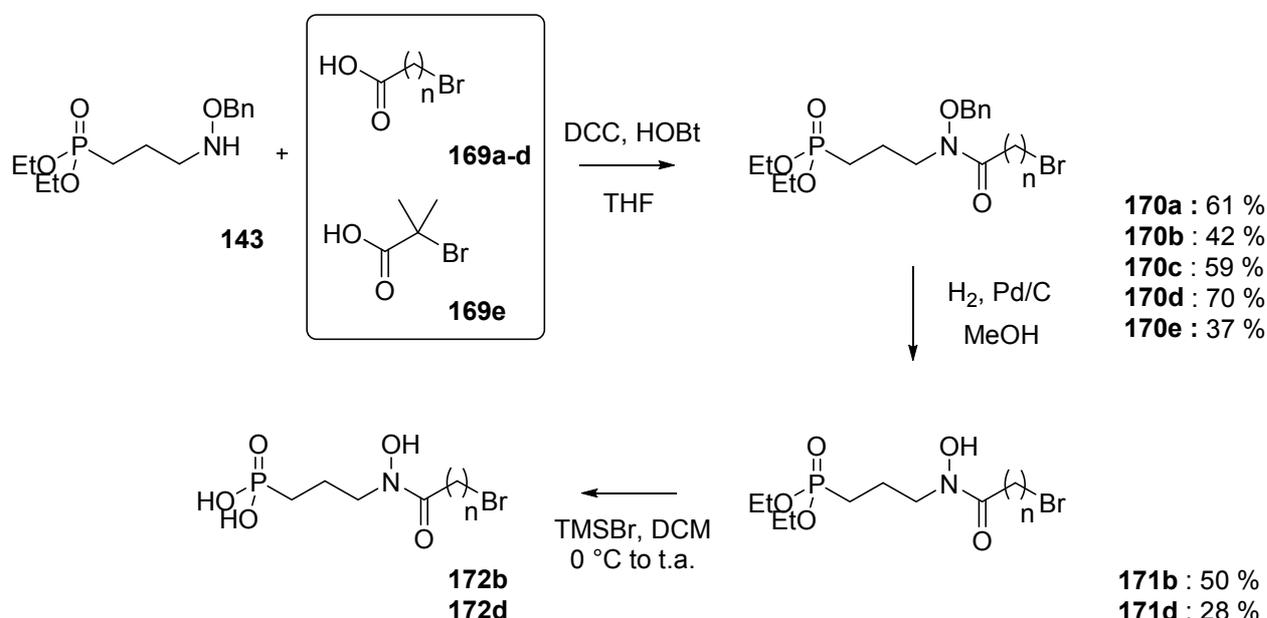


Figure 120 : Synthèse des dérivés bromés en pince dite naturelle.

Par contre, la déprotection du groupement benzyle des composés **170a** ($n = 1$), **170e** et **170c** ($n = 3$), n'a pas permis de conduire aux produits attendus. Pour le composé **170a** ($n = 1$), l'analyse des spectres de RMN, indique que le brome n'est plus présent. En effet, nous observons l'apparition d'un singulet à 2,17 ppm, intégrant pour 3 protons, ainsi qu'un $-CH_3$ à 20,6 ppm, correspondant à un groupement méthyle et indiquant la perte du brome. Dans le cas du composé **170e**, fonctionnalisé avec deux méthyles, la perte du brome est également observée. En effet, l'apparition d'un septuplet à 2,36 ppm, intégrant pour un proton en RMN du proton, et d'un $-CH$ à 35,7 ppm en RMN du carbone, confirment cette observation. Cette déshalogénéation pourrait résulter d'une insertion du Pd, suivie d'une

hydrogénation ou, d'un mécanisme radicalaire, qui serait favorisée dans le cas d'une longueur de chaîne $n = 1$, par stabilisation des intermédiaires radicalaires.

Pour le composé **170c**, possédant un espaceur de trois carbones, plusieurs essais d'hydrogénolyse ont été réalisés et ont conduit à la formation de plusieurs composés dont les structures n'ont pu être déterminées à ce jour.

La déprotection des groupements éthyles des composés **171b** et **171d** a été réalisée en présence de TMSBr dans le dichlorométhane. Pour le composé **172b** ($n = 2$), les analyses RMN sont complexes et montrent la présence de quatre composés. Le composé attendu **172b** est présent sous la forme de deux conformères *Z* et *E* dans des proportions 20/45 (**A** et **B**, Fig. 121). Pour le troisième composé, le spectre RMN nous indique que nous avons toujours la partie phosphono-hydroxamique mais celui-ci serait modifié au niveau de l'espaceur (**C**, Fig. 121). En effet, des déplacements chimiques à 4,36 ppm, associé à un carbone à 67,9 ppm sont présents dans son spectre RMN. Néanmoins, la structure n'a pu être déterminée. Le dernier composé pourrait correspondre à un fragment possédant toujours la partie phosphono-hydroxamique (**D**, Fig. 121).

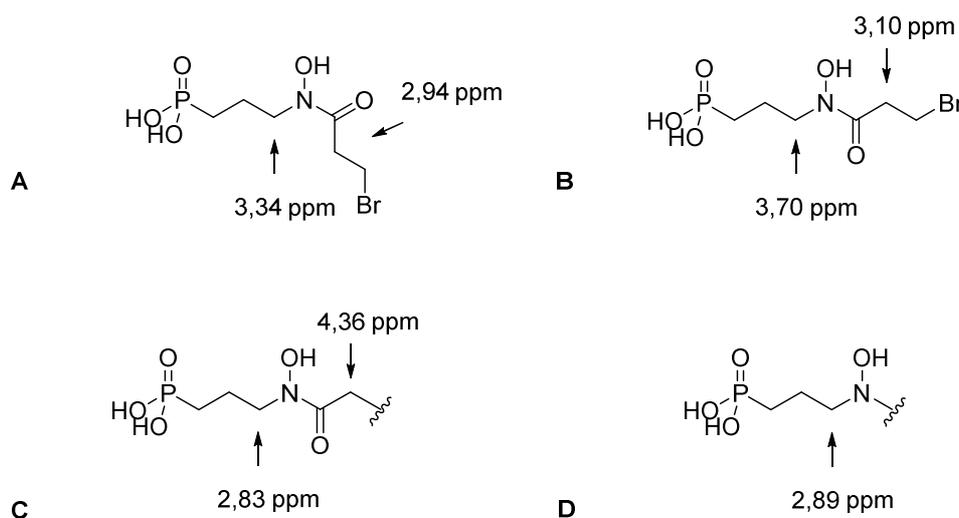


Figure 121 : Analyses spectroscopiques RMN hypothétique des produits formés lors de la dernière étape de déprotection du composé **171b**.

A, Conformère *Z* ; **B**, Conformère *E* ; **C**, 3^{ème} structure modifiée au niveau de l'espaceur ; **D**, 4^{ème} structure modifiée au niveau de l'acide rétro-hydroxamique.

Dans le cas d'une chaîne $n = 4$, nous avons obtenu le composé **172d** souhaité. L'analyse des spectres RMN dans le CD_3OD montre qu'il est présent sous la forme de deux conformères *Z* et *E* dans des proportions 55/45 respectivement.

2. Synthèse des dérivés bromés en pince inversée

Ayant en notre possession les dérivés bromés **164c** et **164d**, obtenus lors de la synthèse des azotures en pince inversée, nous avons réalisé l'hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif (Fig. 122).

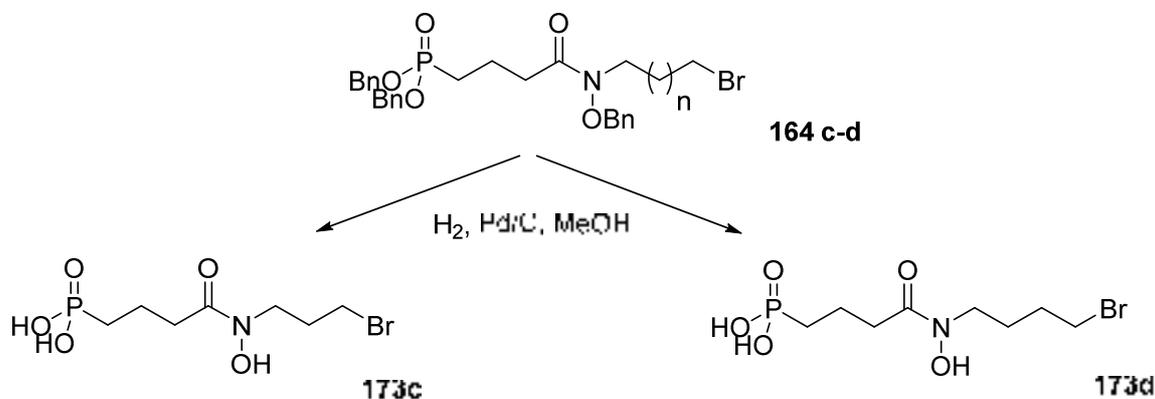


Figure 122 : Hydrogénolyse des dérivés bromés **164c** et **164d**.

Pour une longueur d'espaceur de trois carbones, malgré plusieurs tentatives, le composé **173c** a été obtenu au mieux à 60 %, mais accompagné de deux produits non identifiés. L'analyse du spectre RMN fait apparaître un signal à 4,21 ppm, associé à un carbone à 62,3 ppm versus des signaux à 3,46 et 31,1 ppm pour le CH₂ en α du brome présent dans le produit attendu (**E**, Fig. 123). A noter que nous avons déjà retrouvé ces signaux pour le troisième composé non identifié dans le cas du composé **172b**. Le troisième composé pourrait correspondre à un composé possédant le fragment phosphono-hydroxamique (**F**, Fig. 123).

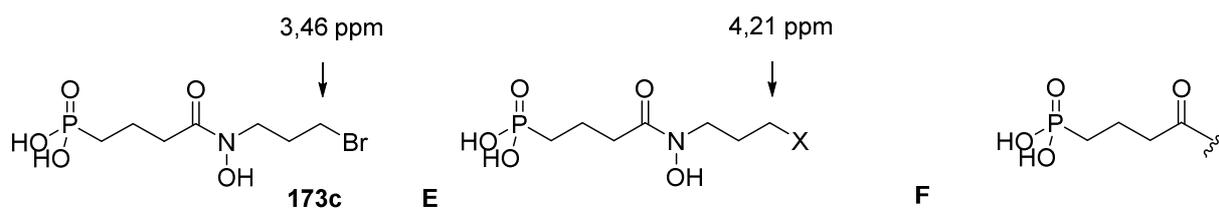


Figure 123 : Propositions de structure en accord avec les données spectroscopiques des produits formés lors de la dernière étape de déprotection du composé **164c**.

E, 3^{ème} structure modifiée au niveau de l'espaceur ; **F**, 4^{ème} structure modifiée au niveau de l'acide rétro-hydroxamique.

Le composé **173d** ($n = 4$), malgré plusieurs essais d'hydrogénolyse a été obtenu en très faible quantité et toujours accompagné de produits non identifiés.

3. Synthèse des alcools en pince naturelle

Les intermédiaires hydroxylés protégés (Fig. 109, p. 110, intermédiaires de synthèse des azotures sont hydrogénolysés pour conduire aux composés **174 b-d** avec des rendements variant de 66 à 96 % (Fig.

124). La déprotection des groupements éthyles est réalisée en présence de TMSBr dans le DCM. Le composé **175b**, de longueur $n = 2$, est obtenu sous la forme de deux conformères *Z* et *E* dans un rapport 50/50.

En revanche, pour des longueurs supérieures ($n = 3$ et 4), une cyclisation, conduisant à la formation de la γ -butyrolactone et de la δ -valérolactone a été observée (Fig. 124).

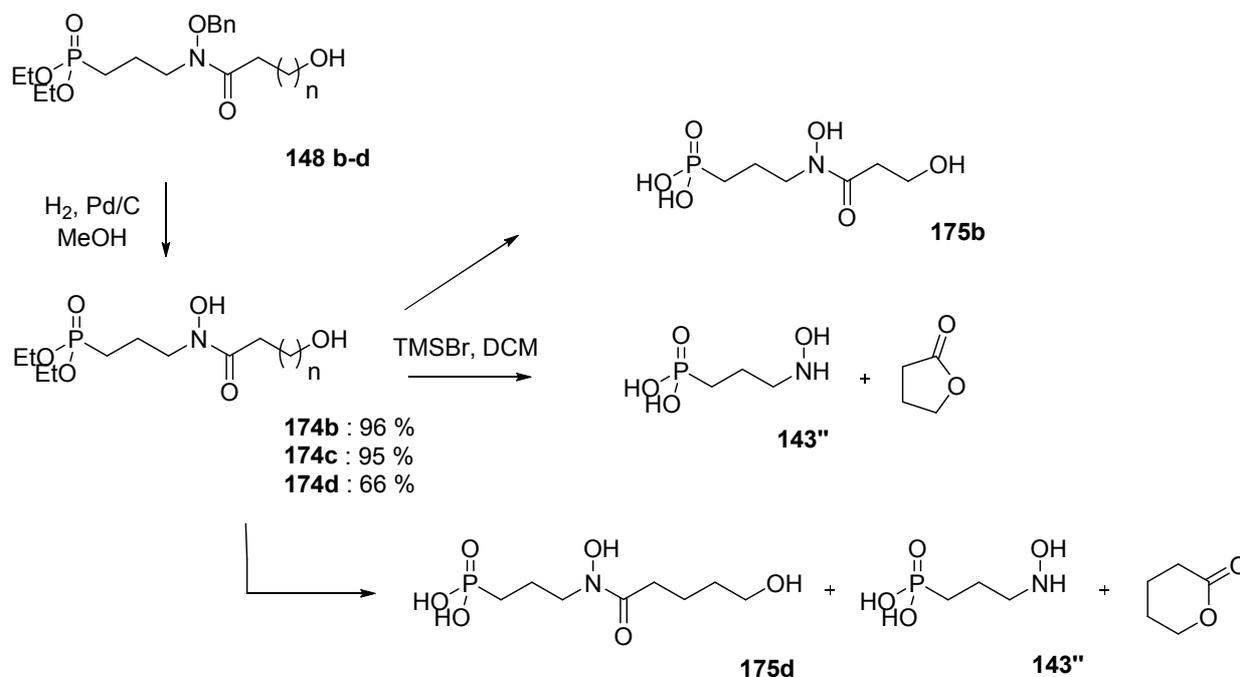


Figure 124 : Produits observés lors de la déprotection des éthyles des composés **148a-c**.

Pour une longueur $n = 3$, seule la γ -butyrolactone est formée. En effet, des déplacements chimiques des CH_2 à $\delta = 4,41, 2,54$ et $2,25$ ppm en RMN du ^1H et un déplacement à 183 ppm pour le carbonyle en RMN du ^{13}C (Tab. 11).

Tableau 11 : Déplacements chimiques des lactones formés lors de la déprotection des dérivés hydroxylés **174 c-d**.

Entrée	Produit	RMN ^1H	RMN ^{13}C	Solvant
1		4,44 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H) ; 2,58 (m, 2H) ; 2,28 (m, 2H)	183,0 ; 70,5 ; 27,9 ; 21,5	D_2O
2		4,11 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H) ; 2,54 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H) ; 1,90 – 1,60 (m, 4H).	63,5 ; 31,9 ; 21,5 ; 19,4	D_2O

Pour une longueur de $n = 4$, nous observons le produit attendu sous forme de deux conformères (40/60), mais nous ne pouvons pas affirmer si ce sont les conformères *Z* et *E* ou une *autre* forme. A côté de ce produit, nous observons la δ -valérolactone ainsi que le fragment **143''**. Ces trois produits seraient présents dans des proportions 50/25/25.

Cette cyclisation pourrait être favorisée par la quantité résiduelle d'HBr contenu dans le TMSBr. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réitéré cette réaction de déprotection en ajoutant dans le milieu réactionnel soit de la triéthylamine soit de la pyridine. Malgré l'ajout de celles-ci, la formation du produit cyclisé a été observée. A ce jour, aucune explication rationnelle n'a pu être apportée.

L'utilisation de TMSBr pour la déprotection des groupements éthyles du phosphonate n'étant pas possible, nous avons décidé de remplacer les éthyles par des groupements benzyles. Pour ce faire, deux méthodes qui varient seulement par l'ordre de condensation des différents fragments ont été envisagées (Fig. 125).

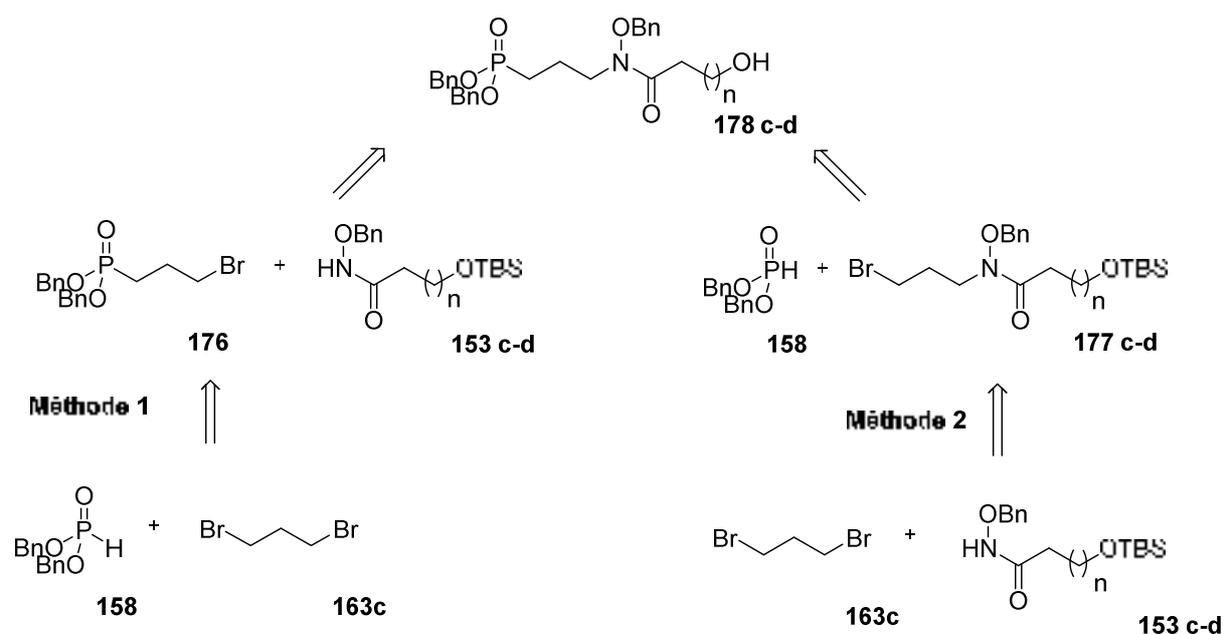


Figure 125 : Remplacement des éthyles du phosphonate par des groupements benzyles.

La première méthode pourrait être réalisée par substitution nucléophile des *N*-(benzyloxy)-3-hydroxypropionamide **153c-d** dont les synthèses ont été précédemment présentées (voie A2, p. 105) sur le 3-bromopropylphosphonate de dibenzyle **176**. Ce dernier serait obtenu par substitution nucléophile de l'anion du dibenzylphosphite **158** formé *in situ* sur le dibromopropane **163c**.

La seconde méthode consisterait à introduire plus tardivement le groupement phosphonate par substitution nucléophile sur le *N*-(benzyloxy)-*N*-(3-bromopropyl)-3-(hydroxyéthyl)propionamide **177c-d**. Ces

derniers seraient formés par substitution nucléophile du *N*-(benzyloxy)-3-hydroxypropionamide **153c-d** sur le dibromopropane **163c**.

Ces deux méthodes ont été mises en place pour des longueurs de chaîne de deux et trois carbones mais malheureusement, les produits escomptés non pas été obtenus. Dans le cas de la première méthode, seuls les produits de départ ont été retrouvés lors de la substitution entre le bromopropylphosphonate de dibenzyle **176** et les hydroxamates **153c-d**.

Dans le cas de la seconde méthode, les hydroxamates *O*-benzylés **153c-d** sont déprotonés en présence de NaH, puis mis à réagir par substitution nucléophile sur le 1,3-dibromopropane **163c** dans le DMF. Les composés **177c** et **177d** sont obtenus avec des rendements respectifs de 36 % et 27 %. L'introduction du groupement phosphonate par substitution nucléophile de l'anion formé *in situ* du dibenzylphosphite sur les composés **177c** et **177d** n'a pas été concluant, et nous avons récupéré les produits de départ.

Après ces multiples essais, seuls deux inhibiteurs **173d** (Br, $n = 4$) et **175b** (OH, $n = 2$), ont été obtenus purs et testés sur la DXR d'*E. coli*. Ces deux composés ont montré des IC_{50} de respectivement 0.8 μ M et 41 μ M, ce qui est très intéressant notamment pour le dérivé bromé.

IV. Cycloalcynes

1. Choix des cyclooctynes et azacyclooctynes

Les cyclooctynes sont les plus petits alcyne cycliques isolables. Ceux possédant un cycle plus petit, ont uniquement été détectés par des analyses de spectroscopie et les plus grands, stables montrent une réactivité restreinte.

En 1961, Wittig et Krebs ont remarqué que les cyclooctynes contraints réagissent violemment avec l'azoture de phényle, formant un triazole par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (Fig. 126).⁴⁴ Cette réactivité avait été observée par Blomquist et Liu, quelques années plus tôt, lors de la première synthèse d'un cyclooctyne.⁴⁵

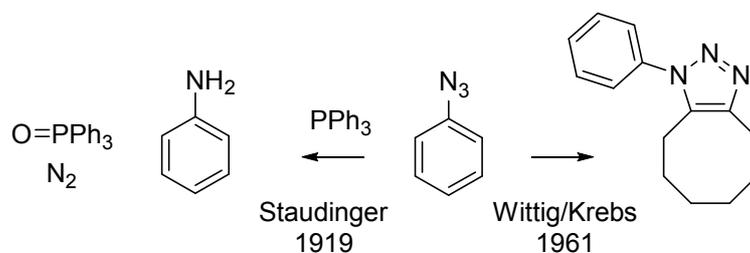


Figure 126 : Réaction 1,3-dipolaire en présence d'un cyclooctyne.⁷

Bertozzi et ses collaborateurs ont mis à profit le potentiel des cyclooctynes pour des réactions de bioconjugaison. Ils ont ainsi conceptualisé une première série de cyclooctynes substitués mais leur faible solubilité en milieu aqueux et leur cinétique lente les a poussés à synthétiser une seconde génération (Fig. 127).⁴⁶ Ces derniers ont été fonctionnalisés avec un atome de fluor en α de l'alcyne, dans le but d'optimiser la cinétique, la stabilité, la solubilité et les propriétés pharmacocinétiques de la cycloaddition. Ces améliorations les ont conduits à poursuivre leurs travaux par la conception d'une troisième génération, de cyclooctynes difluorés, améliorant de manière significative la cinétique. Plus récemment, la synthèse de cyclooctynes fusionnés avec un cycle aromatique ou comportant un hétéroatome a été décrite.⁴⁷ Le nom de SPAAC a ainsi été introduit pour « strain-promoted alkyne azide cycloaddition ».

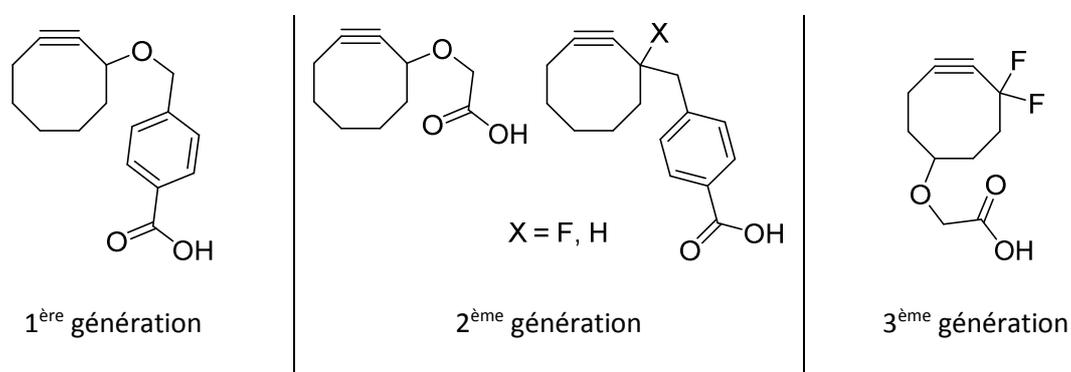


Figure 127 : Différentes générations de cyclooctynes synthétisés par l'équipe de Bertozzi.⁴⁷

Très tôt, Sustmann et Houk ont étudié les orbitales moléculaires des cycloadditions 1,3-dipolaires ainsi que l'effet des substituants.^{48,49,50}

Plus récemment, Houk et ses collaborateurs ont étudié les états de transition de l'azoture de phényle, du cyclooctyne et du 3,3-difluorocyclooctyne, pour expliquer l'impact des cyclooctynes sur la vitesse de réaction de click.⁵¹ Ils ont ainsi montré que la barrière d'activation passe de 16.2 kcal/mol dans le cas de l'azoture de phényle à 8.0 kcal/mol pour le cyclooctyne et 6.0 kcal/mol pour le 3,3-difluorocyclooctyne. Ces résultats confirment les hypothèses faites par Bertozzi concernant l'amélioration de la cinétique suite à l'ajout d'atomes de fluor.

D'autres groupes ont également étudié la réactivité de ces cycles contraints. Ils ont pu mettre en avant que l'insertion de l'alcyne dans un cycle crée une distorsion dans la géométrie de l'état de transition, le rendant plus réactif. Différents effets électroniques (hyperconjugaison et interaction électrostatique) favorisent également la réactivité des composés (Fig. 128).^{52,53,54}

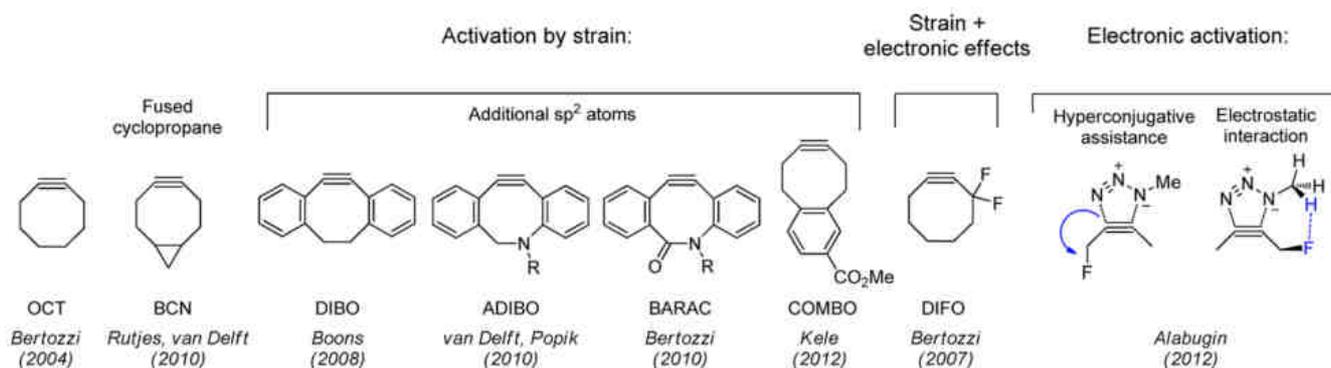
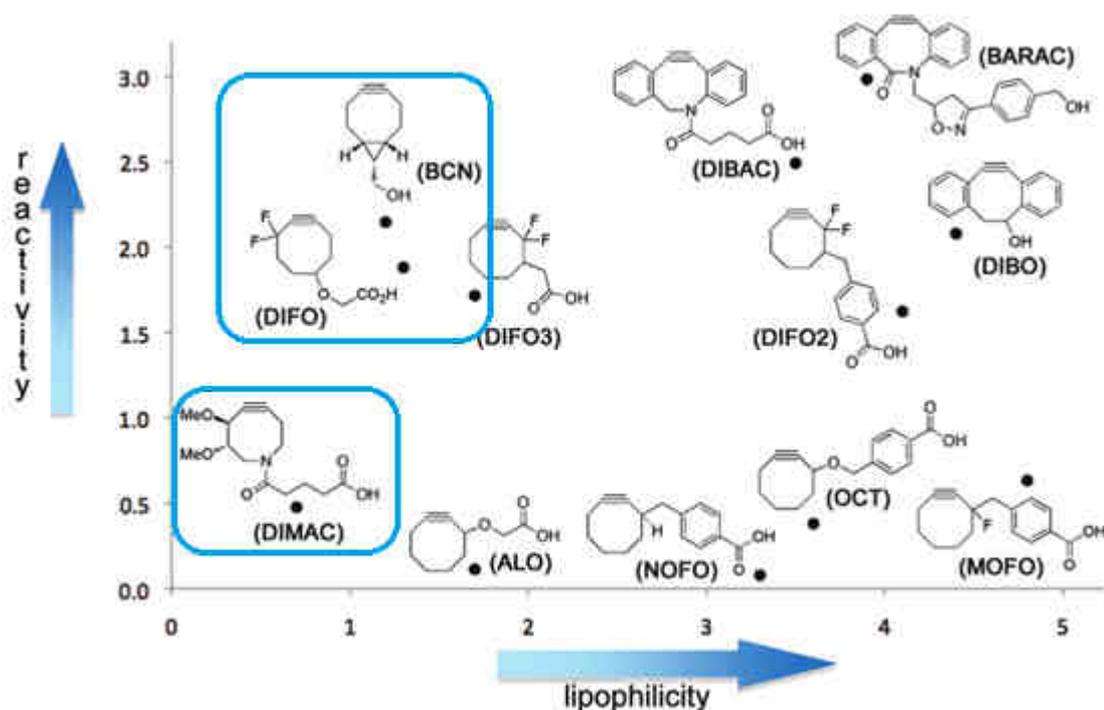


Figure 128 : Différents mode d'activation d'un cyclooctyne.⁵⁴

Afin d'augmenter la biodisponibilité des cyclooctynes, l'équipe de Bertozzi a développé des cyclooctynes plus hydrophiles en introduisant un atome d'azote dans le cycle (DIMAC, Fig. 129).⁵⁵

Plusieurs équipes ont également rapporté des synthèses d'autres cycloalcynes contraints : des dibenzocyclooctyne (DIBO) ainsi que des cyclononynes (Fig. 129).

Afin d'éviter l'utilisation de cuivre en milieu biologique, nous avons donc décidé de travailler avec des cycles contraints. Notre choix s'est porté sur la synthèse de cyclooctyne et d'azacyclooctyne. Concernant leur choix, plusieurs paramètres sont entrés en compte. Tout d'abord, leur réactivité doit être raisonnable, car si les deux fonctions sont trop réactives, la réaction pourrait se produire en dehors des sites de fixation. La molécule ainsi formée risquerait ainsi d'être moins apte à venir se fixer au sein de l'enzyme et par conséquent à l'inhiber. Le caractère lipophile et le positionnement de la fonctionnalisation sont également des paramètres à prendre en compte.

Figure 129 : Réactivité des cyclooctynes versus caractère lipophile.⁵⁶

Pour répondre à ces facteurs (rapport au compromis réactivité/lipophilie), nous avons choisi comme modèle, des composés du type BCN, DIMAC et DIFO (Fig. 129). Cependant, ne connaissant pas la cinétique nécessaire pour réaliser la réaction click dans la DXR, nous avons sélectionné des cyclooctynes ne possédant pas d'atomes de fluor ou des cyclooctynes du type DIBAC qui sont à l'origine d'une accélération de la vitesse de réaction, ce qui pourrait être un frein dans notre cas.

Pour favoriser la biodisponibilité, nous avons choisi de réaliser la synthèse d'un cyclooctyne et d'un azacyclooctyne judicieusement fonctionnalisés afin que le mime de NADPH pointe vers la poche de ce dernier.

2. Stratégie de synthèse des cyclooctynes et azacyclooctynes

Les cyclooctynes et azacyclooctynes **A**, pourraient être obtenus suite au réarrangement du sélénediazole **B**, qui serait formé à partir des cyclooctanone et azacyclooctanone **C** et **D**, respectivement fonctionnalisés en position 3 et 4 (Fig. 130). La cyclooctanone **C** pourrait être obtenue après la fonctionnalisation de l'énone **183**. Ce dernier serait synthétisé à partir du cyclooctanone **179** commercial. L'azacyclooctanone **D**, pourrait être obtenue suite à la réduction de l'azacyclooctenone **E**, précédemment obtenue par une réaction de métathèse du composé **208'**. Ce dernier serait formé suite à la condensation entre la 6-hydroxyhex-1-en-3-one **194** et l'allylamine **202a**. Les intermédiaires clés de ces deux synthèses sont la cycloocténone **183** et l'allylamine **208'**.

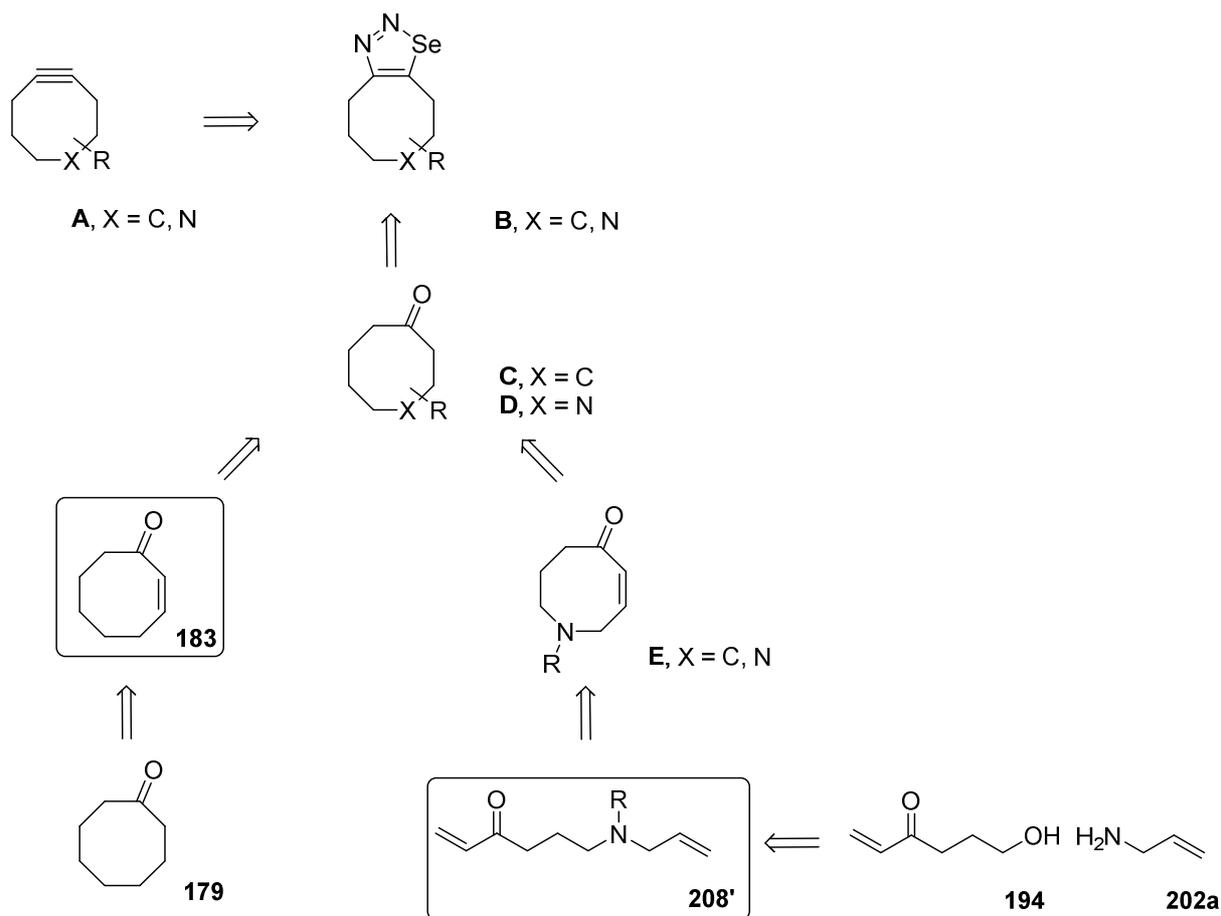
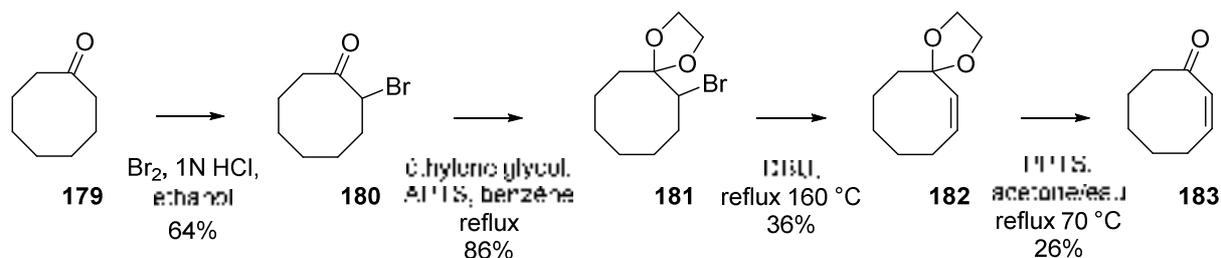


Figure 130 : Rétrosynthèse des cyclooctynes et azacyclooctynes.

a. Tentative de synthèse d'un cyclooctyne

Pour la préparation du cyclooctyne, nous nous sommes inspirés des travaux de Bertozzi concernant la synthèse de la seconde génération de DIFO.⁴⁶ Ces travaux passent par la formation de la cyclooctanedione **185** dont la synthèse a été rapportée par plusieurs équipes.^{57, 58}

Cette synthèse débute par la bromation de la cyclooctanone **179** en position α de la cétone conduisant à l' α -bromocétone **180** avec un rendement de 64 % (Fig. 131). Dans leur publication, Anseth et ses collaborateurs ont rapporté la nécessité de protéger la cétone sous la forme d'un acétal en utilisant l'éthylène glycol en présence d'APTS au reflux dans le benzène. Pour des raisons de toxicité, nous avons décidé de remplacer le benzène par du toluène. Plusieurs essais en l'absence ou en présence de tamis moléculaire ou de Na_2SO_4 ont été réalisés. La formation de l'acétal a été observée par RMN, mais accompagné d'un produit non identifié et de la cyclooctanone **179** de départ dans des proportions 1/1,3/1,2. La tentative de purification sur colonne de gel de silice ne nous a pas permis d'isoler le produit du fait des faibles différences de rapports frontaux.

Figure 131 : Synthèse de la (Z)-cyclooct-2-én-1-one **183**.

Nous avons donc décidé de former l'acétal en présence du benzène ce qui a conduit à l'obtention du 6-bromo-1,4-dioxaspiro[4.7]dodécane **181** avec un rendement de 86 %. Une réaction d'élimination sur le bromoacétal **181** en présence d'une base encombrée, la DBU, conduit à l'alcène **182** avec un rendement de 36 %. La déprotection de celui-ci, en présence de PPTS, permet d'accéder à l'énone **183** souhaité avec un rendement de 26 %.

Cette suite réactionnelle nous a permis d'accéder à l'énone **183** avec un rendement global de 5 %. En parallèle, nous avons mis en oeuvre une synthèse permettant d'accéder en une étape à l'énone **183** par oxydation à l'IBX dans le liquide ionique [bmim][Br] (Fig. 132).⁵⁹ Cependant, la formation du produit attendu n'a jamais été observée.

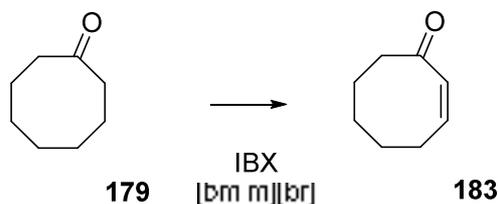
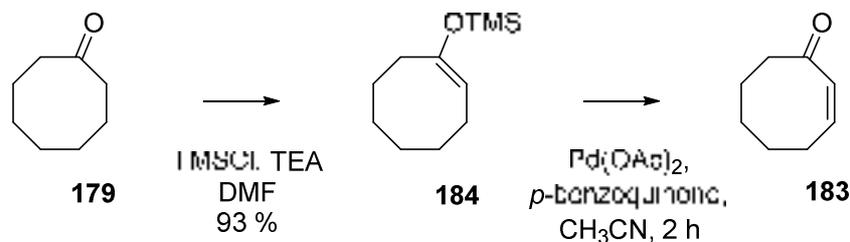


Figure 132 : Synthèse de la (Z)-cyclooct-2-én-1-one via l'IBX

Une troisième voie de synthèse a donc été envisagée. Celle-ci fait intervenir une déhydrosilylation catalysée en présence de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$

Le cyclooctanone **173** est convertie en éther d'énol silylé **178** en présence de triéthylamine et de chlorure de triméthylsilyle dans le DMF avec un rendement de 93 % (Fig. 133).^{60, 61}

Figure 133 : Nouvelle voie de synthèse pour l'obtention de la cycloocténone **177**.

L'énone **183** est obtenu par une déhydro-silylation de Saegusa-Ito catalysée par du Pd(OAc)₂.⁶² Dans un premier temps, nous avons utilisé les conditions de Shimizu, nécessitant l'introduction du catalyseur en quantité sub-stoechiométrique (0,05 éq.) (entrée 1, Tab. 12).⁶³ Cette réaction nous a permis d'obtenir un mélange de l'énone **183** et de la cyclooctanone **179** avec un rendement de 3 % dans un rapport de 2/0,8.

Tableau 12 : Conditions pour la déhydro-silylation catalysée au Pd(OAc)₂.

Entrée	Conditions	% énone 183 /cyclooctanone 179 , déterminé par RMN	Rendement
1	Pd(OAc) ₂ (0,05 éq), dppe (0,05 éq), diallyl carbonate (2 éq), CH ₃ CN, reflux, 1 h	2/0.8	3 %
2	Pd(OAc) ₂ (10 mol%), DMSO, t.a., 72 h	2/1	10 %
3	Pd(OAc) ₂ (0,5 éq), <i>p</i> -benzoquinone (0,5 éq), CH ₃ CN, t.a., 2 h	2/0.8	48 %

Les rendements étant faibles, nous avons reproduit la réaction en augmentant les quantités de catalyseur (0.1 eq.) selon les conditions mises au point par Larock (entrée 2, Tab. 12).⁶⁴ Le produit attendu **183**, a de nouveau été obtenu en mélange avec la cyclooctanone **179** de départ avec un rendement de 10 % dans des proportions 2/1. Finalement, la méthode décrite par Saegusa, utilisant 0,5 équivalent nous a permis d'obtenir l'énone **183** avec un rendement avec 48 % dans des proportions 2/0,8 (entrée 3, Tab. 12).⁶²

Pour fonctionnaliser l'énone **183**, deux méthodes ont été envisagées. La première permettrait de transformer l'énone **183** en cyclooctanedione **185** par une oxydation de Wacker-Tsuji en présence du Na₂PdCl₄.⁶⁵ La dione pourra ainsi être fonctionnalisée par une réaction de Wittig (Fig. 134). La seconde méthode permettrait de fonctionnaliser la cyclooctanone **183** par une addition 1,4 de Michael, par un organocuprate de lithium selon la réaction de Saunders.⁶⁶

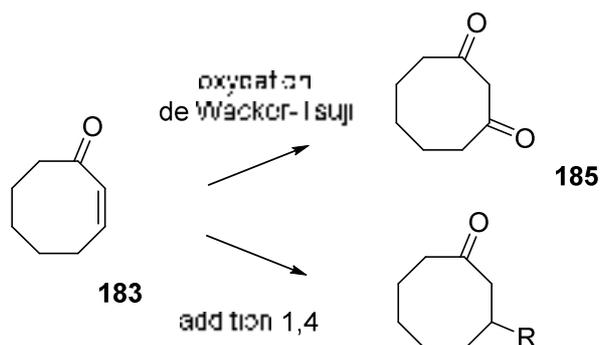


Figure 134 : Modification de l'énone **177** via une oxydation de Wacker-Tsuji ou une addition 1,4.

Pour la première méthode, la formation du cyclooctanedione **185** a été observée en RMN, mais le produit n'a jamais pu être isolé.

La seconde méthode, nécessite la synthèse de l'organolithien **187** par réaction du 2-(3-chloropropoxy)tétrahydro-2H-pyrane avec du lithium (Fig. 135).

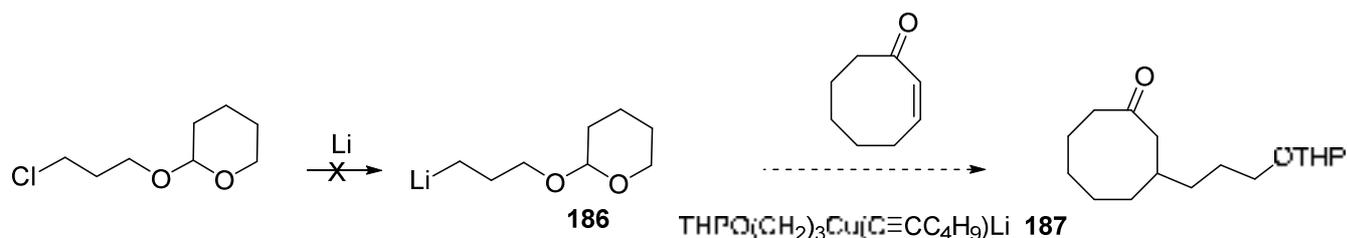
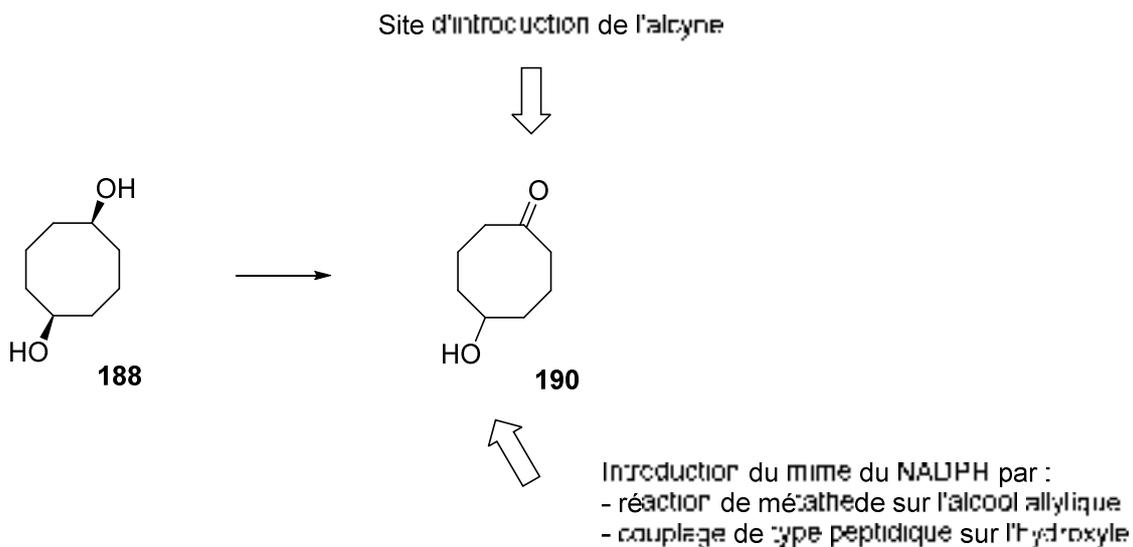


Figure 135 : Addition 1,4 de l'organolithien **187** sur la cycloocténone **183**.

Malgré plusieurs essais en condition anhydre, et avec différents conditionnements pour le lithium (granule, ruban), nous n'avons pas pu observer la formation du lithien **186** par titration.

Suite aux difficultés rencontrées pour fonctionnaliser la cycloocténone **183** en position 3, nous avons tenté de fonctionnaliser le cyclooctyne en position 5, en utilisant le 1,5-cyclooctanediol **188**, plus onéreux.^{67,68} En effet, la présence de deux fonctions hydroxyles, servirait pour l'une de point de fonctionnalisation tandis que l'autre permettrait d'introduire l'alcyne. L'alcyne pourrait être introduit par le réarrangement d'un sélénediazole ou par une *syn*-élimination d'un triflate vinylique.

Figure 136 : Fonctionnalisation du 1,5-cyclooctanediol **188**.

Selon la nature du mime du NADPH (dihydropyridine ou acide naphthoïque), deux approches de fonctionnalisation ont été envisagées (Fig. 136). Une première approche permettrait d'introduire les acides sélectionnés par modélisation moléculaire par une réaction d'estérification sur l'hydroxyle. La seconde approche, permettrait d'introduire un dérivé de dihydropyridine, synthétisé en collaboration avec deux stagiaires, via un espaceur par une réaction de métathèse (Fig. 137).⁶⁹

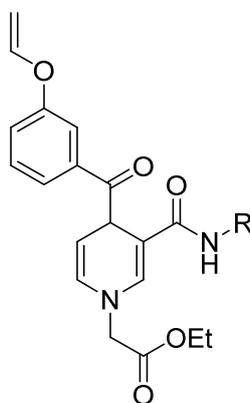


Figure 137 : Mime du NADPH du type dihydropyridine.

Pour la première approche, la première étape consiste en une mono-oxydation du 1,5-cyclooctanediol **188** en présence de PCC dans le DCM (Fig. 138). La 5-hydroxycyclooctanone **189** est obtenue avec un rendement de 79 %.

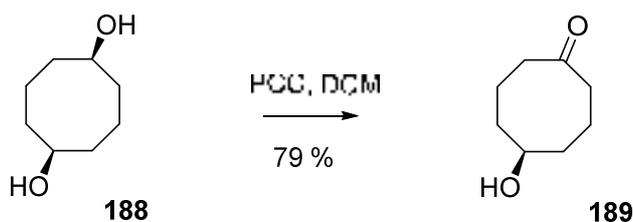
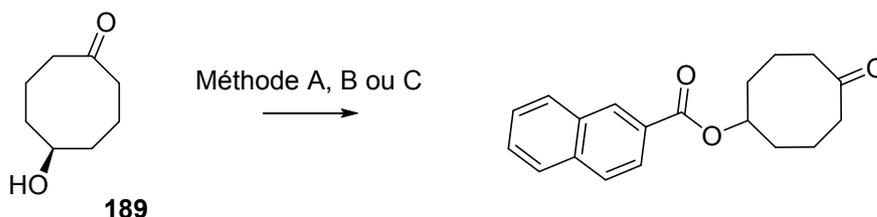


Figure 138 : Mono-oxydation du 1,5-cyclooctanediol.

Pour la seconde étape, plusieurs conditions de couplage peptidique ont été réalisées, à partir de l'acide 2-naphtoïque pouvant mimer le site du nicotinamide (Fig. 139).

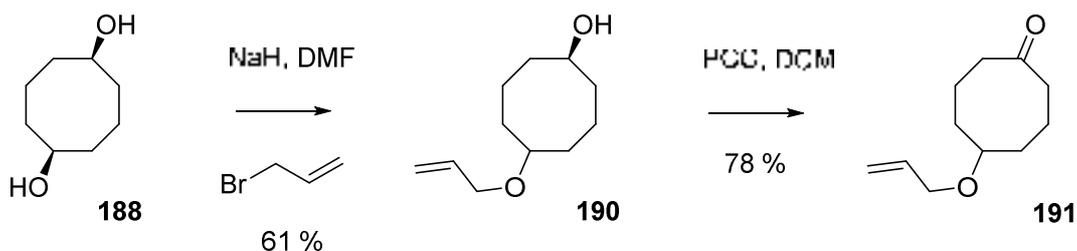
Trois tests ont été réalisés selon les conditions suivantes :

- A. EDC.HCl, HOBt, DIPEA, DMF
- B. DCC, HOBt, THF
- C. DIC, HOBt, THF

Figure 139 : Tests de couplage du 5-hydroxycyclooctanone **189** avec l'acide 2-naphtoïque.

Quelles que soient les conditions utilisées, nous n'avons pas observé de consommation significative de la 5-hydroxycyclooctanone **189** de départ. D'autres tests devront être mis en œuvre avec un agent de couplage différent des carbodiimides employés.

La seconde méthode débute par la mono-allylation du 1,5-cyclooctanediol **188** par une réaction de substitution de ce dernier sur le bromure d'allyle (Fig. 140).⁶⁸ Cette réaction est réalisée en présence de NaH dans le DMF et conduit au cyclooctanediol mono-allylé **190** avec un rendement de 61 %. L'alcool libre est ensuite oxydé en cétone dans le DCM par ajout successif de PCC. La cyclooctanone substitué **191** est obtenue avec un rendement de 78 %.

Figure 140 : Synthèse de la cyclooctanone **191**.

Un test de métathèse a été réalisé à partir du bromure d'allyle en présence du catalyseur de Grubbs de seconde génération au reflux dans le DCM, à l'abri de lumière (Fig. 141).

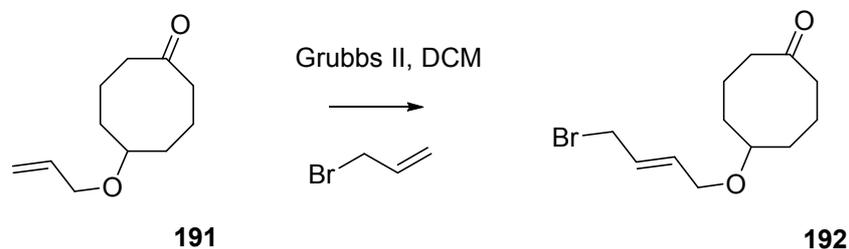


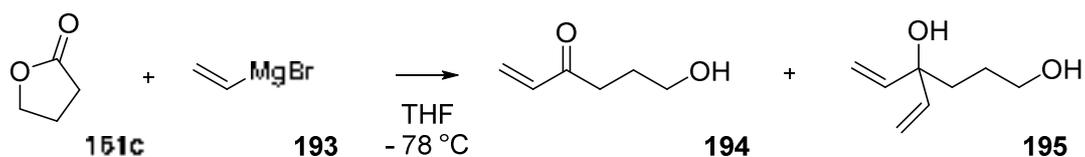
Figure 141 : Essai de métathèse entre la cyclooctanone X et le bromure d'allyle.

La formation du produit escompté a été mise en évidence par RMN-¹H, et spectrométrie de masse en mélange avec d'autres composés. Faute de temps, nous n'avons pas pu réaliser la réaction de métathèse avec le dérivé de dihydropyridine.

b. Tentative de synthèse d'azacyclooctyne

Concernant la synthèse de l'azacyclooctanone, nous avons choisi de nous inspirer de travaux de Bertozzi utilisant la métathèse pour former le cycle.⁵⁵

La première méthode envisagée pour obtenir le composé **194**, consiste à ouvrir la γ -butyrolactone **151c** par le bromure de vinylmagnésium **193**. Cependant, la réaction n'a pas conduit au produit souhaité et nous avons observé la formation du 4-vinylhex-5-ène-1,4-diol **195**.

Tableau 13 : Conditions opératoires pour l'ouverture de la γ -butyrolactone. * = stoppé après l'ajout du magnésien.

Entrée	Solvant	Température	Concentration	Equivalent de	Durée	194	195	Produit de départ
			magnésien dans le THF	magnésien ajoutée				
1	THF	-70 °C	1 M	1	1 h		✓	✓
2	THF	-70 °C	1 M	0,7	*	✓	✓	✓
3	THF	-70 °C	1 M	0,5	*		✓	✓
4	THF	-70 °C	1 M	0,3	*	✓	✓	✓
5	THF	-70 °C	0,25 M	0,8	*		✓	✓
6	THF	-70 °C	0,25 M	0,6	*		✓	✓
7	THF	-70 °C	0,25 M	0,5	*	✓	✓	✓
8	THF	-70 °C	0,25 M	0,3	*	✓	✓	✓
9	Et ₂ O	-70 °C	0,1M	0,6	*	✓	✓	✓
10	Et ₂ O	-70 °C	0,1M	0,6	*	✓	✓	✓
11	THF	-70 °C	0,1M	0,6	*			✓
12	THF	-70 °C	0,1M	1	*	✓	✓	✓

De nombreux essais ont été réalisés pour observer la formation du produit souhaité et sont reportés dans le tableau 13. Dès les premiers essais, malgré un abaissement de la température à $-70\text{ }^\circ\text{C}$, nous avons observé la formation du produit di-substitué **195**. Afin d'éviter la double addition du magnésien sur la lactone, nous avons souhaité faire varier le nombre d'équivalents de magnésien ajouté, la réaction étant neutralisée dès la fin de l'introduction de la quantité souhaitée. Pour les entrées 2 et 4, nous avons observé la formation du produit attendu, la 6-hydroxyhex-1-én-3-one **194** mais dans de faibles proportions par rapport au composé **195**. Avec ces résultats encourageants, nous avons fait varier la concentration du magnésien introduit en préparant des solutions à 0,25 M et 0,1 M (entrée 5 à 12). Selon les conditions présentées entrée 2, 4, 7 à 10 et 12, le produit souhaité a été observé mais toujours en mélange avec le produit de double addition **195**. Les conditions ayant donné le meilleur rapport correspondent à l'entrée 12 pour laquelle nous avons obtenu les composés **194/195** dans des proportions 0,4/2.

Du fait de ces résultats peu concluants et de la difficulté à isoler le composé souhaité, une autre voie de synthèse pour mener à la 6-hydroxyhex-1-én-3-one **194**, a été réalisée, à partir du 1,4-butanediol **196** commercial (Fig. 142).^{70,71}

La monosilylation du 1,4-butanediol **196**, est obtenue avec un rendement de 71 %. L'hydroxyle libre **197** est ensuite oxydé en aldéhyde **198** via une réaction de Swern avec un rendement de 75 %. L'addition de bromure de vinylmagnésium **193** sur l'aldéhyde **198** a conduit à l'obtention de l'alcool allylique **199** souhaité avec un rendement de 78 %. L'oxydation de l'alcool secondaire **199** par le periodinane de Dess Martin, conduit à l'énone **200** avec un rendement de 58 %.

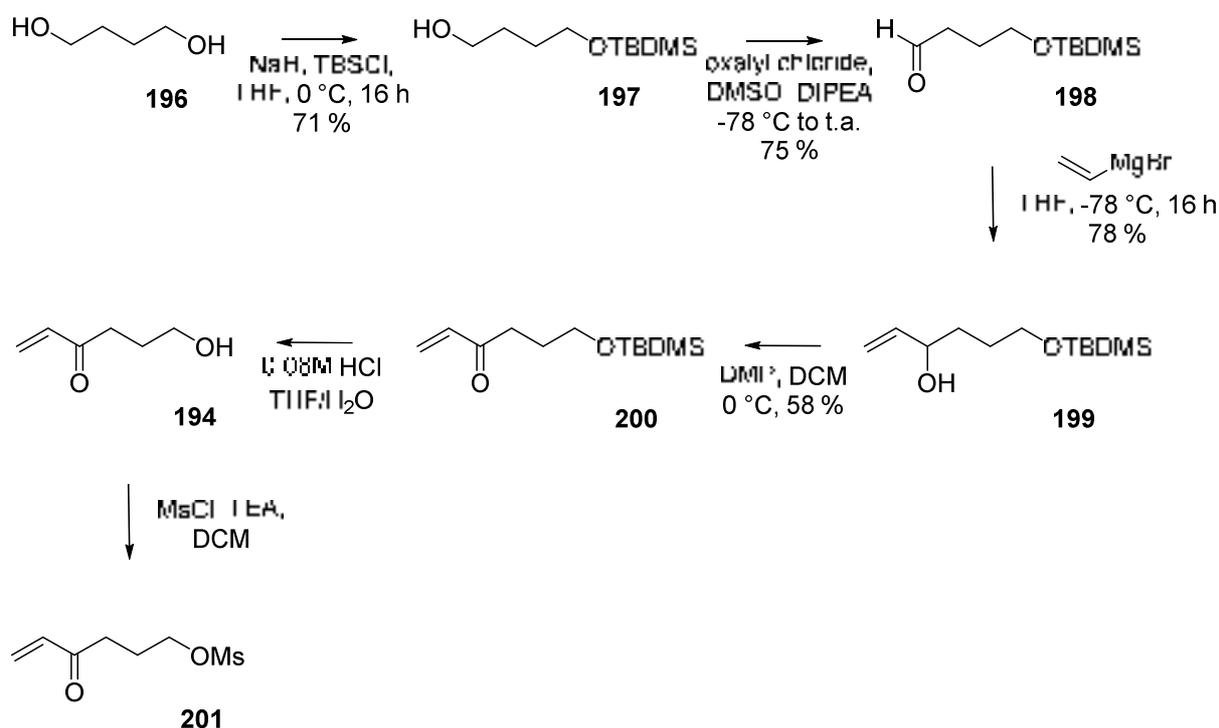
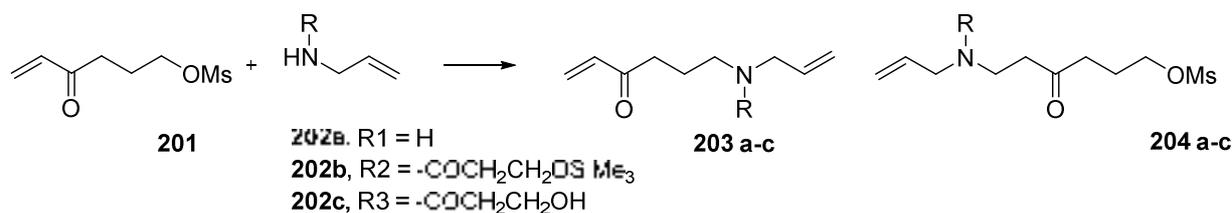


Figure 142 : Nouvelle voie de synthèse pour l'azacyclooctyne.

L'utilisation de TBAF pour déprotéger l'éther silylé **200** n'a pas fonctionné. Plusieurs conditions ont été testées comme l'utilisation de résines acides (Dowex, Amberlyte 15, Amberlyte CG-50), mais aucune n'a conduit au produit souhaité.

L'alcool est finalement déprotégé à l'aide d'une solution à 0.08M d'HCl. Le mélange brut réactionnel est de suite, rapidement purifié sur colonne, donnant accès au produit partiellement pur. Le produit est ensuite engagé dans l'étape suivante, qui consiste à former le mésylate par traitement de celui-ci en présence du chlorure de mésylate et de la triéthylamine dans le dichlorométhane. Le mésylate est substitué par l'allylamine **202a** ou par l'allylamine fonctionnalisée **202b-c**, mais le produit escompté n'a jamais été obtenu (Tab. 14). Plusieurs essais, ont été réalisés en faisant varier le solvant, la température, la durée ainsi que l'utilisation d'une base non nucléophile (Tab. 14).

Tableau 14 : Conditions pour la substitution du mésylate **201** par l'allylamine **202 a-c**.

Entrée	R	Base	Solvant	Durée	Température	Produit
1	R ₁		DMF	16 h	TA	-
2	R ₁	TEA	DMF	16 h	TA	-
3	R ₁	Pyridine	THF	16 h	TA	-
4	R ₁		THF	5 min	TA	204
5	R ₁	Pyridine	DCM	2 h	0 °C	204
6	R ₁	TEA	THF	2 h	TA	204
7	R ₂	Pyridine	DCM	16 h	0 °C	Pdt de départ
8	R ₂			16 h	TA	Pdt de départ
9	R ₃	TEA	THF	16 h	TA	Pdt de départ

Pour la substitution réalisée à partir de l'allylamine (entrées 1 à 6), nous observons la formation d'un produit non identifié après 16 h, et ceci quel que soit la présence d'une base ou non milieu réactionnel. Pour étudier l'impact du temps sur la formation du produit, les réactions ont ensuite été stoppées après 5 min ou 2 h, introduisant une base ou non. Nous avons observé dans ces cas (entrées 4 à 6) la formation du produit **204**, résultant d'une addition 1,4 sur l'énone.

Pour étudier l'impact des groupements portés par l'allylamine (entrée 7 à 9), nous avons introduit des groupements électroattracteurs mais dans ce cas aucune réaction n'a été observée.

L'introduction de l'azote dans la chaîne étant difficile par cette voie, il a été décidé de l'introduire dès le départ, via une nouvelle voie de synthèse à partir l'époxyde **203** commercial (Fig. 143).

Cette réaction fait réagir l'anion de l'acétonitrile sur l'époxyde **205**, suivi par la réduction du nitrile en présence de LiAlH_4 décrite par Yoshida en 1988.⁷² L'amine **207** est soumis à l'étape suivante sans étape de purification. Le diène **208** est ensuite obtenu par substitution nucléophile de l'amine **205** sur le

bromure d'allyle en présence de la base minérale K_2CO_3 . Les amines primaires et secondaires étant généralement incompatibles avec le catalyseur de Grubbs du fait de leur capacité à se chélater au métal du centre catalytique, nous avons décidé d'introduire le 4-bromobutyrate d'éthyle à cette étape par substitution de l'amine sur celui-ci. Le composé **209** est obtenu avec un rendement de 25 %.

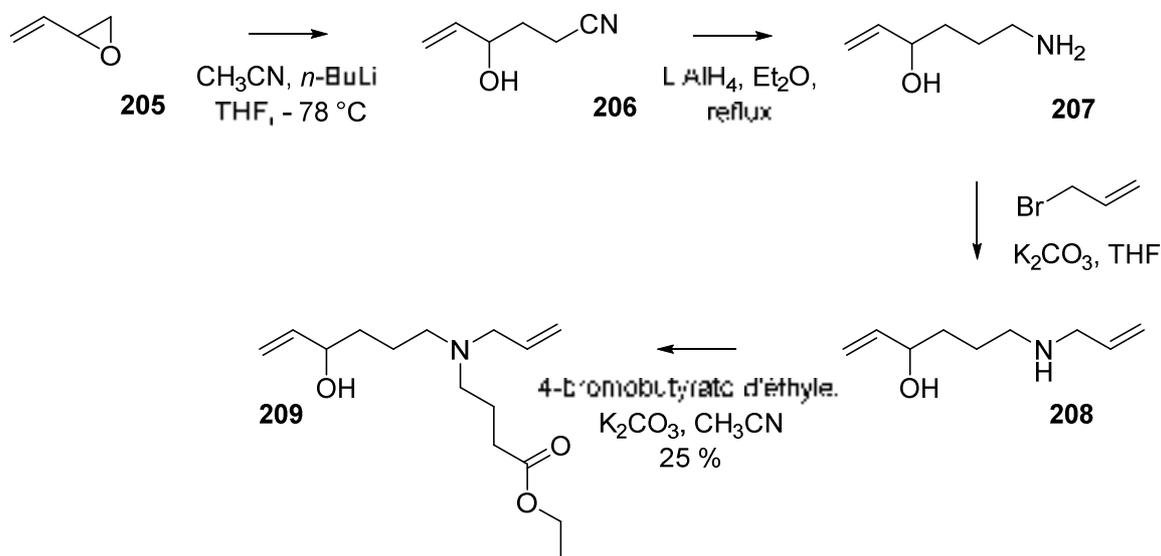


Figure 143 : Synthèse de composé **209**.

A ce stade, un seul essai de métathèse a pu être réalisé et les quantités utilisées n'ont pas permis d'identifier le produit souhaité. Il sera donc nécessaire dans le futur de reproduire la réaction à partir d'une quantité plus conséquente.

Si la réaction de Grubbs ne fonctionne pas, il serait intéressant de remplacer l'éthyl-4-bromobutyrate par un amide, ou en protégeant l'amine avec un groupement électro attracteur ou encombré pour favoriser la métathèse.

V. Conclusion

Pour conclure ce chapitre, nous avons décrit dans une première partie la synthèse d'inhibiteurs de type azoture selon trois méthodes, avec des rendements avant déprotection finale qui sont respectivement de 24 % ($n = 1$), 24 % ($n = 2$), 33 % ($n = 3$) et 31 % ($n = 4$). L'ensemble des inhibiteurs a été testé sur la DXR purifiée d'*E. coli*, et par antibiogramme sur une souche sauvage d'*E. coli* et une autre résistante à la fosmidomycine. Ces premiers résultats sont prometteurs, puisque tous les composés inhibent l'enzyme. De plus, les composés **138a** ($n = 1$) et **138d** ($n = 4$), montrent une bonne inhibition sur antibiogramme. Cette capacité à inhiber la DXR et à se fixer dans le site actif de l'enzyme est un point important pour la poursuite de nos travaux selon cette approche. Parallèlement, nous avons également entrepris la synthèse de ces inhibiteurs en pince dite inversée mais la déprotection finale ne nous a pas permis de les obtenir avec une pureté suffisante pour les tester *in vitro*.

Dans un second temps, ayant obtenu des bonnes valeurs d'IC₅₀ pour les azotures, nous avons souhaité tester des composés fonctionnalisés avec un brome ou un hydroxyle, en tant qu'inhibiteurs potentiels.

Parmi les différentes synthèses entreprises, seule, la synthèse de deux composés a pu être menée à son terme. Ces deux composés, **165d** (Br, n = 4) et **167b** (OH, n = 2), ont pu être testés sur la DXR d'*E. coli* et ont montré une activité inhibitrice de respectivement 0.8 μM et 41 μM, ce qui est très intéressant notamment pour le dérivé bromé.

Dans une seconde partie, nous avons décrit les tentatives de synthèse d'un cyclooctyne et d'un azacyclooctyne. Concernant l'azacyclooctyne, la dernière méthode de synthèse n'a pu être conduite à son terme mais semble être en bonne voie. Il sera donc nécessaire de poursuivre les travaux entrepris. Concernant le cyclooctyne, la fonctionnalisation du cyclooctyne avec le mime à NADPH pourra être envisagée par une réaction de métathèse.

En parallèle, nous avons testé deux cyclooctynes commerciaux pour voir s'ils étaient capables de se fixer à l'enzyme. Le BCN **210** et le dibenzocyclooctyne amine **211**, ont ainsi été testés sur la DXR d'*E. coli* (Fig. 144). Le composé **208** a montré une inhibition de la DXR de 16 % à 100 μM et le composé **209**, une inhibition de 27 % à 600 μM. Cette faible inhibition démontre la nécessité d'avoir de bons mimes du NADPH.

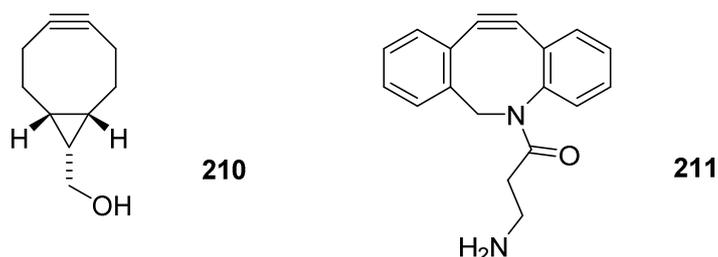


Figure 144 : Cyclooctynes commerciaux testés sur la DXR purifié d'*E. coli*.

Pour pallier aux problèmes de synthèse, il serait peut-être plus judicieux de préparer des mimes du NADPH et de les greffer sur des cyclooctynes commerciaux. Du fait du coût relativement onéreux des cyclooctynes, un travail d'optimisation devra être réalisé sur les mimes du NADPH et ceux-ci devront pouvoir être greffés en dernière étape sur les cyclooctynes sélectionnés.

- (1) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (2) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216–2230.
- (3) Huisgen, R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen. *Angew. Chem.* **1963**, *13* (1938), 604–637.
- (4) Staudinger, H.; Hauser, E. Über Neue Organische Phosphorverbindungen IV Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1921**, *4*, 861–886.
- (5) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143.
- (6) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- (7) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse : A Tale of Two Biorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676.
- (8) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (9) 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.
- (10) 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.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (11) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210–2215.
- (12) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; 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*, 210–216.
- (13) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Van Maarseveen, J. H. Cu I-Catalyzed Alkyne-Azide “click” cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- (14) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry : Applications of the 1,3-Dipolar Cycloaddition between Azides and Alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.
- (15) 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*, 15998–15999.
- (16) 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*, 8923–8930.
- (17) Majireck, M. M.; Weinreb, S. M. A Study of the Scope and Regioselectivity of the Azides with Internal Alkynes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8680–8683.

- (18) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- (19) Angell, Y. L.; Burgess, K. Peptidomimetics via Copper-Catalyzed Azide–alkyne Cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674.
- (20) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- (21) Salic, A.; Mitchison, T. J. A Chemical Method for Fast and Sensitive Detection of DNA Synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105* (7), 2415–2420.
- (22) Meldal, M.; Tomøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide - Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.
- (23) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272.
- (24) Arioli, F.; Borrelli, S.; Colombo, F.; Falchi, F.; Filippi, I.; Crespan, E.; Naldini, A.; Scalia, G.; Silvani, A.; Maga, G.; et al. N-[2-Methyl-5-(Triazol-1-Yl)phenyl]pyrimidin-2-Amine as a Scaffold for the Synthesis of Inhibitors of Bcr-Abl. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2009–2018.
- (25) Colombo, F.; Tintori, C.; Furlan, A.; Borrelli, S.; Christodoulou, M. S.; Dono, R.; Maina, F.; Botta, M.; Amat, M.; Bosch, J.; et al. “Click” Synthesis of a Triazole-Based Inhibitor of Met Functions in Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4693–4696.
- (26) 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.
- (27) Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366–15367.
- (28) Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. H. 1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors. *Chem. Bio. Chem* **2005**, *6*, 1167–1169.
- (29) 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*, 2497–2508.
- (30) Debets, M. F.; van der Doelen, C. W. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Azide: A Unique Dipole for Metal-Free Bioorthogonal Ligations. *Chem. Bio. Chem* **2010**, *11*, 1168–1184.
- (31) Suresh, S.; Shyamraj, D.; Larhed, M. Synthesis of Antimalarial Compounds Fosmidomycin and FR900098 through N- or P-Alkylation Reactions. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1183–1188.
- (32) Qi, J.; Blanden, A. R.; Bane, S.; Kingston, D. G. I. Design, Synthesis and Biological Evaluation of a Simplified Fluorescently Labeled Discodermolide as a Molecular Probe to Study the Binding of Discodermolide to Tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5247–5254.
- (33) Haelters, J.; Corbel, B.; Jaffre, P. Synthesis of Functionalized Alkoxyalkylidene Gem - Bisphosphonates. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6537–6543.
- (34) Gissot, A.; Volonterio, A.; Zanda, M. One-Step Synthesis of O-Benzyl Hydroxamates from Unactivated Aliphatic and Aromatic Esters. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6925–6928.

- (35) Berkley E. Gryder†, Michelle J. Akbashev†, Michael K. Rood†, Eric D. Raftery†, W. M.; Meyers§, Paulette Dillard‡, Shafiq Khan‡, and A. K. O. Selectively Targeting Prostate Cancer with Antiandrogen Equipped Histone Deacetylase Inhibitors. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 2550–2560.
- (36) Verbrugghen, T.; Vandurm, P.; Pouyez, J.; Maes, L.; Wouters, J.; Calenbergh, S. Van. Alpha-Heteroatom Derivatized Analogues of FR900098 as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 376–380.
- (37) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswaran, R.; Girmay, B. Cis-Trans Isomerism in Monoalkylhydroxamic Acids by ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 970–973.
- (38) Brown, D. A.; Coogan, R. A.; Fitzpatrick, N. J.; Glass, W. K.; Abukshima, D. E.; Shiels, L.; Ahlgrcn, M. Conformational Behaviour of Hydroxamic Acids : Ab Initio and Structural Studies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 2673–2679.
- (39) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswaran, R.; Mohammed, S. A. ^1H and ^{13}C NMR Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 40–45.
- (40) Kakkar, R.; Grover, R.; Chadha, P. Conformational Behavior of Some Hydroxamic Acids. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (12), 2200–2206.
- (41) Tchertanov, L. Structural Metrics Relationships in Covalently Bonded Organic Azides. *Acta Crystal.* **1999**, *55* (5), 807–809.
- (42) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (43) Sulsky, R.; James, P. Alkylation of N-Benzyloxyureas and Carbamates. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 31–34.
- (44) Wittig, G.; Adolf, K. Zur Existenz Niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- (45) Blomquist, A. T.; Liu, L. H. Many-Membered Carbon Rings. VII. Cyclooctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154.
- (46) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
- (47) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1211–1219.
- (48) Sustmann, R. A Simple Model for Substituent Effects in Cycloaddition Reactions. I. 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 2717–2720.
- (49) Sustmann, R.; Trill, H. Substituent Effects in 1, 3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *1*, 838–840.
- (50) Houk, K. N. The Frontier Molecular Orbital Theory of Cycloaddition Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 361.
- (51) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. Transition States of Strain-Promoted Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *10*, 1633–1636.

- (52) Schoenebeck, F.; Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. Reactivity and Regioselectivity in 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azides to Strained Alkynes and Alkenes: A Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121–8133.
- (53) Gold, B.; Shevchenko, N. E.; Bonus, N.; Dudley, G. B.; Alabugin, I. V. Selective Transition State Stabilization via Hyperconjugative and Conjugative Assistance: Stereoelectronic Concept for Copper-Free Click Chemistry. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 75–89.
- (54) Gold, B.; Dudley, G. B.; Alabugin, I. V. Moderating Strain without Sacrificing Reactivity: Design of Fast and Tunable Noncatalyzed Alkyne – Azide Cycloadditions via Stereoelectronically Controlled Transition State Stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1558–1569.
- (55) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099.
- (56) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, a T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Bioconjugation with Strained Alkenes and Alkynes. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.
- (57) Sims, E. a; Deforest, C. a; Anseth, K. S. A Mild, Large-Scale Synthesis of 1,3-Cyclooctanedione: Expanding Access to Difluorinated Cyclooctyne for Copper-Free Click Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1871–1873.
- (58) Pirrung, M. C.; Webster, N. J. G. Mechanism of Intramolecular Photocycloadditions of Cyclooctenones. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3603–3613.
- (59) Chhikara, B. S.; Chandra, R.; Tandon, V. IBX in an Ionic Liquid: Eco-Friendly Oxidation of 17- α Methylandrostan-3 β ,17 β -Diol, an Intermediate in the Synthesis of Anabolic Oxandrolone. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7585–7588.
- (60) Clifford, K.; Cornforth, J. W.; Mallaby, R.; Phillips, G. T. Stereochemistry of Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase. *Chem. Commun.* **1971**, 1599–1600.
- (61) Bertozzi, C. R.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Baskin, J. M. Compositions and Methods for Modification of Biomolecules, Patent US 7,807,619, **2010**.
- (62) Ito, Y.; Hirao, T.; Saegusa, T. Synthesis of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds by palladium(II)-Catalyzed Dehydrosilylation of Silyl Enol Ethers. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1011–1013.
- (63) Tsuji, J.; Minami, I.; Shimizu, I. A Novel Palladium-Catalyzed Preparative Method of α,β -Unsaturated Ketones and Aldehydes from Saturated Ketones and Aldehydes via Their Silyl Enol Ethers. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5635–5638.
- (64) Larock, R. C.; Hightower, T. R.; Kraus, G. A.; Hahn, P.; Zheng, D. A Simple, Effective, New, Palladium-Catalyzed Conversion of Enol Silanes to Enones and Enals. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2423–2426.
- (65) Tsuji, J.; Nagashima, H.; Hori, K. A New Preparative Method for 1,3-Dicarbonyl Compounds, Catalyzed by Pd(Cl)₂ Using Hydroperoxides as the Reoxidant of Pd(0). *Chem. Lett.* **1980**, 257–260.
- (66) Saunders, M.; Krause, N. The Use of Stochastic Search in Looking for Homeomorphic Isomerism: Synthesis and Properties of bicyclo[6.5.1]tetradecane. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1791–1795.
- (67) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.

- (68) Bertozzi, C. R.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Baskin, J. M.; Sletten, E. M. Compositions and Methods for Modification of Biomolecules, Patent US 2016/0243135, **2016**.
- (69) Deraeve, C.; Miruna, I.; Rebbah, F.; Le, F.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernardes-génisson, V.; Bernadou, J.; Pratviel, G. Chemical Synthesis , Biological Evaluation and Structure – Activity Relationship Analysis of Azaisoindolinones , a Novel Class of Direct Enoyl-ACP Reductase Inhibitors as Potential Antimycobacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6225–6232.
- (70) Lee, A. H. F.; Chan, A. S. C.; Li, T. Synthesis of 5-(7-Hydroxyhept-3-Enyl)-1,2-Dithiolan-3-One 1-Oxide, a Core Functionality of Antibiotic Leinamycin. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 833–839.
- (71) Galvani, G.; Lett, R.; Kouklovsky, C. Regio- and Stereochemical Studies on the Nitroso-Diels-Alder Reaction with 1,2-Disubstituted Dienes. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15604–15614.
- (72) Tamaru, Y.; Kawamura, S.; Bando, T.; Tanaka, K.; Yoshida, Z. Stereoselective Intramolecular Haloamidation of N-Protected 3-Hydroxy-4-Pentenylamines and 4-Hydroxy-5-Hexenylamines. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5491–5501.

Chapitre 2 : Stratégie bisubstrat

Chapitre 2 : Stratégie bisubstrat

I. Introduction

Comme indiqué en introduction (partie II, sous paragraphe 2d.), cibler simultanément les sites du NADPH et du DXP à l'aide d'une molécule unique semble être possible et plusieurs équipes ont déjà envisagé cette possibilité, dont la nôtre. Le terme bisubstrat définit ainsi, le fait de cibler deux sites avec une molécule unique.

Les composés se fixant au site du NADPH, décrits en introduction et ayant la meilleure inhibition sont les composés **135** avec une IC_{50} de 130 nM sur la DXR d'*E. coli* et **137d** avec une IC_{50} de 140 nM sur la DXR de *M. tuberculosis* (Fig. 145), ce qui reste inférieur à l'activité de la fosmidomycine.¹

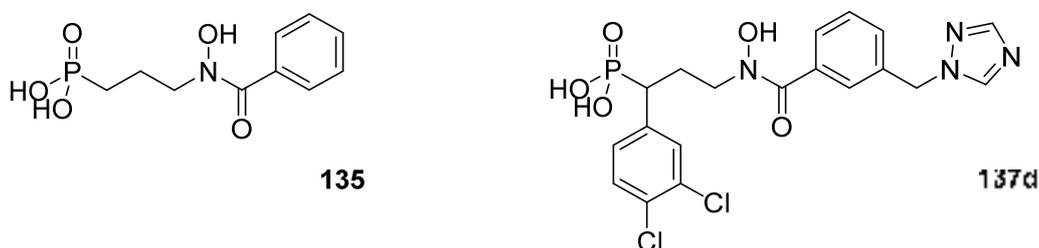


Figure 145 : Inhibiteurs de type bisubstrat possédant les meilleures activités inhibitrices.

Au sein de notre équipe, les travaux s'étaient orientés vers la synthèse de composés possédant, une rhodanine pour cibler le site de fixation du NADPH et une fonction catéchol, capable de se chélater au métal du site actif.² Les résultats ont démontré l'importance du groupement catéchol pour observer une inhibition de la DXR d'*E. coli* dans le bas micromolaire. Cependant, les meilleurs composés n'avaient pas montré d'activité *in vitro* par la méthode de diffusion en gélose sur *E. coli*.³

Dans le cadre des premiers travaux de notre équipe selon cette approche bisubstrat, il avait donc été décidé de modifier en intégralité la structure des composés sans conserver de motif tel qu'une partie de la fosmidomycine. Dans le cas présent, il a été choisi de conserver ce motif et de faire varier les mimes du NADPH. Par ailleurs, certains inhibiteurs décrits dans la littérature, selon cette approche, se sont révélés être non compétitifs vis-à-vis du NADPH. En réalité, ils ne se fixaient pas dans la poche du NADPH mais dans une poche alternative. De ce fait, nous avons choisi de faire varier la longueur de l'espaceur entre la partie fosmidomycine et mime du NADPH, afin d'en étudier l'impact, sachant que le nicotinamide du NADPH se situe à approximativement 3,5 Å de l'atome de carbone du groupement formyle de la fosmidomycine.

Pour joindre le mime du NADPH et du DXP, nous avons décidé d'introduire une fonction amide. L'intérêt de ce groupement amide est d'obtenir un espaceur stable, bien toléré en milieu biologique et qui pourrait contribuer à la fixation de l'inhibiteur *via* des liaisons hydrogènes. Il a été employé par

plusieurs équipes auparavant. Certaines ont remplacé l'acide hydroxamique par un amide simple, ce qui avait conduit dans la majorité des cas à une perte significative de l'activité inhibitrice.^{4,5} D'autres ont déjà utilisé cette fonction en tant qu'espaceur mais avec un seul groupement méthylène entre l'amide et le carbonyle de la pince.⁴ Ces derniers possèdent des IC_{50} dans le bas micromolaire, notamment avec le composé **131** ayant une IC_{50} de 1 μM sur la DXR d'*E. coli* et de 0,4 μM sur la DXR de *P. falciparum* (Fig. 146).

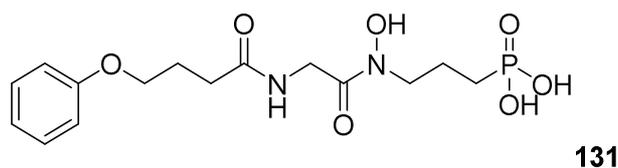


Figure 146 : Inhibiteurs de type bisubstrat, possédant un espaceur de type amide.

L'effet de l'élongation de la longueur de l'espaceur a également été étudié par l'équipe de Dowd, qui a mis en évidence une augmentation de l'activité inhibitrice (Tab. 15). Cependant, il s'avère que ces composés se fixent dans une poche alternative.⁶

Tableau 15 : Inhibiteurs de type bisubstrat ciblant une poche alternative.

	Composé	R	n	IC_{50} DXR de Mtb (μM)
	134a	Ph	1	26.9
	134b	Ph	3	17.8
	134c	Cyclohexyle	0	20 % d'inhibition à 100 μM

Leur étude a toutefois mis en avant l'importance du groupement aromatique pour obtenir une IC_{50} de l'ordre du micromolaire, car lorsque celui-ci est remplacé par un cyclohexyle, il y a une perte importante de l'activité (composé **134c**, Tab. 15).

Dans le premier chapitre, nous avons souhaité synthétiser deux molécules distinctes qui pourraient une fois dans le site actif interagir ensemble et produire un inhibiteur. Dans ce chapitre, nous allons présenter les travaux réalisés pour l'approche bisubstrat, qui consiste à produire une seule molécule ciblant deux sites distincts de l'enzyme afin d'augmenter la spécificité de l'inhibition. Les inhibiteurs synthétisés seront constitués de trois régions clés. Une première mimant le DXP, une seconde ciblant le site du NADPH et plus particulièrement le nicotinamide et une dernière qui jouerait le rôle d'espaceur entre ces deux mimes.

Afin de cibler au mieux la poche du NADPH, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe du Dr. Roland Stote de l'IGBMC et les études de docking ont été entreprises par le Dr. Fanny Krebs et le Dr. Jérémy Esque.

II. Modélisation moléculaire

1. Première approche pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat

Les travaux ont été réalisés à partir de la structure de la DXR issue d'*E. coli* (PDBid 1Q0Q), cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur NADPH.⁷ Le métal a été rajouté à partir des coordonnées du Mn^{2+} de la DXR possédant le PDBid 4AIC, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, du cofacteur NADPH et du métal Mn^{2+} .⁸ Les calculs de docking ont été réalisés avec le programme AutoDock Vina via l'interface Racocon. Les molécules ont été modélisées grâce au logiciel Avogadro 1.1.0.⁹

Leurs travaux ont débuté par la recherche des interactions potentiellement exploitables à la surface de la protéine. Un criblage de 350 molécules diverses et variées a été réalisé et a permis d'obtenir une carte de population du type d'atomes tapissant la surface des zones d'intérêts potentiels. Les sites, ainsi détectés à proximité des zones d'intérêts (*i.e.* sites de fixation du substrat et du cofacteur) permettent de prédire de potentielles interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogènes avec un résidu accepteur ou donneur. La comparaison de ces sites avec le DXP et NADPH a confirmé l'utilité des résultats du criblage. La conception de molécule a ensuite été entreprise selon deux approches par l'équipes de modélisation : une première, fondée sur le squelette de la fosmidomycine et construite fragment après fragment, et une seconde, basée sur la conception de molécules à partir de composés commerciaux.

Pour la première méthode de conception, les interactions polaires entre la DXR et le NADPH sont localisées au niveau du pont diphosphate et du ribose 2'-phosphate du NADPH. Il a été démontré que le 2'-phosphate du NADPH contribue fortement à la fixation du cofacteur à l'enzyme mais non à la catalyse. En effet, lorsque le NADPH est remplacé par son analogue, NADH, l'activité de la DXR diminue fortement.¹⁰ Ainsi, dans la première approche, les molécules ont été conceptualisées en travaillant en premier lieu sur la région mimant le cycle nicotinamide (Fragment 1) puis en second lieu, sur la région du pont diphosphate et du ribose 2'-phosphate (Fragment 2) (Fig. 147).

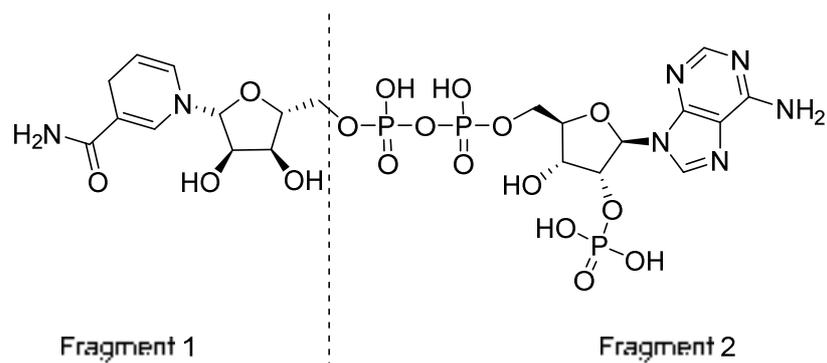


Figure 147 : Décomposition du NADPH en deux fragments pour la conception d'inhibiteurs.

Pour le fragment 1, la fosmidomycine a été fonctionnalisée au niveau de l'hydroxamate avec des dérivés aryles et naphthalènes sélectionnés grâce au criblage (Fig. 148). Le premier critère de sélection des molécules dockées est que le phosphonate doit pouvoir interagir avec l'un des deux résidus clés du point d'ancrage, à savoir la Ser186 et/ou l'His209, de manière à s'assurer de la fixation du mime au niveau du site du DXP. Ce premier travail a permis de confirmer le potentiel des aromatiques qui se placent à l'endroit où se loge le cycle nicotinamide du cofacteur.

Pour cibler le fragment 2, une première série de composés possédant un sulfonyle et fonctionnalisé à son extrémité avec un phosphonate a été étudiée (Fig. 148). De plus, un critère de sélection a été ajouté : les molécules doivent interagir avec la Thr10 et/ou le Trp212. Le premier acide aminé est décrit comme interagissant avec le ribose 2'-phosphate du NADPH, tandis que le Trp212 est un résidu clé de la boucle de confinement du site actif.¹¹ L'optimisation de cette seconde série a conduit à l'obtention de composés, permettant de cibler les zones d'interactions clés du NADPH.

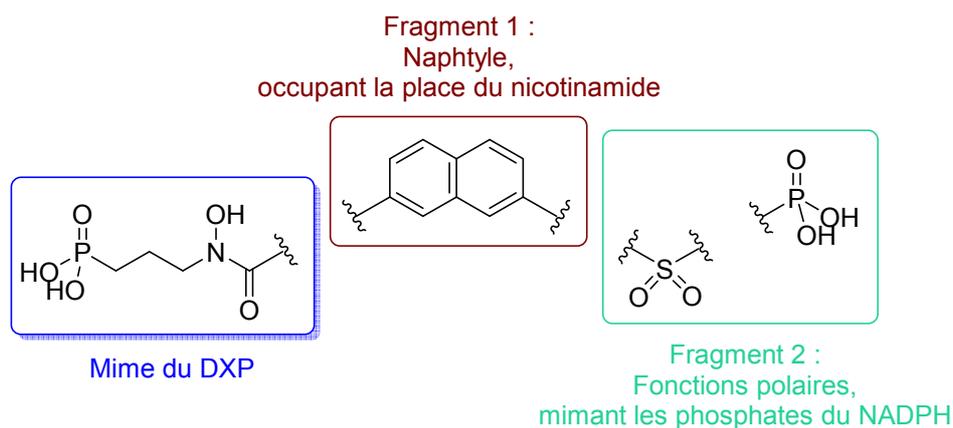


Figure 148 : Fragments mis en avant par étude de modélisation moléculaire pour la conception d'inhibiteur de type bisubstrat.

Cette première approche montre l'importance d'un groupement aromatique pour cibler le nicotinamide et d'une fonction polaire pour interagir avec les régions du diphosphate et du ribose 2'-phosphate.

2. Seconde approche pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat

a. Simplification des mimes de NADPH

Pour la seconde approche, en collaboration avec les modélisateurs, nous avons décidé de travailler sur des mimes plus simples, ciblant prioritairement le site du nicotinamide, pour évaluer leur potentiel. Si ces résultats sont concluants, la synthèse des composés issus de l'approche 1 pourra être conduite.

En nous fondant sur les résultats précédents, le choix des fragments commerciaux s'est orienté vers des dérivés du groupement naphthyle. A partir de cette sélection et de la structure des mimes de type acide phosphono retro-hydroxamiques du DXP, dont la longueur de l'espaceur varie de 1 à 4 atomes de carbone, l'équipe de modélisation a réalisé des études de docking sur les composés correspondants (Fig. 149).

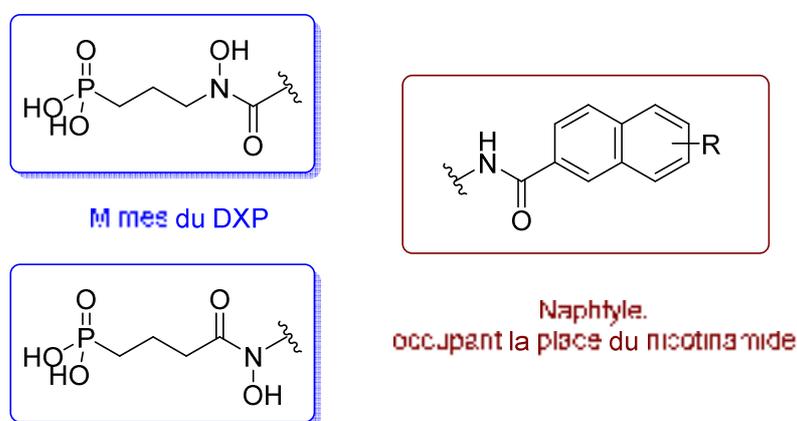


Figure 149 : Conception d'inhibiteurs de type bisubstrat à partir de fragments commerciaux.

Lors de l'étude de docking, chaque molécule a été dockée cinq fois de manière indépendante sur la DXR en présence du cation Mg^{2+} . Les molécules, dont les cinq structures résultantes interagissent avec la Ser186, ont été sélectionnées, et la moyenne des estimations d'énergies de fixation de chacune a été calculée.

Le nombre de molécules retenues étant important, une seconde sélection a été réalisée en nous fondant sur les estimations d'énergie moyenne de fixation. De plus, les résultats n'ayant pas montré de différence importante entre la pince naturelle ou inverse, nous avons travaillé sur la synthèse en pince naturelle.

b. Sélection des acides commerciaux

Le choix des acides commerciaux est fondé sur les études de modélisation et répondent aux critères suivants :

1. Des acides présentant de bons résultats selon les études de modélisation
2. Des acides substitués permettant d'évaluer l'influence de modifications

3. Un acide qui n'a pas été retenu lors des études de docking

Nous avons ainsi choisi pour répondre au premier critère l'acide 6-hydroxy-2-naphtoïque **212**, ainsi que l'acide 4'-propylbiphényl-4-carboxylique **213** ayant démontré de bons résultats (Fig. 150).

Pour répondre au second critère, nous avons choisi l'acide 2-naphtoïque **214**, l'acide 6-méthoxy-2-naphtoïque **215** et l'acide 4'-hydroxy-4-biphényl carboxylique **216** pour étudier l'influence de la présence d'un groupement hydroxyle. Ensuite pour étudier l'influence de la longueur de chaîne entre l'acide et le naphthyle, l'acide 2-naphtylacétique **217** a été sélectionné, sachant que ce composé répond au troisième critère. Enfin pour analyser l'importance du naphthyle, l'acide 4-hydroxybenzoïque **218** et l'acide 5-hydroxynicotinique **219** ont été choisis.

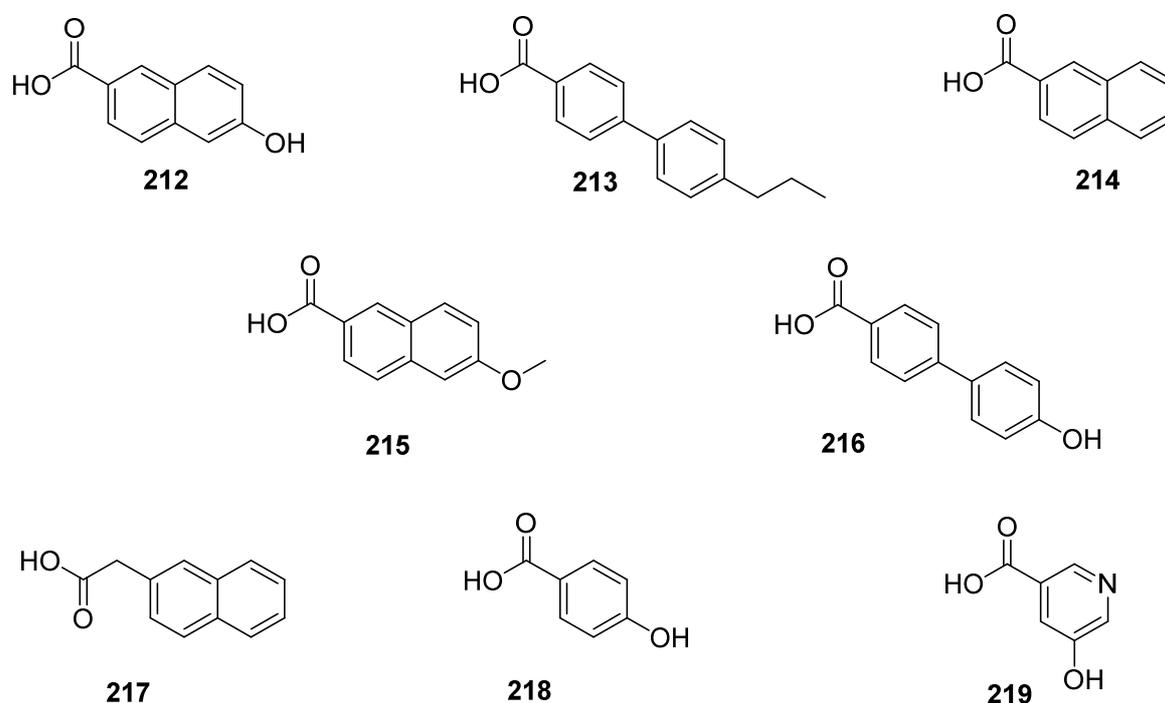


Figure 150 : Acides commerciaux sélectionnés pour la synthèse de bisubstrat.

Malgré la sélection d'acides commerciaux relativement simples, l'avantage de notre méthode par rapport aux autres groupes, est d'étudier l'influence de la longueur de chaîne entre la pince et l'amide. Comme une partie des inhibiteurs bisubstrat synthétisés jusqu'à aujourd'hui, n'atteignent pas le site de fixation du NADPH, mais vraisemblablement, une autre poche, nous avons décidé de faire varier cette longueur pour étudier son impact. De plus, nous avons souhaité conserver les trois éléments clés du mime du DXP qui sont le phosphonate, l'acide rétro-hydroxamique et la chaîne liant ces deux parties.

III. Synthèse des inhibiteurs de type bisubstrat

1. Stratégie de synthèse convergente

La voie de synthèse envisagée consiste à réaliser un couplage de type peptidique entre le diéthyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143**, préalablement synthétisé (chapitre 1) et les fragments **Y** de différentes longueurs de chaîne (Fig. 151). Celui-ci pourrait être obtenu par un couplage de type peptidique entre les acides commerciaux et un aminoacide de longueur de chaîne variable, à savoir la β -alanine, la glycine, l'acide γ -aminobutyrique et l'acide 5-aminovalérique.

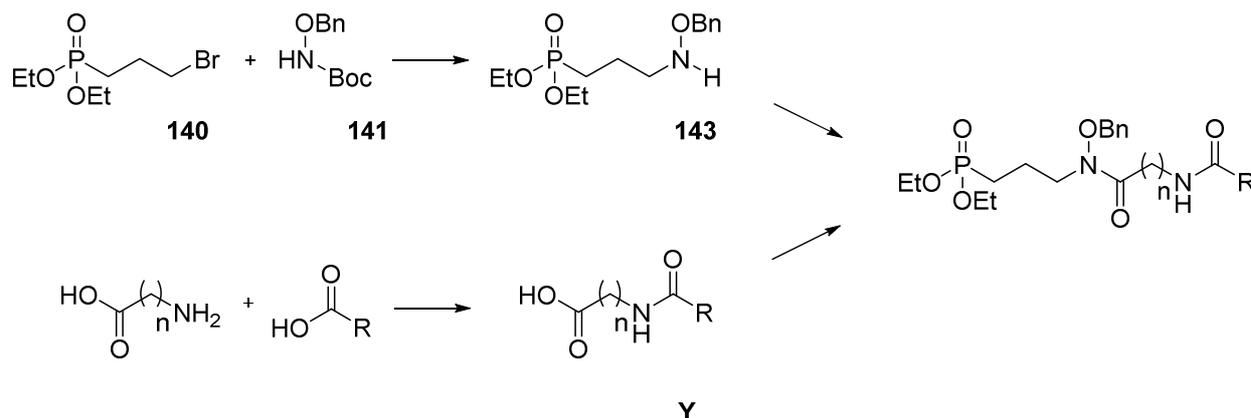


Figure 151 : Stratégie de synthèse convergente.

Un couplage de type peptidique entre **143** et **Y** permettrait de conduire aux intermédiaires protégés désirés.

2. Synthèse des inhibiteurs de type bisubstrat

a. Synthèse des différents fragments **Y**

L'obtention du fragment **Y**, débute par un couplage de type peptidique. Pour une question de visibilité, la suite réactionnelle est présentée à partir de l'acide 2-naphtoïque (Fig. 152).¹²

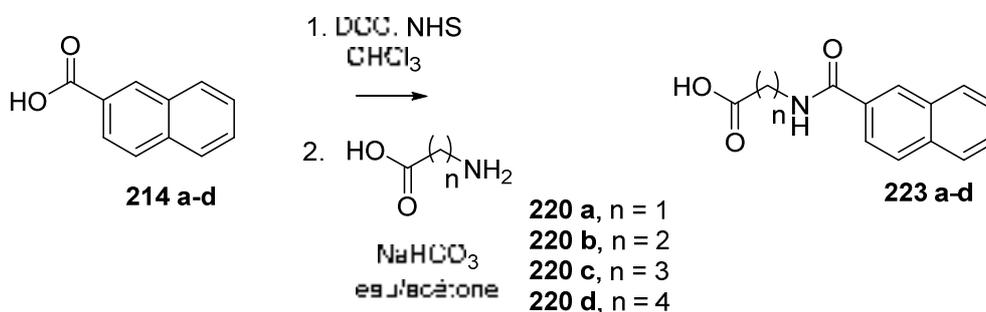
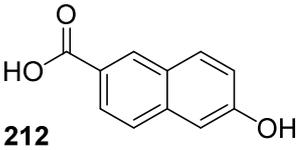
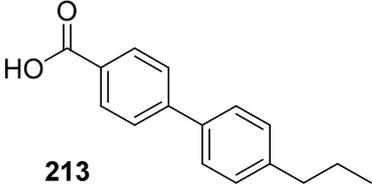
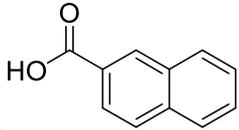
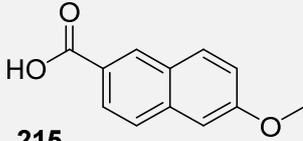
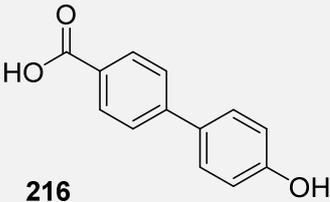


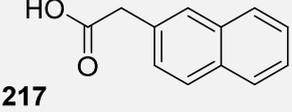
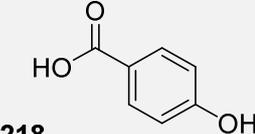
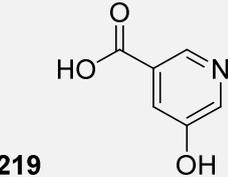
Figure 152 : Voie de synthèse des inhibiteurs de type bisubstrat appliqué à l'acide 2-naphtoïque.

Les acides sont activés sous la forme d'un ester à l'aide de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de DCC dans le chloroforme. Les aminoacides de longueurs comprises entre 1 et 3 carbones, à l'exception du composé **214** réalisé pour des longueurs variants de 1 à 4 carbones, sont ensuite

condensés sur l'ester en milieu aqueux basique. Les acides sont obtenus par précipitation, ainsi pour ceux dont nous n'avons pas observé de précipitation, une autre voie a été envisagée et sera présentée ultérieurement. Cette première étape donne accès à la première série de fragments **Y**, dont les résultats sont consignés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Synthèse des fragment Y.

ACIDES	Aminoacides de longueur n	Composés	Obtention du fragment Y	Rendement
 212	n = 1	221a	X	
	n = 2	221b	✓	42 %
	n = 3	221c	X	
 213	n = 1	222a	✓	36 %
	n = 2	222b	✓	-
	n = 3	222c	✓	-
 214	n = 1	223a	✓	92 %
	n = 2	223b	✓	75 %
	n = 3	223c	✓	72 %
	n = 4	223d	✓	-
 215	n = 1	224a	✓	74 %
	n = 2	224b	✓	67 %
	n = 3	224c	✓	-
 216	n = 1	225a	X	
	n = 2	225b	✓	19 %
	n = 3	225c	X	
	n = 1	226a	✓	89 %
	n = 2	226b	✓	84 %

 217	n = 3	226c	✓	-
 218	n = 1	227a	X	
	n = 2	227b	X	
	n = 3	227c	X	
 219	n = 1	228a	X	
	n = 2	228b	X	
	n = 3	228c	X	

b. Condensation du composé **143** et du fragment Y.

La seconde étape est la condensation du diéthyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** avec chacun des fragments **223a-d**, réalisé dans le THF en présence du couple DIC/HOBt (Fig. 153).

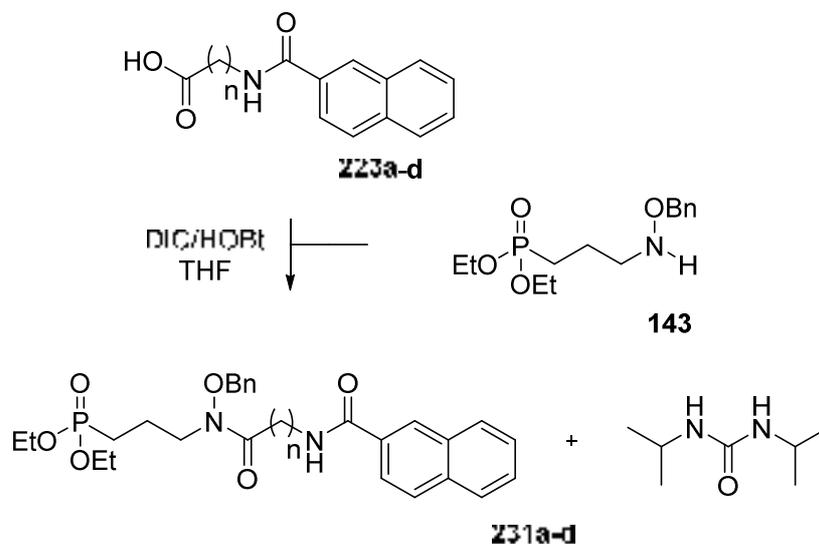


Figure 153 : Second couplage de type peptidique entre le phosphonate **138** et l'acide 2-naphtoïque.

La purification des composés obtenus s'est révélée délicate, et a nécessité un travail d'optimisation. En effet, dans les mélanges bruts réactionnels, il reste toujours encore du produit de départ **143**, ayant un rapport frontal proche du produit d'arrivé (Rf 0.36 pour le produit attendu versus 0.4 pour le réactif de départ **143**). De plus, la diisopropyl urée, formée lors de la réaction de couplage, partiellement insoluble est difficile à éliminer. Après de nombreux essais, les produits ont été purifiés par

chromatographie sur gel de silice automatisé avec un gradient de 100 % acétate d'éthyle, jusqu'à 90/10 acétate d'éthyle/méthanol. Les rendements sont reportés dans le Tableau 17.

Les dernières étapes mises en jeu consistent d'une part à déprotéger la pince par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif dans le méthanol, dont les rendements sont indiqués dans le tableau 17. Puis d'autre part, à déprotéger les diéthyles du phosphonate à l'aide de TMSBr dans du DCM (Fig. 154).

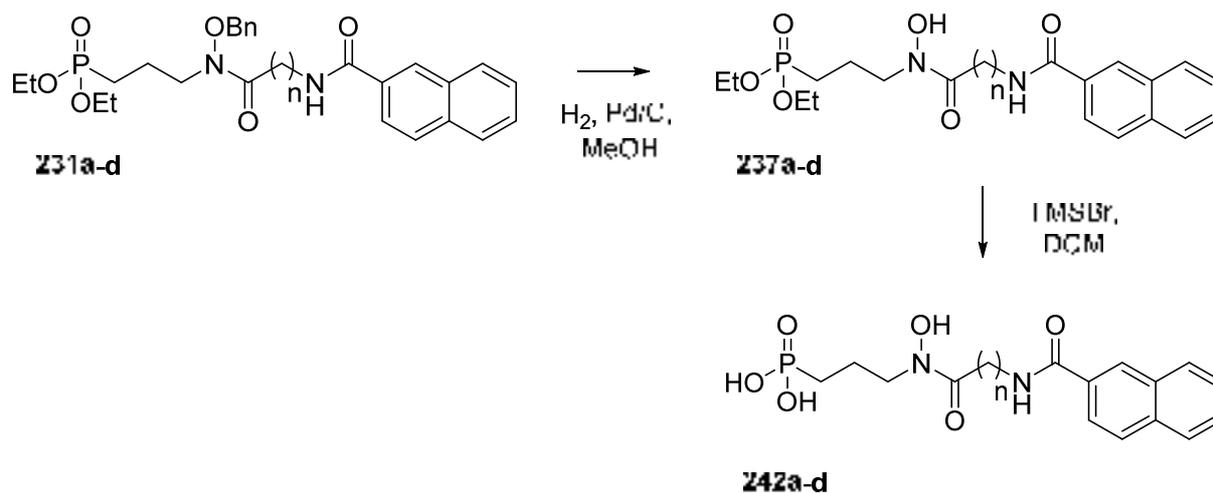
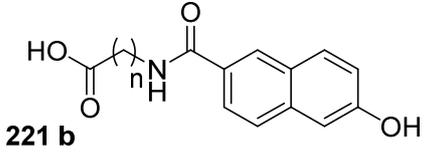
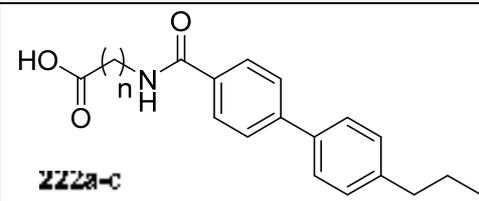
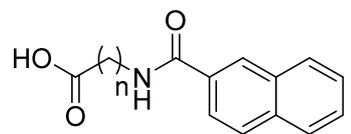
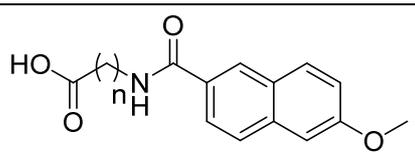
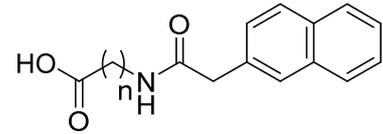


Figure 154 : Déprotection finale des inhibiteurs, appliqué à l'acide 2-naphtoïque

Suite à ces différentes étapes, quatorze composés ont été synthétisés avec succès. Pour le couplage, les rendements varient de 16 à 76 %. Ceci peut être expliqué par le fait que les réactions sont stoppées après 3 à 5 jours malgré la présence de la benzyldihydroxylamine **143** de départ, lorsque plus aucune évolution ne semble avoir lieu.

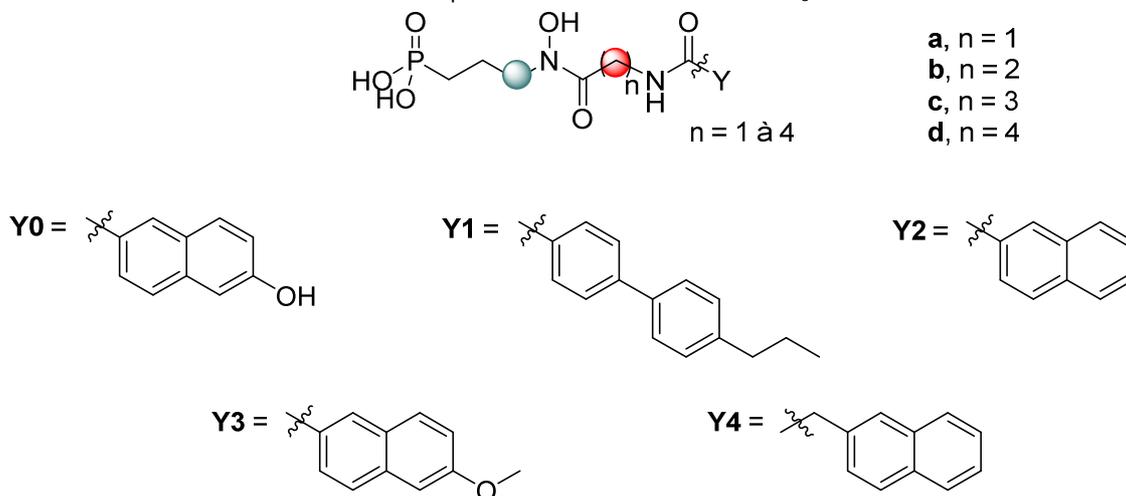
Pour la déprotection de la pince, les rendements varient de 27 à 85 %, selon la méthode d'hydrogénation utilisée. Lorsque l'on fait buller le dihydrogène obtenu à l'aide d'un générateur, l'hydrogénolyse est incomplète même après plusieurs jours. L'utilisation d'un ballon de dihydrogène à pression atmosphérique permet d'accéder aux produits déprotégés avec des meilleurs rendements.

Tableau 17 : Composés de type bisubstrat synthétisés.

	Second couplage		Déprotection benzyle		Obtention du produit final
	Composés	Rendements	Composés	Rendements	
 221 b	229b	28 %	235b	78 %	✓ 240b
 222a-c	230a	38 %	236a	71 %	✓ 241a
	230b	27 %	236b	85 %	✓ 241b
	230c	16 %	236c	81 %	✓ 241c
 223a-d	231a	69 %	237a	40 %	✓ 242a
	231b	25 %	237b	27 %	✓ 242b
	231c	40 %	237c	62 %	✓ 242c
	231d	-	237d	59 %	✓ 242d
 224a-c	232a	73 %	238a	78 %	✓ 243a
	232b	71 %	238b	52 %	✓ 243b
	232c	40 %	238c	73 %	✓ 243c
 225a-c	233a	76 %	239a	60 %	✓ 244a
	233b	33 %	239b	29 %	✓ 244b
	233c	29 %	239c	29 %	✓ 244c

3. Analyse spectroscopique RMN

Les spectres RMN des composés finaux (entrées 1 à 4, 6 à 12 et 14), mettent en évidence la présence de deux conformères *Z* et *E* dans des proportions variables, reportées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Proportions de conformères dans le CD₃OD.

ENTREE	Composé	n	Y	$\delta(\text{CH}_2\text{N})$ en ppm (<i>Z/E/autre</i>)	$\delta(\text{CH}_2\text{CO})$ en ppm (<i>Z/E/autre</i>)	Proportions (%) <i>Z/E/autre</i>
1	240b	2	Y0	3,35/3,68/-	2,69/2,88/-	38/62/-
2	241a	1	Y1	3,35/-/-	4,12/-/-	100/-/-
3	241b	2	Y1	3,31/3,66/-	2,64/2,84/-	20/80/-
4	241c	3	Y1	3,31/3,70/-	2,44/2,63/-	10/90/-
5	242a	1	Y2	3,34/-/3,04	4,17/-/4,15	70/-/30
6	242b	2	Y2	3,35/3,70/-	2,71/2,87/-	55/45/-
7	242c	3	Y2	3,35/3,71/-	2,46/2,64/-	50/50/-
8	242d	4	Y2	3,34/3,70/-	2,42/2,58/-	30/70/-
9	243a	1	Y3	3,34/-/-	4,14/-/-	100/-/-
10	243b	2	Y3	3,32/3,69/-	2,70/2,88/-	55/45/-
11	243c	3	Y3	3,35/3,69/-	2,46/2,62/-	50/50/-
12	244a	1	Y4	3,34/3,68/-	3,96/4,19/-	55/45/-
13	244b	2	Y4	3,31/-/3,49	2,53/-/2,67	60/-/40
14	244c	3	Y4	-/3,66/-	-/2,51/-	-/100/-

Par ailleurs, tous les composés possèdent un groupement amide dans leur structure, celui-ci pourrait engendrer deux conformères supplémentaires. Cependant, du fait de l'importante gêne stérique due aux aromatiques, nous avons émis l'hypothèse que l'amide serait uniquement présent en conformation *E*.

L'analyse des spectres RMN réalisés dans le CD₃OD, montre que le méthylène en α de l'azote, apparaît sous la forme de deux signaux à environ $\delta = 3,35$ et $3,70$ ppm, correspondant respectivement aux conformères *Z* et *E*. Les déplacements chimiques du méthylène en α du carbonyle dépendent de la longueur de l'espaceur. Pour le conformère *E*, les déplacements chimiques sont observés aux environs de $\delta = 4,2$ ppm ($n = 1$), $2,86$ ppm ($n = 2$), $2,65$ ppm ($n = 3$) et $2,6$ ppm ($n = 4$) alors que pour les conformères *Z*, ils sont déblindés avec $\delta = 4,15$ ppm ($n = 1$), $2,68$ ppm ($n = 2$), $2,45$ ppm ($n = 3$) et $2,42$ ppm ($n = 4$).

Pour le composé **242a** (entrée 5), nous observons l'apparition d'un signal supplémentaire à $3,04$ ppm selon le déplacement du méthylène en α de l'azote et la disparition d'un signal à $3,70$ ppm, correspondant au conformère *E*. De même, pour le composé **244b** (entrée 13), nous observons l'apparition d'un signal à $3,49$ ppm pour le même méthylène et la disparition à $3,70$ ppm, correspondant également au conformère *E*. A ce stade, il ne nous est pas possible de déterminer la structure de ce conformère supplémentaire. Toutefois, nous pourrions envisager la formation de conformères cycliques : formation d'un cycle à 8 chaînons par liaison hydrogène intramoléculaire entre le carbonyle de l'amide (accepteur de liaison hydrogène) et l'hydroxylamine (donneur de liaison hydrogène), pour le composé **242a** (A, Fig. 155), ou d'un cycle à 6 chaînons par liaison hydrogène entre le carbonyle de l'hydroxamate et le N-H de l'amide pour le composés **244b** (B, Fig. 155).

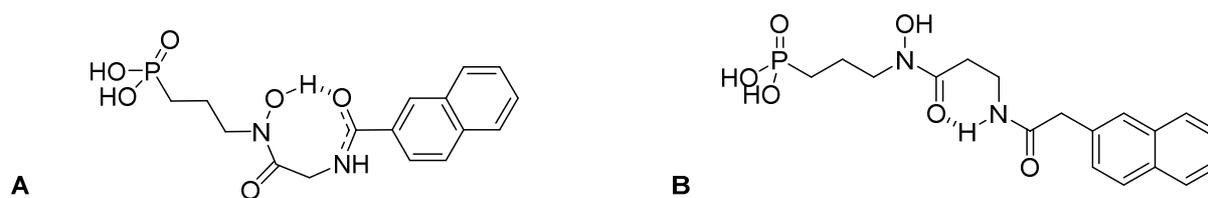


Figure 155 : Autres conformations envisagées de **242a** et **244b**.

En règle générale, pour une longueur $n = 1$, le conformère *Z* est obtenu soit seul (entrées 2 et 9, Tab. 18), soit il est majoritaire (entrées 5 et 12, Tab. 18). Dans ce cas, les gênes stériques pourraient être limités par la rigidité imposée par cette longueur, favorisant le conformère *Z* avec la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydroxylamine et le carbonyle de la pince (Fig. 156).

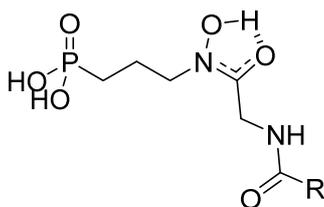


Figure 156 : Conformère Z favorisée pour une longueur de chaîne réduite.

Avec l'augmentation de la longueur, il semble que le conformère *E* devienne majoritaire (entrées 1, 3, 4, 7 et 8), voir l'unique pour le composé **244c** (entrée 14). Nous pouvons émettre l'hypothèse que les gênes stériques dues à la flexibilité de l'espaceur seraient dans ce cas plus accrues, ayant pour conséquence la formation du conformère *E* majoritaire.

4. Evaluation biologique

a. Test enzymatique sur la DXR purifiée d'*E. coli* du premier panel d'inhibiteurs

Une partie de ces composés ont été testés sur la DXR d'*E. coli*, par le Dr. Denis Tritsch (Tab. 19) afin de déterminer leur IC₅₀.

Les IC₅₀ des différents inhibiteurs synthétisés au laboratoire et ciblant le site de reconnaissance du DXP ont toujours été mesurées selon les mêmes conditions opératoires : pré-incubation de la DXR avec les inhibiteurs et le NADPH pendant 2 minutes. En effet, les inhibiteurs tels que la fosmidomycine sont de type slow-binding c'est-à-dire qu'ils se fixent de manière lente et qu'après leur fixation à l'enzyme il se produit un changement de conformation du complexe ternaire (DXR-NADPH-inhibiteur), avec, comme conséquence, la formation d'un complexe plus stable. Dans ces conditions, les concentrations en NADPH et en DXP sont respectivement de 0,2 et 0,5 mM.

La DXR suit un mécanisme bibi ordonné, ou le NADPH se fixe en premier à l'enzyme, formant ainsi le complexe DXR-NADPH, auquel vient se lier par la suite le DXP dans son site de reconnaissance, suite à un changement de conformation induit par la fixation du NADPH. Donc, en ce qui concerne la méthode 1, nous testons la capacité des inhibiteurs à se fixer au complexe (DXR-NADPH), notamment dans le site de reconnaissance du DXP, car, le coenzyme, en concentration saturante, se lie très rapidement à l'enzyme.

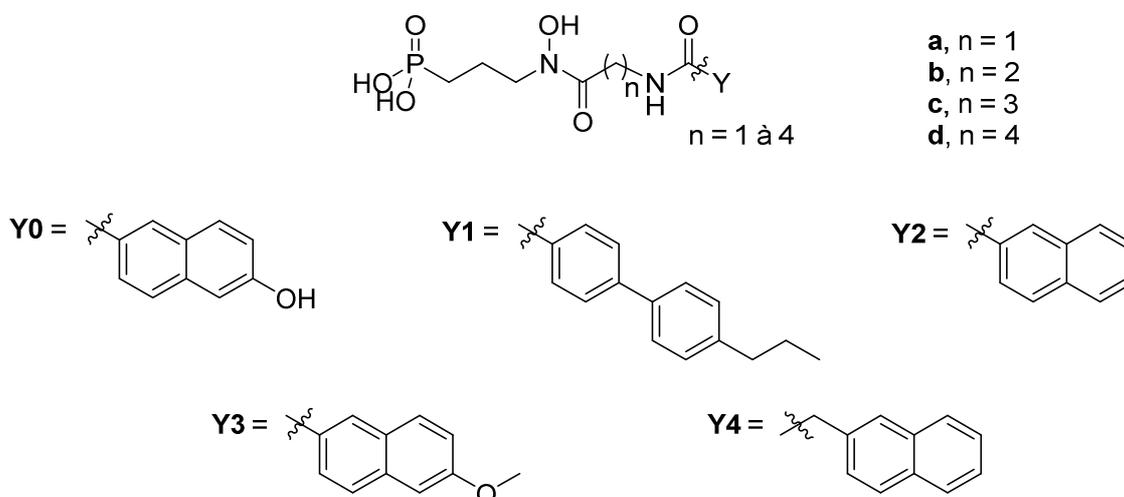
Dans le cadre de cette seconde approche, les inhibiteurs, visant le site de reconnaissance du NADPH, la DXR est pré-incubée en présence des inhibiteurs et du DXP, et le NADPH est ajouté ensuite pour lancer la réaction enzymatique. Le DXP ne devrait alors pas se fixer à la DXR en absence du coenzyme et la capacité des inhibiteurs à se lier à l'apoenzyme sera mesurée.

Un troisième mode opératoire a été envisagé, à savoir pré-incubation de la DXR avec les inhibiteurs puis addition du DXP et du NADPH à la suite pour lancer la réaction enzymatique. Les trois méthodes ont été testées avec le composé **242c**.

La méthode 1 permettant d'évaluer la fixation au niveau du site du DXP a été appliquée et la méthode 2 donnant de meilleurs résultats a été privilégiée pour les inhibiteurs de type bisubstrat.

Les résultats obtenus selon ces deux méthodes sont regroupés dans le tableau 19. A noter que tous les composés n'ont pu être testés par manque de temps.

Tableau 19 : Activité inhibitrice des inhibiteurs de type bisubstrat. NT = Non Testé et / = erroné car l'enzyme était dégradé.



ENTREE	Composé	N	Y	IC ₅₀ Méthode 1 (μM)	IC ₅₀ Méthode 2 (μM)
1	240b	2	Y0	10.7	Inhibition maximum d'environ 46 %
2	241a	1	Y1	/	Inhibition maximum d'environ 50 %
3	241b	2	Y1	20 % inhibition à 20 μM	15 % inhibition à 20 μM
4	241c	3	Y1	0,7	10,8
5	242a	1	Y2	NT	NT
6	242b	2	Y2	10,2	NT
7	242c	3	Y2	NT	1.5
8	242d	4	Y2	4,4	NT
9	243a	1	Y3	/	/

10	243b	2	Y3	7,7	Inhibition maximum d'environ 50 %
11	243c	3	Y3	1,5-0,9	Inhibition maximum d'environ 50 %
12	244a	1	Y4	/	Inhibition maximum d'environ 50 %
13	244b	2	Y4	NT	13,8
14	244c	3	Y4	NT	1,6

De manière surprenante, dans la majorité des cas où les composés ont été testés selon les deux méthodes, nous observons que l'inhibition n'est pas totale pour certains composés quand la méthode 2 est utilisée (entrée 1, 10 à 12, Tab. 19). En effet, nous notons une inhibition maximale de l'ordre de 50 %. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat: soit les molécules ne se fixent qu'à un seul site actif de la DXR, celui-ci étant un dimère, l'autre gardant ainsi toute son activité ; soit, elles se fixent près du site actif induisant une baisse de l'activité enzymatique de moitié par diminution de l'affinité de la DXR pour le NADPH et/ou le DXP, ou par un relargage plus lent des produits de la réaction enzymatique, à savoir, le NADP⁺ et/ou le MEP. Comme l'enzyme est incubée avec l'inhibiteur en présence de DXP, la protection par le substrat d'une partie des sites actifs de l'enzyme ne semble pas pouvoir être envisageable car ce phénomène n'est pas observable pour tous les composés testés. De plus, comme le NADPH se fixe avant le DXP, ce dernier ne peut pas bloquer les sites de fixation en l'absence du NADPH. S'il devait se fixer sur l'apoenzyme, l'occupation des sites de fixation du DXP devrait être limitée du fait de la faible affinité de la DXR pour le DXP (K_m de l'ordre de 100 μM).

En revanche, lorsque la méthode 1 est utilisée, l'enzyme semble pouvoir être inhibée en totalité. Apparemment le NADPH permet une meilleure fixation des bisubstrats à l'enzyme, probablement par l'intermédiaire de leur partie phosphonohydroxamate. Cependant si la partie mime du nicotinamide est capable de se fixer dans le site de fixation du NADPH, la présence de celui-ci l'en empêcherait mais il n'est pas exclu que celui-ci soit en compétition avec le NADPH ou qu'il se lie au site hydrophobe proche du site actif permettant éventuellement d'augmenter l'affinité de la DXR pour ces composés.

Par ailleurs, dans le cas des composés **241a-c** et **244a-c** (entrées 2 à 4 et 12 à 14, Tab. 19), nous observons que l'augmentation de la longueur de l'espaceur améliore la capacité inhibitrice. Cela est bien visible lorsque les inhibiteurs sont incubés en présence du NADPH laissant suggérer que la partie

mime du DXP pourrait mieux se fixer dans le site du DXP. Le composé **241c** ($IC_{50} < 1 \mu M$) est le plus performant, et une étude cinétique plus poussée (détermination du K_i) devrait être entreprise pour analyser son mode de fixation à la DXR et vérifier s'il se fixe bien au niveau du site du NADPH ou au niveau de la poche hydrophobe située à proximité.

L'absence d'inhibition totale révélée par la méthode 2 devra également être approfondie pour déterminer si ces résultats ont un lien avec le site occupé par les mimes, (site du NADPH ou poche hydrophobe).

Pour le composé **241b** (entrée 3, Tab. 19), nous observons une faible inhibition quel que soit la méthode utilisée. Nous pourrions émettre l'hypothèse que celui-ci se fixe à la DXR mais dans des sites différents.

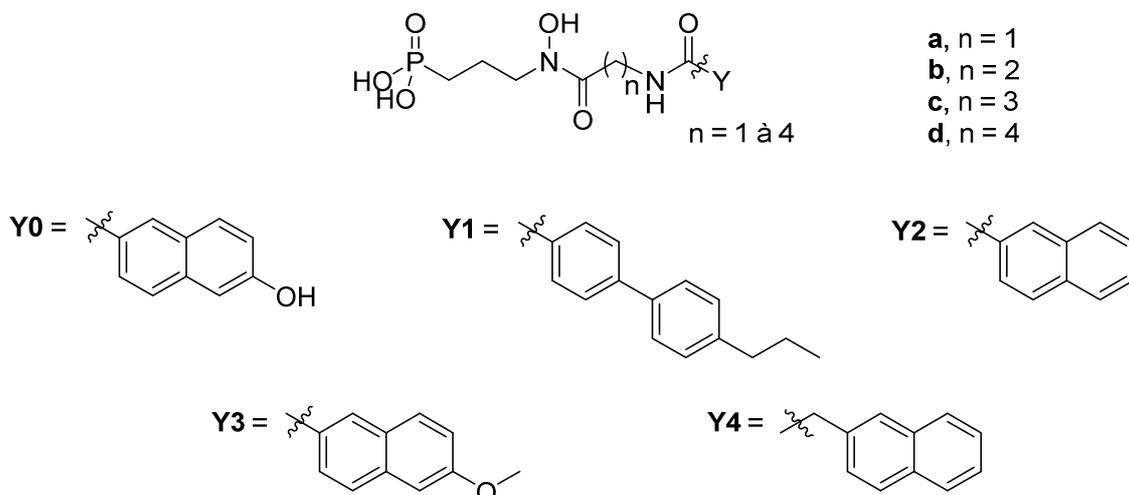
A ce jour, tous les composés n'ont pas été testés soit selon les deux méthodes, soit selon une, il sera donc nécessaire de réaliser ces tests, pour comparer l'ensemble.

Néanmoins, une grande partie des composés ont été testés *in vitro* quant à leur capacité d'inhiber la croissance d'*E. coli* pour affirmer ou infirmer ces résultats.

b. Test *in vitro* par la méthode de diffusion en gélose sur *E. coli*

Une partie des composés synthétisés ont pu être testés *in vitro* sur une souche d'*E. coli* par la méthode de diffusion en milieu solide gélosé. Les quantités déposées sont d'environ 30 nanomoles pour les molécules testées et de 2 nanomoles pour la référence fosmidomycine. Les diamètres d'inhibition sont reportés dans le Tableau 20.

Tous les composés testés sur une souche sauvage d'*E. coli*, à l'exception du composé **244c**, sont capables d'inhiber la croissance des bactéries. L'efficacité moindre observée par rapport à la fosmidomycine en règle générale, pourrait être due à la diffusion plus lente de ces molécules dans la gélose. Par ailleurs, les composés ont été testés sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine par mutation des transporteurs du glycérol 3-phosphate et du glucose 6-phosphate. Aucun d'entre eux n'a été en mesure d'inhiber cette souche, indiquant que ces inhibiteurs utilisent les mêmes transporteurs que la fosmidomycine.

Tableau 20 : Test *in vitro* par la méthode de diffusion en gélose sur *E. coli*. NT = non testé ; - = aucune inhibition.

ENTREE	Composé	N	Y	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Diamètre de la zone d'inhibition de la Fosmidomycine (mm)
1	240b	2	Y0	15	33
2	241a	1	Y1	14	27
3	241b	2	Y1	10	33
4	241c	3	Y1	22	33
5	242a	1	Y2	NT	NT
6	242b	2	Y2	NT	NT
7	242c	3	Y2	12	33
8	242d	4	Y2	NT	NT
9	243a	1	Y3	13	27
10	243b	2	Y3	16	33
11	243c	3	Y3	15	33
12	244a	1	Y4	11	27
13	244b	2	Y4	13	33
14	244c	3	Y4	-	-

Le meilleur résultat obtenu avec le composé **241c** (entrée 4, Tab. 20), est en corrélation avec ceux obtenus sur la DXR. Pour ce composé, il serait intéressant d'étudier l'influence de la longueur de l'espaceur afin de déterminer si le biphenyle se fixe de manière optimale pour une longueur de 3 chainons et si cette augmentation entraîne une perte d'activité ou à l'inverse une amélioration.

Tous les composés qui possèdent une inhibition maximum d'environ 50 % selon la méthode 2, se révèlent tous être capables de pénétrer au sein de la bactérie et d'inhiber sa multiplication (entrée 2, 10 à 12, Tab. 20).

Le composé **241b** qui par hypothèse se fixerait sur l'enzyme mais pas dans les sites du DXP et NADPH montre à nouveau une activité modeste *in vitro*.

5. Synthèse partielle des inhibiteurs à partir des acides comportant un groupement hydroxyle

La synthèse de l'intégralité des composés n'a pu être conduite avec les acides **212**, **216**, **218** et **219**. La présence de l'hydroxyle pourrait être responsable de ce manque de réactivité car plusieurs couplages sont possibles. Il a donc été décidé de protéger la fonction acide des aminoacides sous la forme d'ester benzylique. La synthèse des derniers composés a été entreprise mais n'a pu être conduite à son terme.

La première étape de la synthèse débute par la protection de la fonction acide. Pour effectuer cette réaction la glycine, la β -alanine, et l'acide γ -aminobutyrique sont traités avec de l'alcool benzylique en présence d'acide *p*-toluènesulfonique au reflux dans du toluène, conduisant à l'obtention des produits **245a-c** (Fig. 157).¹³ Ces composés sont obtenus sous la forme de sel de tosylate d'ammonium.

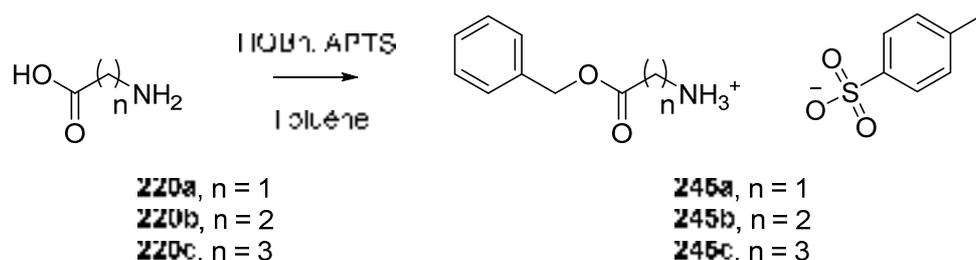


Figure 157 : Protection de la fonction acide sous la forme d'ester benzylique.

Le couplage des composés **243 a-c** avec les acides commerciaux **212**, **214**, **216** et **217**, a été réalisé via deux méthodes. La première, en présence de EDC/HOBt/TEA [méthode (i)] et la seconde en présence de DCC/TEA [méthode (ii)] (Fig. 158).^{14, 13}

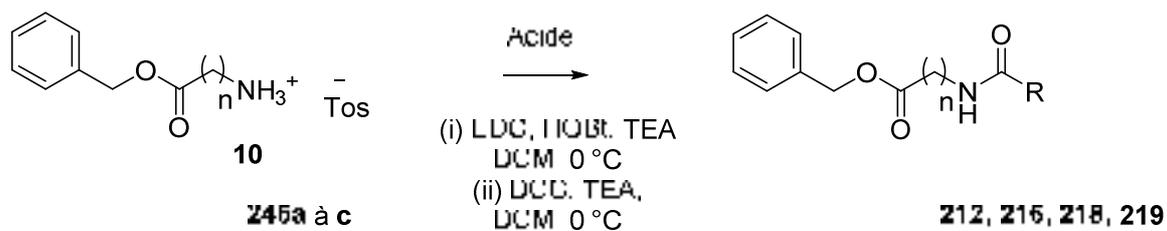
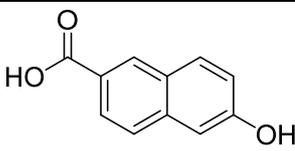
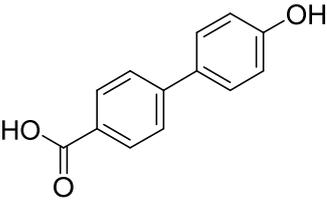
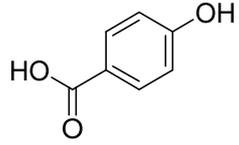


Figure 158 : Test de couplage de type peptidique avec les aminoacides protégés.

Les essais mis en œuvre sont reportés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Rendements des couplages des fragments ester benzylique avec les différents acides.

* = non testés, faute de temps

Ester benzylique Acides commerciaux	245a, n = 1	245b, n = 2	245c, n = 3
 212	*	 	26 % méthode (ii) 240c
 216	*	méthode (ii) 246b	*
 218	36 % méthode (ii) 247a	68 % méthode (ii) 247b	48 % méthode (i) 247c
 219	54 % méthode (i) 248a	48 % méthode (i) 248b	50 % méthode (i) 248c

Les rendements des produits obtenus oscillent entre 26 et 68 %. La formation du composé **246b** a été observée par analyse RMN du brut réactionnel mais celui-ci n'a pu être purifié.

Faute de temps, nous avons déprotégé les groupements benzyles par hydrogénolyse catalysée au palladium activé sur charbon uniquement sur les composés **240c** et **247b** (Fig. 159). Les produits souhaités ont été obtenus avec de faibles rendements de respectivement 8 et 24 %. Nous observons

sur les spectres RMN, la présence d'un singulet aux alentours de 3,72 ppm, intégrant pour 3 protons, ainsi qu'un carbone à 52,08 ppm. Ces déplacements chimiques sont caractéristiques d'un groupement méthoxy. La réaction se faisant en présence de méthanol, celui-ci pourrait avoir réagi sur l'acide pour conduire à l'ester méthylique.

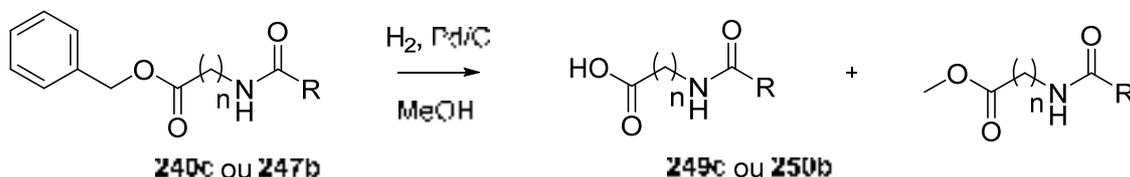


Figure 159 : Produits résultants de l'étape d'hydrogénation.

Pour éviter la formation de ce produit, le méthanol a été remplacé soit par de l'éthanol ou de l'isopropanol, permettant de poursuivre la synthèse sur les autres composés, qui à ce jour n'ont pas été purifiés

Pour finir, les acides libres sont couplés avec le diéthyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** selon les conditions mises au point précédemment (Fig. 160), à savoir en présence de DIC/HOBt dans le THF, permettant d'obtenir les composés **251a** et **252b** avec des rendements respectifs de 34 et 18 %.

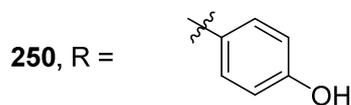
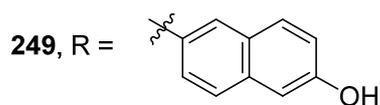
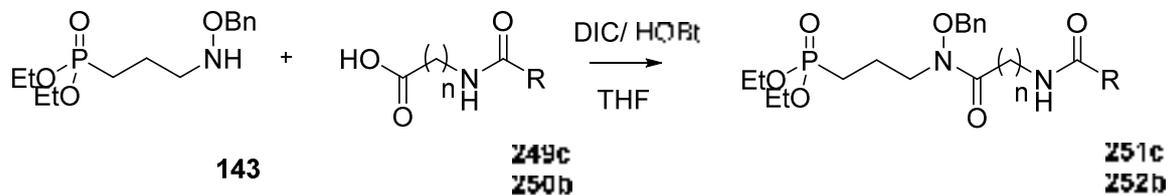


Figure 160 : Couplage de type peptidique pour la synthèse du dernier panel.

Afin de finaliser ce projet, il restera à effectuer ces deux étapes de déprotection selon les conditions opératoires décrites auparavant.

IV. Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons travaillé, en collaboration avec une équipe de modélisation moléculaire, à l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de type bisubstrat. Les travaux réalisés en amont

par cette équipe ont permis d'identifier des molécules pouvant interagir non seulement au niveau du site actif du DXP, mais également à proximité de ce dernier, notamment, au niveau du site de fixation du cofacteur NADPH.

En nous fondant sur les études de docking réalisées par nos collaborateurs, nous avons choisi de développer la synthèse d'inhibiteur à partir d'acides commerciaux ciblant le site de fixation du nicotinamide. Une stratégie de synthèse convergente, a été appliquée pour la synthèse des composés. La synthèse des inhibiteurs à partir des acides et 4'-propylbiphényl-4-carboxylique **213**, 6-méthoxy-2-naphtoïque **215**, et 2-naphtylacétique **217** a été conduite à son terme. En revanche, la synthèse à partir des acides possédant un hydroxyle a nécessité l'introduction de deux étapes supplémentaires de protection et déprotection et n'a pu être achevée à ce jour.

Une partie des inhibiteurs synthétisés a pu être testée sur la DXR purifiée d'*E. coli* et par la méthode de diffusion en gélose. Ces résultats obtenus sont très intéressants et confirment l'efficacité des aromatiques pour cibler le site du nicotinamide. Nous observons une corrélation entre les résultats de modélisation et les résultats d'inhibition, pour les composés fonctionnalisés avec les acides 6-hydroxy-2-naphtoïque **212** et 4'-propylbiphényl-4-carboxylique **213**, choisi pour leurs bons résultats en docking. Ce dernier, a notamment montré la meilleure activité inhibitrice lors des tests enzymatiques et sur boîte de Pétri avec l'inhibiteur **241c**.

L'augmentation de la longueur de chaîne entre les acides 2-naphtoïque **214** et 2-naphtylacétique **217** n'a pas démontré de réelle amélioration. En revanche, l'introduction du groupement méthoxy sur l'acide avec l'acide 6-méthoxy-2-naphtoïque **215** permet d'augmenter l'inhibition. Toutefois, toutes les longueurs d'espaceurs n'ayant pas été réalisées, il sera nécessaire de terminer les synthèses pour comparer l'ensemble.

Ces premiers résultats sont très encourageants avec la quasi-totalité des composés inhibant la croissance d'*E. coli*, mais il sera nécessaire de réaliser des études complémentaires pour vérifier le mode de fixation des inhibiteurs dans l'enzyme. Il sera par exemple intéressant de déterminer les K_i de nos composés pour voir s'ils sont bien compétitifs vis-à-vis du site du nicotinamide du NADPH. Les inhibiteurs possédant les meilleures activités inhibitrices pourront également être étudiés par cristallographie pour confirmer leur mode de fixation. Ces analyses pourront par ailleurs peut-être apporter des précisions quant aux inhibiteurs montrant la plus mauvaise inhibition (maximum d'inhibition de 50 %) selon la méthode 2. Car malgré cette mauvaise inhibition observée lors des tests enzymatiques, ceux possédant cette caractéristique ont montré une bonne inhibition sur boîte de Pétri. Cette mauvaise inhibition ne doit donc pas être considérée comme un facteur d'exclusion mais pourrait être caractéristique d'un autre mode de fixation.

D'un point de vue perspective, la solubilité d'une partie des composés est relativement faible, ce qui a nécessité de les solubiliser dans le DMSO pour les tests biologiques. Il sera donc nécessaire de travailler sur ce point, ce qui pourra être amélioré par l'ajout d'une tête polaire comme indiqué lors de la première approche des études de modélisation.

- (1) Jansson, A. M.; Więckowska, A.; Björkelid, C.; Yahiaoui, S.; Sooriyaarachchi, S.; Lindh, M.; Bergfors, T.; Dharavath, S.; Desroses, M.; Suresh, S.; et al. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6190–6199.
- (2) Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Catechol – Rhodanine Derivatives : Specific and Promiscuous Inhibitors of *Escherichia Coli* Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3713–3719.
- (3) Zinglé, C. Biosynthèse Des Isoprénoïdes: Synthèse D'inhibiteurs de la 1-Désoxyxylulose 5-Phosphate Réducto-Isomérase, Une Nouvelle Piste Pour L'élaboration de Nouveaux Antimicrobiens. Université de Strasbourg, 2010.
- (4) Gießmann, D.; Heidler, P.; Haemers, T.; Van Calenbergh, S.; Reichenberg, A.; Jomaa, H.; Weidemeyer, C.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Link, A. Towards New Antimalarial Drugs: Synthesis of Non-Hydrolyzable Phosphate Mimics as Feed for a Predictive QSAR Study on 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 643–656.
- (5) Bodill, T.; Conibear, A. C.; Blatch, G. L.; Lobb, K. A.; Kaye, P. T. Synthesis and Evaluation of Phosphonated N -Heteroarylcarboxamides as DOXP-Reductoisomerase (DXR) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1321–1327.
- (6) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Uh, E.; Johnny, C.; Haymond, A.; Lundberg, L.; Pinkham, C.; Kehn-Hall, K.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; et al. Design of Potential Bisubstrate Inhibitors against *Mycobacterium Tuberculosis* (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr)-Evidence of a Novel Binding Mode. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 1099–1104.
- (7) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of E. Coli 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115–127.
- (8) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Åqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. Structures of *Mycobacterium Tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Provide New Insights into Catalysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (27), 19905–19916.
- (9) Krebs, F. Etudes in Silico et Expérimentale de La DXR et Synthèse de D- et L-GAP Énantiomériquement Purs. PhD thesis, Université de Strasbourg, **2016**.
- (10) de Carvalho, L. P. S.; Blanchard, J. S. Kinetic and Chemical Mechanism of Alpha-Isopropylmalate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **2006**, *45* (29), 8988–8999.
- (11) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E.coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115–127.
- (12) Muro-Small, M. L.; Chen, J.; McNeil, A. J. Dissolution Parameters Reveal Role of Structure and Solvent in Molecular Gelation. *Langmuir* **2011**, *27*, 13248–13253.
- (13) Li, S.; Zeng, D. Deuterium Isobaric Tag Reagents for Quantitative Analysis, 2011.
- (14) Kloss, F.; Lincke, T.; Hertweck, C. Highly Efficient Total Synthesis of the Clostridium-Derived Anti-MRSA Antibiotic Closthioamide. *European J. Org. Chem.* **2011**, 1429–1431.

Chapitre 3 : Interface stratégie biligand et bisubstrat

Chapitre 3 : Interface stratégie biligand et bisubstrat

I. Etat de l'art sur la chimie click *in situ* en présence d'alcyne vrais

L'utilisation d'enzyme pour conduire à l'obtention de son propre inhibiteur à partir de deux composés distincts a déjà été employée. Au départ, les différentes approches envisagées ne faisaient pas encore état de l'utilisation de chimie « click ». Cependant, la bio-orthogonalité de cette dernière l'a rapidement propulsée comme alternative de choix.

L'équipe de Mock a démontré dans les années 90 le fait que la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne est accélérée par un ordre de grandeur de 4 à 5 lorsque ceux-ci sont disposés de manière rapprochée au sein du récepteur synthétique d'un cucurbiturile.^{1,2,3} Ainsi, l'emploi d'un alcyne contraint peut être contourné dans le cas où le système biologique peut de lui-même assembler les ligands et conduire à son inhibiteur.

Cette stratégie a ainsi été employée pour la première fois dans la synthèse d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) qui hydrolyse l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique et qui est une cible de choix pour de nombreuses maladies, dont la maladie d'Alzheimer.⁴ Les tests réalisés sur l'enzyme d'anguille et de souris ont exclusivement conduit à la formation du régioisomère 1,5 dont l'activité des différents leaders est bien meilleure comparée à celle du régioisomère 1,4, analysé par une méthode de LC/MS-SIM (Selected Ion Monitoring).^{5, 6} En règle générale, la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne est plutôt lente à température ambiante. Dans le cas de l'AChE, la cinétique est considérablement augmentée. La structure cristallographique de l'enzyme en présence du régioisomère 1,5-**TZ2PA6** révèle un important changement conformationnel, à proximité du site catalytique, non observé en présence du régioisomère 1,4 (Fig. 161).⁷ Les résultats mettent en évidence le rôle joué par le groupement triazole formé *in situ* dans l'efficacité des régioisomères 1,5, en augmentant l'affinité des inhibiteurs pour l'enzyme. L'effet des paramètres stériques et dynamiques sur la cycloaddition est encore à l'étude à l'heure actuelle.⁸

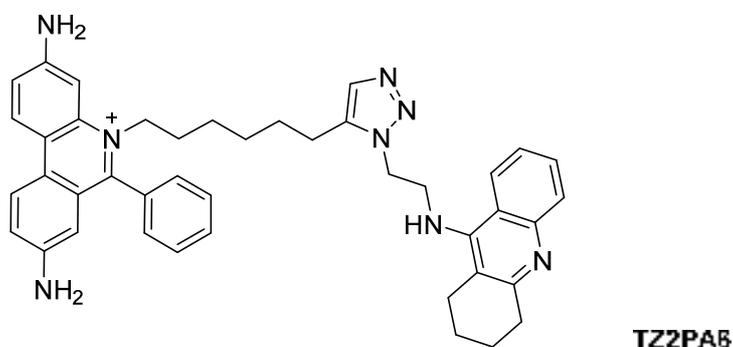


Figure 161 : Structure du TZ2PA6 synthétisé par cycloaddition 1,3-dipolaire *in situ*.⁷

La chimie click *in situ* a également été employée dans la synthèse d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique,⁹ de la protéase du VIH,¹⁰ des tyrosines kinases¹¹ ou encore de la chitinase.¹²

Hormis son utilisation dans le cadre de la synthèse de nouveaux inhibiteurs, la réaction click a également été utilisée dans l'exploration conformationnelle de poches de fixation de ligands. Le but est de voir si de nouvelles interactions peuvent être envisagées ou si des composés plus volumineux pouvaient s'y fixer. L'équipe de Willand a de cette manière étudié la flexibilité de la protéine EthR.¹³ Cette protéine est une cible dans la synthèse d'inhibiteurs d'enzymes de *Mycobacterium tuberculosis*. L'éthionamide (ETH), un antibiotique utilisé en seconde ligne dans le traitement de la tuberculose, est une pro-drogue qui doit être activée par la mono-oxygénase EthA. Cette dernière est une protéine produite en faibles quantités par la bactérie, ce qui limite l'efficacité de l'ETH. L'EthA est elle-même contrôlée par le répresseur transcriptionnel EthR qui, lorsqu'il se fixe sur l'opérateur du gène EthA, réprime son expression (**A**, Fig. 162). La formation d'un complexe EthR/ligand (L) empêche la protéine de se fixer au gène, impliquant la production de l'enzyme EthA permettant ainsi l'activation de l'ETH (**B**, Fig. 162).

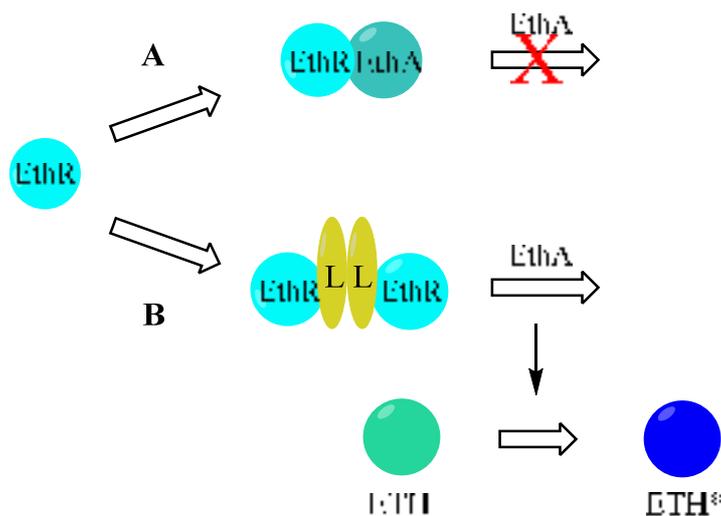


Figure 162 : Synergie d'action de l'ETH et d'un ligand d'EthR.¹⁴

La flexibilité du site actif a été mise en évidence par l'utilisation d'un inhibiteur de EthR, fonctionnalisé avec un azoture (**BDM14801**) en présence de différents alcynes aromatiques ou aliphatiques sélectionnés (Fig. 163). Ces derniers ont été fonctionnalisés de manière à cibler une partie hydrophobe de la poche. Ce sont notamment deux phénylalanines qui ont montré cette flexibilité car elles se déplacent et ouvrent le chemin vers un tunnel hydrophobe qui peut être exploité pour le développement d'inhibiteurs.

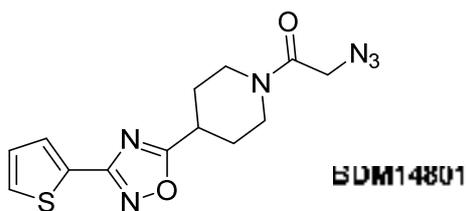


Figure 163 : Inhibiteur BDM31381 ayant servi à la conception de l'azoture BDM14801.

Cette stratégie a également été employée pour la synthèse de sondes fluorescentes¹⁵ ou a permis de mettre en évidence des ligands qui ne ciblent pas le site actif.^{16, 17}

L'équipe d'Abell travaille quant à elle sur l'augmentation de l'efficacité de l'enzyme à induire la réaction click en augmentant sa sensibilité de détection, ce qui peut être un facteur limitant dans l'optimisation des ligands. De plus, cette méthode pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles familles de composés qui en temps normal seraient de faibles inhibiteurs non détectés car en trop faible quantité.¹⁸

Ainsi, suite aux difficultés rencontrées pour synthétiser les cyclooctynes, et aux publications faisant référence à l'utilisation d'alcynes vrais pour la chimie click *in situ*, nous avons choisi d'appliquer cette approche à la DXR. Une fois l'inhibiteur de la fosmidomycine fonctionnalisé par un azoture et le mime du nicotinamide, fonctionnalisé avec un alcyne vrai, au sein de l'enzyme, la fermeture de la boucle, pourrait entraîner un rapprochement entre l'azoture et l'alcyne et ainsi promouvoir la réaction de chimie click. Ce chapitre, présente les travaux réalisés dans ce cadre.

II. Synthèse d'alcynes terminaux et évaluation biologique

1. Sélection des alcynes à synthétiser par modélisation moléculaire

Pour exploiter cette stratégie et ne possédant pas d'étude de ce type sur la DXR, nous avons fait appel à la modélisation pour sélectionner les composés à synthétiser.

Les études de modélisation moléculaires, réalisées dans le cadre de l'approche bisubstrat, nous ont guidés pour la synthèse des mimes du nicotinamide. Pour cette approche bisubstrat, huit acides commerciaux avaient été sélectionnés mais seule la synthèse de quatre d'entre eux avait pu être conduite à son terme. Pour cette étude, nous avons choisi ces quatre acides à savoir l'acide 4'-propylbiphényl-4-carboxylique **213**, l'acide 2-naphtoïque **214**, l'acide 6-méthoxy-2-naphtoïque **215** et l'acide 2-naphtylacétique **217**, ainsi que l'acide 4'-bromostilbène-4-carboxylique (Fig. 164).

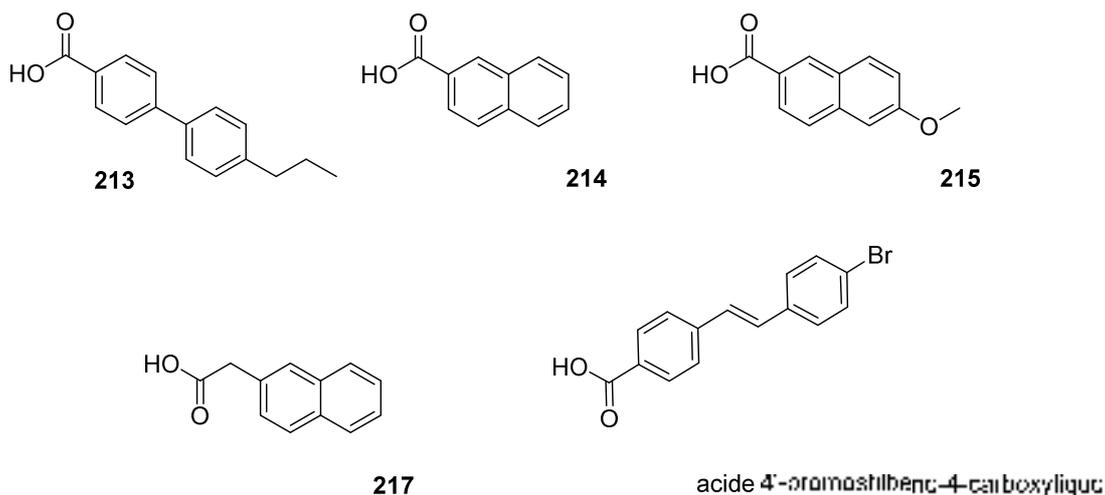


Figure 164 : Acides commerciaux sélectionnés pour mimer le nicotinamide du NADPH.

Concernant le choix de l'alcyne, l'analyse d'une bibliothèque d'une vingtaine d'alcynes commerciaux a été entreprise par nos collaborateurs, conduisant à la sélection de trois alcynes : l'alcool propargylique **253**, la 3-éthynylaniline **254** et le 3,4-difluorophénylacétylène **255** (Fig. 165). Les deux premiers ont été choisis de manière à y condenser les acides commerciaux mimant le NADPH et le troisième a été utilisé en tant que mème.

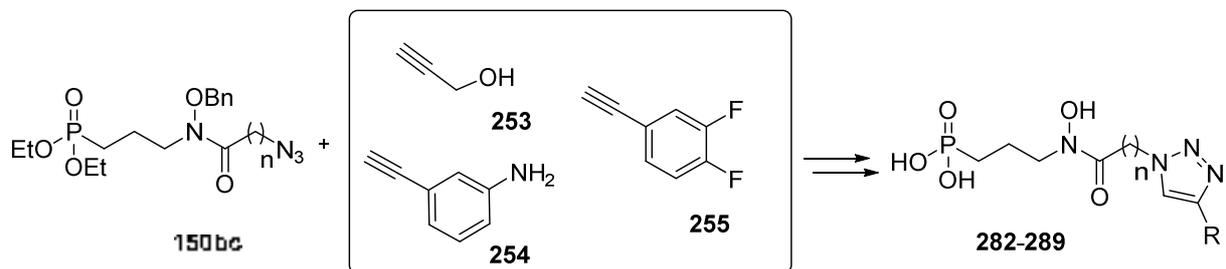


Figure 165 : Alcynes vrais sélectionnés pour la réaction de chimie click.

2. Synthèse des alcynes fonctionnalisés avec le mème du NADPH

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer la capacité de ces alcynes à se fixer au niveau de la poche du NADPH. Les acides commerciaux ont été condensés sur les alcynes, par un couplage de type peptidique avec le couple EDC.HCl/HOBt (Fig. 166).

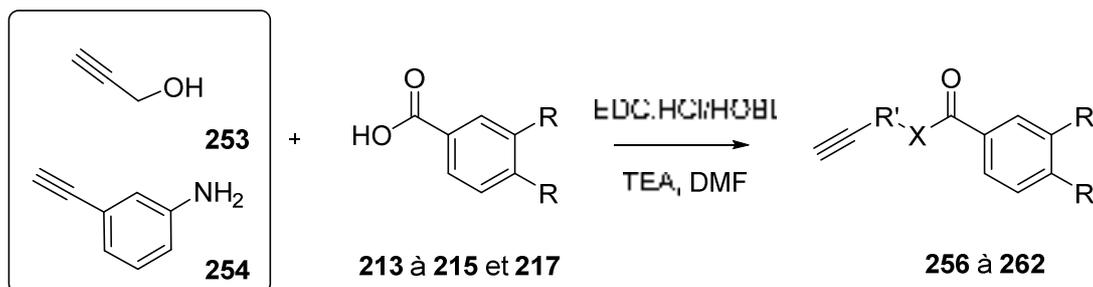


Figure 166 : Synthèse des mèmes de NADPH avec les acides commerciaux sélectionnés dans l'approche bisubstrat.

Par cette méthode, nous avons obtenu sept composés, avec des rendements compris entre 28 et 90 %.

Le stilbène décrit par l'équipe de Slama-Schwok est utilisé comme mime du nicotinamide dans le cadre de la synthèse d'inhibiteur de NOS. Nous avons choisi de réaliser la synthèse d'un alcynes fonctionnalisés avec un stilbène, afin d'en étudier le potentiel d'inhibition chez la DXR (Fig. 167).¹⁹

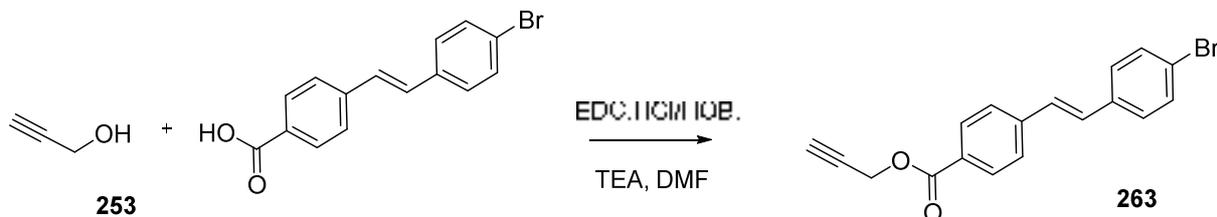


Figure 167 : Synthèse mime du NADPH avec le stilbène.

Pour ce faire, l'alcool propargylique est couplé à l'acide 4'-bromostilbène-4-carboxylique dans les mêmes conditions indiquées précédemment, et le composé **263** est obtenu après purification avec un rendement de 76 %.

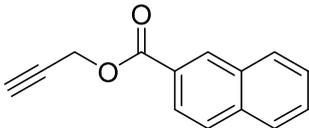
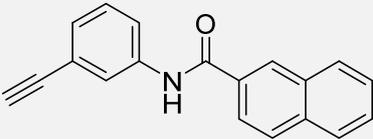
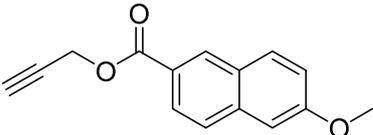
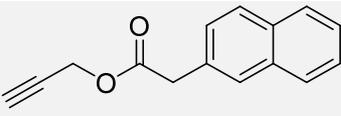
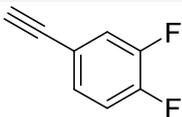
3. Evaluation biologique des alcynes sur la DXR purifiée d'*E. coli*

Une partie des différents composés ont été testés sur la DXR d'*E. coli*, par le Dr. Denis Tritsch, selon la méthode 2 (chapitre 2, page 164), où les inhibiteurs sont préalablement incubés en présence de la DXR et du DXP pendant deux minutes avant d'initier la réaction enzymatique par l'ajout du NADPH.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition des alcynes sur la DXR par la méthode 2.

ENTREE	Composé	Structure	Concentration (μM)	Pourcentage d'inhibition (%)
1	256		40	12
2	257		40	24

3	258		40	4
4	259		40	4
5	260		40	16
6	261		200	11
7	255		200	11

Les tests d'inhibition avec les alcynes montrent que ces composés sont de faibles inhibiteurs avec des pourcentages d'inhibition, allant de 4 à 24 % en fonction de leur concentration. Le meilleur résultat de cette série est obtenu avec le composé **257**, (entrée 2), possédant un pouvoir d'inhibition de 24 % à 40 μM .

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de réaliser la réaction de click expérimentalement et de tester les triazoles en tant qu'inhibiteur de type bisubstrat.

III. Synthèse de triazoles bisubstrats : de potentiels inhibiteurs de la DXR

Cette approche a été réalisée pour synthétiser rapidement un grand nombre d'inhibiteurs, et étudier l'influence du triazole.

1. Synthèse des triazoles par réaction de click

La synthèse a été mise en œuvre avec les azotures **150bc**, possédant un espaceur de 2 et 3 groupements méthylènes. Les azotures sont clickés avec les alcynes en présence du $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et de l'ascorbate de sodium dans un mélange butanol-eau (5/2) (Fig. 168).²¹

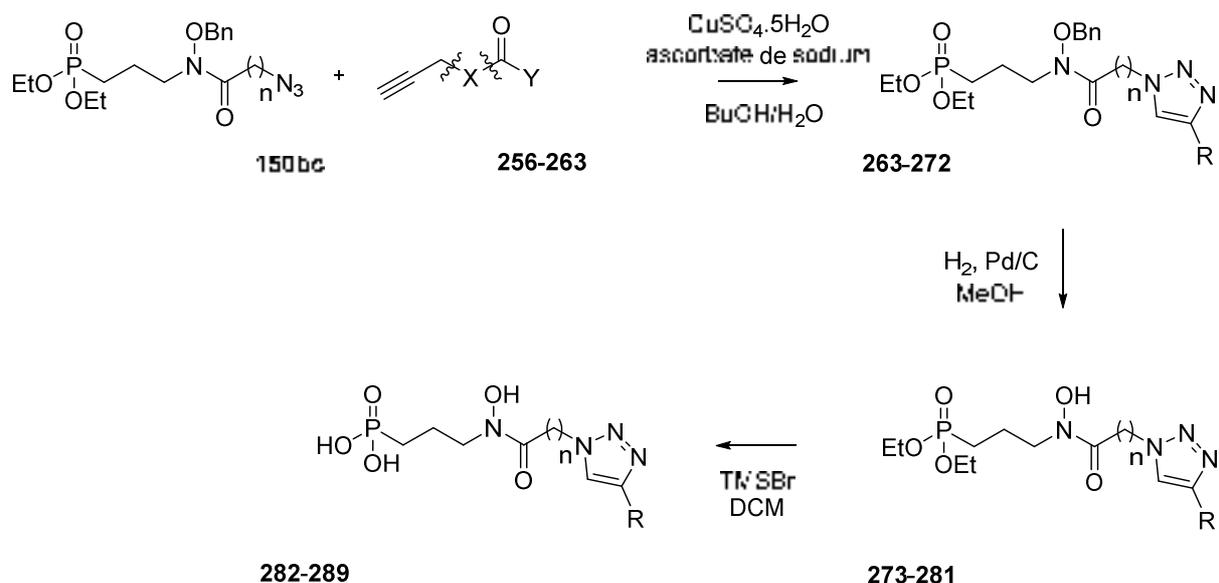
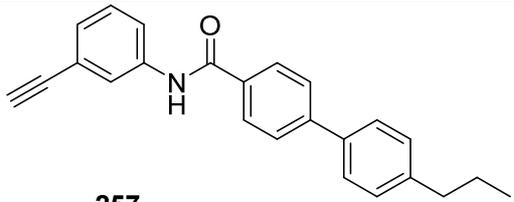
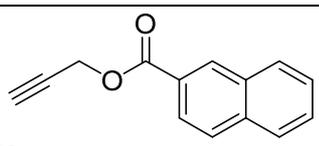
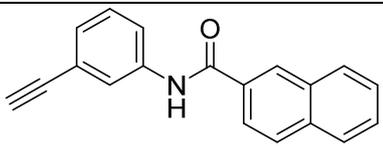
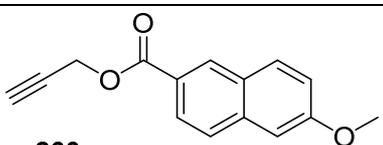
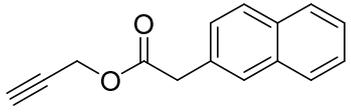
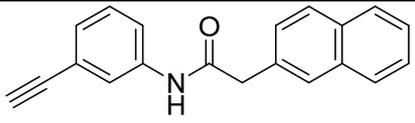


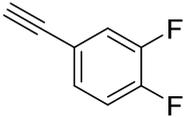
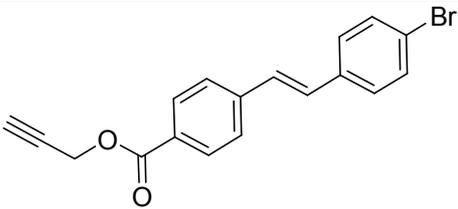
Figure 168 : Synthèse des inhibiteurs par réaction click.

Une série de neuf composés ont été obtenus avec des rendements variant de 16 à 88% (Tab. 23). Les benzyles sont déprotégés par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif conduisant aux composés souhaités avec des rendements compris entre 35 et 90 % (Tab. 23). L'utilisation du TMSBr dans le dichlorométhane permet de déprotéger les éthyles du groupement phosphonate, aux produits souhaités. Les rendements n'ont pu être déterminés à cause de la présence d'eau provenant de l'étape d'hydrolyse des intermédiaires silylés (Fig. 168).

Tableau 23 : Rendements des étapes de click et de déprotection du groupement benzyle.

	Réaction de click		Déprotection benzyle		Obtention produit final
	Produit	Rendement	Produit	Rendement	
 256	264b	63 %	273b	70 %	✓ 282b
	264c	62 %	273c	64 %	✓ 282c

 257	265b	16 %	274b	64 %	✓ 283b
	265c	51 %	274c	56 %	✓ 283c
 258	266b	88 %	275b	65 %	✓ 284b
	266c	-	275c	60 %	✓ 284c
 259	267b	59 %	276b	72 %	✓ 285b
	267c	93 %	276c	35 %	✓ 285c
 260	268b	52 %	277b	57 %	✓ 286b
	268c	58 %	277c	71 %	✓ 286c
 261	269b	49 %	278b	53 %	✓ 287b
	269c	35 %	278c	75 %	✓ 287c
 262	270b	62 %	279b	66 %	✓ 288b
	270c	82 %	279c	49 %	✓ 288c
	271b	57 %	280b	70 %	✓ 289b

<p>255</p> 	271c	-	280c	90 %	✓ 289c
<p>263</p> 	272b	84 %	281b	29 %	X
	272c	74 %	X	X	X

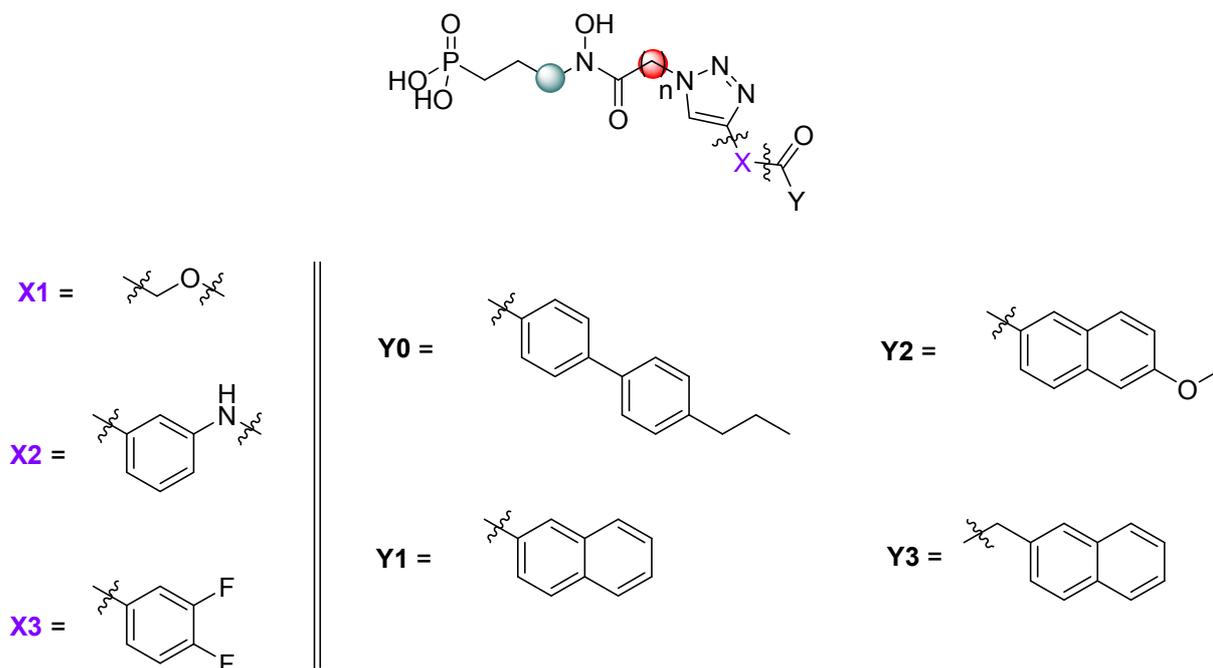
La synthèse avec le stilbène comme mime du nicotinamide n'a pu être réalisée que partiellement par manque de temps. Dans ce cas, la déprotection du benzyle **272b** est réalisée à l'aide du trichlorure de bore dans le DCM à 0 °C. Cette manipulation a été réalisée avec succès pour le composé **281b** obtenu avec un rendement de 29 %.

2. Etudes spectroscopiques RMN des triazoles

Comme dans le cas des composés décrits auparavant et possédant un acide rétro-hydroxamique, nous avons observé la présence de conformères *Z* et *E* dans des proportions différentes.

Les déplacements chimiques des protons caractéristiques et les proportions des conformères *Z* et *E* sont résumés dans le Tableau 24 et varient en fonction du solvant et des facteurs stériques.

Dans le cadre des composés fonctionnalisés avec un amide, du fait de l'importante gêne stérique due aux aromatiques, nous avons émis l'hypothèse que seul le conformère *E* est présent.

Tableau 24 : Analyses RMN-¹H des atomes voisins de la pince hydroxamique et estimation de la proportion de conformères dans le CD₃OD ou *(CD₃)₂SO.


ENTREE	Composé	X	Y	$\delta(\text{CH}_2\text{N})$ en ppm (Z/E/autre)	$\delta(\text{CH}_2\text{CO})$ en ppm (Z/E/autre)	Proportions (%) Z/E/autre
	282b	X1	Y0	-/3,66/-	-/3,17/-	-/100/-
2	282c	X1	Y0	-/3,66/-	-/2,54/-	-/100/-
3*	283b	X2	Y0	3,20/3,55	2,97/3,07	25/75/-
4*	283c	X2	Y0	-/3,53/-	-/2,41/-	-/100/-
5	284b	X1	Y1	3,35/3,65/-	3,04/3,19/-	30/70/-
6	284c	X1	Y1	3,35/3,65/-	2,43/2,59/-	70/30/-
7	285b	X2	Y1	3,34/3,70/-	3,13/3,29/-	70/30/-
8*	285c	X2	Y1	3,19/3,54/-	2,28/2,41/-	30/70/-
9	286b	X1	Y2	3,35/3,65/-	3,06/3,22/-	15/85/-
10	286c	X1	Y2	3,35/3,65/-	2,43/2,58/-	30/70/-
11	287b	X1	Y3	3,35/3,66/3,63	3,08/3,26/3,15	12/28/60
12	287c	X1	Y3	3,34/-/-	2,45/-/-	100/-/-

13	288b	X2	Y3	3,35/3,67/-	3,10/3,26/-	25/75/-
14	288c	X2	Y3	-/3,66/-	-/2,54/-	-/100/-
15	289b	X3		3,35/3,69/-	3,11/3,27/-	50/50/-
16	289c	X3		-/3,68/-	-/2,56/-	-/100/-

Les proportions des conformères *Z* et *E* sont fonctions de la longueur de la chaîne ainsi que des fragments **X** et **Y**. En RMN ^1H dans le CD_3OD , les protons en α de l'azote, apparaissent sous la forme de deux signaux à environ $\delta = 3,35$ et $3,68$ ppm, correspondant respectivement aux conformères *Z* et *E*. La valeur des déplacements chimiques des protons en α du carbonyle dépend de la longueur de l'espaceur. Pour le conformère *E*, les déplacements chimiques sont observés aux environs de $\delta = 3,2$ ppm pour $n = 2$ et $\delta = 2,50$ ppm pour $n = 3$. Pour les conformères *Z*, ils sont observés vers $\delta = 3,10$ ppm pour $n = 2$ et $\delta = 2,45$ ppm pour $n = 3$.

Pour les composés **282b**, **282c**, **283c**, **288c** et **289c** (entrées 1, 2, 4, 14 et 16), seul le conformère *E* est présent. Il est possible que le conformère *E*, soit favorisé par les gênes stériques importantes.

A l'inverse, dans le cas du composé **287c** (entrée 12), seul le conformère *Z* est observé et est majoritaire pour les composés **284c** et **285b** (entrées 6 et 7). Ce conformère serait favorisé par la formation d'un dimère, résultant de deux liaisons hydrogènes intermoléculaires entre la pince et le phosphonate (Fig. 169).

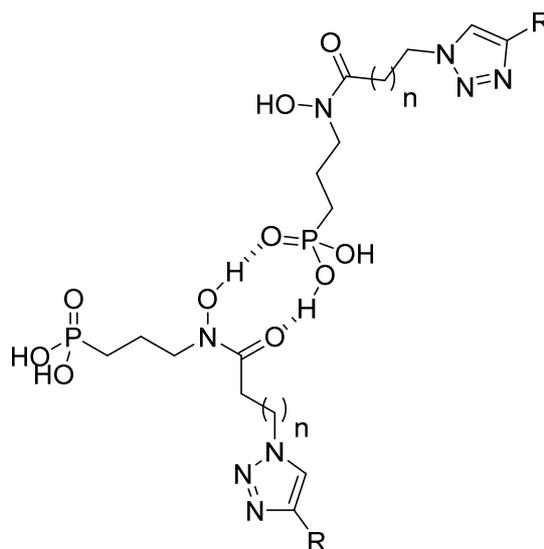


Figure 169 : Interaction hypothétique favorisant le conformère *Z*, par formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre la pince d'une molécule et le phosphonate d'une autre.

D'autre part, de manière générale, dans le cas des composés fonctionnalisés avec le fragment **X1**, le conformère *Z* devient majoritaire, ou, les proportions évoluent en sa faveur, avec l'augmentation de la longueur de chaîne. Au contraire, dans le cas du fragment **X2** (aniline), le conformère *E* devient majoritaire. La présence de ces fragments **X1** et **X2** doit jouer un rôle dans les proportions de ces conformères. Néanmoins, pour les composés **282b** et **282c** (entrées 1 et 2), fonctionnalisés sous forme d'ester, avec le fragment **X1**, seul le conformère *E* est présent. Le biphenyle (**Y0**) doit probablement avoir un impact sur ces proportions.

Pour le composé **287b** (entrée 11), nous observons l'apparition de signaux supplémentaires à $\delta = 3,63$ ppm (CH_2N) et $\delta = 3,15$ ppm (CH_2CO), correspondant probablement à la présence d'un troisième conformère. Celui-ci pourrait correspondre à un cycle à 8 chaînons, formés par une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'hydrogène de l'hydroxylamine et l'atome d'azote du triazole en position 2 (Fig. 170). Cependant, à ce stade et avec les informations dont nous disposons, il ne nous a pas été possible d'en déterminer la structure.

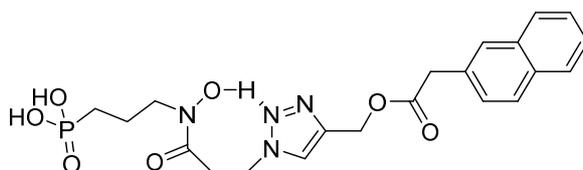


Figure 170 : Structures hypothétique du troisième conformère pour le composé **287b**.

Les composés **283b**, **283c** et **285c** (entrées 3, 4 et 8), n'étant pas solubles dans le CD_3OD , les analyses RMN ont été réalisées dans le $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Dans ce cas, on observe un blindage des protons avec des déplacements chimiques qui pour le conformère *E* sont de $\delta = 3,55$ ppm *versus* 3,68 ppm pour le (CH_2N) et de $\delta = 3,07$ ppm ($n = 2$) et $\delta = 2,41$ ppm ($n = 3$) pour le méthylène en α du carbonyle. Pour le conformère *Z*, ces déplacements sont déplacés vers 3,2 ppm *versus* 3,35 ppm pour le $\delta(\text{CH}_2\text{N})$. Les méthylènes en α du carbonyle sont déplacés vers $\delta = 2,97$ ppm ($n = 2$) et $\delta = 2,28$ ppm ($n = 3$).

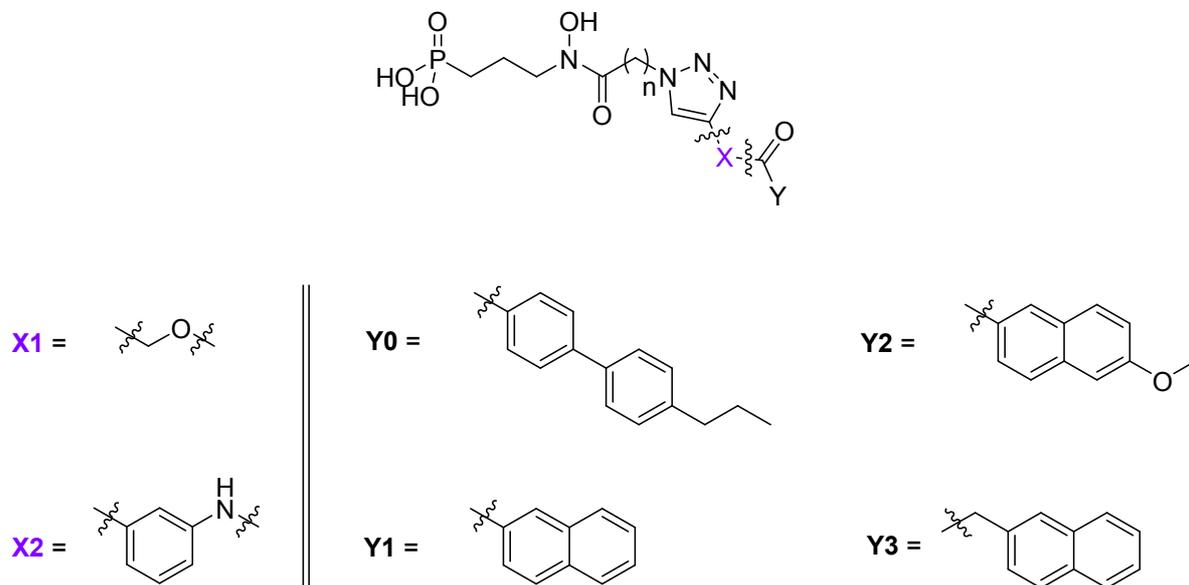
3. Evaluation biologique

a. Tests enzymatiques sur la DXR purifié d'*E. coli*

Une partie des composés synthétisés a été testée sur la DXR d'*E. coli*. Comme dans le cas de l'approche bisubstrat, les composés étant susceptibles de se fixer au niveau du site du nicotinamide du NADPH, c'est pourquoi, les deux méthodes précédemment énoncées pour les tests enzymatiques ont été mise en œuvre. Dans la première, l'inhibiteur est incubé en présence de DXP pendant 2 min à 37 °C, la réaction enzymatique étant ensuite initiée par l'addition de NADPH. Dans la seconde méthode, l'inhibiteur est incubé en présence de NADPH pendant 2 min à 37 °C, et la réaction enzymatique est

ensuite initiée par l'addition de DXP. Par manque de temps, seule une partie des composés a été testée sur la DXR purifiée (Tab. 25).

Tableau 25 : Activité inhibitrice des inhibiteurs testés sur la DXR d'*E. coli*.



ENTREE	Composé	X	Y	Méthode 1 / IC ₅₀ (μM)	Méthode 2 / IC ₅₀ (μM)
1	282c	X1	Y0	Inhibition non spécifique de la DXR car le composé forme des micelles	
2	283c	X2	Y0	Pas d'inhibition à 14 μM	13,5
3	284c	X1	Y1	1,6	4,6
4	286c	X1	Y2	1,7	3,5
5	287c	X1	Y3	2,9	4,8

Les composés **284c**, **286c** et **287c** (entrées 3, 4 et 5), possédant le même espaceur **X1**, montrent une bonne activité selon les deux méthodes avec des IC₅₀ dans le bas micromolaire. Il faut noter une corrélation entre les deux valeurs obtenues selon les deux méthodes. Ces résultats nous laissent penser que les inhibiteurs se placeraient bien dans la poche du NADPH (Inhibition méthode 2). De plus, la présence de ce dernier améliorerait leur affinité pour le site du DXP, visible par une légère augmentation de l'inhibition obtenue dans le cas de la méthode 1.

Le composé **283c** (entrée 2) semble mieux se fixer au niveau du site du NADPH puisque l'on observe une meilleure inhibition avec la méthode 2 par rapport à la méthode 1. De plus, il ne semble pas être en compétition avec le DXP puisqu'une activité relativement faible est observée avec la méthode 1. A

la vue de ces résultats, nous pourrions émettre l'hypothèse que le cycle benzénique supplémentaire favorise les interactions avec le site du nicotinamide et que la partie mime du DXP n'accède pas de manière optimale au site du substrat.

Le composé **282c**, n'a pas montré d'inhibition spécifique car il forme des micelles en solution aqueuse. Cette inhibition non spécifique avait déjà été mise en avant lors de l'évaluation des bisubstrats de type catéchol-rhodanine synthétisés au sein de notre laboratoire et lors d'une étude sur le pouvoir d'inhibition des flavonoïdes.^{22,23}

Ces IC₅₀ de l'ordre du micromolaire, sont encourageants et montrent de nouveau qu'il semble possible de cibler le site du NADPH sans avoir à synthétiser des molécules trop complexes.

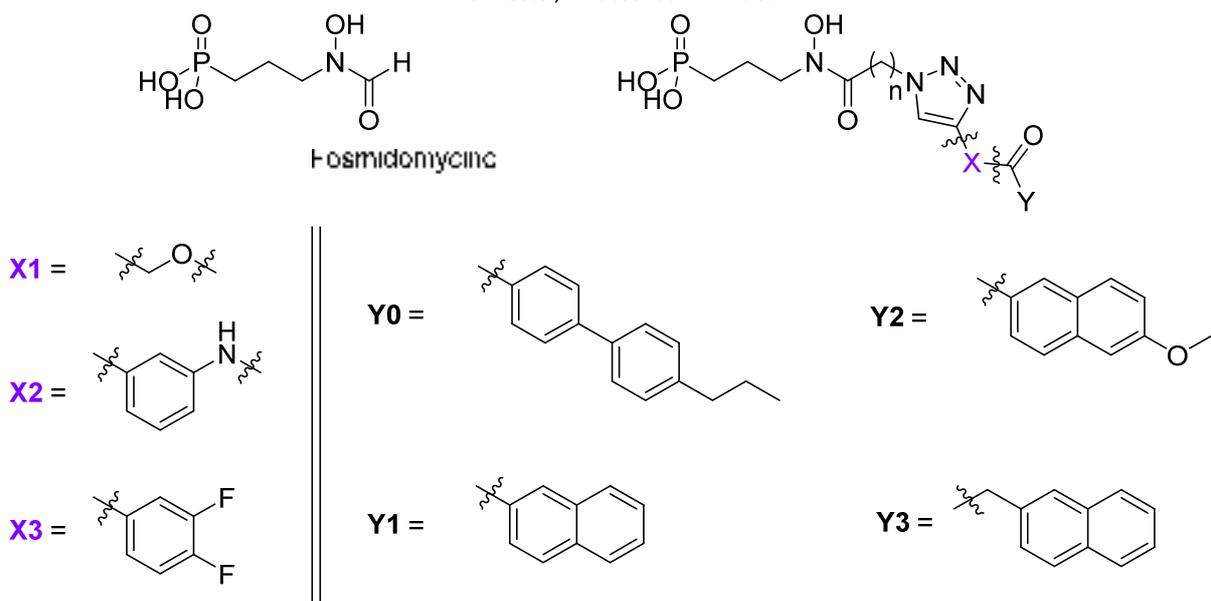
L'influence de la longueur de chaîne n'a pu être évaluée, par manque de temps, et notamment, aucun des composés possédant un espaceur à deux carbones n'a pu être testé sur la DXR. Ces composés devront être testés dans le futur.

b. Tests *in vitro* par la méthode de diffusion en gélose sur *E. coli*

L'ensemble des composés synthétisés a pu être testé *in vitro* sur des souches d'*E. coli* avec la méthode de diffusion en milieu solide gélosé. Les quantités d'inhibiteurs déposées sont d'environ 30 nanomoles tandis que le dépôt de la fosmidomycine est de 2 nanomoles. Une quinzaine de composés ont pu être testés et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Test *in vitro* par la méthode de diffusion en gélose sur *E. coli*.

NT = Non testé., - = absence d'inhibition



ENTREE	Composé	X	Y	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Diamètre de la zone d'inhibition de la fosmidomycine (mm)
1	282b	X1	Y0	-	33
2	282c	X1	Y0	-	33
3	283b	X2	Y0	NT	
4	283c	X2	Y0	16	33
5	284b	X1	Y1	-	27
6	284c	X1	Y1	13	33
7	285b	X2	Y1	12	27
8	285c	X2	Y1	9	27
9	286b	X1	Y2	8	33
10	286c	X1	Y2	10	33
11	287b	X1	Y3	13	27
12	287c	X1	Y3	16	33
13	288b	X2	Y3	-	27
14	288c	X2	Y3	-	27
15	289b	X3		15	33

La majorité des composés synthétisés ont été capables d'inhiber la croissance d'*E. coli*. Toutefois, les composés fonctionnalisés avec le biphényle **Y0** (entrées 1 et 2), n'ont pas montré de bonne inhibition lorsqu'ils sont sous forme d'ester. En revanche, l'inhibiteur **283c** (entrée 4), qui se fixerait principalement au niveau du site du NADPH, montre une des meilleures inhibitions de cette série. L'introduction d'un cycle aromatique supplémentaire (e.g. fragment **X2**), améliorerait donc la fixation de l'inhibiteur au niveau du site du NADPH. Le biphényle **Y0** est donc prometteur et une étude cinétique plus poussée devrait être entreprise pour analyser son mode de fixation.

Pour les composés fonctionnalisés avec le groupement naphthyle **Y1**, le composé **284b** (entrée 5), n'inhibe pas du tout la croissance de la bactérie. Les autres molécules, **284c**, **285b** et **285c** (entrées 6 à 8), inhibent la croissance de manière modérée.

Dans le cas des composés **286b** et **286c** (entrées 9 et 10), une augmentation de la longueur de chaîne semble favorable. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'une élongation de la chaîne.

Nous avons vu que les composés fonctionnalisés avec le groupement biphényle **Y0**, sont moins bons lorsqu'ils sont sous forme d'ester. En revanche, les composés fonctionnalisés avec le groupement **Y3** sont meilleurs sous la forme d'ester et inactifs en présence du cycle benzénique. Notamment le **287c** (entrée 12), qui est aussi bon que le composé **283c**. La nature du groupement **X** a donc un impact en corrélation avec le groupement **Y** auquel il est associé.

Pour finir, l'inhibiteur **289b** (entrée 15) est l'un des meilleurs inhibiteurs, malgré l'absence de fonctionnalisation supplémentaire. Pour évaluer l'influence de l'espaceur, il faudra tester le composé **289c** (n = 3).

De plus, il est à noter qu'aucun des composés n'a été en mesure d'inhiber une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine par mutation des transporteurs du glycérol 3-phosphate et du glucose 6-phosphate, ce qui laisse à penser que ces inhibiteurs pénètrent dans la bactérie selon les mêmes transporteurs que ceux utilisés pour la fosmidomycine.

IV. Conclusion

Dans le cadre de cette nouvelle approche, nous avons voulu étudier la capacité de l'enzyme à promouvoir la réaction de click *in situ* avec des alcynes vrais. Les études de docking nous ont permis de sélectionner trois alcynes vrais et de les condenser avec les acides commerciaux choisis préalablement dans le cas des bisubstrats (chapitre 2, pages 155). Les alcynes ont été synthétisés et

testés, cependant leur activité biologique est modeste. En effet, pour envisager de réaliser la réaction de click *in situ*, il serait plus confortable d'avoir des inhibiteurs possédant une inhibition dans le bas micromolaire. Ces mimes étant conceptualisés pour cibler le site du nicotinamide, il semblerait intéressant pour avoir un mime du NADPH plus efficace de chercher à cibler également le pont diphosphate et le 2' ribose phosphate si nous souhaitons étudier la réaction de click *in situ*. Nous avons donc décidé de réaliser la réaction de click expérimentalement, dans le but d'obtenir une nouvelle librairie de composés de type bisubstat.

Une quinzaine de triazoles ont ainsi été obtenus avec succès et leur évaluation biologique a pu être conduite. Les premiers résultats cinétiques sont très intéressants avec des valeurs d'inhibition dans le bas micromolaire pour les composés **283c**, **284c**, **286c** et **287c**. Le premier notamment a montré des résultats surprenants qui pourraient laisser penser que cet inhibiteur se fixe principalement au niveau du site du NADPH, ce qui devra être confirmé par des analyses complémentaires.

Cependant, contrairement aux bisubstrats, tous les composés n'ont pas été capables d'inhiber l'enzyme par la méthode de diffusion en gélose. Différentes hypothèses peuvent être émises : un problème de diffusion dans le milieu gélosé, la présence d'amidases ou d'estérases ou encore un relargage des composés à l'extérieur de la cellule bactérienne par des pompes à efflux.

Dans le cadre des synthèses de la réaction de click, nous avons utilisé du cuivre pour la catalyse, nous donnant exclusivement accès aux composés substitués en 1,4. Il serait intéressant de réaliser de nouveau ces synthèses pour les composés les plus probants en présence de ruthénium de manière à étudier l'impact d'une fonctionnalisation en 1,5.

En ce qui concerne, les inhibiteurs possédant un stilbène, la synthèse devra être achevée pour étudier leur impact en tant que mime du NADPH.

- (1) Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Manimaran, T. L. Cycloaddition Induced by Cucurbituril. A Case of Pauling Principle Catalysis. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3619–3620.
- (2) Mock, W. L.; Irra, T. a; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. Catalysis by Cucurbituril. The Significance of Bound-Substrate Destabilization for Induced Triazole Formation. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302–5308.
- (3) Mock, W. L. Cucurbituril. *Arch. Gen. Psychiatry* **1995**, *175* (11), 1416–1418.
- (4) Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry in Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (6), 1053–1057.
- (5) Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809–12818.
- (6) Krasinski, A.; Radić, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686–6692.
- (7) Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radić, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-Frame Inhibitor Captures Acetylcholinesterase in a Unique Conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101* (6), 1449–1454.
- (8) Bourne, Y.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Steric and Dynamic Parameters Influencing in Situ Cycloadditions to Form Triazole Inhibitors with Crystalline Acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (5), 1611–1621.
- (9) Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44* (1), 116–120.
- (10) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; et al. Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (9), 1435–1439.
- (11) Peruzzotti, C.; Borrelli, S.; Ventura, M.; Pantano, R.; Fumagalli, G.; Christodoulou, M. S.; Monticelli, D.; Luzzani, M.; Fallacara, A. L.; Tintori, C.; et al. Probing the Binding Site of Abl Tyrosine Kinase Using in Situ Click Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (2), 274–277.
- (12) Hirose, T.; Sunazuka, T.; Sugawara, A.; Endo, A.; Iguchi, K.; Yamamoto, T.; Ui, H.; Shiomi, K.; Watanabe, T.; Sharpless, K. B.; et al. Chitinase Inhibitors: Extraction of the Active Framework from Natural Argifin and Use of in Situ Click Chemistry. *J. Antibiot.* **2009**, *62* (5), 277–282.
- (13) Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Loch, C.; Baulard, A.; Deprez, B. Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (11), 1007–1013.
- (14) Baulard, A. R. Dopage Dans Le Peloton Des Antituberculeux. *Nouvelles.* **2005**, pp 351–353.
- (15) Hu, M.; Chen, X.; Chen, S.; Ou, T.; Yao, M.; Gu, L. A New Application of Click Chemistry in Situ : Development of Fluorescent Probe for Specific G-Quadruplex Topology. *Nat. Publ. Gr.* **2015**, No. August, 1–9.
- (16) Agnew, H. D.; Rohde, R. D.; Millward, S. W.; Nag, A.; Yeo, W. S.; Hein, J. E.; Pitram, S. M.; Abdul Ahad Tariq, V.; Burns, A. M.; Krom, R. J.; et al. Iterative in Situ Click Chemistry Creates Antibody-

- like Protein-Capture Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4944–4948.
- (17) Millward, S. W.; Henning, R. K.; Kwong, G. A.; Pitram, S.; Agnew, H. D.; Deyle, K. M.; Nag, A.; Hein, J.; Lee, S. S.; Lim, J.; et al. Iterative in Situ Click Chemistry Assembles a Branched Capture Agent and Allosteric Inhibitor for akt1. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (45), 18280–18288.
- (18) Tieu, W.; Soares da Costa, T. P.; Yap, M. Y.; Keeling, K. L.; Wilce, M. C. J.; Wallace, J. C.; Booker, G. W.; Polyak, S. W.; Abell, A. D. Optimising in Situ Click Chemistry: The Screening and Identification of Biotin Protein Ligase Inhibitors. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (9), 3533.
- (19) Li, Y.; Wang, H.; Tarus, B.; Perez, M. R.; Morellato, L.; Henry, E.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Ramassamy, B.; Dhimane, H.; et al. Rational Design of a Fluorescent NADPH Derivative Imaging Constitutive Nitric-Oxide Synthases upon Two-Photon Excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109* (31), 12526–12531.
- (20) Wang, J.; Uttamchandani, M.; Li, J.; Hu, M.; Yao, S. Q. Rapid Assembly of Matrix Metalloprotease Inhibitors Using Click Chemistry. *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3821–3824.
- (21) Artyushin, O. I.; Sharova, E. V.; Yarkevich, A. N.; Genkina, G. K.; Vinogradova, N. V.; Brel, V. K. Design of Phosphonate Analogs of Short Peptides by “click” Chemistry. *Russ. Chem. Bull.* **2015**, *64* (9), 2172–2177.
- (22) Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-billiard, C.; Rohmer, M. Catechol – Rhodanine Derivatives : Specific and Promiscuous Inhibitors of *Escherichia Coli* Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3713–3719.
- (23) Tritsch, D.; Zinglé, C.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. Flavonoids: True or Promiscuous Inhibitors of Enzyme? The Case of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Chem.* **2015**, *59*, 140–144.

Chapitre 4 : Nouvelle cible au sein de la DXR

Chapitre 4 : Nouvelle cible au sein de la DXR

I. Introduction

Les sites de fixation du DXP et du cofacteur sont très proches, permettant de favoriser la réaction de réduction du substrat. Il est intéressant de noter qu'entre les deux se trouve une zone hydrophobe qui assure une interaction avec le cycle nicotinamide et le squelette carboné du substrat. Cette zone implique un tryptophane et deux méthionines (Trp212, Met214 et Met276, numérotation pour l'enzyme d'*E. coli*) et pourrait être exploitée comme une cible potentielle

L'équipe de Dowd a développé des inhibiteurs de type bisubstrat *N*-acyle et *O*-liés de la DXR (Fig. 171). Leurs travaux ont montré que certains inhibiteurs étaient non-compétitifs du NADPH et qu'ils se fixaient à l'enzyme via un nouveau mode de fixation, à proximité du site actif.¹

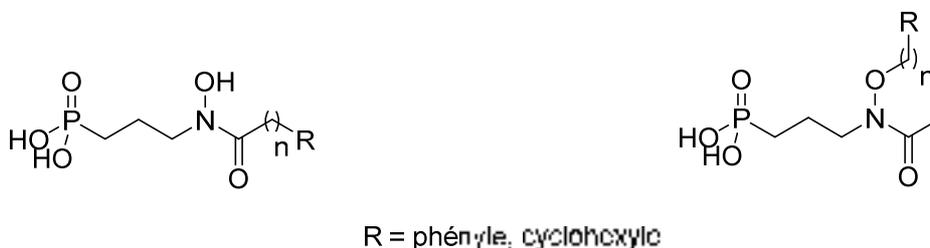


Figure 171 : Composés *N*-acyles et *O*-liés décrits par l'équipe de Dowd.¹

Auparavant, l'équipe de Schlitzer avait également observé la capacité de certains composés à se fixer en dehors du site du DXP. A partir d'étude de docking, ils ont supposé que ces inhibiteurs se fixaient via une liaison hydrogène entre un carbonyle placé de manière appropriée sur une chaîne acyle et la chaîne principale de la méthionine 214 localisée dans la boucle flexible de l'enzyme et recouvrant le site actif.² Cependant, leur activité sur l'enzyme d'*E. coli*, bien qu'intéressante, reste inférieure à celles de la fosmidomycine et du FR-900098. Les meilleurs composés possèdent un IC₅₀ dans le bas micromolaire (1.3-20 μM), ce qui reste modeste en comparaison à la fosmidomycine et au FR-900098 qui inhibent dans le bas nanomolaire (35 nM) la DXR d'*E. coli*.

En collaboration avec l'équipe de modélisation moléculaire, nous avons désiré cibler la zone se trouvant entre les deux sites de fixation du DXP et du NADPH. Pour ce faire, nous avons choisi de nous orienter vers un groupement dansyle (Fig. 172).

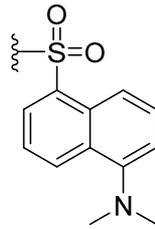


Figure 172 : Groupement dansyle.

Le groupement dansyle est un fluorophore absorbant à 335 nm et émettant à 520 nm (NADPH : 340/460). Il est largement utilisé dans de nombreuses applications biologiques. Sa petite taille et ses propriétés fluorescentes rendent ce composé intéressant. En effet, un inhibiteur efficace, portant un tel groupement pourrait être suivi par microscopie à fluorescence lors de tests biologiques.

II. Modélisation du dansyle dans la poche

Nos collaborateurs ont ainsi réalisé des études de modélisation moléculaire d'analogues de la fosmidomycine, fonctionnalisés avec un groupement dansyle.³ Les études ont été réalisées selon le même protocole utilisé pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat et développé dans le chapitre 2 (pages 153).

Les résultats de ces analyses de docking nous ont confortés dans ce choix. L'image **A** de la figure 173 issue de cette étude, montre que le dansyle se trouverait dans une zone hydrophobe, différente de la zone de fixation du NADPH (**B**, Fig. 173).

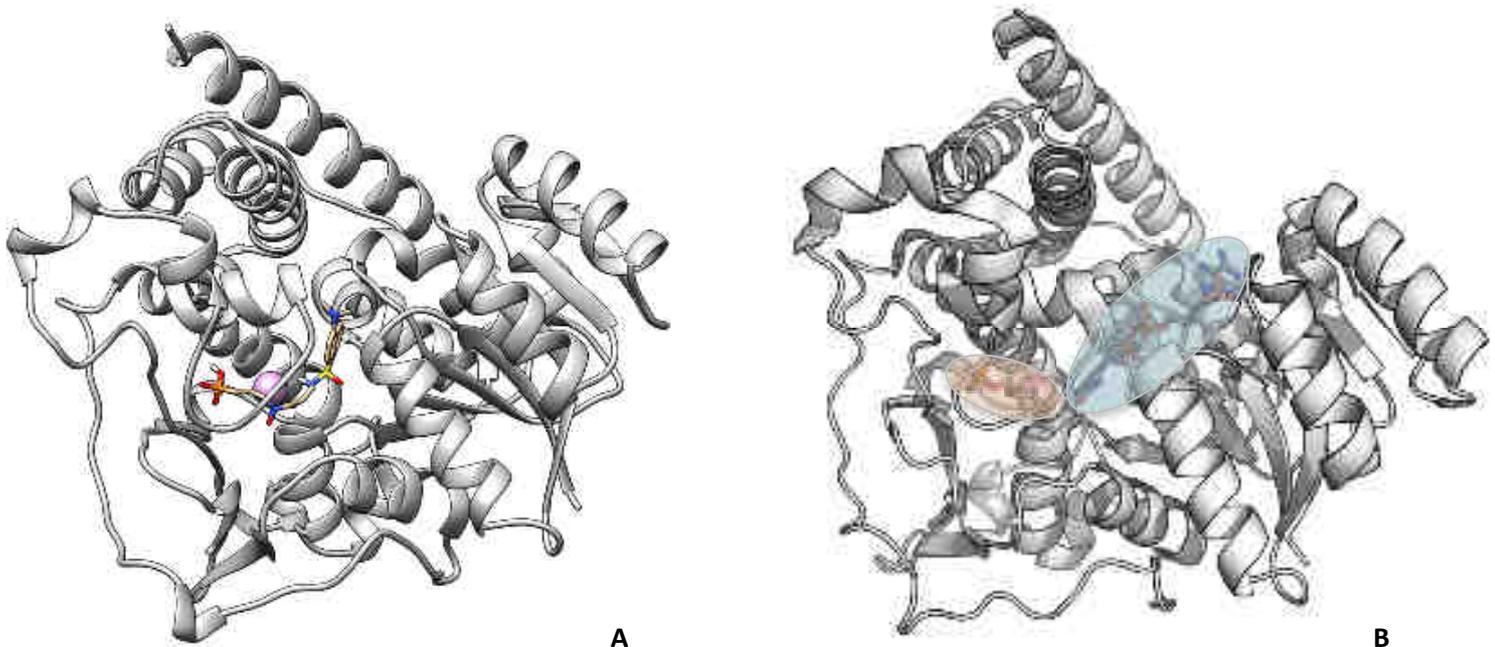


Figure 173 : A. DXR avec un inhibiteur de type dansyle obtenue par analyse de docking ; B. DXR en présence du DXP, du métal et du NADPH à droite. Les ligands sont représentés en bâtonnets et le métal en sphère. Le PDBid de la structure est 1QQQ.⁴

Afin d'étudier l'influence de la longueur de chaîne entre la pince chélatant le métal et le groupement dansyle, nous avons choisi de réaliser la synthèse de ces composés pour une longueur de chaîne de 1 à 4.

III. Synthèse des inhibiteurs de type dansyle

1. Schéma rétro-synthétique

D'un point de vue rétro-synthétique, les inhibiteurs ciblés **297a-d** pourraient être obtenus par déprotection des dérivés **295a-d** (Fig. 174).

La synthèse de ces derniers pourrait être conduite par condensation des dérivés amine **290a-d** sur le chlorure de dansyle commercial **291**. Les amino-phosphonates seraient eux-mêmes obtenus par hydrogénation catalytique des azotures **150a-d** ou par un couplage de type peptidique entre les intermédiaires **143** et **293a-d**.

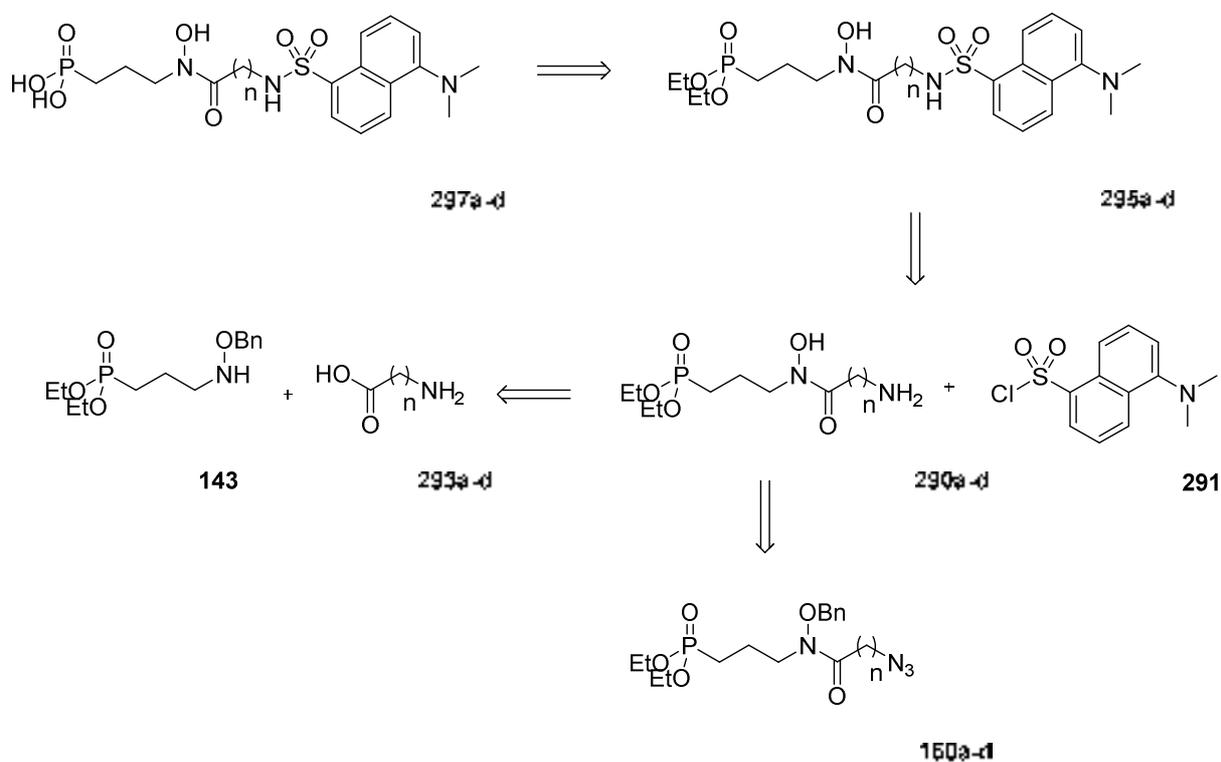


Figure 174 : Schéma rétro-synthétique de la synthèse des analogues dansyle de la fosmidomycine **150a-d**.

2. Synthèse des analogues dansylés

La description de la synthèse des azotures de longueur de chaîne comprise entre 1 et 4 atomes de carbone entre le groupement carbonyle et l'azoture a été développée dans le chapitre 1. La réduction des quatre intermédiaires **150a-d**, se fait par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif, permettant la déprotection concomitante du benzyle (Fig. 175). La purification s'est révélée délicate car les composés sont très polaires. Ils sont purifiés par colonne chromatographique sur couche mince

avec ajout d'acide formique pour aider à la migration. Les produits **290a-d** sont ainsi obtenus sous forme de sels.

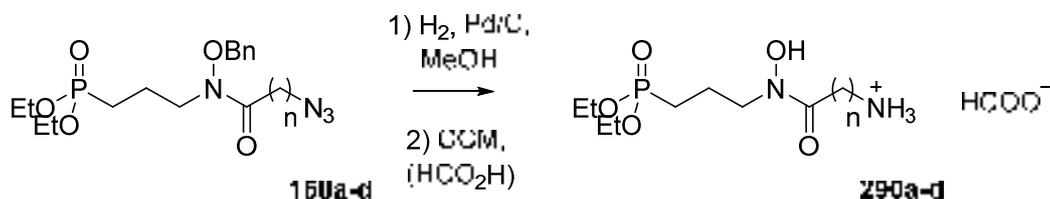


Figure 175 : Hydrogénolyse des azotures.

Après avoir libéré l'amine de son sel, celle-ci est condensée sur le chlorure de dansyle commercial (Fig. 176).

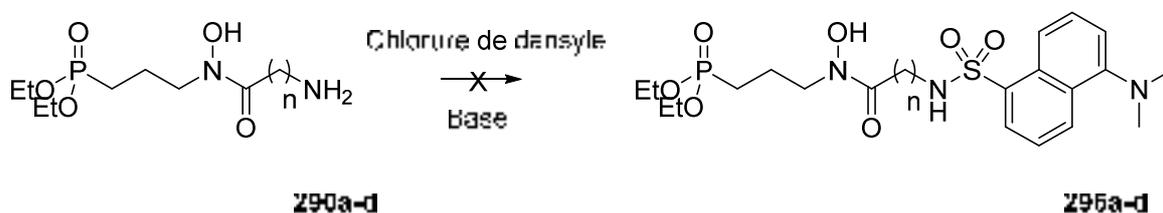


Figure 176 : Condensation des amines sur le chlorure de dansyle.

Pour ce faire, une base non nucléophile, de type triéthylamine ou carbonate de potassium, a été utilisée.^{5,6}

Toutefois, dans le cas des longueurs $n = 3$ et 4 , nous observons en RMN ^1H des signaux qui correspondraient aux groupements méthylènes de la γ -butyrolactame (entrée 1, Tab. 27) et de la δ -valérolactame (entrée 2, Tab. 27).

Tableau 27 : Déplacements chimiques attribués aux lactames dans le CDCl_3 .

ENTREE	COMPOSE	DEPLACEMENTS CHIMIQUES OBSERVES EN ^1H (PPM)
1		6.13 (s, 1H), 3.40 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.30 (m, 2H), 2.20 – 2.07 (m, 2H).
2		5.92 (s, 1H), 3.37 – 3.29 (m, 2H), 2.38 (m, 2H), 1.88 – 1.74 (m, 4H).

De ce fait, si l'amine se cyclise et conduit à la formation de ces lactames, nous devrions retrouver l'hydroxylamine **Z** (Fig. 177).

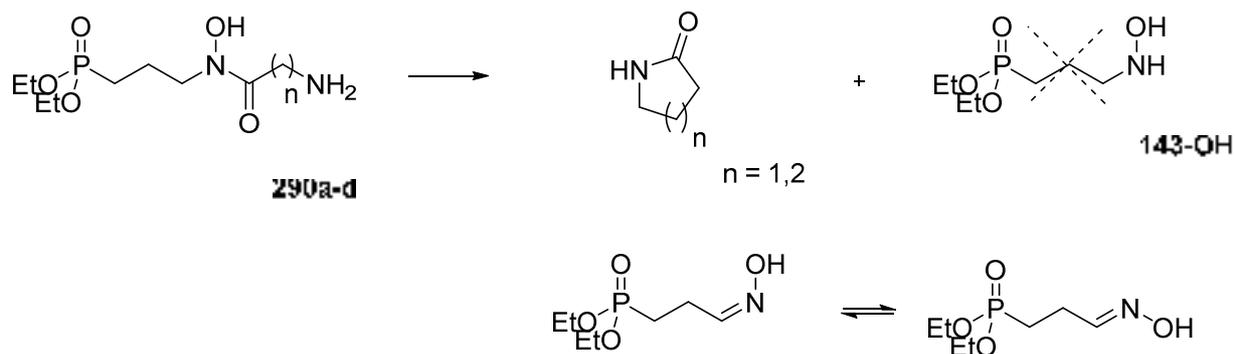


Figure 177 : Formation hypothétique de la 2-pyrrolidinone ou 2-piperidone et de l'oximes syn et anti en équilibre.

Cependant, l'analyse des spectres RMN ^1H , montre l'apparition de deux triplets intégrant pour un proton chacun, aux alentours de 6,80 ppm et 7,48 ppm correspondants à des protons éthyléniques. De plus, deux doublets sont observés en ^{13}C RMN, vers 150,0 et 150,7 ppm possédant une constante de couplage de respectivement 16,3 Hz et 14,7 Hz. Cette constante peut être attribuée à un couplage carbone-phosphore en J^{β} déjà observé dans les spectres d'autres molécules que nous avons synthétisées. A partir de ces données spectrales, nous envisageons avoir formé une oxime, présente sous la forme de deux conformères, *syn* et *anti*, en équilibre à température ambiante (Fig. 177).

Pour une longueur de chaîne, $n = 2$, aucun essai sur le chlorure de dansyle n'a été réalisé. En revanche, nous avons déprotégé les groupements éthyles portés par le phosphonate en utilisant du TMSBr dans le DCM, pour évaluer l'activité inhibitrice de cette molécule en tant qu'inhibiteur (Fig. 178). Cette molécule a pu être testée sur l'enzyme selon les mêmes conditions que celles indiquées dans les chapitres précédents et a révélé une IC_{50} de 240 μM , ce qui en fait l'un des inhibiteurs les moins efficaces, testés dans le cadre de ces travaux.

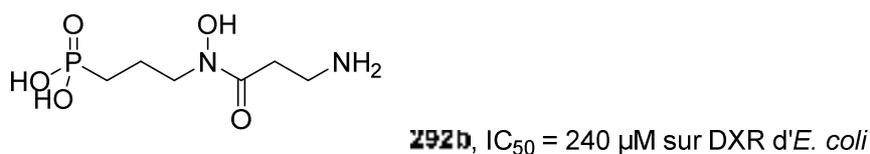


Figure 178 : Inhibiteur de type amine testé sur la DXR d'*E. coli*.

Par ailleurs, l'étude des spectres RMN indique que celui-ci est présent sous la forme de deux conformères *Z/E* dans un rapport 30/70. En effet, le conformère *E* qui résonnerait à champ plus faible serait caractérisé par des déplacements chimiques de 3,71 et 2,91 ppm, pour les méthylènes en α de l'azote et du carbonyle. Le conformère *Z* serait quant à lui caractérisé par des déplacements à 3,35 et 2,75 ppm pour les mêmes méthylènes.

La synthèse des dérivés possédant une longueur de $n=1$ a été réalisée, toutefois l'analyse du mélange brut réactionnel en RMN ^1H montre qu'aucune conversion n'a eu lieu.

N'ayant pu obtenir les composés souhaités par cette méthode, nous avons envisagé d'insérer l'espaceur via une réaction de couplage entre la benzyloxyamine **143** et l'acide γ -aminobutyrique **293c**. Deux tests de couplage peptidique entre le diéthyl (3-((benzyloxy)amino)propyl) phosphonate et l'acide γ -aminobutyrique ont été effectués (Fig. 179) : dans le premier cas à l'aide de l'agent de couplage EDC.HCl et de l'activateur HOBt, en présence de la DIPEA dans le dichlorométhane ; dans le second cas, avec pour agent de couplage le DCC et l'agent activateur HOBt dans le THF.

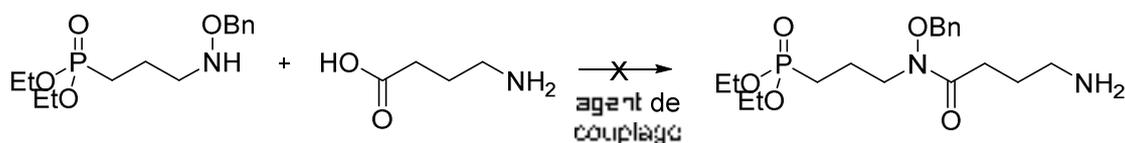


Figure 179 : Couplage de type peptidique entre l'hydroxylamine **143** et l'acide γ -aminobutyrique **293c**.

Dans les deux cas, aucune consommation totale du phosphonate de départ n'a pu être observée par CCM. Cependant, nous observons la formation de l'urée. Il est donc possible que deux équivalents de l'acide γ -aminobutyrique aient réagi de façon intermoléculaire ou qu'il y est eu cyclisation conduisant à la formation de la γ -butyrolactame

À la vue de ces résultats, nous avons choisi de mettre en place une stratégie de synthèse convergente qui consiste à condenser le phosphonate **143** avec le groupement dansyle, sur lequel l'espaceur aura été préalablement greffé (Fig. 180). En effet, une condensation des amino-acides de différentes longueurs **293a-d**, avec le chlorure de dansyle **291** devrait permettre d'accéder aux produits souhaités **294a-d**. La synthèse de la benzyloxyamine **143** a été décrite au chapitre 1 (pages 107).

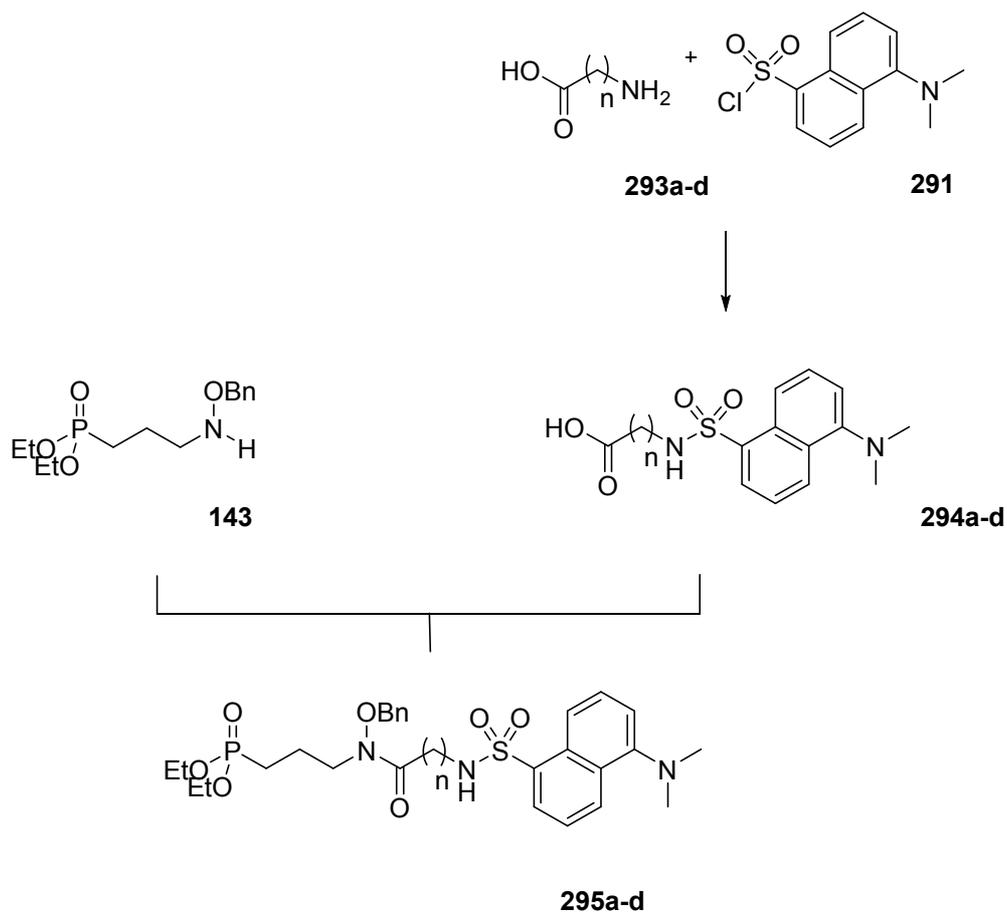


Figure 180 : Stratégie de synthèse convergente.

La synthèse des composés **294a-d** débute par un couplage des amino-acides à savoir, la glycine, la β -alanine, l'acide γ -aminobutyrique et l'acide 5-aminovalérique, de longueur comprise entre 1 et 4 atomes de carbone, avec le chlorure de dansyle, en milieu aqueux basique (Fig. 181).⁷ Les dérivés ont été obtenus avec des rendements compris entre 75 et 95 %, pour les quatre longueurs de chaîne.

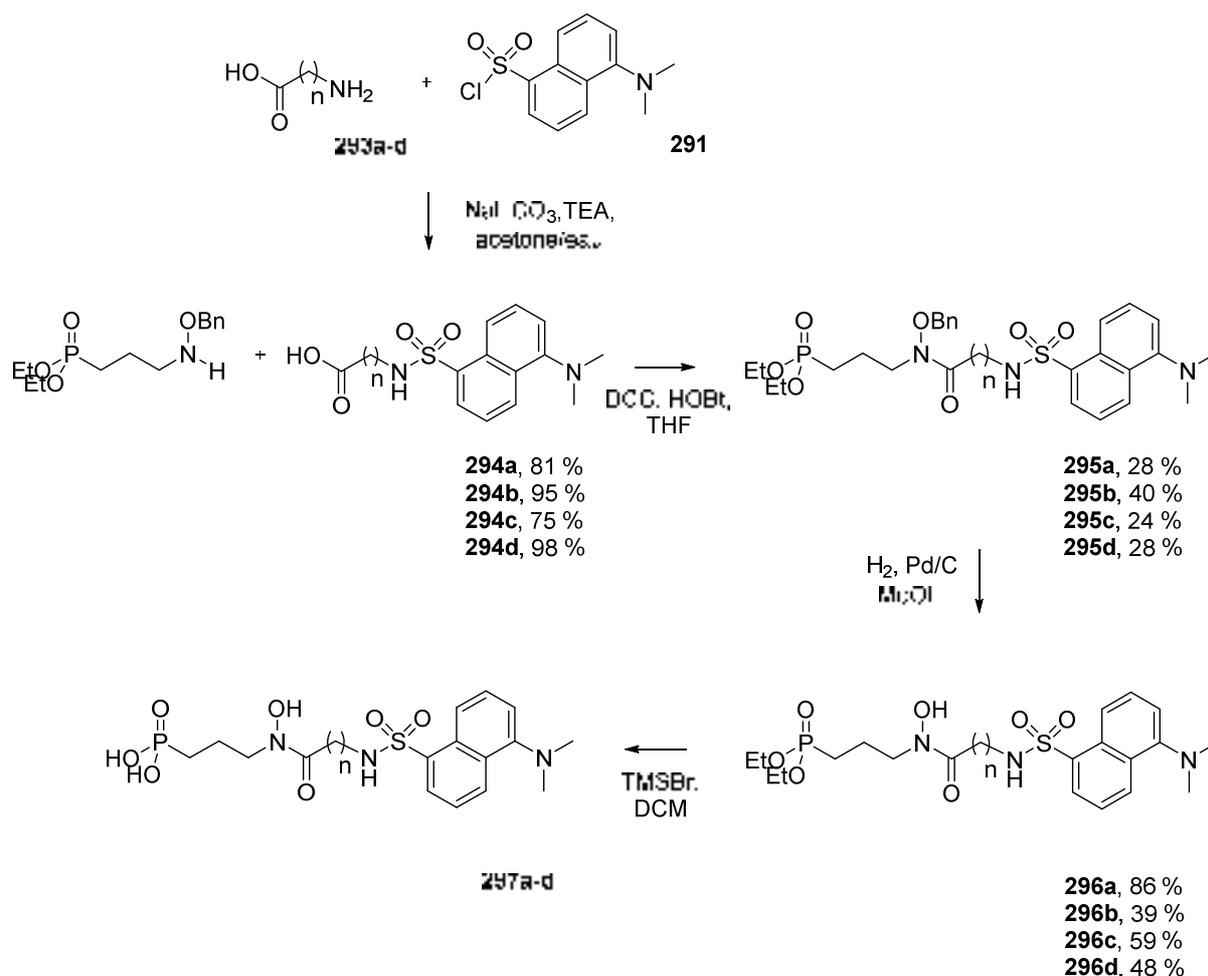


Figure 181 : Synthèse des analogues de la fosmidomycine, fonctionnalisés avec un groupement dansyle.

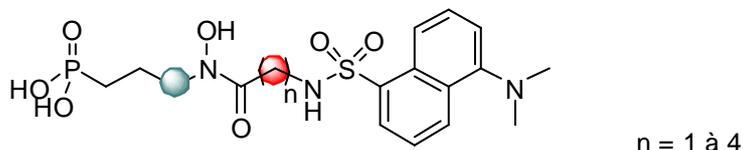
Le diéthyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** est ensuite traité avec les dérivés de dansyle **294a-d**, en présence du DCC et HOBT dans le THF. En utilisant les conditions de purification mise au point dans le cas des bisubstrats, les différents intermédiaires **295a-d** ont été obtenus avec des rendements compris entre 28 et 40 %, pour les quatre longueurs de chaîne. Le groupement benzyle est ensuite déprotégé par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif dans le méthanol avec des rendements variant de 39 à 88 % à nouveau pour les quatre longueurs de chaîne. Pour finir, les éthyl phosphonates sont déprotégés en présence de TMSBr dans le DCM.

3. Etudes spectroscopiques RMN des inhibiteurs de type dansyle.

Lors de l'analyse des produits finaux, la présence de deux conformères a été observée. En accord avec les hypothèses faites dans les chapitres précédents, les protons en α de l'azote seraient plus déblindés pour la conformation *E*.

Par hypothèses, le conformère *E* est caractérisé par un déplacement chimique proche de 3,6 ppm pour le méthylène en α de l'azote, tandis que le même méthylène du conformère *Z* résonne aux alentours

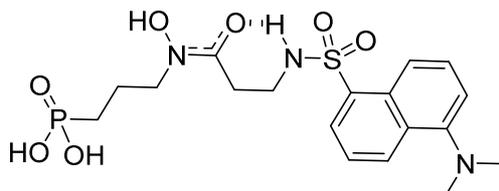
de 3,35 ppm. A partir de ces analyses, nous avons pu déterminer le rapport des conformères *Z* et *E*, qui est résumé dans le tableau 28.

Tableau 28 : Proportions des conformères *Z* et *E* par analyse RMN dans le CD₃OD.

ENTREE	Composé	n	$\delta(\text{CH}_2\text{N})$ en ppm (<i>Z/E/autre</i>)	$\delta(\text{CH}_2\text{CO})$ en ppm (<i>Z/E/autre</i>)	Proportions (%) <i>Z/E/autre</i>
1	297a	1	3,35/-/-	3,82/-/-	100/-/-
2	297b	2	3,34/-/3,50	2,41/-/2,58	15/-/85
3	297c	3	3,34/-/-	2,22/-/-	100/-/-
4	297d	4	3,34/3,61/-	2,12/2,27/-	20/80/-

Pour une longueur de chaîne d'un carbone (**297a**, entrée 1) et de trois carbones (**297c**, entrée 3), seul le conformère *Z* serait présent. Cette forme pourrait être favorisée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire ou intermoléculaire entre une molécule d'eau et l'acide hydroxamique.

Pour $n = 2$, en dehors du signal à 3,34 ppm pour le $\delta(\text{CH}_2)$ en α de l'azote correspondant aux conformères *Z*, nous observons l'apparition d'un signal à 3,5 ppm pour le même méthylène, ne correspondant pas au conformère *E* et qui pourrait être attribué à un autre conformère. Ainsi, ce composé serait présent sous la forme du conformère *Z* accompagné d'un autre conformères dans des proportions 15/85. Cependant, à ce stade et avec les informations dont nous disposons, il ne nous a pas été possible de déterminer la structure de ce conformère supplémentaire. Il pourrait correspondre à un cycle à 6 chaînons, résultant d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le carbonyle de l'hydroxamate et le N-H du sulfonamide (Fig. 182).

Figure 182 : Liaison hydrogène intramoléculaire conduisant à la formation d'un cycle à 6 pour **297b**.

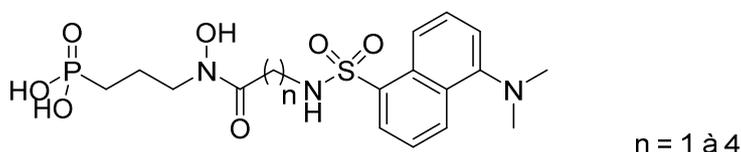
Pour le composé **297d** (n = 4), seuls les conformères *Z* et *E* seraient présents dans un ratio 20/80, en faveur du conformère *E*. A noter que c'est un équilibre lent, puisque les proportions varient en fonction du temps.

4. Evaluation biologique

a. Tests enzymatiques sur la DXR purifiée d'*E. coli*

Les deux méthodes de tests enzymatiques, citées précédemment, ont été appliquées à cette nouvelle série d'inhibiteurs potentiels. Les résultats sont présentés dans le tableau 29. Pour rappel, dans le cadre de la méthode 1, l'inhibiteur est incubé en présence du NADPH pendant 2 min à 37 °C, puis la réaction enzymatique est initiée par l'ajout du DXP. Pour la méthode 2, l'inhibiteur est incubé en présence de DXP pendant 2 min à 37 °C, puis la réaction enzymatique est initiée par l'ajout du NADPH.

Tableau 29 : Activité inhibitrice des inhibiteurs de type dansyle.



ENTREE	Composé	n	IC ₅₀ Méthode 1 (μM)	IC ₅₀ Méthode 2 (μM)
1	297a	1	0,076	0,206
2	297b	2	16,8	1,5
3	297c	3	15,8	1,1
4	297d	4	3,1	Inhibition maximale à 40 %

Cette nouvelle série nous a permis de mettre en évidence le potentiel du composé **297a** (entrée 1, Tab. 29), dont l'activité inhibitrice surpasse celle de tous les composés obtenus lors de ces travaux de thèse. En effet, avec une IC₅₀ de 76 nM (méthode 1), il se rapproche de la fosmidomycine et du FR-900098 dont les IC₅₀ sont d'environ 32 nM.⁸ A noter que même selon la méthode 2, son activité est de l'ordre du nanomolaire, ce qu'aucun des composés présentés auparavant n'avait atteint. De plus, la différence d'inhibition observée entre ces deux méthodes nous indique que la présence du cofacteur favoriserait la fixation de l'inhibiteur au niveau du site du DXP.

Nous pouvons également remarquer que lorsque la longueur de chaîne augmente de 1 à 4, les inhibiteurs perdent en activité inhibitrice mais que l'inhibiteur **297d** (entrée 4, Tab. 29) retrouve une activité proche d'une concentration nanomolaire selon la méthode 1. Cependant, selon la méthode 2, ce dernier possède une activité maximale inhibitrice de 40 %. À la vue de ces résultats, nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que les composés **297a** et **297d**, sont des inhibiteurs qui se fixeraient probablement selon deux modes distincts sur l'enzyme.

b. Tests *in vitro* sur boîte de Pétri

Afin de confirmer le potentiel de ces quatre composés, leur évaluation *in vitro* a été réalisée sur une souche d'*E. coli* par la méthode de diffusion en milieu solide gélosé (Fig. 183). Les quantités d'inhibiteurs déposés sont d'environ 30 nanomoles tandis que le dépôt de la fosmidomycine est de 2 nanomoles. Les diamètres de la zone d'inhibition sont regroupés dans le tableau 30.

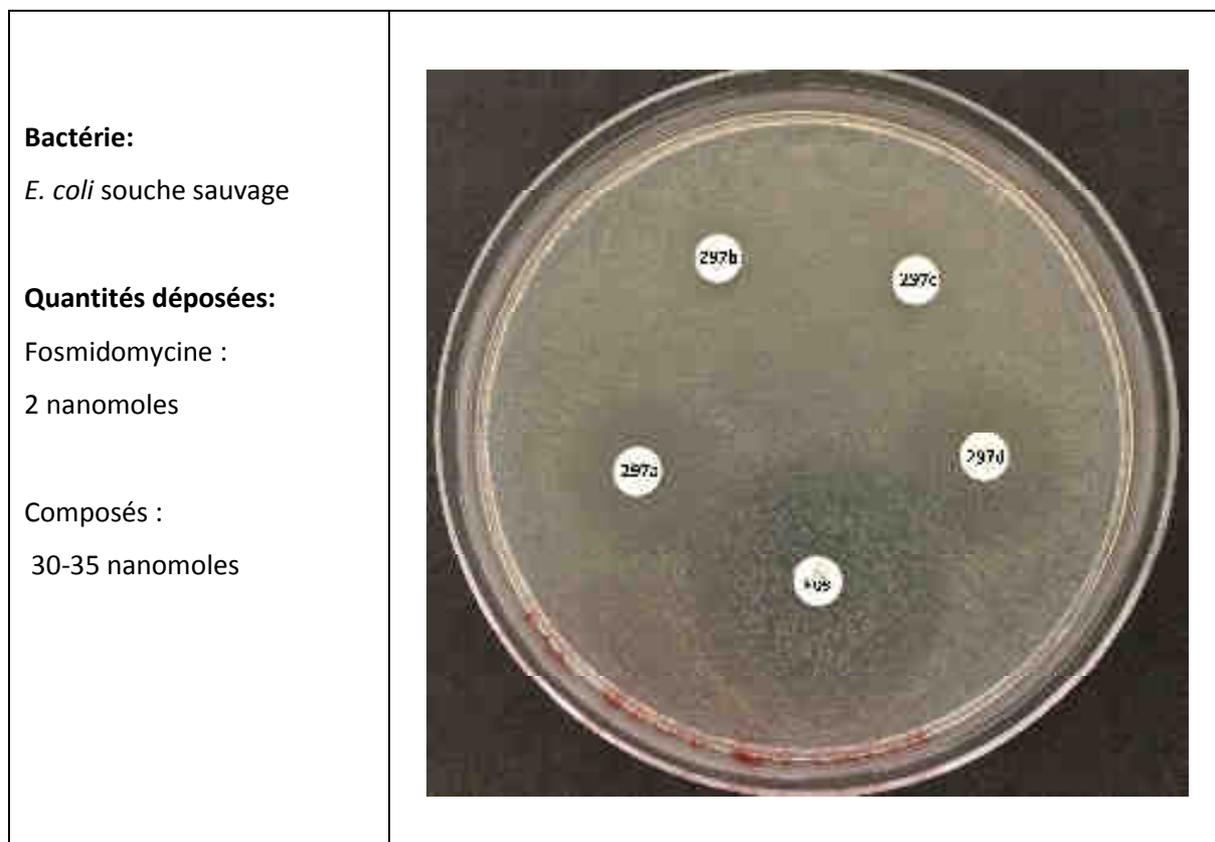
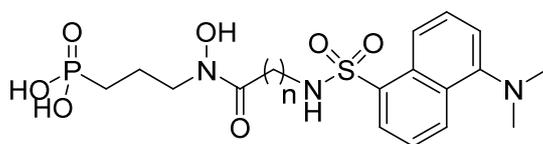


Figure 183 : Antibiogramme des inhibiteurs de type dansyle.

Tableau 30 : Tests *in vitro* des inhibiteurs de type dansyle.



n = 1 à 4

ENTREE	Composé	n	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Diamètre de la zone d'inhibition de la Fosmidomycine (mm)
1	297a	1	21	35
2	297b	2	12	35
3	297c	3	14	35
4	297d	4	20	35

En accord avec les tests enzymatiques, c'est le composé **297a** (entrée 1) qui montre un diamètre de zone d'inhibition le plus élevé. Le composé **297d** (entrée 4), montre un diamètre équivalent au composés **297a**. Or le composé **297a** avait une activité inhibitrice bien supérieure par rapport au composé **297d**. Ce dernier possède probablement une meilleure capacité à pénétrer au sein de la bactérie.

Le suivi du devenir de ces composés dans la bactérie pourra être envisagé par microscopie en fluorescence.

c. Test sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine

Les composés ont été testés sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine par mutation des transporteurs du glycérol 3-phosphate et du glucose 6-phosphate (Fig. 184). Aucun d'entre eux n'a été en mesure d'inhiber cette souche, indiquant que ces inhibiteurs utilisent les mêmes transporteurs que la fosmidomycine car les bactéries sont résistantes à celle-ci.

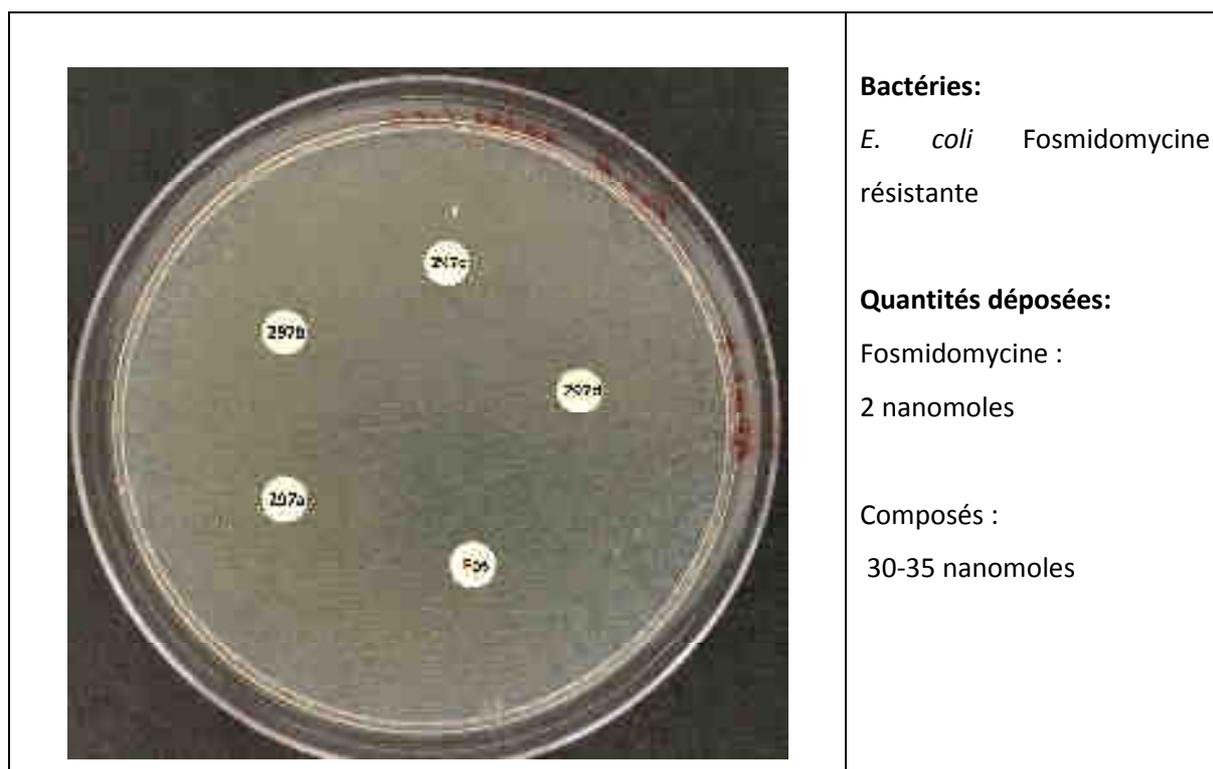


Figure 184 : Antibiogramme des inhibiteurs de type dansyle sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine.

A ce jour, nous n'avons pas d'explication concernant le fossé observé entre la très bonne IC₅₀ du composé **297a** et sa moins bonne activité *in vitro*. Nous pouvons à ce stade, émettre plusieurs hypothèses. Tout d'abord, un problème de solubilité pourrait être la cause, limitant ainsi la diffusion

de nos composés sur disque. Ensuite, bien que nos composés utilisent le même transporteur que la fosmidomycine, leur taille plus importante pourrait limiter leur passage au travers de la membrane. Ils pourraient également être sujet à dégradation, ce qui pourrait expliquer la nécessité de fortes quantités en inhibiteur en comparaison de la quantité de fosmidomycine utilisée. Enfin, ces composés pourraient être rejetés hors de la cellule bactérienne par des pompes à efflux.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons synthétisé des dérivés de la fosmidomycine portant, via un espaceur de différentes longueurs, un groupement dansyle. L'objectif était d'étudier la capacité de ces composés à se fixer à la DXR en exploitant des interactions situées entre le site actif du DXP et du cofacteur.

Nous avons été en mesure d'obtenir quatre composés avec des rendements respectifs globaux de 19.5 % (n = 1), 14.8 % (n = 2), 10.6 % (n = 3) et 13.2 % (n = 4) avant déprotection finale.

Ces molécules ont ensuite été testées sur la DXR d'*E. coli* et ont montré une bonne activité inhibitrice, notamment le composé **297a**, qui est un très bon candidat avec une IC₅₀ de 76 nM, comparable à celle de la fosmidomycine sur cette même souche. Le regain d'activité inhibitrice du composé **297d** selon la méthode 1, en corrélation avec l'augmentation de la longueur de l'espaceur montre qu'il serait intéressant de réaliser la synthèse de nouveaux inhibiteurs possédant des longueurs de chaînes plus grandes. Ainsi, nous pourrions déterminer si une chaîne plus longue pourrait ou non améliorer l'activité inhibitrice des composés.

Par ailleurs, ces deux composés, **297a** et **297d**, devraient faire l'objet d'études plus poussées pour comprendre leur mode de fixation. Ainsi, la mesure des K_i, permettrait de déterminer si ces inhibiteurs sont compétitifs vis-à-vis du NADPH ou s'ils se fixent dans la poche. Enfin, nous pourrions réaliser une étude cristallographique de ces composés en présence de la DXR, pour définir avec précision les sites de fixation de chacun. En fonction des résultats, les bons IC₅₀ ou les maximums d'inhibition obtenus selon la méthode 2, montreront peut-être une corrélation entre les sites ciblés et permettront d'utiliser cette méthode 2 en tant que modèle. De plus, si le composé **297a** se fixe bien dans la poche hydrophobe ciblée, il sera peut-être plus pertinent dans le futur de chercher à cibler cette poche et non celle du NADPH.

Les résultats sur boîte de Pétri, bien qu'inférieurs à ceux de la fosmidomycine sont très intéressants. Ils mettent en évidence une modification au regard de la stabilité ou de la solubilité de ces composés, par rapport la fosmidomycine. Par ailleurs, tous les composés testés au cours de ce chapitre ont montré une activité inhibitrice dans le bas micromolaire, ce qui confirme l'intérêt du groupement dansyle.

En revanche, aucun des composés n'a été en mesure d'inhiber la croissance des bactéries d'une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine. Cela pourrait être dû à l'absence de transporteur. Pour pallier les problèmes de biodisponibilité liés à la polarité de ces molécules, il serait intéressant dans le futur de masquer le phosphonate sous forme de prodrogue. Des travaux concernant une nouvelle approche du type *cycloSaligényle* ont été initiés au sein de notre laboratoire. Il conviendra donc peut-être d'adapter cette approche de type prodrogue à nos meilleurs inhibiteurs et tout particulièrement au composé **297a** (Fig. 184). Il sera aussi important comme indiqué auparavant d'étudier avec plus de précision le mode de fixation de ce dernier dans l'enzyme.

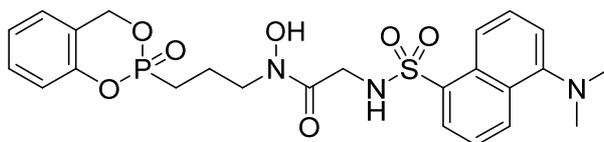


Figure 184 : Prodrogue de type cycloSaligényle.

- (1) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Uh, E.; Johny, C.; Haymond, A.; Lundberg, L.; Pinkham, C.; Kehn-Hall, K.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; et al. Design of Potential Bisubstrate Inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr)-Evidence of a Novel Binding Mode. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 1099–1104.
- (2) Ortman, R.; Wiesner, J.; Silber, K.; Klebe, G.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Novel Deoxyxylulosephosphate-Reductoisomerase Inhibitors: Fosmidomycin Derivatives with Spacious Acyl Residues. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 483–490.
- (3) Krebs, F. Etudes in Silico et Expérimentale de La DXR et Synthèse de D- et L-GAP Énantiofériquement Purs. PhD thesis, Université de Strasbourg, 2016.
- (4) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E. Coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115–127.
- (5) Ferla, B. La; Spinosa, V.; Palazzo, M.; Balsari, A.; Foppoli, A. A.; Rumio, C.; Nicotra, F. Dansyl C - Glucoside as a Novel Agent Against Endotoxic Shock. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1677–1680.
- (6) Zoidl, M.; Müller, B.; Torvisco, A.; Tysoe, C.; Benazza, M.; Siriwardena, A.; Withers, S. G.; Wrodnigg, T. M. Concise Synthesis of C-1-Cyano-Iminosugars via a New Staudinger / Aza Wittig / Strecker Multicomponent Reaction Strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2777–2780.
- (7) Petry, S.; Nazare, M.; Schmidt, T.; Matter, H. Fluorescence-Labeled Fatty Acids and Uses Thereof. Patent US2015/0285812 A1, 2015.
- (8) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3203–3207.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons souhaité concevoir de nouveaux inhibiteurs de la voie du MEP, impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez de nombreuses bactéries pathogènes. Cette voie comporte sept enzymes, qui peuvent toutes être des cibles potentielles, dans la synthèse de nouveaux antimicrobiens. La seconde enzyme, à savoir la DXR est particulièrement bien décrites et de nombreux inhibiteurs sont rapportés dans la littérature. Cette enzyme catalyse le réarrangement du DXP en MEP en présence d'un cation divalent et du cofacteur NADPH.

La fosmidomycine et son analogue méthylé (FR-900098), sont deux inhibiteurs naturels, montrant l'un des meilleurs pouvoirs inhibiteurs sur différentes souches. Ces deux composés ont servi de modèle dans la synthèse d'une grande partie des inhibiteurs synthétiques. En effet, le phosphonate est l'un des seuls groupements acceptés par l'enzyme pour se fixer au point d'ancrage du phosphate du DXP. L'acide hydroxamique (ou retro-hydroxamique) se chélate au métal présent dans l'enzyme et un espaceur de 3 atomes de carbone entre ces deux fonctions permet un positionnement optimal de celles-ci dans l'enzyme. La plupart des travaux, ont ainsi eu pour but de modifier ces trois points clés. Dans le cadre de nos travaux, nous avons souhaité cibler à la fois le site de fixation du DXP ainsi que celui du NADPH afin d'augmenter l'efficacité et l'affinité de nos composés.

Dans une première approche, dite biligand, nous avons choisi de préparer deux molécules judicieusement fonctionnalisées : une mimant le site du DXP et l'autre le site du NADPH. Une fois dans l'enzyme, elles devraient réagir entre elles et conduire à un inhibiteur unique, *via* la formation de liaison covalente. Pour conceptualiser au mieux nos mimes, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de modélisation moléculaire du Dr. Roland Stote et les travaux ont été réalisés par le Dr. Fanny Krebs et le Dr. Jérémy Esque. Nous avons ainsi choisi de synthétiser, d'une part un mime de la fosmidomycine fonctionnalisé avec un azoture et, d'autre part un cycloalcyne contraint portant le mime du NADPH. Ces deux groupements bioorthogonaux, devraient réagir *via* une réaction de click *in situ*, accélérée par le cycle contraint. Une série d'azotures avec un espaceur de longueur variable a été synthétisée avec succès et leurs bonnes inhibitions nous ont confortés dans notre projet. En effet, leur évaluation biologique sur la DXR purifiée et sur antibiogramme a montré que ce sont de bons inhibiteurs avec des valeurs d'IC₅₀ dans le bas micromolaire. L'azoture possédant le plus petit espaceur présente la capacité la plus importante à inhiber la croissance des bactéries. Au vu de ces bons résultats, la synthèse de ceux-ci, avec un acide hydroxamique (pince dite inversée) a également été entreprise mais s'est révélée plus délicate et ils n'ont pu être testés à ce jour. Nous avons également synthétisé une série de mimes de la fosmidomycine fonctionnalisés par un brome ou hydroxyle qui

pourraient permettre de greffer les mimes du NADPH. Après de nombreux essais, seuls deux inhibiteurs ont pu être testés sur la DXR d'*E. coli* et le composé portant un brome de longueur d'espaceur $n = 4$ a montré une activité intéressante.

Pour la synthèse des cycloalcynes contraints, de multiples essais ont été réalisés mais, à ce jour, aucune des voies de synthèse mises en œuvre ne nous a permis d'accéder aux composés souhaités. Au vu de ces difficultés, il sera peut-être préférable dans le futur de se procurer des cyclooctynes commerciaux, relativement onéreux, et d'y condenser les mimes de NADPH, synthétisés au laboratoire.

La seconde approche, consiste à synthétiser une molécule unique, ciblant toujours à la fois le site du DXP et du NADPH. Cette dernière, appelée approche bisubstrat, a été développée par quelques groupes qui ont réussi à cibler le site du NADPH avec plus ou moins de succès. Comme pour l'approche biligand, la partie mime du DXP reprend les trois points clés de la fosmidomycine sur lequel seront greffés les mimes du nicotinamide du NADPH, du type aromatique, *via* des espaceurs de 1 à 4 atomes de carbone. La synthèse de quatorze composés a pu être réalisée, ainsi que leur évaluation biologique sur la DXR purifiée selon deux méthodes, et sur la croissance d'*E. coli*. Les premiers résultats obtenus sont très intéressants car la quasi-totalité des composés inhibent la DXR. Toutefois, nous avons observé des résultats assez surprenants concernant les tests d'inhibition de la DXR, permettant d'évaluer la capacité des inhibiteurs à se fixer dans la poche du NADPH. En effet, certains composés ont montré un maximum d'inhibition de 50 %, tandis que d'autres ont été capables d'inhiber la DXR dans le bas micromolaire. Ces résultats sont d'autant plus étonnants, que ceux montrant ce maximum ont été capables d'inhiber sur antibiogramme une souche d'*E. coli*. Ces résultats indiquent que les composés se fixeraient de manière différente dans l'enzyme. Il a en effet été observé que les inhibiteurs conçus pour mimer le site du NADPH cibleraient pour certains une poche hydrophobe située entre le DXP et le NADPH. Il sera donc intéressant dans le futur de réaliser des études complémentaires pour vérifier le mode de fixation de ces bisubstrats dans l'enzyme. La détermination des K_i pourra permettre de voir si ces composés sont des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du NADPH. Pour finir, il sera intéressant d'achever la synthèse des inhibiteurs envisagés pour pouvoir réaliser un comparatif avec les études de docking.

Au vu des difficultés à synthétiser les cyclooctynes, nous avons souhaité étudier la capacité de la DXR à promouvoir une réaction de click avec un alcyne vrai. La cinétique devrait être plus lente, mais des études ont montré que dans certaines enzymes, la conformation de celles-ci peut induire le rapprochement entre les deux fonctions et permettre la réaction. Dans un premier temps, nous avons synthétisé et testé sur la DXR d'*E. coli*, une série d'alcyne vrais. Les composés étant de relativement faibles inhibiteurs, ces résultats nous ont incité à réaliser la réaction de click expérimentalement. Nous

avons ainsi synthétisé 16 nouveaux inhibiteurs de type bisubstrat, fonctionnalisés avec un triazole. Là encore, leur activité biologique est très encourageante puisque nous observons des inhibitions de l'ordre du micromolaire. En revanche, une partie des composés n'a pas été capable d'inhiber la croissance sur souche d'*E. coli*.

Finalement, nous nous sommes également intéressés à cibler une poche hydrophobe présente au niveau de la boucle flexible, recouvrant le site actif de la DXR. Pour ce faire, nous avons choisi le groupement dansyle, séparé du mime de la fosmidomycine par un espaceur de 1 à 4 atomes de carbone. Un résultat d'inhibition analogue à la fosmidomycine a été obtenu avec le composé possédant l'espaceur le plus court. Cependant, cet inhibiteur semble plutôt se fixer au niveau du site du NADPH que dans la poche. De plus, bien qu'il possède un bon IC_{50} comparable à la fosmidomycine, il est moins efficace que cette dernière sur antibiogramme.

D'un point de vue général, les composés qui ont été testés semblent mieux se fixer au niveau du site du DXR. Il est probable que le cofacteur NADPH favorise la fixation de la partie mime du DXP à l'enzyme.

Dans le cadre de l'approche bisubstrat et dansyle, les molécules obtenues devront faire l'objet d'études complémentaires pour déterminer leur mode de fixation. Il est probable que certaines se fixent au niveau du site du NADPH tandis que d'autres se fixent au niveau de la poche hydrophobe.

Enfin, aucun de nos composés n'a été capable d'inhiber la croissance des bactéries d'une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine, ce qui pourrait être expliqué par l'absence de transporteur. Pour augmenter leur biodisponibilité il serait intéressant dans le futur de masquer ce groupement sous forme de prodrogue.

Partie expérimentale

General methods

All non-aqueous reactions were run in dry solvents under argon atmosphere. Commercial grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Acros Organics and used without further purification. Petroleum ether 40-60 °C was used for purification.

Flash chromatography was performed on silica gel 60 (230-400 mesh) from Merck, with the solvent system as indicated. Automated flash chromatography was performed on silica gel (30 or 50 μm) on a Combiflash® Rf™ (Serlabo Technologies) or on a Puriflash® 215 (Interchim).

TLC plates were revealed under UV light (254 nm) and/or by spraying with an ethanolic solution of phosphomolybdic acid (20 %) or with an ethanolic solution of potassium permanganate followed by heating.

The NMR spectra were recorded on a BRUKER Avance 300 (^1H -NMR 300 MHz; ^{13}C -NMR 75.5 MHz; ^{31}P -NMR 121.5 MHz; ^{19}F -NMR 282.4 MHz) or on a BRUKER Avance 400 (^1H -NMR 400 MHz; ^{13}C -NMR 100.6 MHz; ^{31}P -NMR 162 MHz) or on a BRUKER Avance 500 (^1H -NMR 500 MHz; ^{13}C -NMR 125.8 MHz). ^1H -NMR experiments were performed in CDCl_3 , D_2O , CD_3OD and $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ with CHCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), DHO ($\delta = 4.79$ ppm), CD_2HOD ($\delta = 3.31$ ppm) and $(\text{CD}_3)(\text{CD}_2\text{H})\text{SO}$ ($\delta = 2.5$ ppm) as internal references. ^{13}C -NMR experiments were performed in CDCl_3 with CDCl_3 ($\delta = 77.23$ ppm), CD_2HOD ($\delta = 49.0$ ppm) and $(\text{CD}_3)(\text{CD}_2\text{H})\text{SO}$ ($\delta = 33.52$ ppm) as internal references. For ^{31}P -NMR reference, the spectrometer had an external reference, corresponding to 80 % phosphoric acid in D_2O ($\delta = 0$ ppm). The chemical shifts (δ) are expressed in ppm. s, d, t, q, h, or bs are abbreviations for multiplicity corresponding to singlet, doublet, triplet, quadruplet, quintuplet, sextuplet and broad singlet. J-couplings are indicated in Hz.

Most of the retro-hydroxamic acid are present as two *Z*, *E* and *other* conformers in equilibrium. If only one signal is described, it is common to all conformers. The evaluation of the relative amount of the conformers was made by integration of the CH_2NOH and/or the $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$ proton signals.

Negative or positive mode electrospray MS were performed on a Bruker Daltonics microTOF spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray (ESI) interface. Calibration was performed using a solution of 10 mM sodium formate. Sample solutions were introduced into the spectrometer source with a syringe pump (Harvard type 55 1111: Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) with a flow rate of $5 \mu\text{L min}^{-1}$.

A/ General procedure for peptidic coupling reaction with DCC/HOBT

To a solution of acid (1 eq.) in THF was added DCC (1.2 eq.) and HOBT (1 eq.) at room temperature and stirred for 30 min. A solution of benzylhydroxylamine/amine (1 eq.) in THF was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was filtered and evaporated. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

B/ General procedure for peptidic coupling with EDC.HCl/HOBT

To a solution of acid (1 eq.) in DCM was added HOBT (1.2 eq.). The mixture was cooled to 0 °C, DIPEA (1.2 eq) and EDC.HCl (1.2 eq) were added. The benzylhydroxylamine/amine (1 eq.) was added 30 minutes later and then the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. After 16 hours, DCM was evaporated, the mixture was diluted in ethyl acetate, washed with a solution at 1N of HCl, with a saturated solution of NaHCO₃ and with brine. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

C/ General procedure for peptide coupling with DIC/HOBT

To a solution of acid (1 eq) in THF (10 mL/mmol), was added HOBT (1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and DIC was added (1.2 eq.). The reaction mixture was stirred over 30 min before the addition of the phosphonate (1 eq) dissolved in THF (5 mL/mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Once there was no more evolution, the solvent was evaporated, followed by the purification of the compound by automated flash chromatography on silica gel (100% EA to 9/1 EA/MeOH).

D/ General procedure for deprotection of *O*-silylated compound

To a solution of *O*-silylated phosphonate (1 eq.) in THF was added TBAF.(H₂O)₃ (3 eq) and stirred for 2 hours at room temperature. The reaction was quenched by the addition of a saturated aqueous solution of NH₄Cl, extracted 3 times with ether and washed with brine. The organics layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

E/ General procedure for the synthesis of mesylate.

To a solution of alcohol (1 eq.) in DCM was added TEA (2.4 eq). The mixture was cooled to 0°C and a solution of methanesulfonyl chloride (2.4 eq) in DCM was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature overnight, quenched by the addition of water, and extracted 3 times with ethyl acetate. The organics layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

F/ General procedure for the synthesis of azide by substitution of mesylate or brominated compound.

To a solution of mesylate or brominated compound (1 eq.) in DMF, was added NaN₃ (2.5 eq.) and stirred for 2 days at room temperature. The reaction was quenched by the pre-cautious addition of water, extracted 3 times with ether, and twice with DCM. The organics layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. No further purification was needed, and the desired compound was afforded as a colorless oil.

G/ General procedure for the lactone opening.

To a stirred solution of N-hydroxybenzyl-amine hydrochloride (1 eq.) in THF was added LiHMDS (4.1 eq) and stirred for 10 min. The reaction mixture was cooled to -78°C . Then was added a solution of lactone **151b-d** (1 eq) in THF and the mixture was stirred for 16h. The reaction was quenched by the addition of saturated aqueous NH_4Cl , extracted 4 times with ethyl acetate, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The crude was directly subjected to deprotection of silylated compound in presence of TBAF. $(\text{H}_2\text{O})_3$ (3 eq) in THF. The mixture was stirred for 2 hours at room temperature. The reaction was quenched by the addition of a saturated aqueous solution of NH_4Cl , extracted 3 times with ether and washed with brine. The organics layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

H/ General procedure for the protection of alcohol.

To a solution of alcohol (1 eq.) in DMF (10 mL) was added imidazole (3 eq) and TBDMSCl (1.2 eq) and the mixture was stirred at room temperature. After 2 hours, the reaction was quenched by the addition of a 5% aqueous solution of NaHCO_3 , extracted twice with ethyl acetate and washed with brine. The organics layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography.

I/ General procedure for the substitution of brominated compound.

To a solution of hydroxamate (1 eq.) in DMF cooled to 0°C was added portion wise NaH (1 eq.) until there is no more off gases. The mixture was stirred for 1 hour at room temperature, cooled again at 0°C before the addition of diethyl phosphonate (1 eq.) and stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by the addition of water, extracted twice with ethyl acetate and washed with brine. The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

J/ General procedure for the saponification of ester 155a-d

To a solution of azido acid (1 eq.) in a mixture of methanol/water (6/5) was added KOH (4 eq.) at 0°C . After 30 minutes, the reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. After 16 hours, methanol was evaporated, the reaction mixture was taken back in DCM and washed twice with DCM. The mixture was then acidified until a pH of 1 with a solution at 2N of HCl, and extracted 3 times with ethyl acetate. The organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound was afforded without further purification.

K/ General procedure for catalytic hydrogenolysis

K1/ To a solution of *O*-benzylated hydroxamate (1 eq) was added palladium on charcoal (10 mol%) in absolute methanol. The reaction was stirred at room temperature, and at atmospheric pressure under an atmosphere of H_2 . The catalyst was removed by filtration under a pad of Celite and the reaction mixture was evaporated to dryness. When necessary, the crude was purified by column chromatography on silica gel.

K2/ To a solution of azide (1 eq.) in DCM at 0°C , was added BCl_3 (3 eq.) dropwise. After 2 h, the reaction was quenched by the addition of a saturated solution of NaHCO_3 . The mixture was

extracted twice with DCM, washed with brine. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography on silica gel.

L/ General procedure for the ethyl deprotection

To a solution of diethylphosphonate (1 eq.) in DCM at 0 °C was added TMSBr (5eq.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h, then allowed to warm up at room temperature and stirred overnight. The reaction was followed by ³¹P NMR. Once finished, the solvent was evaporated to dryness. Then, water was added, the mixture was stirred for 2 h and evaporated to dryness.

M/ General procedure for the synthesis of amino-acid

To a solution of acid (1 mmol) and NHS (1 mmol) in CHCl₃ was added DCC (1.2 eq) and the mixture was stirred over 2 h. The precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated under reduced pressure, affording a white solid submitted to the next step without purification. To a solution of amino-acid (1 eq.) and NaHCO₃ (2 eq.) in water was added a solution of the activated ester previously obtained in acetone. After stirring the reaction at room temperature overnight, the solvent was removed under reduced pressure and the residue, dissolved in water. The insoluble solid was filtrated, and the filtrate was acidified to pH = 3 with diluted HCl, leading to the precipitation of the desired compound. The solid was filtered off, washed with water and dried under vacuum overnight.

N/ General procedure for the synthesis of benzyl ester 245a-c

To a solution of amino acid (1 eq.) and benzyl alcohol (3 eq.) in toluene was added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (1 eq.). The mixture was stirred under reflux overnight and then cooled to ambient temperature. Diethyl ether was added slowly and the mixture was cooled to 0 °C, resulting in the precipitation of the product. The product was isolated by filtration, washed with ether and dried under vacuum, to afford the desired compound as a colorless solid.

O/ General procedure for the coupling reaction of benzyl ester 245a-c with acid 212, 216, 218 and 219

Method 1

To a solution of benzylester (1 eq.) in DCM was added EDC.HCl (1.2 eq.), and HOBt (1.2 eq.). Subsequently, TEA (1.8 eq.) and acid (1 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Then, the solution was diluted with ethyl acetate and washed twice with a saturated solution of NH₄Cl. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The solid crude was mixed with hot chloroform and diethyl ether was added dropwise until cloudiness. Crystallization of the desired compound was induced by ultrasonic bath. Once crystalized, diethyl ether was added and the solid was removed by filtration and dried under vacuum. When necessary, the compound was purified by column chromatography.

Method 2

To a solution of benzylester (1 eq.) and acid (1 eq.) in DCM was added DCC and TEA (3 eq.). The mixture was stirred for 24 h at room temperature. The filtrate was then removed by filtration and the organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried under Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography.

P/ General procedure for the synthesis of alkynes

A solution of acid (1 eq.) and HOBt (1.2 eq.) in DMF was cooled to 0 °C. Then DIPEA (1.2 eq.) and EDC.HCl (1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 30 min before the addition of alcohol/amine/phosphono-hydroxylamine (1 eq.) diluted in DCM. Once finished, the solvent was evaporated. The crude was diluted in ethyl acetate and was subsequently washed with a solution of 1N HCl, a saturated solution of NaHCO₃, and brine. The organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure. The compounds were purified by column chromatography on silica gel.

Q/ General procedure for the click chemistry

To a solution of azide (1 eq.), CuSO₄.5H₂O (0.1 eq., 10 mol %) and sodium ascorbate (0.2 eq., 20 mol %) in a 5:2 mixture of BuOH/water was added the alkyne. The mixture was stirred overnight at room temperature with exclusion of light. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was subjected to column chromatography on silica gel (100 % EA to 90/10 EA/MeOH).

R/ General procedure for the synthesis of dansyl derivative

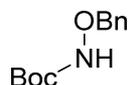
To a solution of amino-acid (5 eq) in water was added NaHCO₃ (20 eq). Then, a solution of dansyl chloride (1 eq) in acetone was added followed by the addition of TEA dropwise. The solution was stirred overnight with exclusion of light. Once the reaction was finished, the mixture was filtered, evaporated and subjected to column chromatography on silica gel.

S/ General procedure for deprotection of Boc protected amine

To a mixture of TFA in DCM was added under stirring a solution of amine protected (1eq.) in DCM and stirred overnight at room temperature. The mixture was made alkaline by the addition of a saturated aqueous solution of NaHCO₃ at 0°C. The mixture was then extracted twice with DCM, washed once with water and once with brine. The organic layers were dried with sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compounds were purified by column chromatography.

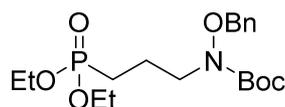
I. Partie expérimentale chapitre 1

N.B : les analyses des composés **138a-d** ont été introduites à la suite des molécules **157a-d** pour plus de clarté dans l'enchaînement.

***t*-butyl (benzyloxy)carbamate 141**

To a solution of *N*-hydroxybenzyl-amino hydrochloride **139** (500 mg, 4 mmol) in THF (20 mL) was added di-*t*-butyl dicarbonate. The mixture was cooled to 0°C and triethylamine was added. The reaction was then allowed to warm to rt and stirred overnight. The reaction was quenched by the addition of water, extracted at 3 times with ethyl acetate, and washed with water and brine. The organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and evaporated. Purification of the crude residue via column chromatography (PE/EA), yielded the desired compound (619 mg, 69%) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.33 (m, 5H), 7.09 (s, 1H), 4.87 (s, 2H, OCH₂Ph), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃).

***t*-Butyl (benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)carbamate 142**

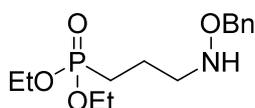
A solution of *t*-butyl benzyloxycarbamate **141** (2g, 8.9 mmol, 1 eq.) in DMF (18 mL) was cooled to 0°C and treated with NaH that was added (223.2 mg, 9.3 mmol, 1.05 eq.) portion wise. Once there is no more off gas, the reaction was left to warm to room temperature over 1h. Then, the mixture was cooled to 0°C, the diethyl 3-bromopropylphosphonate **140** was added and the reaction was stirred at room temperature over 16h. The reaction was quenched by the precautionous addition of water, then extracted 3 times with ethyl acetate. The organic layers were dried with sodium sulfate, filtered and concentrated. No more purification was needed and the desired compound was afforded in a quantitative yield as a colorless oil.

R_f = 0.58 (95/5 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.43 – 7.31 (m, 5H), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.13 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.48 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 1.89 (m, 2H), 1.82 – 1.68 (m, 2H), 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 156.5, 135.4, 129.3, 128.6, 128.4, 81.5, 77.0 (OCH₂Ph), 61.5 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 49.8 (d, ³J_{C-P} = 19.3 Hz, CH₂NOBn), 28.2, 23.1 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 20.4 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.5.

Diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate 143

To a mixture of TFA (22 mL) in DCM (65 mL) was added under stirring a solution of *t*-butyl benzyloxy (3-(diethoxyphosphoryl)propyl)carbamate **142** (3.56 g, 8.8 mmol) in DCM (10 mL) and stirred overnight

at room temperature. The mixture was made alkaline by the addition of a saturated aqueous solution of NaHCO₃ at 0°C. The mixture was then extracted twice with DCM, washed once with water and once with brine. The organic layers were dried with sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. No further purification was needed and the desired compound was afforded (2.64 g, 99%) as a yellow-colorless oil.

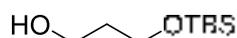
R_f = 0.24 (95/5 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.42 – 7.31 (m, 5H), 4.71 (s, *J* = 3.1 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.20 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 2.99 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NOBn), 1.94 – 1.71 (m, 4H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 134.4, 129.1, 129.0, 128.6, 76.2 (OCH₂Ph), 62.2 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 50.4 (d, ³J_{C-P} = 13.4 Hz, CH₂NOBn), 23.1 (d, ¹J_{C-P} = 142.2 Hz, PCH₂), 18.1 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.5.

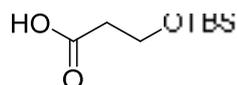
3-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)propan-1-ol **145**



To a solution of 1,3-propanediol **144** (3 mL, 39.9 mmol, 1.5 eq.) in THF (40 mL) was added NaH (640 mg, 26.6 mmol, 1 eq.) portion wise at 0°C and stirred for 2.5 h. To the mixture was then added TBSCl (4.0 g, 26.6 mmol, 1 eq.) and stirred overnight. The reaction mixture was quenched by the addition of a solution of NaHCO₃ in methanol, extracted with DCM, and then washed subsequently by water and brine. The organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and evaporated. The desired compound (883 mg, 17 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 3.87 – 3.82 (t, 2H), 3.82 – 3.78 (t, 2H), 1.78 (q, 2H), 0.91 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

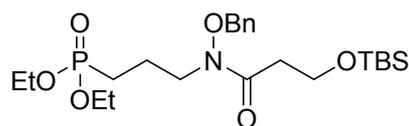
3-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)propanoic acid **146**



To a solution of 2-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)ethanol ether **145** (200 mg, 1.05 mmol) in DCM (10 mL) was added sodium hydrogencarbonate (126 mg, 1.05 mmol) and Dess Martin periodinane (669 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq.) at room temperature and stirred for 2 h. The reaction mixture was then concentrated, diluted in cyclohexane to precipitate the by-product, filtered and evaporated. The crude is used for the next step without purification and diluted in *t*-BuOH, and 2-methyl-2-butene. To the reaction was added a mixture of NaClO₂ and NaH₂PO₄ in water dropwise and was stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was portionated between DCM and brine. The organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and evaporated. The desired compound (186 mg, 87 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 3.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)propanamido)propyl)phosphonate **147b**



To a solution of 3((tert-butyldimethylsilyloxy) propanoic acid **146b** (186 mg, 0.9 mmol) in THF (10 mL) was added DCC (222 mg, 1.08 mmol, 1.2 eq.) and HOBT (121.5 mg, 0.9 mmol) at room temperature and stirred for 30 min. A solution of diethyl (3-((benzyloxy)amino) propyl phosphonate **143** (274 mg, 0.9 mmol) in THF (5 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was filtered and evaporated. Purification of the crude residue via column chromatography (EA/MeOH), yielded the desired compound (104 mg, 24%) as colorless oil.

Or

The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **147b** from hydroxamate **153b** (872 mg, 2.8 mmol) and phosphonate **140** (67.2 mg, 2.8 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **147b** (752 mg, 55%) as a colorless oil.

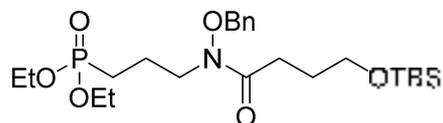
R_f = 0.6 (95/5 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.39 (s, 5H), 4.87 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.12 – 4.04 (m, 4H, POCH₂), 3.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.02 – 1.86 (m, 2H), 1.81 – 1.66 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9, 134.3, 129.1, 128.9, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 62.3 (CH₂O), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (CH₂NOBn), 33.6 (C(O)CH₂), 25.9 (C(CH₃)₃), 24.4 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 20.3, 18.3, 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), -5.3 (Si(CH₃)₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.37 .

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-((tert-butyldimethylsilyloxy)butanoyl)butanoyl)propyl)phosphonate **147c**



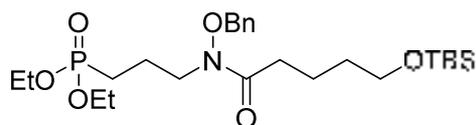
The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **147c** from hydroxamate **153c** (1.20 g, 3.71 mmol) and phosphonate **140** (0.712 mL, 3.71 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **147c** (984 mg, 55%) as a colorless oil.

R_f = 0.6 (95/5 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.38 (s, 5H), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.15 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.65 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.88 – 1.77 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (s, *J* = 1.3 Hz, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, *J* = 3.1 Hz, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.8, 134.3, 129.1, 128.9, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 62.3 (CH₂O), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.6 (CH₂NOBn), 33.6, 28.1, 25.9, 24.4 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 20.3, 18.3, 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), -5.3 (Si(CH₃)₂).

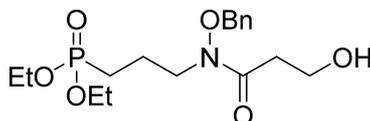
³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.9.

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-5-((tert-butyldimethylsilyloxy)pentanamido)propyl)phosphonate 147d

The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **147d** from hydroxamate **153d** (3.25 g, 9.63 mmol) and phosphonate **140** (2.5 mg, 9.63 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **147d** (3.62 mg, 68 %) as a colorless oil.

R_f = 0.6 (95/5 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.42 – 7.34 (m, 5H), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.19 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (m, 2H, CH₂NOBn), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.42 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.04 – 1.84 (m, 2H), 1.77 – 1.46 (m, 6H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 148b

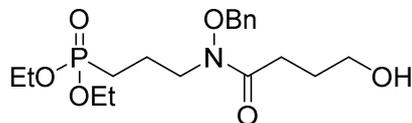
The general procedure **D** was applied to synthesize the compound **148b** from *O*-silylated phosphonate **147b** (1.106 g, 2.27 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **148b** (652 mg, 77 %) as a colorless oil.

R_f = 0.33 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.47 – 7.35 (m, 5H), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.84 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.64 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.95 (ddd, *J* = 15.9, 11.7, 7.1 Hz, 2H), 1.81 – 1.66 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.4, 134.0, 129.2, 129.1, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.3, 45.3 (d, ³J_{C-P} = 18.4 Hz, CH₂NOBn), 34.3, 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 143 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 31.1.

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-hydroxybutanamido)propyl)phosphonate 148c

The general procedure **D** was applied to synthesize the compound **148c** from *O*-silylated phosphonate **147c** (1.91 g, 6.06 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **148c** (495 mg, 64 %) as a colorless oil.

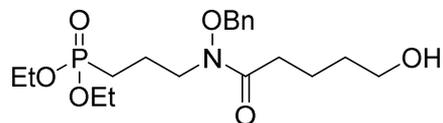
R_f = 0.33 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ 7.39 (s, *J* = 8.5 Hz, 5H), 4.84 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.90 (m, 2H), 1.89 – 1.82 (m, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.33 – 1.28 (t, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.3, 134.2, 129.2, 129.0, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, POCH₂), 45.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 16.1$ Hz, CH₂NOBn), 30.9, 29.5, 27.2, 22.9 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 142.6$ Hz, PCH₂), 20.2, 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.19 .

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-5-hydroxypentanamido)propyl)phosphonate **148d**



The general procedure **D** was applied to synthesize the compound **148d** from *O*-silylated phosphonate **147d** (3.62 g, 7.03 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **148d** (1.6 g, 58 %) as a colorless oil.

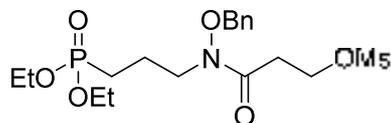
R_f = 0.33 (9/1 EA/MeOH)

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.50 – 7.28 (m, 5H), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.21 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.60 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.86 (m, 2H), 1.81 – 1.64 (m, 4H), 1.57 (dq, $J = 9.1, 6.4$ Hz, 2H), 1.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.3, 134.3, 129.2, 129.0, 128.7, 76.3 (OCH₂Ph), 62.0, 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, POCH₂), 45.8 (CH₂NOBn), 32.3, 31.8, 23.0 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 142.6$ Hz, PCH₂), 20.2, 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

3-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-3-oxopropyl methanesulfonate **149b**



The general procedure **E** was applied to synthesize the compound **149b** from alcohol **148b** (303 mg, 0.8 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **149b** (361 mg, 91 %) as a colorless oil.

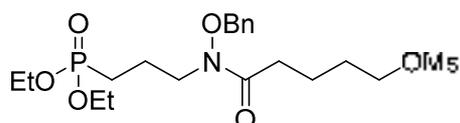
R_f = 0.47 (9/1 EA/MeOH)

^1H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.35 (m, 5H), 4.84 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.48 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.17 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.75 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.04 (s, 3H), 2.81 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.04 – 1.88 (m, 2H), 1.81 – 1.65 (m, 2H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, chloroform-*d*) δ 129.2, 129.2, 128.8, 77.2 (OCH₂Ph), 65.5, 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, POCH₂), 37.1, 32.0, 22.3 (PCH₂), 20.2 (PCH₂CH₂), 16.3 (POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (162 MHz, chloroform-*d*) δ 30.9.

5-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-5-oxopentyl methanesulfonate **149d**



The general procedure **E** was applied to synthesize the compound **149d** from alcohol **148d** (1.18 g, 3 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **149d** (1.13 mg, 79 %) as a colorless oil.

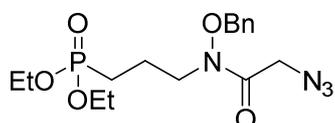
Rf = 0.47 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.48 – 7.30 (m, 5H), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.22 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.16 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.00 (s, 3H), 2.42 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.01 – 1.88 (m, 2H), 1.80 – 1.65 (m, 6H), 1.37 – 1.26 (m, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.2, 134.2, 129.2, 129.1, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 69.6 (CH₂O), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (CH₂NOBn), 37.4 (CH₃), 31.4, 28.6, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.2 Hz, PCH₂), 20.4, 20.2 (d, ²*J*_{C-P} = 5.0 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

Diethyl (3-(2-azido-N-(benzyloxy)acetamido)propyl)phosphonate **150a**



The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **150a** from 2-azidoacetic acid (982 mg, 9.7 mmol) and phosphonate **143** (2.9 g, 9.7 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **150a** (2.4 g, 65 %) as a colorless oil.

Rf = 0.51 (9/1 EA/MeOH)

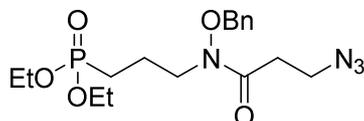
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.38 (m, 5H, CH_{Ar}), 4.82 (s, 2H, CH₂OBn), 4.16 – 4.05 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.87 (s, 2H, CH₂N₃), 3.77 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.02 – 1.93 (m, 2H), 1.78 – 1.70 (m, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2 (CO), 133.6 (NOCH₂C), 129.4, 129.4, 128.9, 76.6 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 50.0 (CH₂N₃), 45.8 (d, ³*J*_{C-P} = 17.8 Hz, CH₂N), 22.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 143.1 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.8.

m/z (ES⁺) 407.14 (80%, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-azido-N-(benzyloxy)propanamido)propyl)phosphonate **150b**



The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **150b** from mesylate **149b** (513 mg, 1.1 mmol). The desired compound **150b** was afforded (434 mg, 96 %) as a colorless oil.

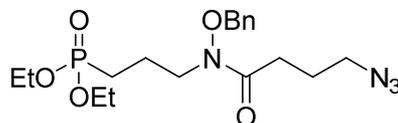
Rf = 0.51 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, NOH), 4.14 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.81 – 3.75 (m, 2H, CH₂NOBn), 3.59 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.09 – 1.92 (m, 2H), 1.92 – 1.79 (m, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.9 (CO), 62.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.5 (d, ³*J*_{C-P} = 3.8 Hz, CH₂N), 46.7 (CH₂N₃), 32.0 (C(O)CH₂), 21.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.1 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 5.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.4.
m/z (ES+) 421.16 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-azido-N-(benzyloxy)butanamido)propyl)phosphonate **150c**



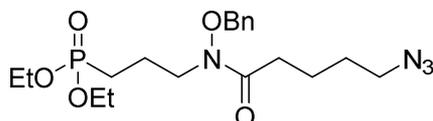
The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **150c** from 4-azidobutanoic acid **156c** (61 mg, 0.47 mmol) and phosphonate **143** (142 mg, 0.47 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **150c** (122 mg, 63 %) as a colorless oil.

R_f = 0.51 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ 7.43 – 7.36 (m, 5H, CHAr), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.14 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.31 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.90 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 2H), 1.79 – 1.67 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.9 (CO), 134.2 (NOCH₂C), 129.2, 129.1, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 50.8, 45.5, 29.1, 23.7, 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 142.5 Hz, PCH₂), 20.2, 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.
m/z (ES+) 435.17 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(5-azido-N-(benzyloxy)pentanamido)propyl)phosphonate **150d**



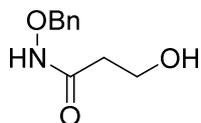
The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **150d** from 5-azidopentanoic acid **156d** (1.9 g, 13.4 mmol) and phosphonate **143** (4 g, 13.4 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **150d** (3.1 g, 55 %) as a colorless oil.

The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **150d** from mesylate **149d** (1.05 g, 2.2 mmol). The desired compound **150d** was afforded (356 mg, 94 %) as a colorless oil.

R_f = 0.51 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.45 – 7.33 (m, 5H), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.78 – 1.69 (m, 2H), 1.65 (dd, *J* = 14.9, 7.5 Hz, 2H), 1.62 – 1.55 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (CO), 134.3 (NOCH₂C), 129.2, 129.0, 128.7, 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 51.1, 45.4, 31.6, 28.4, 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 21.6, 20.2 (d, ²J_{C-P} = 5.1 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

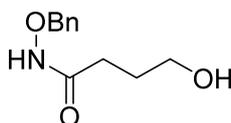
³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.19.
m/z (ES+) 449.18 (100%, [M]⁺).

N-(benzyloxy)-3-hydroxypropanamide 152b

The general procedure **G** was applied to synthesize the compound **152b** from N-hydroxybenzyl-amine hydrochloride **139** (3.15 g, 18.8 mmol) and β -propiolactone **151b** (0.93 mL, 18.8 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 50 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **152b** (2.65 g, 69 %) as a colorless oil.

R_f = 0.32 (EA)

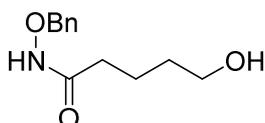
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.43 – 7.33 (m, 5H), 4.91 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.87 – 3.80 (m, 2H), 2.34 (s, 2H).

N-(Benzyloxy)-4-hydroxybutanamide 152c

The general procedure **G** was applied to synthesize the compound **152c** from N-hydroxybenzyl-amine hydrochloride **139** (2.1 g, 12.5 mmol) and γ -butyrolactone **151c** (0.96 mL, 12.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 50 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **152c** (2.22 g, 78 %) as a colorless oil.

R_f = 0.32 (EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.37 (m, 5H), 4.89 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.63 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.20 (s, 2H, C(O)CH₂), 1.84 (q, 2H).

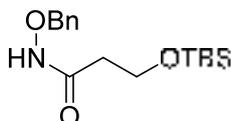
N-(Benzyloxy)-5-hydroxypentanamide 152d

The general procedure **G** was applied to synthesize the compound **152d** from N-hydroxybenzyl-amine hydrochloride **139** (2.6 g, 15.6 mmol) and δ -valerolactone **151d** (1.45 mL, 15.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 50 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **152d** (2.65 g, 73 %) as a colorless oil.

R_f = 0.32 (EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.82 (s, 1H), 7.44 – 7.32 (m, 5H), 4.89 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.59 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.07 (d, *J* = 16.3 Hz, 2H), 1.76 – 1.65 (m, 2H), 1.61 – 1.46 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3, 135.6, 129.2, 128.8, 128.5, 78.0 (OCH₂Ph), 61.9 (CH₂OH), 32.6, 31.5, 21.6.

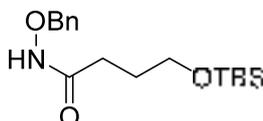
N-(Benzyloxy)-3-((tert-butyldimethylsilyloxy)propenamide 153b

The general procedure **H** was applied to synthesize the compound **153b** from alcohol **152b** (1.3 g, 6.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 70/30), to afford the desired compound **153b** (1.8 g, 90 %) as a colorless oil.

R_f = 0.91 (EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.38 (m, 5H), 4.93 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.83 – 3.75 (m, 2H), 2.43 – 2.33 (m, 2H), 0.82 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 169.8, 135.7, 129.0, 128.6, 128.5, 78.1 (OCH₂Ph), 58.8 (CH₂OTBS), 37.6 (C(O)CH₂), 25.7 (C(CH₃)₃), 18.0, -5.5 (Si(CH₃)₂).

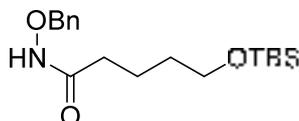
N-(Benzyloxy)-4-hydroxybutanamide 153c

The general procedure **H** was applied to synthesize the compound **153c** from alcohol **152c** (2.1 g, 10 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 70/30), to afford the desired compound **153c** (2.6 g, 81 %) as a colorless oil.

R_f = 0.91 (EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.86 (s, 1H), 7.41 – 7.30 (m, 5H), 4.91 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.64 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.28 – 2.09 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.92 – 1.78 (m, 2H), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1, 135.0, 129.2, 128.7, 128.6, 78.1 (OCH₂Ph), 62.1 (CH₂OTBS), 25.9 (C(CH₃)₃), 25.6, 18.2, -5.3 (Si(CH₃)₂).

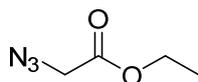
N-(Benzyloxy)-5-((tert-butyldimethylsilyloxy)pentanamide 153d

The general procedure **H** was applied to synthesize the compound **153d** from alcohol **152d** (2.5 g, 11.4 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 70/30), to afford the desired compound **153d** (3.3 g, 86 %) as a colorless oil.

R_f = 0.91 (EA)

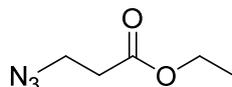
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.10 (s, 1H), 7.40 (s, 5H), 4.93 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.63 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂OTBS), 2.06 (s, 2H), 1.71 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.55 (m, 2H), 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 129.2, 128.8, 128.6, 77.2 (OCH₂Ph), 62.9 (CH₂OTBS), 29.8, 25.9 (C(CH₃)₃), 22.3, 19.2, 18.3, -5.3 (Si(CH₃)₂).

Ethyl 2-azidoacetate 155a

The general procedure **F** was applied for the synthesis of the compound **155a** from ethyl bromoacetate **154a** (3 g, 17.9 mmol). The desired compound (1.9 g, 83 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

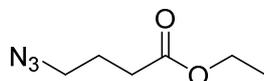
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.02 (s, 2H), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

3-Azidopropanoic acid 155b

The general procedure **F** was applied for the synthesis of the compound **155b** from ethyl-3-bromopropionate **154b** (500 mg, 17.9 mmol). The desired compound (134 g, 34 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.19 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

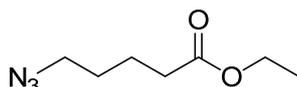
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.8, 60.9, 46.7, 34.0, 14.1.

Ethyl 4-azidobutanoate 155c

The general procedure **F** was applied for the synthesis of the compound **155c** from ethyl 4-bromobutyrate **154c** (3 g, 15.4 mmol). The desired compound (1.9 g, 83 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.15 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.36 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.92 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H).

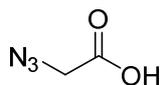
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.7, 60.6, 50.6, 31.1, 24.2, 14.2.

Ethyl 5-azidopentanoate 155d

The general procedure **F** was applied for the synthesis of the compound **155d** from ethyl-5-bromovalerate **154d** (500 mg, 2.4 mmol). The desired compound (357 mg, 87 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

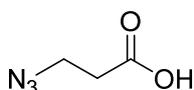
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.30 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 9.1, 5.1$ Hz, 2H), 1.79 – 1.57 (m, 4H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.1, 60.4, 51.0, 33.7, 28.2, 22.1, 14.2.

2-Azidoacetic acid 156a

The general procedure **J** was applied for the synthesis of the compound **156a** from 2-azidoacetic acid **155a** (1.9 g, 14.8 mmol). The desired compound (985 mg, 66 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

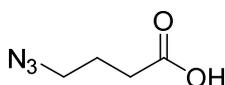
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, chloroform-*d*) δ 8.64 (br s, 1H), 3.98 (s, 2H).

3-Azidopropanoic acid 156b

The general procedure **J** was applied for the synthesis of the compound **156b** from 3-azidopropanoic acid **155b** (2.4 g, 16.8 mmol). The desired compound (310 mg, 16 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, chloroform-*d*) δ 3.73 – 3.57 (m, 2H), 2.65 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H).

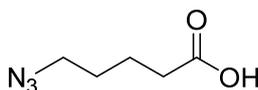
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.3, 58.8, 34.8.

4-Azidobutanoic acid 156c

The general procedure **J** was applied for the synthesis of the compound **156c** from ethyl-4-azidobutanoate **155c** (1.9 g, 12.7 mmol). The desired compound (1.5 g, 91 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 10.91 (s, 1H), 3.38 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.92 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H).

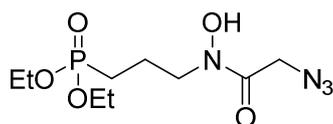
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, chloroform-*d*) δ 178.7, 50.4, 30.8, 23.9.

5-Azidopentanoic acid 156d

The general procedure **J** was applied for the synthesis of the compound **156d** from ethyl-5-azidopentanoate **155d** (2.4 g, 14.3 mmol). The desired compound (1.9 mg, 94 %) was obtained without further purification as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 3.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.84 – 1.53 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 179.3, 51.0, 33.3, 28.2, 21.8.

Diethyl (3-(2-azido-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonate 157a

The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **157a** from *O*-benzylated hydroxamate **150a** (509 mg, 1.3 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **157a** (28 mg, 7 %) as a colorless oil.

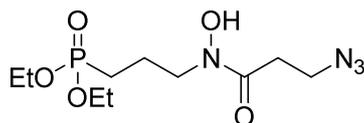
R_f = 0.36 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.85 (s, 1H), 4.14 (s, 2H, CH₂N₃), 4.11 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.78 – 3.73 (m, 2H, CH₂NOH), 1.98 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 169.0 (CO), 62.4 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 50.2 (CH₂N₃), 47.9 (d, ³J_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂NOH), 22.0 (d, ¹J_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.8 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.78.

m/z (ES⁺) 317.09 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-azido-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 157b

The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **157b** from *O*-benzylated hydroxamate **150b** (200 mg, 0.05 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **157b** (92 mg, 59 %) as a colorless oil.

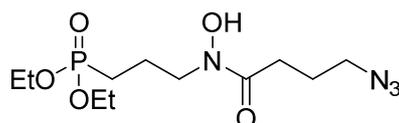
R_f = 0.36 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, NOH), 4.14 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.81 – 3.75 (m, 2H, CH₂NOH), 3.59 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.09 – 1.92 (m, 2H), 1.92 – 1.79 (m, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.9 (CO), 62.4 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.5 (d, ³J_{C-P} = 3.8 Hz, CH₂NOH), 46.7 (CH₂N₃), 32.0 (C(O)CH₂), 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 140.1 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.4.

m/z (ES⁺) 331.11 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-azido-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonate 157c

The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **157c** from *O*-benzylated hydroxamate **150c** (200 mg, 0.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **157c** (110 mg, 70 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1 EA/MeOH)

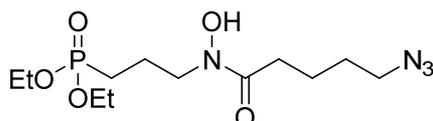
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.85 – 9.50 (br s, 1H, NOH), 4.11 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.76 – 3.71 (m, 2H, CH₂NOBH), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.94 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.8 (CO), 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 51.0, 47.4 (d, ³J_{C-P} = 3.8 Hz, CH₂NOH), 29.4 (C(O)CH₂), 23.9, 22.0 (d, ¹J_{C-P} = 140.0 Hz, PCH₂), 18.7 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

***m/z* (ES⁺)** 323.14 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(5-azido-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonate **157d**



The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **157d** from *O*-benzylated hydroxamate **150d** (300 mg, 0.7 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **157d** (144 mg, 61 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1 EA/MeOH)

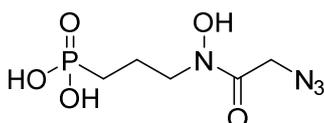
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, NOH), 4.11 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.79 – 3.74 (m, 2H, CH₂NOH), 3.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.04 – 1.93 (m, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 4H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.5 (CO), 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 51.2, 47.4 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH₂NOH), 31.8, 28.6, 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 140.0 Hz, PCH₂), 21.7, 18.6 (d, ²J_{C-P} = 6.0 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, chloroform-*d*) δ 35.5.

***m/z* (ES⁺)** 359.14 (100 %, [M]⁺).

(3-(2-Azido-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonic acid **138a**



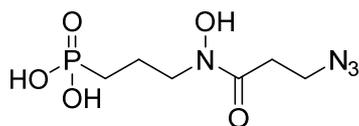
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **138a** from diethylphosphonate **157a** (35 mg, 0.12 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of three *Z* and *E* and *undetermined* conformers in a ratio of 39/40/21 respectively.

¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 4.05 (s, 0.8 of 2H, CH₂N₃), 3.78 (s, 0.8 of 2H, CH₂N₃), 3.69 (t, *J* = 6.8 Hz, 0.8 of 2H, CH₂NOH), 3.52 (s, 0.4 of 2H, CH₂N₃), 3.27 – 3.20 (m, 0.8 of 2H, CH₂NOH), 3.07 – 3.02 (m, 0.4 of 2H, CH₂NOH), 1.94 – 1.80 (m, 2H), 1.68 – 1.51 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, deuterium Oxide) δ 166.7 (CO), 52.4 (CH₂N₃), 52.0 (d, ³J_{C-P} = 15.9 Hz, CH₂NOH), 49.0 (d, ³J_{C-P} = 18.2 Hz, CH₂NOH), 46.6 (CH₂N₃), 41.3 (CH₂N₃), 40.1 (d, ³J_{C-P} = 17.4 Hz, CH₂NOH), 26.1 (d, ¹J_{C-P} = 133.0 Hz, PCH₂), 25.1 (d, ¹J_{C-P} = 133.0 Hz, PCH₂), 24.8 (d, ¹J_{C-P} = 133.0 Hz, PCH₂), 21.4 (d, ²J_{C-P} = 3.9 Hz, PCH₂CH₂), 20.3 (d, ²J_{C-P} = 4.0 Hz, PCH₂CH₂), 18.3 (d, ²J_{C-P} = 4.2 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, deuterium Oxide) δ 24.9, 24.1, 23.4.

HRMS (ES⁺) calculated for C₅H₁₀N₄O₅P [M]⁺: 237.0383, found 237.0385 (100%).

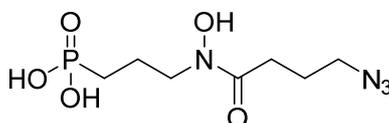
(3-(3-Azido-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid 138b

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **138b** from diethylphosphonate **157b** (31 mg, 0.10 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture undetermined.

¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 3.88, 3.68, 3.58, 2.94, 2.91, 2.83, 2.81, 1.87 – 1.78, 1.61 – 1.51.

¹³C NMR (126 MHz, deuterium Oxide) δ 172.9, 48.7 (d, ³J_{C-P} = 19.3 Hz, CH₂NOH), 46.4, 33.1, 31.2, 24.8 (d, ¹J_{C-P} = 134 Hz, PCH₂), 15.9.

³¹P NMR (121 MHz, deuterium Oxide) δ 27.4, 25.1.

(3-(4-Azido-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonic acid 138c

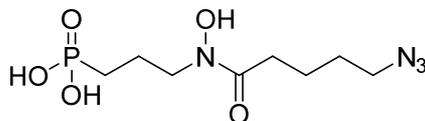
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **138c** from diethylphosphonate **157c** (70 mg, 0.21 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of three *Z* and *E* and *undetermined* conformers in a ratio of 45/15/40 respectively.

¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 3.73 (m, 0.3 of 2H, CH₂NOH), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 0.9 of 2H, CH₂NOH), 3.42 – 3.32 (m, 0.8 of 2H (CH₂NOH) + 2H, CH₂N₃), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 0.9 of 2H, C(O)CH₂), 2.51-2.42 (m, 0.3 of 2H and 0.8 of 2H), 2.03-1.93 (m, 2H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.82 – 1.66 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, deuterium Oxide) δ 178.0, 50.9 (d, *J* = 18.3 Hz), 50.5, 50.3, 30.9, 29.9, 29.0, 26.9, 23.6, 23.5, 19.6, 17.1.

³¹P NMR (121 MHz, deuterium Oxide) δ 29.9, 29.6, 26.7.

HRMS (ES⁻) calculated for C₇H₁₄N₄O₅P [M]⁻: 265.0696, found 265.0706 (100%).

(3-(5-Azido-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonic acid 138d

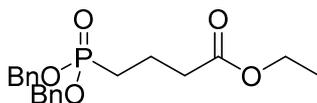
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **138d** from diethylphosphonate **157d** (70 mg, 0.21 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *E* and *undetermined* conformers in a ratio of 25/75 respectively.

¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 3.71 (t, *J* = 6.8 Hz, 0.5 of 2H, CH₂NOH), 3.66 (t, *J* = 6.8 Hz, 1.5 of 2H, CH₂NOH), 3.33 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 1.5 of 2H, C(O)CH₂), 2.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 0.5 of 2H, C(O)CH₂), 1.83 (m, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.53 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, deuterium Oxide) δ 50.7 (CH₂N₃), 48.6 (d, ³J_{C-P} = 19.2 Hz, CH₂N), 31.1 (C(O)CH₂), 27.5, 25.4, 21.6, 20.5.

³¹P NMR (121 MHz, deuterium Oxide) δ 25.2, 24.8.

HRMS (ES⁻) calculated for C₈H₁₆N₄O₅P [M]⁻: 279.0853, found 279.0823 (100%).

Ethyl 4-(dibenzylphosphonyl)butanoate 160

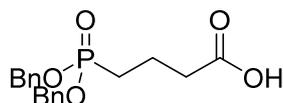
To a solution of dibenzyl phosphite **158** (2g, 7.7 mmol, 1.5 eq) in THF at 0 °C, was added NaH (184 mg, 7.7 mmol, 1.5 eq.). After 15 min, ethyl 4-bromobutyrate **159c** (1 mL, 5.13 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred for 48H. The reaction was quenched by the addition of a saturated solution of NH₄Cl, and extracted with diethyl ether 3 times. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (PE 100 % to PE/EA 50/50). The desired compound **160** (958 mg, 33 %) was afforded as a colorless oil.

R_f = 0.41 (7/3 PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.42 – 7.30 (m, 10H), 5.02 (m, 4H, OCH₂Ph), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.99 – 1.74 (m, 4H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.6, 136.3, 128.6, 128.4, 127.9, 67.1 (d, ²J_{C-P} = 6.4 Hz, POCH₂), 60.4 (OCH₂Ph), 34.4 (d, ³J_{C-P} = 16.4 Hz, CH₂NOBn), 25.2 (d, ¹J_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 18.0 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 14.2.

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.2.

4-(Dibenzylphosphonyl)butanoic acid 161

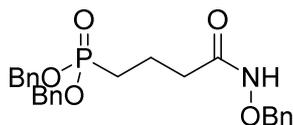
To a solution of **160** (958 mg, 2.5 mmol, 1 eq.) in THF, was added LiOH (152 mg, 6.4 mmol, 2.5 eq.), dissolved in a minimum amount of water. The mixture was stirred overnight at room temperature. The water was added and the solution was extracted with ethyl acetate. The aqueous layer was acidified with a 4 M HCl solution and extracted with ethyl acetate 3 times. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure. The desired compound **161** (403 mg, 46 %) was obtained without further purification.

R_f = 0.21 (7/3 PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.27 (s, 10H), 5.13 – 4.82 (m, 4H), 2.50 – 2.32 (m, 2H), 1.95 – 1.70 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 137.7, 129.6, 129.3, 127.9, 68.5 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 39.2, 26.1 (d, ¹J_{C-P} = 139.4 Hz, PCH₂), 20.5 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 32.5.

Dibenzyl (4-((benzyloxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonate 162

The general procedure **B** (peptide EDC DCM) was applied to synthesize the compound **162** from carboxylic acid **161** (200 mg, 0.57 mmol) and benzylhydroxylamine **139** (106 mg, 0.86 mmol, 1.5 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **162** (180 mg, 69 %) as a colorless oil.

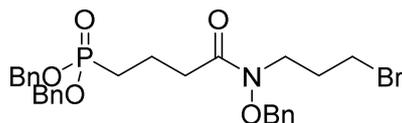
R_f = 0.49 (EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.65 – 9.46 (broad s, 1H, NH), 7.39 – 7.25 (m, 15H, CH_{Ar}), 5.03 – 4.82 (m, 6H, OCH₂Ph), 2.12 (m, 2H, CH₂CO), 1.87-1.74 (m, 4H, PCH₂CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 169.8 (CO), 136.1 (d, ³J_{C-P} = 5.3 Hz, POCH₂C), 135.5 (NOCH₂C), 129.1, 128.6, 128.5, 127.94, 78.1 (OCH₂Ph), 67.2 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 32.7 (d, ³J_{C-P} = 12.3 Hz, CH₂CO), 24.5 (d, ¹J_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.5 (d, ²J_{C-P} = 4.9 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.7.

Dibenzyl (4-((benzyloxy)(3-bromopropyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonate **164c**



The general procedure for peptidic coupling **A** in presence was applied to synthesize the desired compound **164c**, from acid **161** (200 mg, 0.57 mmol) and benzylhydroxylamine **168c** (140 mg, 0.57 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **164c** (130 mg, 40 %) as a colorless oil.

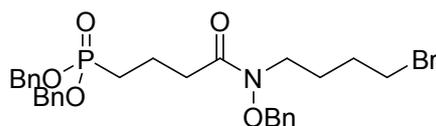
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.40 – 7.35 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.35 – 7.31 (m, 10H, CH_{Ar}), 5.03 (dd, *J* = 11.8, 8.7 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.95 (dd, *J* = 11.8, 8.0 Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.76 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.76 (s, 2H, CH₂NOBn), 3.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂Br), 2.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CO), 2.14 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.95 – 1.86 (m, 2H), 1.85 – 1.76 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.8 (CO), 136.3 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂C), 134.1 (NOCH₂C), 129.3, 129.1, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 76.4 (OCH₂Ph), 67.1 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂Ph), 44.0 (CH₂NOBn), 32.3 (d, ³J_{C-P} = 15.1 Hz, CH₂CO), 30.8, 30.1, 25.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.5 Hz, PCH₂), 17.4 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.7.

m/z (ES⁺) 598.11 (100 %, [M+Na]⁺).

Dibenzyl (4-((benzyloxy)(4-bromobutyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonate **164d**

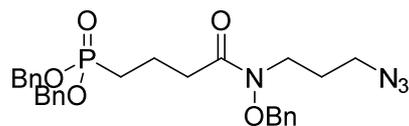


The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **164d** from hydroxamate **162** (710 mg, 1.6 mmol) and 1,4-dibromobutane **163b** (0.187 mL, 1.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **164d** (115 mg, 13 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.41 – 7.30 (m, 15H, CH_{Ar}), 5.04 (dd, *J* = 11.8, 8.7 Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.96 (dd, *J* = 11.8, 7.9 Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.64 (s, 2H, CH₂NOBn), 3.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Br), 2.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂CO), 1.92 (m, 2H, CH₂), 1.86 – 1.73 (m, 6H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.8 (CO), 136.4 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂C), 134.3 (NOCH₂C), 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 76.3 (OCH₂Ph), 67.0 (d, ²J_{C-P} = 6.4 Hz, POCH₂Ph), 44.3 (CH₂NOBn), 33.2 (CH₂Br), 32.3 (d, ³J_{C-P} = 15.7 Hz, CH₂CO), 29.7 (CH₂), 25.4 (CH₂), 25.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.4 Hz, PCH₂), 17.5 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.9.

Dibenzyl 4-((3-azidopropyl)(benzyloxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonate 165c

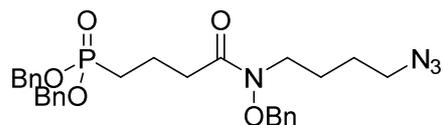
The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **165c** from brominated compound **164c** (282 mg, 0.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 30/70 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **165c** (272 g, 97 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.32 – 7.21 (m, 15H), 4.95 (dd, $J = 11.9, 8.7$ Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.87 (dd, $J = 11.8, 7.9$ Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.66 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.58 (m, 2H, CH₂NOBn), 3.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂N₃), 2.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CO), 1.85 – 1.67 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.9 (CO), 136.4 (d, $^3J_{C-P} = 6.1$ Hz, POCH₂C), 134.2 (NOCH₂C), 129.2, 129.1, 128.7, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 76.4 (OCH₂Ph), 67.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, POCH₂Ph), 48.9 (CH₂N₃), 42.8 (CH₂NOBn), 32.3 (d, $^3J_{C-P} = 15.2$ Hz, CH₂CO), 26.9, 25.2 (d, $^1J_{C-P} = 140.4$ Hz, PCH₂), 17.4 (d, $^2J_{C-P} = 4.9$ Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.8.

***m/z* (ES-)** 537.24 (100 %, [M]⁻).

Dibenzyl 4-((4-azidobutyl)(benzyloxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonate 165d

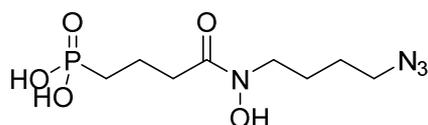
The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **165d** from brominated compound **164d** (102 mg, 0.17 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **165d** (53 mg, 55 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.43 – 7.29 (m, 15H), 5.04 (dd, $J = 11.8, 8.6$ Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.96 (dd, $J = 11.8, 7.9$ Hz, 2H, POCH₂Ph), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.64 (brs, 2H, CH₂NOBn), 3.26 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂N₃), 2.48 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CO), 1.97 – 1.86 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.85 – 1.77 (m, 2H, PCH₂), 1.73 – 1.65 (m, 2H), 1.60 – 1.51 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.8 (CO), 136.4 (d, $^3J_{C-P} = 6.1$ Hz), 134.3, 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 76.3 (OCH₂Ph), 67.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, POCH₂Ph), 50.9 (CH₂N₃), 44.7 (CH₂NOBn), 32.3 (d, $^3J_{C-P} = 15.6$ Hz, CH₂CO), 26.0, 25.2 (d, $^1J_{C-P} = 140.5$ Hz, PCH₂), 24.0, 17.5 (d, $^2J_{C-P} = 4.6$ Hz).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.9.

***m/z* (ES+)** 573.22 (100 %, [M+Na]⁺).

(4-((4-Azidobutyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonic acid 166d

The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **166d** from azide **165d** (102 mg, 0.17 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 60/40 respectively.

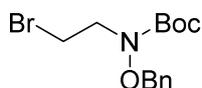
¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 3.65 (m, 3.4H, 2H for B(OMe)₃ and 0.8 for CH₂NOH), 3.27 (s, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 2.99 (dt, *J* = 15.3, 7.5 Hz, 2H), 2.57 (q, *J* = 7.4 Hz, 0.8 of 2H, C(O)CH₂), 2.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 1.86 – 1.73 (m, 4H), 1.70 – 1.53 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, deuterium Oxide) δ 176.6, 52.0, 49.8, 48.7, 47.0, 38.8 (d, *J* = 28.0 Hz), 34.3 (d, *J* = 17.6 Hz), 27.1, 26.1, 23.8, 23.3 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.4 Hz, PCH₂), 20.0, 18.5 (d, ²*J*_{C-P} = 3.9 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 29.3, 28.8.

***m/z* (ES⁺)** 279.09 (100 %, [M]⁺).

***t*-Butyl (benzyloxy)(2-bromoethyl)carbamate 167b**



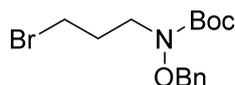
The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **167b** from *t*-butylbenzyloxycarbamate **141** (1 g, 4.5 mmol) and 1,2-dibromoethane **163b** (3.36 g, 17.9 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **167b** (1.02 mg, 70 %) as a colorless oil.

R_f = 0.63 (8/2 PE/EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.33 (m, 5H), 4.89 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.77 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CHBr), 3.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, NCH₂), 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 156.1 (CO), 135.2 (OCH₂C), 129.5, 128.7, 128.5, 82.1 (C(CH₃)₃), 77.4 (OCH₂Ph), 51.5 (NCH₂), 28.2 (C(CH₃)₃), 27.6 (CH₂Br).

***t*-Butyl (benzyloxy)(3-bromopropyl)carbamate 167c**

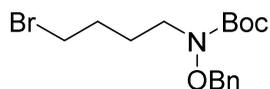


The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **167c** from *t*-butylbenzyloxycarbamate **141** (1 g, 4.5 mmol) and 1,3-dibromopropane **163c** (1.81 mL, 17.9 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **167c** (1.15 g, 77 %) as a colorless oil.

R_f = 0.63 (8/2 PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.47 – 7.31 (m, 5H, CHAr), 4.85 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.57 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CHBr), 3.41 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH₂), 2.13 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃).

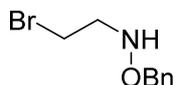
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 156.4 (CO), 135.4 (OCH₂C), 129.4, 128.6, 128.4, 81.6 (C(CH₃)₃), 76.9 (OCH₂Ph), 48.1 (NCH₂), 30.8 (CH₂Br), 30.4 (CH₂), 28.3 ((CH₃)₃).

***t*-Butyl (benzyloxy)(4-bromobutyl)carbamate 167d**

The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **167d** from *t*-butylbenzyloxycarbamate **141** (1 g, 4.5 mmol) and 1,4-dibromobutane **163d** (2.14 mL, 17.9 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **167d** (1.27 g, 79 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.33 (m, 5H, CHAr), 4.84 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂Br), 3.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, NCH₂), 1.91 – 1.83 (m, 2H, CH₂), 1.78 – 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃).

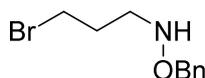
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 156.5 (CO), 135.5 (OCH₂Ph), 129.4, 128.5, 128.4, 81.4 (C(CH₃)₃), 76.9 (OCH₂Ph), 48.6 (NCH₂), 33.3 (CH₂Br), 29.9 (CH₂), 28.3 ((CH₃)₃), 25.7 (CH₂).

O-Benzyl-N-(2-bromoethyl)hydroxylamine 168b

The general procedure **S** was applied to synthesize the compound **168b** from protected benzylhydroxylamine **167b** (1.02 g, 3.11 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **168b** (661 mg, 92 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.37 – 7.30 (m, 5H, CHAr), 4.73 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.60 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂Br), 3.25 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, NCH₂).

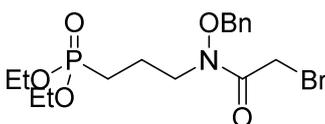
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 137.6 (OCH₂C), 128.4, 128.4, 127.9, 76.2 (OCH₂Ph), 53.2 (NCH₂), 31.2 (CH₂Br).

O-Benzyl-N-(3-bromopropyl)hydroxylamine 168c

The general procedure **S** was applied to synthesize the compound **168c** from protected benzylhydroxylamine **167c** (1.15 g, 3.2 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **168c** (758 mg, 93 %) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.41 – 7.28 (m, 5H, CHAr), 4.70 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.46 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂Br), 3.07 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH₂), 2.08 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 137.7 (OCH₂Ph), 128.4, 128.4, 127.9, 76.3 (OCH₂Ph), 50.0 (NCH₂), 31.5 (CH₂Br), 30.5 (CH₂).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-2-bromoacetamido)propyl)phosphonate 170a

The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170a** from benzyloxyamine **143** (745 mg, 2.48 mmol) and bromoacetic acid **169a** (345 mg, 2.48 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 80/20 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **170a** (637 g, 60 %) as a colorless oil.

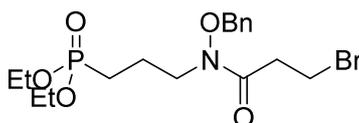
Rf = 0.56 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.41 (s, J = 8.7 Hz, 5H), 4.93 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.20 – 3.98 (m, 4H, POCH₂), 3.90 (s, 2H, CH₂Br), 3.78 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.08 – 1.88 (m, 2H), 1.85 – 1.66 (m, 2H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.2 (CO), 133.7 (NOCH₂C), 129.5, 129.4, 128.9, 76.6 (OCH₂Ph), 61.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 45.7 (d, $^3J_{C-P}$ = 15.8 Hz, CH₂NOBn), 25.6, 22.8 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.6 Hz, PCH₂), 20.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.1 Hz, PCH₂CH₂), 16.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.95.

***m/z* (ES+)** 422.07 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-bromopropanamido)propyl)phosphonate 170b

The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170b** from benzyloxyamine **143** (200 mg, 0.66 mmol) and 3-bromopropionic acid **169b** (101 mg, 0.66 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 80/20 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **170b** (121 g, 42 %) as a colorless oil.

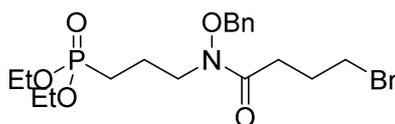
Rf = 0.56 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.36 (m, 5H, CHAr), 4.85 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.75 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.59 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂Br), 2.97 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂CO), 2.01 – 1.90 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.6 (CO), 133.9 (NOCH₂C), 129.3, 129.2, 128.8, 76.5 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 18.8 Hz, CH₂NOBn), 35.5, 26.6, 22.9 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.7 Hz, PCH₂), 20.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 3.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

***m/z* (ES+)** 436.08 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-bromobutanamido)propyl)phosphonate 170c

The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170c** from benzyloxyamine **143** (1 g, 3.8 mmol) and bromobutyric acid **169c** (553 mg, 3.8 mmol). The crude product was purified by

column chromatography (PE/EA 80/20 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **170c** (875 g, 49 %) as a colorless oil.

Rf = 0.56 (9/1 EA/MeOH)

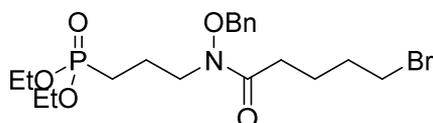
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.42 (s, 5H, CHAr), 4.86 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.18 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.49 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂Br), 2.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CO), 2.21 – 2.12 (m, 2H, CH₂CH₂Br), 1.96 (m, 2H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.6 (CO), 134.1 (NOCH₂C), 129.3, 129.1, 128.7, 76.5 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, ³*J*_{C-P} = 19.8 Hz, CH₂NOBn), 33.7, 30.5, 27.2, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.5 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.0.

***m/z* (ES⁺)** 450.10 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-5-bromopentanamido)propyl)phosphonate **170d**



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170d** from benzyloxyamine **143** (1 g, 3.8 mmol) and 5-bromovaleric acid **169d** (643 mg, 3.8 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 80/20 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **170d** (1.16 g, 70 %) as a colorless oil.

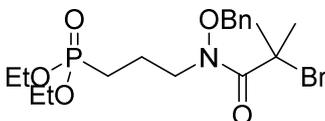
Rf = 0.56 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.34 (m, 5H, CHAr), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.39 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂Br), 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂CO), 1.99 – 1.90 (m, 2H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.78 – 1.69 (m, 4H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 134.3 (NOCH₂C), 129.2, 129.0, 128.7, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 33.2, 32.2, 31.3, 23.1, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.4 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²*J*_{C-P} = 4.9 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-2-bromo-2-methylpropanamido)propyl)phosphonate **170e**

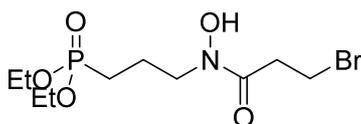


The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170e** from benzyloxyamine **143** (262 mg, 0.86 mmol) and 2-bromo-2-methyl propionic acid **169e** (145 mg, 0.86 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 80/20 to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **170e** (143 g, 37 %) as a colorless oil.

Rf = 0.56 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.52 – 7.33 (m, 5H), 5.06 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.08 (dq, *J* = 7.9, 7.1, 2.2 Hz, 4H, POCH₂), 3.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 1.99 (s, 8H, CH₂ + CH₃), 1.84 – 1.68 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

***m/z* (ES⁺)** 474.08 (100 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-bromo-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 171b

The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **171b** from *O*-benzylated hydroxamate **170b** (143 mg). The crude product was purified by column chromatography (EA 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **171b** (56 mg, 50 %) as a colorless oil.

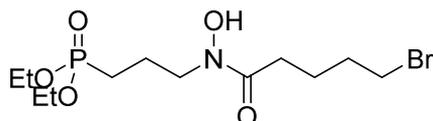
R_f = 0.46 (95/5 DCM/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.79 (s, 1H), 4.15 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.80 – 3.75 (m, 2H, CH₂NOH), 3.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂Br), 3.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CO), 2.04 – 1.94 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.7 (CO), 62.4 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.5 (d, ³J_{C-P} = 4.1 Hz, CH₂NOH), 35.9, 26.8, 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 140.1 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.4.

m/z (ES⁺) 446.04 (60 %, [M]⁺).

Diethyl (3-(5-bromo-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonate 171d

The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **171d** from *O*-benzylated hydroxamate **170d** (145 mg). The crude product was purified by column chromatography (EA 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **171d** (34 mg, 28 %) as a colorless oil.

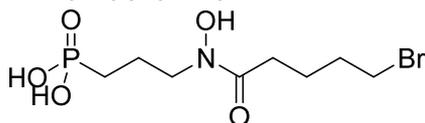
R_f = 0.46 (95/5 DCM/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.63 (s, 1H), 4.06 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (brs, 2H, CH₂NOH), 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂Br), 2.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CO), 2.00 – 1.87 (m, 4H), 1.87 – 1.73 (m, 4H), 1.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.4 (CO), 62.2 (d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂), 47.5 (d, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, CH₂NOH), 33.4, 32.4, 31.4, 23.2, 22.1 (d, ¹J_{C-P} = 140.6 Hz, PCH₂), 18.9 (d, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.9.

m/z (ES⁺) 374.07 (100 %, [M]⁺).

(3-(5-Bromo-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonic acid 172d

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **172d** from diethylphosphonate **171d** (53 mg, 0.134 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 45/55 respectively.

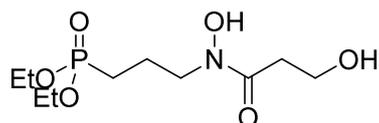
¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 3.69 (t, *J* = 6.8 Hz, 1.1 of 2H, CH₂NOH), 3.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂Br), 3.35 (dd, *J* = 7.0, 2.1 Hz, 0.9 of 2H, CH₂NOH), 2.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 1.1 of 2H, CH₂CO), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 0.9 of 2H, CH₂CO), 2.14 – 1.62 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.7 Hz, CH₂NOH), 33.8, 33.7, 33.7, 33.5, 33.1, 32.2, 25.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.3 Hz, PCH₂), 24.6, 24.4, 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, Methanol-*d*₄) δ 29.7, 27.5.

HRMS (ES⁺) calculated for C₈H₁₆BrN₁O₅P [M]⁺: 315.9944, found 315.9955 (30%).

Diethyl (3-(N,3-dihydroxypropanamido)propyl)phosphonate **174b**



The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **174b** from *O*-benzylated hydroxamate **148b** (200 mg). The crude product was purified by column chromatography (EA 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **174d** (145 mg, 96 %) as a colorless oil.

R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

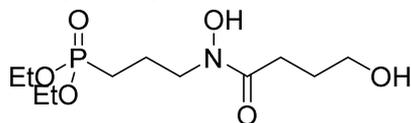
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.80 (s, 1H), 4.15 – 4.04 (m, 4H, POCH₂), 3.88 (brs, 2H), 3.77 (brs, 2H), 2.78 (s, 2H, CH₂CO), 1.98 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (CO), 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 58.7, 47.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂NOH), 34.4, 22.1 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.5 Hz, PCH₂), 18.8 (d, ²*J*_{C-P} = 4.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 31.1.

***m/z* (ES⁺)** 284.13 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N,4-dihydroxybutanamido)propyl)phosphonate **174c**



The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **174c** from *O*-benzylated hydroxamate **148c** (206 mg). The crude product was purified by column chromatography (EA 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **174c** (150 mg, 95 %) as a colorless oil.

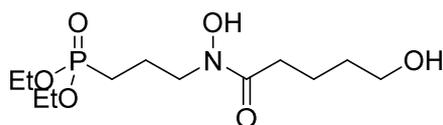
R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.79 – 9.68 (m, 1H), 4.16 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.80 – 3.75 (m, 2H), 3.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.74 – 2.67 (m, 2H, CH₂CO), 2.02 – 1.82 (m, 6H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.3 (CO), 62.6, 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 47.4 (d, ³*J*_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂NOH), 29.9, 27.4, 21.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.2 Hz, PCH₂), 18.7 (d, ²*J*_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.2.

***m/z* (ES⁺)** 320.12 (100%, [M+Na]⁺).

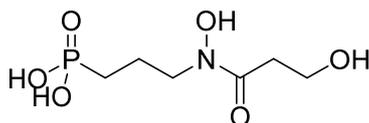
Diethyl (3-(N,5-dihydroxypentanamido)propyl)phosphonate 174d

The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **174d** from *O*-benzylated hydroxamate **148d** (446 mg). The crude product was purified by column chromatography (EA 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **174d** (227 mg, 66 %) as a colorless oil.

R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.64 (s, 1H), 4.17 – 3.98 (m, 4H, POCH₂), 3.84 – 3.72 (m, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CO), 2.03 – 1.92 (m, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.2 (CO), 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, POCH₂), 62.0, 47.4 (d, ³J_{C-P} = 5.3 Hz, CH₂NOH), 32.2, 31.6, 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 140.8 Hz, PCH₂), 20.3, 18.7, 16.3 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).
m/z (ES+) 311.15 (85 %, [M+Na]⁺).

(3-(N,3-Dihydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid 175b

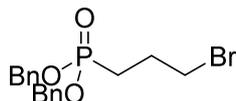
The general procedure **K1** was applied to synthesize the compound **175b** from diethylphosphonate **174b** (58 mg, 0.21 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 50/50 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 3.87 – 3.77 (m, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.3 Hz, 1 of 2H, CH₂NOH), 3.38 – 3.32 (m, 1 of 2H, CH₂NOH), 2.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.53 (t, *J* = 6.2 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.10 – 1.99 (m, 1H), 1.92 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.90 – 1.81 (m, 1H), 1.79 – 1.69 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.6 (CO), 57.3, 50.8 (d, ³J_{C-P} = 15.6 Hz, CH₂NOH), 34.8, 23.5 (d, ¹J_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 17.2 (d, ²J_{C-P} = 4.2 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 28.5, 26.1.

m/z (ES-) 226.05 (26 %, [M]⁻).

Dibenzyl (3-bromopropyl)phosphonate 176

The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **176** from dibenzylphosphite **158** (5 g, 19.1 mmol) and 1,3-dibromopropane **163c** (7.74 mL, 76.2 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 50/50 to EA 100 %), to afford the desired compound **176** (3.4 g, 47 %) as a colorless oil.

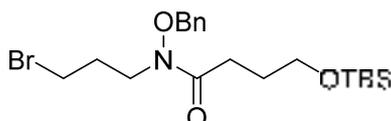
R_f = 0.50 (7/3 PE/EA)

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.30 (m, 10H), 5.07 (dd, J = 11.8, 9.0 Hz, 2H, OCH₂Ph), 4.97 (dd, J = 11.8, 8.3 Hz, 2H, POCH₂Ph), 3.40 (td, J = 6.4, 0.8 Hz, 2H, CH₂Br), 2.16 – 2.02 (m, 2H), 2.00 – 1.84 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 136.2 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 5.9 Hz, POCH₂C), 128.6, 128.5, 128.0, 67.3 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.4 Hz, OCH₂Ph), 33.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 19.2 Hz, CH₂Br), 25.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 4.2 Hz, PCH₂CH₂), 24.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 142.2 Hz, PCH₂).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.6.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(3-bromopropyl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)butanamide 177c**



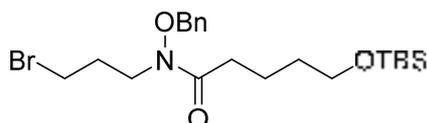
The general procedure I was applied to synthesize the compound **177c** from benzyloxyamine **153c** (154 mg, 0.46 mmol) and 1,3-dibromopropane **163c** (0.05 mL, 0.46 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 70/30 to EA 100 %), to afford the desired compound **177c** (58 mg, 27 %) as a colorless oil.

R_f = 0.41 (5/5 PE/EA)

^1H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.24 (s, 5H), 4.69 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.63 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.49 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.27 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.02 (p, J = 6.6 Hz, 2H), 1.67 (p, J = 6.4 Hz, 2H), 0.73 (s, 9H, C(CH₃)₃), -0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 134.3, 129.2, 129.0, 128.7, 76.5 (OCH₂Ph), 62.3 (CH₂OTBS), 30.3, 28.7, 27.5, 25.9, 23.8, 18.3 (C(CH₃)₃), -5.3 (Si(CH₃)₂).

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(3-bromopropyl)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)pentanamide 177d**

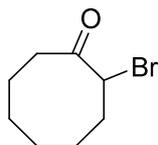


The general procedure I was applied to synthesize the compound **177d** from benzyloxyamine **153d** (150 mg, 0.48 mmol) and 1,3-dibromopropane **163c** (0.05 mL, 0.48 mmol, 4 eq.). The crude product was purified by column chromatography (PE/EA 70/30 to EA 100 %), to afford the desired compound **177d** (75 mg, 36 %) as a colorless oil.

R_f = 0.41 (5/5 PE/EA)

^1H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ 7.43 – 7.39 (m, 5H), 4.88 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.95 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.80 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.27 – 2.14 (m, 2H), 0.89 (s, J = 2.9 Hz, 9H, C(CH₃)₃), 0.07 (s, J = 3.0 Hz, 6H, Si(CH₃)₂).

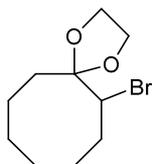
^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 134.3, 129.2, 129.0, 128.7, 77.3 (OCH₂Ph), 59.3 (CH₂OTBS), 30.9, 25.9, 21.0, 18.3 (C(CH₃)₃), -5.3 (Si(CH₃)₂).

2-Bromocyclooctanone 180

To a solution of cyclooctane **179** (1 g, 7.9 mmol) in ethanol (10 mL) was added HCl (1N, 2.8 mL) at room temperature. The reaction mixture was cooled to 0°C and bubbled by a draught of argon over 5 min. Then was added bromine (0.61 mL, 11.85 mmol, 1.5 eq.) portionwise at 0°C and stirred for 24 h. The mixture was quenched by the addition of a solution of sodium bisulfate, evaporated, extracted 4 times with ether and washed with brine. The organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and evaporated. Purification of the crude residue via column chromatography (PE/EA), yielded the desired compound **180** (1.033 g, 64 %) as a colorless oil.

R_f = 0.53 (95/5, PE/EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 4.28 (dd, *J* = 11.3, 4.0 Hz, 1H, CHBr), 2.92 – 2.85 (m, 1H), 2.40 (ddt, *J* = 11.2, 7.8, 3.9 Hz, 2H), 2.36 – 2.29 (m, 2H), 1.97 – 1.90 (m, 1H), 1.79 – 1.65 (m, 3H), 1.57 (m, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 1H), 1.22 – 1.13 (m, 1H).

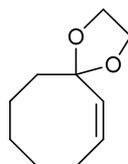
6-Bromo-1,4-dioxaspiro[4.7]dodecane 181

To a solution of 2-bromocyclooctan-1-one **180** (500 mg, 2.4 mmol) in benzene (20 mL) was added APTS (10 mol%, 0.24 mmol, 46 mg) and ethylene glycol (10 eq, 2.4 mmol, 1.34 mL). The reaction was fitted with a Dean Stark condenser and refluxed over 24 h (110 °C). The mixture was cooled to room temperature, washed once with water, and extracted 3 times with ethyl acetate. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound was afforded as a yellow oil (508 mg, 86 %) without further purification.

R_f = 0.66 (90/10, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.54 – 4.49 (m, 1H), 4.17 – 4.13 (m, 2H, OCH), 4.03 – 3.92 (m, 2H, OCH₂), 2.36 – 2.26 (m, 2H), 2.04 – 1.96 (m, 1H), 1.92 – 1.84 (m, 1H), 1.75 – 1.49 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 110.9 (CO), 66.1 (OCH₂), 65.1 (OCH₂), 59.6 (CHBr), 34.3, 33.7, 26.7, 22.2.

(Z)-1,4-dioxaspiro[4.7]dodec-6-ene 182

To a solution of 6-bromo-1,4-dioxaspiro[4.7]dodecane **181** (8.369 g, 33.7 mmol) was added DBU (2 eq, 67.4 mmol, 10.09 mL) and stirred 5 hours at 160 °C under reflux. Then, the reaction was quenched by the addition of water, extracted 5 times with diethyl ether and 5 times with ethyl acetate, and washed with brine. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced

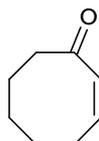
pressure. Purification by flash Combi chromatography yielded the desired compound (1.818 g, 32%) as a yellow oil.

R_f = 0.68 (90/10, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 5.69 – 5.56 (m, 2H, CH=CH), 3.93 (s, 4H, OCH₂), 2.41 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.68 – 1.49 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 133.3 (C=C), 131.4 (C=C), 109.8 (CO), 63.9 (OCH₂), 39.2, 27.7, 24.4, 23.8, 21.6.

(Z)-cyclooct-2-en-1-one **183**

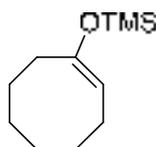


To a solution of (Z)-1,4-dioxaspiro[4.7]dodec-6-ene **182** (200 mg, 1.19 mmol) in a mixture of acetone/water (14.25/0.75 mL) was added PPTS (10 mol%, 29.9 mg). The reaction was heated under reflux (70 °C) overnight. After 16 hours, the acetone was evaporated; a solution of saturated aqueous NaHCO₃ was added, extracted 3 times with diethyl ether and washed with brine. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 90/10) yielded the desired compound (33 mg, 22 %) as a yellow oil. To a solution of Pd(OAc)₂ (17 mg, 0.7 mmol, 0.5eq.) and *p*-benzoquinone (82 mg, 0.7 mmol, 0.5 eq.) in acetonitrile was added **184** (30 mg, 1.5 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred for 2 h, and then filtered on a pad of celite. Purification by column chromatography yielded the desired compound (90 mg, 48 %) as a yellow oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 6.36 (dt, *J* = 12.5, 7.0 Hz, 1H, CH=CH), 6.01 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH=CH), 2.66 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.59 – 2.45 (m, 1H), 1.83 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 206.1 (CO), 141.6 (C=C), 132.4 (C=C), 42.7, 28.5, 25.1, 23.0, 22.5.

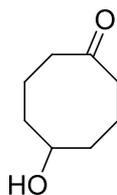
(E)-(Cyclooct-1-en-1-yloxy)trimethylsilane **184**



To a solution of cyclooctanone **179** (10 g, 79.2 mmol) in DMF, was added TEA (22 mL, 158 mmol, 2 eq.) and TMSCl (20 mL, 158 mmol, 2 eq.) and the mixture was stirred under reflux overnight. The reaction was quenched by the addition of water and the DMF was removed by evaporation under reduced pressure. The residue was diluted with hexane, washed with water three times and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **184** (14.7 g, 93 %) was afforded by distillation under reduced pressure as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 4.75 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.22 – 2.13 (m, 2H), 2.09 – 1.92 (m, 2H), 1.68 – 1.45 (m, 8H), 0.20 (s, 9H, SiCH₃)₃.

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 153.0, 105.4 (C=CH), 31.0, 30.9, 27.8, 26.3, 26.3, 25.4, 0.4 (SiCH₃)₃.

5-Hydroxycyclooctan-1-one 189

To a solution of PCC (747 mg, 3.5 mmol, 1 eq.) in DCM was added a solution of 1,5 cyclooctanediol **188** (500 mg, 3.5 mmol, 1 eq.) in DCM. After 4 h, anhydrous diethyl ether was added and the mixture was filtered through a pad of celite. The desired compound **189** (390 mg, 79 %) was afforded by column chromatography (PE/EA 80/20 to PE/EA 50/50) as a colorless oil.

R_f = 0.25 (6/4, PE/EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 4.34 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CHO), 2.51 (brs, 1H), 2.12 (m, 2H), 1.95 (m, 4H), 1.74 (m, 2H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.53 (dd, *J* = 13.6, 5.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 207.1 (CO), 72.5 (CHOH), 36.3, 28.2, 20.6.

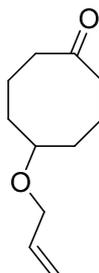
5-(Allyloxy)cyclooctan-1-ol 190

To a solution of 1,5-cyclooctanediol **188** (570 mg, 3.5 mmol, 1 eq.) in DMF at 0 °C, was added NaH (92 mg, 3.8 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred for 1 h at 0 °C, followed by the addition of allyl bromide (0.30 mL, 3.5 mmol, 1 eq.) dropwise. The reaction was allowed to warm to room temperature overnight and then quenched by the addition of water. The aqueous layer was extracted 5 times with diethyl ether and the organic layers were combined and washed with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **190** (442 mg, 61 %) was afforded by column chromatography (PE/EA 90/10 to PE/EA 30/70) as a colorless oil.

R_f = 0.42 (EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 5.97 – 5.86 (m, 1H, CH=CH₂), 5.27 (dd, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.15 (dd, *J* = 10.4, 1.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 3.96 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.81 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, CHO), 3.40 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, CHO), 1.86 (m, 6H), 1.71 – 1.57 (m, 4H), 1.50 – 1.42 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 135.4 (CH=CH₂), 116.4 (CH=CH₂), 78.5 (COCH₂), 71.8, 69.1, 36.5, 32.7, 20.5.

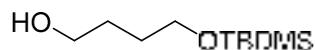
5-(Allyloxy)cyclooctan-1-one **191**

To a solution of alcohol **190** (442 mg, 2.4 mmol, 1 eq.) in DCM, was added portionwise PCC (724 mg, 3.36 mmol, 1.4 eq.) over 2 h. The mixture was stirred for an additional 30 min, and then concentrated under reduced pressure and directly submitted to column chromatography (PE/EA 90/10 to PE/EA 50/50). The desired compound **191** (341 mg, 78 %) was afforded as a colorless oil.

R_f = 0.74 (EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 5.87 (ddt, *J* = 17.2, 10.9, 5.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.24 (dq, *J* = 17.2, 1.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.15 (dq, *J* = 10.4, 1.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 3.91 (m, 2H, OCH₂), 3.18 (m, CHO), 2.57 (ddd, *J* = 13.2, 9.3, 3.5 Hz, 2H), 2.30 (ddd, *J* = 13.5, 9.2, 3.4 Hz, 2H), 2.21 – 1.98 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.70 (m, 2H).

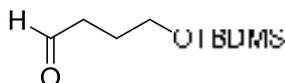
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 216.7 (CO), 134.9 (CH=CH₂), 116.8 (CH=CH₂), 77.6 (CH), 69.4, 42.2, 33.7, 22.9.

4-((*t*-butyldimethylsilyl)oxy)butan-1-ol **197**

To a solution of 1,4-butanediol **196** (10 g, 111 mmol, 1 eq.) in THF, cooled at 0 °C, was added NaH (2.9 g, 122 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred for 2.5 h at 0 °C, followed by the addition of TBDMSCl (18.4 g, 122 mmol, 1.1 eq.). After 16 h, the reaction was quenched by the addition of K₂CO₃. The mixture was extracted 3 times with diethyl ether and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **197** (16.2 mg, 71 %) was afforded by column chromatography (PE/EA 90/10 to PE/EA 30/70) as a colorless oil.

R_f = 0.8 (3/7, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 3.76 – 3.61 (m, 4H), 1.76 – 1.58 (m, 4H), 0.91 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

4-((*t*-butyldimethylsilyl)oxy)butanal **198**

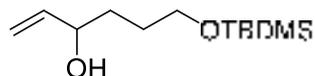
To a solution of DMSO (0.208 mL, 2.94 mmol, 3 eq.) in DCM was added a solution of oxalyl chloride (0.12 mL, 1.4 mmol, 1.5 eq.) in DCM, dropwise at – 78 °C. The mixture was stirred for 15 min, before the addition of a solution of alcohol **197** (200 mg, 0.98 mmol, 1 eq.) in DCM, still at – 78 °C. The mixture was stirred for 45 min at – 78 °C before the addition of DIPEA (0.85 mL, 4.9 mmol, 5 eq.). The reaction was allowed to warm up to room temperature in 45 min. The mixture was poured in diethyl ether, washed with a solution of CuSO₄ (3 times) and by a saturated solution of NH₄Cl (3 times). The organic

layers was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure, yielding the desired compound **198** (148 mg, 75 %), submitted to the next step without further purification.

R_f = 0.69 (9/1, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.80 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂O), 2.51 (td, *J* = 7.1, 1.8 Hz, 2H, COCH₂), 1.87 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, 6H, SiCH₃).

6-((*t*-butyldimethylsilyloxy)hex-1-en-3-ol **199**



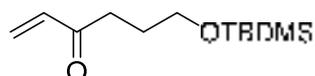
To a solution of aldehyde **198** (199 mg, 1.9 mmol) in THF was added a solution of vinylmagnesium bromide (0.9 mL, 1M in THF, 1 eq.) at -78 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched by the addition of a saturated solution of NH₄Cl, extracted 3 times with EA. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **199** (176 mg, 78 %) was afforded by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 80/20) as a colorless oil.

R_f = 0.35 (9/1, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 5.89 (ddd, *J* = 17.2, 10.4, 5.9 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.25 (dt, *J* = 17.2, 1.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.14 – 5.06 (m, 1H, CH=CH₂), 4.15 (m, 1H, CHOH), 3.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂O), 2.65 (brs, 1H, OH), 1.72 – 1.60 (m, 4H), 0.91 (s, *J* = 2.9 Hz, 9H, C(CH₃)₃), 0.08 (s, *J* = 3.1 Hz, 6H, SiCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 141.2 (CH=CH₂), 114.3 (CH=CH₂), 72.6 (CHOH), 63.4 (CH₂O), 34.5, 28.7, 25.9 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), -5.3 (SiCH₃).

6-((*t*-butyldimethylsilyloxy)hex-1-en-3-one **200**

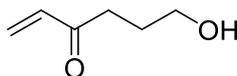


To a solution of allylic alcohol **199** (2.2 g, 9.6 mmol, 1 eq.) in DCM was added Dess-Martin periodinane (4.06 g, 9.6 mmol, 1 eq.) at 0 °C. The cooling bath was removed and the reaction was stirred for 15 min being poored in diethyl ether. The mixture was stirred for 30 min with a mix of an aqueous saturated solution of NaHCO₃ and an aqueous saturated solution of Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with ether (3 times) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **200** (1.3 g, 58 %) was afforded by column chromatography (PE 100 % to PE/EA 50/50) as a colorless oil.

R_f = 0.47 (9/1, PE/EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 6.37 (dd, *J* = 17.7, 10.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.24 (dd, *J* = 17.7, 1.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.84 (dd, *J* = 10.5, 1.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 3.65 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂O), 2.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, COCH₂), 1.84 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, 6H, SiCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 200.8 (CO), 136.6 (CH=CH₂), 128.0 (CH=CH₂), 62.1 (CH₂O), 35.8, 26.9, 25.9 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), -5.3 (SiCH₃).

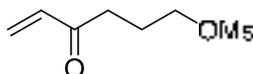
6-Hydroxyhex-1-en-3-one 194

To a solution of enone **200** (54 mg, 0.23 mmol) was added a solution of HCl at 0.08 M in a mixture of THF/H₂O (10/5). A saturated solution of NaHCO₃ was added, and THF was added until separation of the two phases. The aqueous layer was extracted with EA (5 times). The combined organic layers were washed with NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **194** was afforded by a quick column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) partially not pure and submitted to the next step in the same day.

R_f = 0.26 (5/5, PE/EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 6.38 (dd, *J* = 17.7, 10.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.25 (dd, *J* = 17.7, 1.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.85 (dd, *J* = 10.2, 1.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 3.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂O), 2.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, COCH₂), 1.90 (tt, *J* = 6.9, 6.1 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 201.0 (CO), 136.4 (CH=CH₂), 128.4 (CH=CH₂), 62.2 (CH₂O), 36.2, 26.5.

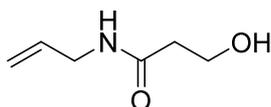
4-Oxohept-5-en-1-yl methanesulfonate 201

To a solution of alcohol **194** (1.23 g), in DCM was added TEA (3.1 mL, 2 eq.) and MsCl (1.74 mL, 2 eq.) at 0 °C. The mixture was stirred overnight at room temperature and quenched by addition of water. The mixture was extracted with DCM (3 times) and EA (2 times). The combined organic layers were washed with NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **201** was afforded by a quick column chromatography (PE 100 % to PE/EA 20/80) and immediately submitted to the next step in the same day.

R_f = 0.41 (5/5, PE/EA)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 6.37 (dd, *J* = 17.7, 10.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.26 (dd, *J* = 17.6, 0.8 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.89 (dd, *J* = 10.5, 0.9 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.29 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂O), 3.01 (s, *J* = 3.8 Hz, 3H, SCH₃), 2.78 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, COCH₂), 2.13 – 2.07 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 199.0 (CO), 136.2 (CH=CH₂), 128.7 (CH=CH₂), 69.2 (CH₂O), 37.3 (SCH₃), 34.8, 23.2.

N-allyl-3-hydroxypropanamide 202a

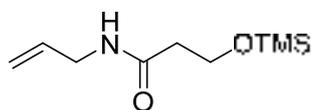
The general procedure **G** was applied to synthesize the compound **202b** and **202c** from allylamine **202a** (0.38 mL, 5 mmol) and β-propiolactone (0.25 mL, 5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA/MeOH 90/10), to afford the desired compound **202c** (95 mg, 15 %) as a colorless oil.

R_f = 0.69 (9/1, EA/MeOH)

^1H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ 6.07 (s, J = 19.6 Hz, 1H, NH), 5.84 (ddt, J = 17.1, 10.3, 5.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.29 – 5.07 (m, 2H, CH=CH₂), 3.89 (m, 4H), 2.49 – 2.43 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.3 (CO), 133.9 (CH=CH₂), 116.4 (CH=CH₂), 58.8 (CH₂O), 41.8, 37.9.

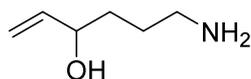
N*-allyl-3-((trimethylsilyl)oxy)propenamide **202c*



^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 6.41 (s, 1H, NH), 5.86 (ddt, J = 17.2, 10.3, 5.5 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.20 (dq, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.14 (dq, J = 10.3, 1.5 Hz, 2H), 3.90 (tt, J = 5.6, 1.6 Hz, 2H), 3.88 – 3.84 (m, 2H), 2.44 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 0.14 (s, 9H, OSiMe₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.6 (CO), 134.2 (CH=CH₂), 115.9 (CH=CH₂), 58.9 (CH₂O), 41.6, 39.4, -0.6 (SiMe₃).

6-Aminohex-1-en-3-ol

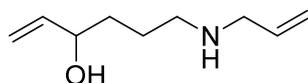


To a solution of acetonitrile (1.11 mL, 21.4 mmol) in THF was added *n*-butyllithium (13.4 mL, 1.75 M in THF, 1.1 eq.) at $-78\text{ }^\circ\text{C}$ and the mixture was stirred for 2 h. To the mixture was added 3,4-epoxy-1-butene **205** (1.5 g, 21.4 mmol, 1eq. in one portion). After stirring for 3 min, the reaction was quenched at the same temperature by addition of a slightly less than one equivalent of 2N HCl. After evaporation of the majority of the solvents, the residue was extracted twice with diethyl ether. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure, leading to the 4-hydroxyhex-5-enitrile, subjected to the next step without purification. To a solution of lithium aluminium hydride (1.5 moles per mole of acetonitrile) in ether was added the crude nitrile **206**, with vigorous stirring, under a gentle reflux. After additional refluxing for 2 h, 15 aq. NaOH solution was added dropwise into the reaction at $0\text{ }^\circ\text{C}$ until the apparition of a precipitate. The precipitate was washed with THF and the solvent were evaporated, leading to the amine **207**, submitted to the next step without further purification.

R_f = 0.07 (5/5, EA/MeOH)

^1H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 6.00 – 5.82 (m, 1H, CH=CH₂), 5.27 (dt, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.09 (dt, J = 10.5, 1.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.12 (m, 1H, CHOH), 2.88 – 2.66 (m, 2H, CH₂NH₂), 1.80 – 1.46 (m, 4H).

6-(Allylamino)hex-1-en-3-ol



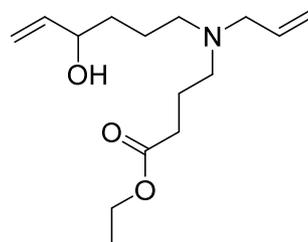
To a solution of amine **207** (500 mg, 4.3 mmol) in THF was added K₂CO₃ (600 mg, 4.3 mmol) and allyl bromide (525 mg, 4.3 mmol). The solvent was evaporated and the residue, submitted to a column chromatography (PE/EA 50/50 to 60/40 EA/MeOH).

R_f = 0.25 (7/3, EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 6.00 – 5.71 (m, 2H, CH=CH₂), 5.35 – 4.94 (m, 4H, CH=CH₂), 4.12 (m, 1H, CHOH), 3.36 – 3.16 (m, 2H, NHCH₂CH=CH₂), 2.79 – 2.55 (m, 2H), 1.88 – 1.49 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 141.80 (CH=CH₂), 135.69 (CH=CH₂), 116.72 (CH=CH₂), 113.48 (CH=CH₂), 71.87 (CHOH), 51.84 (CH₂N), 49.07 (CH₂N), 37.09, 26.56.

Ethyl 4-(allyl(4-hydroxyhex-5-en-1-yl)amino)butanoate **209**



To a solution of 6-(allylamino)hex-1-en-3-ol **208** (110 mg, 0.71 mmol) in CH₃CN was added K₂CO₃ (118 mg, 1.2 eq.) and ethyl 4-bromobutyrate (0.102 mL, 0.71 mmol, 1 eq.). Water was added to the mixture and was extracted 3 times with EA. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The desired compound **209** (45 mg, 25 %) was afforded by column chromatography (PE/EA 70/30 to EA/MeOH 90/10) as a colorless oil.

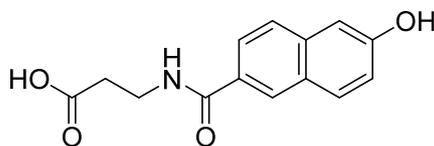
R_f = 0.6 (9/1, EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 5.93 – 5.81 (m, 2H, CH=CH₂), 5.31 – 5.04 (m, 4H, CH=CH₂), 4.13 (m, 2H, CH₂O), 4.08 (m, 1H, CHOH), 3.25 – 3.00 (m, 2H, NCH₂CH=CH₂), 2.57 – 2.39 (m, 4H), 2.35 – 2.28 (m, 2H), 1.88 – 1.74 (m, 2H), 1.73 – 1.50 (m, 4H), 1.29 – 1.23 (m, 3H).

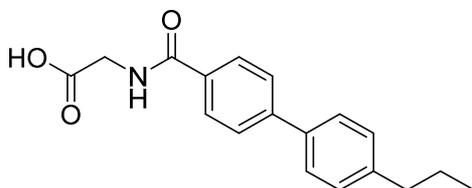
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3 (CO), 141.8 (CH=CH₂), 134.1 (CH=CH₂), 118.6 (CH=CH₂), 113.5 (CH=CH₂), 72.0 (CHOH), 60.4, 56.3, 54.1, 52.4, 37.0, 32.1, 23.8, 21.3, 14.2 (CH₃).

***m/z* (ES⁺)** 270.20 (100 %, [M]⁺).

II. Partie expérimentale chapitre 2

3-(6-Hydroxy-2-naphthamido)propanoic acid 221b

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **221b** from 6-hydroxy-2-naphthoic acid **212** (500 mg, 2.6 mmol) and β -alanine **220b** (236 mg, 2.6 mmol). The desired compound **221b** (299 mg, 42 %) was afforded without further purification as a colorless solid.

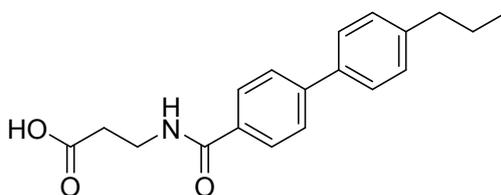
(4'-n-Propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)glycine 222a

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **222a** from 4'-n-propylbiphenyl-4-carboxylic acid **213** (303 mg, 1.2 mmol) and glycine **220a** (95 mg, 1.2 mmol). The desired compound **222a** (133 mg, 36 %) was afforded without further purification as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.87 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.25 (s, 2H), 4.22 (s, 2H, CH₂NH), 2.62 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.67 (h, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₃), 0.96 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.7 (CO), 167.6 (CO), 144.6, 142.8, 137.2, 131.8, 129.0, 127.5, 127.0, 126.9, 41.6 (CH₂NH), 37.6, 24.4, 13.8 (CH₃).

m/z (ES+) 296.13 (30%, [M]⁺).

3-(4'-n-Propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)propanoic acid 222b

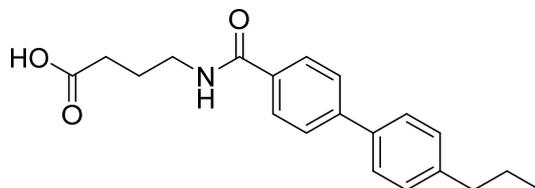
The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **222b** from 4'-n-propylbiphenyl-4-carboxylic acid **213** (563 mg, 2.3 mmol) and β -alanine **220b** (209 mg, 2.3 mmol). The desired compound **222b** was afforded without further purification as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.90 – 7.87 (m, 2H), 7.73 – 7.69 (m, 2H), 7.60 – 7.57 (m, 2H), 7.31 – 7.28 (m, 2H), 3.66 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂NH), 2.71 – 2.63 (m, 4H), 1.80 – 1.59 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.9 (CO), 173.4 (CO), 144.2, 142.5, 137.2, 132.4, 128.7, 127.4, 126.5, 126.3, 37.2, 35.6, 33.2, 24.87, 12.6 (CH₃).

m/z (ES+) 310.14 (100%, [M]⁺).

4-(4'-*n*-Propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)butanoic acid **222c**



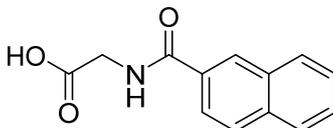
The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **222c** from 4'-*n*-propylbiphenyl-4-carboxylic acid **213** (563 mg, 2.3 mmol) and γ -aminobutyric acid **220c** (242 mg, 2.3 mmol). The desired compound **222c** was afforded without further purification as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.45 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NH), 2.64 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.94 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.68 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 175.6 (CO), 144.1, 142.5, 137.2, 132.6, 128.7, 127.4, 126.5, 126.3, 39.0, 37.2, 30.9, 24.4, 24.3, 12.6.

m/z (ES+) 324.16 (100%, [M]⁺).

(2-Naphthoyl)glycine **223a**



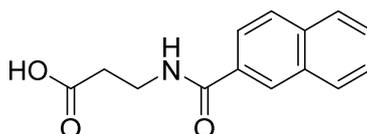
The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **223a** from 2-naphtoic acid **214** (200 mg, 1.16 mmol) and glycine **220a** (87.1 mg, 1.16 mmol). The desired compound **223a** (245 mg, 92 %) was afforded without further purification as a white solid.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.43 (s, 1H), 8.02 – 7.90 (m, 4H), 7.64 – 7.54 (m, 2H), 4.16 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 171.8 (CO), 169.1 (CO), 134.9, 132.6, 130.9, 128.6, 127.9, 127.6, 127.5, 127.4, 126.5, 123.4, 41.0 (CH₂).

m/z (ES+) 228.07 (100%, [M]⁺).

3-(2-Naphthamido)propanoic acid **223b**



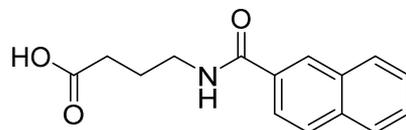
The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **223b** from 2-naphtoic acid **214** (535 mg, 2.3 mmol) and β -alanine **220b** (184 mg, 2.06 mmol). The desired compound **223b** (568 mg, 75 %) was obtained without further purification as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.36 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.93 (t, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.87 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 2H), 3.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NH), 2.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 174.0 (CO), 168.8 (CO), 134.8, 132.6, 131.3, 128.5, 127.9, 127.4, 127.3, 126.4, 123.4, 35.7 (CH₂), 33.2 (CH₂).

m/z (ES+) 242.08 (100%, [M]⁺).

4-(2-Naphthamido)butanoic acid **223c**

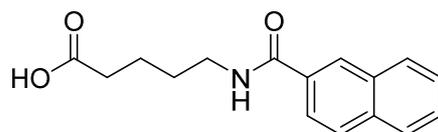


The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **223c** from 2-naphthoic acid **214** (535 mg, 2.06 mmol) and 5-aminovaleric acid **220c** (213 mg, 2.06 mmol). The desired compound **223c** (572 mg, 72 %) was afforded without further purification as a colorless solid.

^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.37 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 11.2, 8.0$ Hz, 2H), 7.88 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.58 (pd, $J = 6.9, 1.5$ Hz, 2H), 3.49 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.96 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H).

m/z (ES+) 256.09 (100%, [M]⁺).

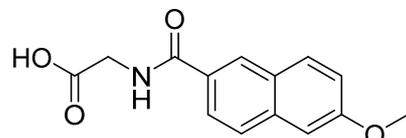
5-(2-Naphthamido)pentanoic acid **223d**



The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **223d** from 2-naphthoic acid **214** (535 mg, 2.06 mmol) and γ -aminobutyric acid **220d** (241 mg, 2.06 mmol). The desired compound **223d** was afforded without further purification as a colorless solid.

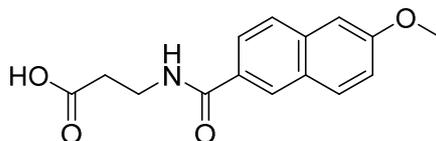
^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.37 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.00 – 7.86 (m, 4H), 7.61 – 7.54 (m, 2H), 3.50 – 3.42 (m, 2H), 2.41 – 2.32 (m, 2H), 1.72 (m, 4H).

(6-Methoxy-2-naphthoyl)glycine **224a**



The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **224a** from 6-methoxy-2-naphthoic acid **215** (411 mg, 1.9 mmol) and glycine **220a** (152 mg, 1.9 mmol). The desired compound **224a** (391 mg, 74 %) was afforded without further purification as a white solid.

m/z (ES+) 282.07 (100%, [M+Na]⁺).

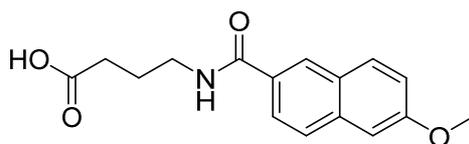
3-(6-Methoxy-2-naphthamido)propanoic acid 224b

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **224b** from 6-methoxy-2-naphthoic acid **215** (200 mg, 0.99 mmol) and β -alanine **220b** (88 mg, 0.99 mmol). The desired compound **224b** (182 mg, 67 %) was afforded without further purification as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.28 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 1.1$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.67 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, C(O)CH₂).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol- d_4) δ 174.2 (CO), 168.9 (CO), 159.3, 136.5, 130.1, 129.0, 127.9, 127.1, 126.7, 123.9, 119.3, 105.2, 54.4 (CH₃), 35.7, 33.4.

m/z (ES+) 296.09 (60%, [M]⁺).

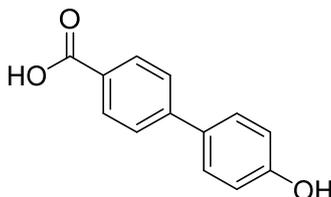
4-(6-Methoxy-2-naphthamido)butanoic acid 224c

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **224c** from 6-methoxy-2-naphthoic acid **215** (207 mg, 1.02 mmol) and γ -aminobutyric acid **220c** (105 mg, 1.02 mmol). The desired compound **224c** was afforded without further purification as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.29 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.89 – 7.79 (m, 3H), 7.29 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.47 (td, $J = 6.9, 4.9$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.44 (dt, $J = 14.4, 7.3$ Hz, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 2H).

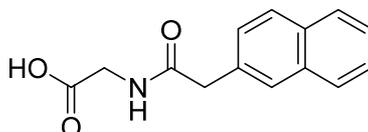
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol- d_4) δ 173.4 (CO), 169.0 (CO), 159.3, 136.5, 130.0, 127.1, 126.7, 123.9, 119.3, 105.2, 54.4 (CH₃), 39.0, 30.9, 24.8.

m/z (ES+) 310.10 (100%, [M+Na]⁺).

4'-Hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid 225b

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **225b** from 4'-hydroxy-4-biphenylcarboxylic acid **216** (500 mg, 2.6 mmol) and β -alanine **220b** (236 mg, 2.6 mmol). The desired compound **225b** (299 mg, 42 %) was afforded without further purification as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.64 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.63 (m, 2H).

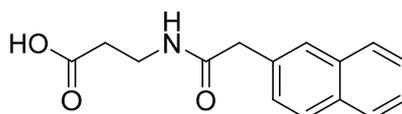
(2-(Naphthalen-2-yl)acetyl)glycine 226a

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **226a** from 2-naphthylacetic acid **217** (307 mg, 1.6 mmol) and glycine **220a** (124 mg, 1.6 mmol). The desired compound **226a** (356 mg, 89 %) was afforded without further purification as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.86 – 7.82 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.51 (qd, $J = 7.0, 3.4$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 5.95 (s, NH), 4.05 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH₂NH), 3.83 (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.6 (CO), 133.5, 132.6, 131.4, 129.0, 128.4, 127.7, 127.6, 127.2, 126.5, 126.2, 43.5, 41.4.

m/z (ES+) 244.10 (100%, [M]⁺).

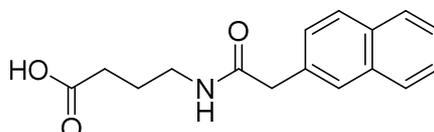
3-(2-(Naphthalen-2-yl)acetamido)propanoic acid 226b

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **226b** from 2-naphthylacetic acid **217** (500 mg, 2.7 mmol) and β -alanine **220b** (240 mg, 2.7 mmol). The desired compound **226b** (586 mg, 84 %) was afforded without further purification as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.82 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.49 – 7.38 (m, 3H), 3.66 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.49 – 3.41 (m, 2H, CH₂NH), 2.57 – 2.49 (m, 2H, C(O)CH₂).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.4 (CO), 172.7 (CO), 133.6, 132.9, 132.4, 127.7, 127.3, 127.2, 126.7, 125.7, 125.6, 125.3, 42.4, 35.2, 33.1.

m/z (ES+) 256.09 (100%, [M]⁺).

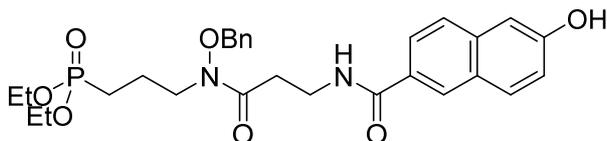
4-(2-(Naphthalen-2-yl)acetamido)butanoic acid 226c

The general procedure **M** was applied to synthesize the compound **226c** from 2-naphthylacetic acid **217** and γ -aminobutyric acid **220c** (324 mg, 3.1 mmol). The desired compound **226c** was afforded without further purification as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.85 – 7.78 (m, 3H), 7.77 – 7.74 (m, 1H), 7.52 – 7.37 (m, 3H), 3.67 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.24 (td, $J = 6.9, 4.0$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.32 (td, $J = 7.4, 4.9$ Hz, 2H), 1.79 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.9 (CO), 172.7 (CO), 133.6, 133.0, 132.5, 127.7, 127.2, 127.2, 126.7, 125.7, 125.3, 42.6, 38.3, 30.5, 24.2.

m/z (ES+) 272.12 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-(6-hydroxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonate 229b

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **229b** from acid **221b** (288 mg, 1.1 mmol) and phosphonate **143** (335 mg, 1.1 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **229b** (171 mg, 28 %) as a colorless oil.

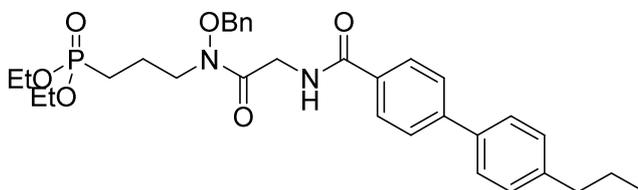
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.24 (s, 6H), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.68 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.93 (m, 4H, POCH₂), 3.65 (d, *J* = 6.3 Hz, 4H, CH₂NH + CH₂NOBn), 2.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.90 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.56 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.7 (CO), 167.8 (CO), 156.5, 136.4, 133.7, 130.7, 129.3, 129, 128.8, 127.5, 127.4, 126.6, 123.8, 119.3, 109.2, 76.5 (OCH₂Ph), 61.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 45.5 (d, ³*J*_{C-P} = 18.7 Hz, CH₂NOBn), 35.2, 32.3, 22.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 143.2 Hz, PCH₂), 20.1, 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

***m/z* (ES+)** 543.23 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-2-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)acetamido)propyl)phosphonate 230a

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **230a** from acid **222a** (586 mg, 2.2 mmol) and phosphonate **143** (690 mg, 2.2 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **230a** (349 mg, 33 %) as a colorless oil

R_f = 0.46 (95/5 EA/MeOH)

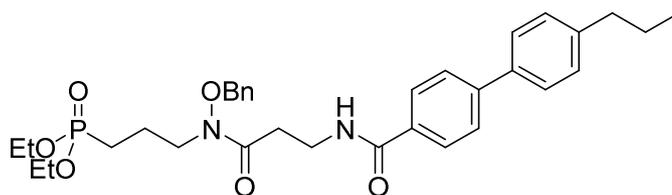
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.68 – 7.65 (m, 2H), 7.58 – 7.53 (m, 2H), 7.43 (m, 5H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.06 (s, 1H, NH), 4.93 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.39 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂NH), 4.15 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.78 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.69 – 2.60 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.04 – 1.92 (m, 2H), 1.79 – 1.64 (m, 4H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.4 (CO), 167.1 (CO), 144.4, 142.7, 137.3, 133.7, 132.2, 129.4, 129.3, 129.0, 128.8, 127.5, 127.0, 127.0, 76.9 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 46.0 (d, ³*J*_{C-P} = 18.0 Hz, CH₂NOBn), 41.5, 37.7, 24.5, 22.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.9 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

***m/z* (ES+)** 581.28 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-(4'-n-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)propanamido)propyl) phosphonate 230b



The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **230b** from acid **222b** (201 mg, 0.6 mmol) and phosphonate **143** (195 mg, 0.6 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **230b** (103 mg, 27 %) as a colorless oil.

R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

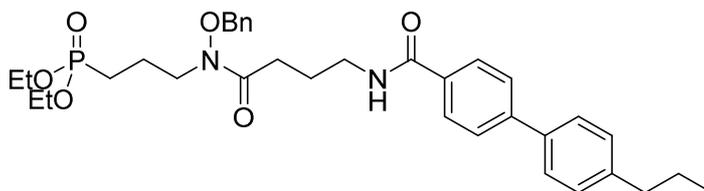
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.43 – 7.32 (m, 5H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.81 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.05 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (m, 4H, CH₂NOBn + CH₂NH), 2.75 (s, 2H, C(O)CH₂), 2.4 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.93 (m, 2H), 1.79 – 1.60 (m, 4H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.0 (CO), 167.0 (CO), 144.1, 142.7, 137.3, 133.8, 132.7, 129.3, 129.2, 129.0, 128.8, 127.4, 127.0, 126.9, 76.5 (OCH₂Ph), 61.8 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.4 (³J_{C-P} = 17.17 Hz, CH₂NOH), 37.7, 35.1, 32.2, 24.5, 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 143.2 Hz, PCH₂), 20.1 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.9 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES+) 595.29 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-(4'-n-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)butanamido)propyl) phosphonate 230c



The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **230c** from acid **222c** (770 mg, 2.3 mmol) and phosphonate **143** (714 mg, 2.3 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **230c** (225 mg, 16 %) as a colorless oil.

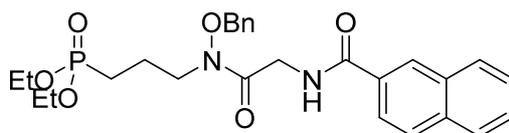
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.54 – 7.49 (m, 2H), 7.33 (t, *J* = 2.9 Hz, 5H), 7.26 (m, 2H), 4.78 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.10 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (m, 2H, CH₂NOBn), 3.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂NH), 2.62 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.97 – 1.82 (m, 4H), 1.79 – 1.62 (m, 4H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.0 (CO), 167.1 (CO), 143.9, 142.6, 137.4, 132.8, 129.2, 129.0, 128.7, 127.4, 126.9, 126.8, 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.4 (d, ³J_{C-P} = 17.6 Hz, CH₂NOBn), 40.2, 37.6, 30.4, 24.5, 23.5, 22.8 (d, ¹J_{C-P} = 121.3 Hz, PCH₂), 22.4, 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES+) 609.30 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(2-(2-naphthamido)-N-(benzyloxy)acetamido)propyl)phosphonate 231a

The general procedure **C** was applied to synthesize compound **231a** from acid **223a** (400 mg, 1.74 mmol) and phosphonate **143** (527 mg, 1.74 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **231a** (616 mg, 69 %) as a colorless oil.

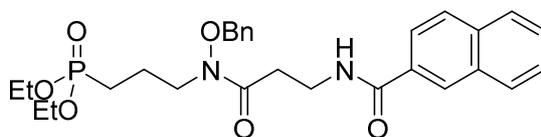
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.37 (s, 1H), 7.97 – 7.86 (m, 4H), 7.61 – 7.53 (m, 2H), 7.48 – 7.38 (m, 5H), 7.16 (s, 1H), 4.94 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.43 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, CH₂NH), 4.15 – 4.05 (m, 4H, POCH₂), 3.80 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (16 MHz, chloroform-*d*) δ 170.4 (CO), 167.3 (CO), 134.8, 133.7, 132.6, 131.1, 129.4, 129.3, 129.0, 128.9, 128.4, 127.7, 127.7, 127.6, 126.7, 123.6, 76.9 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 46.2 (d, ³J_{C-P} = 18.5 Hz, CH₂NOH), 41.6 (CH₂NH), 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 142.9 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²J_{C-P} = 3.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 30.8.

m/z (ES⁺) 535.21 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(3-(2-naphthamido)-N-(benzyloxy)propanamido)propyl)phosphonate 231b

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **231b** from acid **223b** (568 mg, 2.3 mmol) and phosphonate **143** (705 mg, 2.3 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc, 100 % to EtOAc/MeOH, 90/10) to afford the desired compound **231b** (308 mg, 25 %) as a colorless oil

R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.29 (s, 1H), 7.96 – 7.80 (m, 4H), 7.59 – 7.49 (m, 2H), 7.38 (s, 5H), 4.82 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.14 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.84 – 3.70 (m, 4H, CH₂NOBn + CH₂NH), 2.77 (m, 2H, C(O)CH₂), 2.04 – 1.86 (m, 2H), 1.84 – 1.66 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.0 (CO), 167.1 (CO), 156.9, 134.7, 133.8, 132.6, 131.6, 129.3, 129.2, 129.0, 128.8, 128.4, 128.3, 127.7, 127.5, 127.4, 126.6, 123.6, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d), 45.4 (d, ³J_{C-P} = 17.8 Hz, CH₂NOH), 35.2, 32.3, 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 141.8 Hz, PCH₂), 20.2 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

m/z (ES⁺) 527.24 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-(2-naphthamido)-N-(benzyloxy)butanamido)propyl)phosphonate 231c

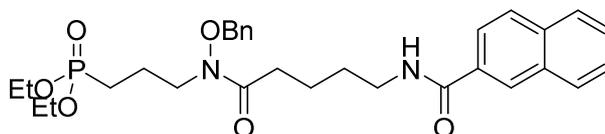
The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **231c** from acid **223c** (241 mg, 0.71 mmol) and phosphonate **143** (216 mg, 0.71 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **231c** (384 mg, 40 %) as a colorless oil

R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.34 (s, 1H), 7.92 – 7.81 (m, 4H), 7.53 (m, 2H), 7.32 (s, 5H), 4.78 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.05 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (s, 2H, CH₂NOBn), 3.51 (m, 2H, CH₂NH), 2.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.01 – 1.94 (m, 2H), 1.94 – 1.86 (m, 2H), 1.78 – 1.60 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.0 (CO), 167.4 (CO), 134.6, 134.0, 132.6, 131.7, 129.2, 129.1, 129.0, 128.7, 128.2, 127.6, 127.5, 127.5, 126.5, 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, ³*J*_{C-P} = 18.0 Hz, CH₂NOBn), 40.3 (CH₂NH), 30.4 (C(O)CH₂), 23.5 22.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.1 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²*J*_{C-P} = 3.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

Diethyl (3-(5-(2-naphthamido)-N-(benzyloxy)pentanamido)propyl)phosphonate 231d

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **231d** from acid **223d** (560 mg, 2.06 mmol) and phosphonate **143** (623 mg, 2.06 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **231d** as a colorless oil

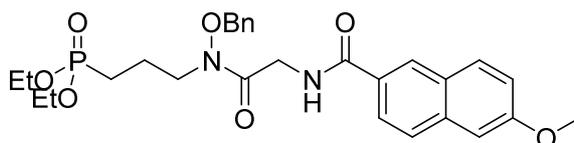
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.35 (s, 1H), 7.92 – 7.80 (m, 4H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 7.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H), 4.79 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.10 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.45 (m, 2H, CH₂NH), 2.45 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.88 (m, 2H), 1.78 – 1.61 (m, 6H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9 (CO), 167.5 (CO), 134.6, 134.2, 132.6, 131.9, 129.2, 129.0, 128.9, 128.7, 128.2, 127.6, 127.4, 127.3, 126.5, 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, ³*J*_{C-P} = 19.0 Hz, CH₂NOBn), 39.6 (CH₂NH), 31.6 (C(O)CH₂), 28.9, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.5 Hz, PCH₂), 21.4, 20.2 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

***m/z* (ES⁺)** 555.27 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-2-(6-methoxy-2-naphthamido)acetamido)propyl)phosphonate 232a

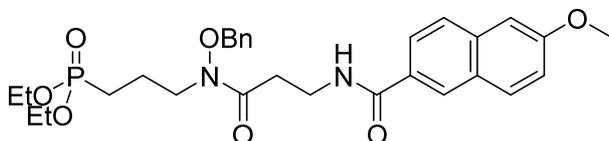
The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **232a** from acid **224a** (250 mg, 0.96 mmol) and phosphonate **143** (291 mg, 0.96 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **232a** (384 mg, 73 %) as a colorless oil.

R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.29 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.48 – 7.39 (m, 5H), 7.20 (dt, *J* = 9.9, 4.9 Hz, 1H), 7.16 – 7.14 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.93 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.42 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂NH), 4.18 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂NOBn), 1.99 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.6 (CO), 167.4 (CO), 159.1, 136.3, 133.7, 130.5, 129.4, 129.3, 128.8, 128.0, 127.4, 127.1, 124.2, 119.7, 105.6, 76.9 (OCH₂Ph), 61.73 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 55.3 (CH₃), 46.1 (d, ³*J*_{C-P} = 17.8 Hz, CH₂NOBn), 41.6, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.9 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²*J*_{C-P} = 4.1 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

***m/z* (ES⁺)** 543.24 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-(6-methoxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonate 232b

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **232b** from acid **224b** (182 mg, 0.66 mmol) and phosphonate **143** (201 mg, 0.66 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **232b** (264 mg, 71 %) as a colorless oil.

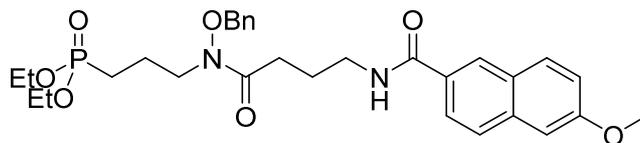
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.22 (s, 1H), 7.83 – 7.78 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.37 (s, 5H), 7.23 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.09 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.81 – 3.69 (m, 4H, CH₂NOBn + CH₂NH), 2.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.94 (m, 2H), 1.79 – 1.65 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.1 (CO), 167.2 (CO), 158.9, 136.2, 133.8, 130.5, 129.3, 128.8, 128.0, 127.3, 127.0, 124.2, 119.6, 105.5, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 55.3 (CH₃), 45.4 (d, ³*J*_{C-P} = 18.6 Hz, CH₂NOBn), 35.1, 32.3, 23.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 20.2, 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

***m/z* (ES⁺)** 579.22 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-(6-methoxy-2-naphthamido)butanamido)propyl)phosphonate 232c

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **232c** from acid **224c** (362 mg, 1.2 mmol) and phosphonate **143** (365 mg, 1.2 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **232c** (289 mg, 40 %) as a colorless oil.

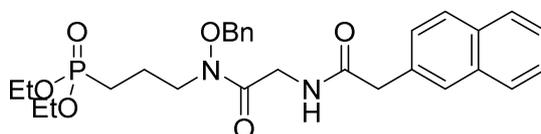
R_f = 0.46 (95/5 EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.29 – 8.22 (m, 1H), 7.88 – 7.73 (m, 3H), 7.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 5H), 7.19 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.12 – 3.98 (m, 4H, POCH₂), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.52 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NH), 2.57 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.02 – 1.85 (m, 4H), 1.71 (ddd, *J* = 18.4, 9.4, 6.6 Hz, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.1 (CO), 167.4 (CO), 158.9, 136.1, 130.5, 129.4, 129.2, 129.1, 128.7, 128.0, 127.3, 127.0, 124.2, 119.5, 105.5, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 55.4 (CH₃), 45.4 (d, ³*J*_{C-P} = 21.4 Hz, CH₂NOBn), 40.2, 30.4, 23.4, 22.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 143.6 Hz, PCH₂), 20.2, 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

m/z (ES⁺) 571.27 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-2-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)acetamido)propyl)phosphonate 233a

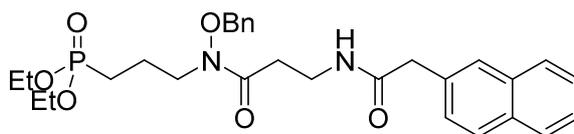
The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **233a** from acid **226a** (250 mg, 1.02 mmol) and phosphonate **143** (310 mg, 1.02 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **233a** (413 mg, 76 %) as a colorless oil.

R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.87 – 7.80 (m, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.43 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 5H), 6.30 (s, 1H, NH), 4.83 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.15 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH₂NH), 4.11 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.78 (s, 2H), 3.68 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NOBn), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.9 (CO), 170.1 (CO), 133.7, 133.5, 132.5, 132.0, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.2, 127.7, 127.3, 126.3, 125.9, 76.83 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.9 (d, ³*J*_{C-P} = 18.7 Hz, CH₂N), 43.7, 41.1, 22.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.8 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²*J*_{C-P} = 4.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

m/z (ES⁺) 527.23 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)propanamido)propyl)phosphonate 233b

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **233b** from acid **226b** (586 mg, 2.2 mmol) and phosphonate **143** (690 mg, 2.2 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **233b** (349 mg, 33 %) as a colorless oil.

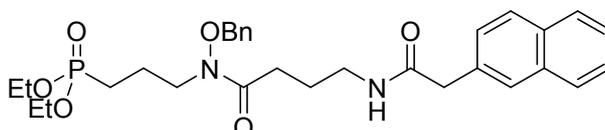
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.79 (m, 3H), 7.70 (s, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.40 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.28 (m, 2H), 6.37 (s, 1H, NH), 4.64 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.14 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.66 (m, 2H), 3.61 (m, 2H, CH₂NOBn), 3.47 (s, 2H, CH₂NH), 2.56 (s, 2H, C(O)CH₂), 1.95 – 1.78 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.4 (CO), 170.9 (CO), 133.9, 133.5, 132.5, 132.4, 129.2, 129.1, 128.7, 128.5, 127.9, 127.7, 127.6, 127.2, 126.2, 125.8, 76.3 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.3 (d, ³J_{C-P} = 18.2 Hz, CH₂NOBn), 44.0, 34.9, 32.1, 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 142.5 Hz, PCH₂), 20.1 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES⁺) 563.22 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)butanamido)propyl)phosphonate 233c

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **233c** from acid **226c** (436 mg, 1.6 mmol) and phosphonate **143** (485 mg, 1.6 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **233c** (102 mg, 11 %) as a colorless oil.

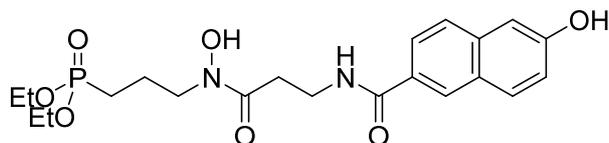
R_f = 0.46 (95/5, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.86 – 7.78 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.37 (m, 4H), 7.31 (s, 2H), 5.92 (s, 1H, NH), 4.69 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.13 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.70 (s, 2H), 3.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.21 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NH), 2.36 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C(O)CH₂), 1.93 – 1.79 (m, 2H), 1.76 – 1.62 (m, 4H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.4 (CO), 171.1 (CO), 134.1, 133.5, 132.5, 132.4, 129.2, 129.1, 128.7, 128.6, 128.2, 127.7, 127.6, 127.3, 126.3, 125.9, 76.2 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.4 (d, ³J_{C-P} = 18.9 Hz, CH₂NOBn), 44.0, 39.5, 29.8, 23.6, 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 143.0 Hz, PCH₂), 22.7 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES⁺) 555.26 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-3-(6-hydroxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonate 235b

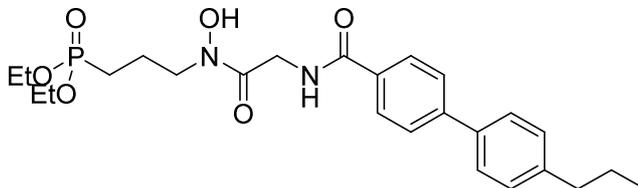
The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **235b** from *O*-benzylated hydroxamate **229b** (86 mg, 0.16 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **235b** (56 mg, 78 %) as a colorless oil.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.80 (s, 1H, NOH), 8.12 (s, 1H), 7.72 – 7.57 (m, 2H), 7.49 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.10 (s, 2H), 4.06 – 3.92 (m, 4H, POCH₂), 3.89 – 3.75 (m, 4H, CH₂NH + CH₂NOH), 2.94 – 2.84 (m, 2H, C(O)CH₂), 2.00 (d, *J* = 22.0 Hz, 2H), 1.84 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 167.6 (CO), 136.2, 130.9, 127.3, 126.6, 124.0, 118.8, 109.2, 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.3 Hz, POCH₂), 35.5, 32.5, 22.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 139.9 Hz, PCH₂), 21.1, 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.1.

***m/z* (ES⁺)** 475.16 (80%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-2-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)acetamido)propyl)phosphonate 236a

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **236a** from *O*-benzylated hydroxamate **230a** (67 mg, 0.11 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **236a** (40 mg, 71 %) as a colorless oil.

R_f = 0.30 (9/1 EA/MeOH)

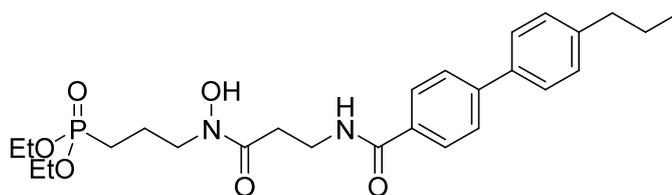
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 10.07 (s, 1H, NOH), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.48 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂NH), 4.18 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.68 – 2.60 (m, 2H), 2.09 – 1.96 (m, 2H), 1.86 (dt, *J* = 18.5, 6.9 Hz, 2H), 1.69 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 169.9 (CO), 167.2 (CO), 144.3, 142.6, 137.3, 132.3, 129.0, 127.5, 127.0, 126.9, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 48.3 (d, ³*J*_{C-P} = 10.4 Hz, CH₂NOH), 41.5, 37.7, 24.5, 22.4 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.4 Hz, PCH₂), 19.2 (PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.0.

***m/z* (ES⁺)** 512.19 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)propanamido)propyl) phosphonate **236b**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **236b** from *O*-benzylated hydroxamate **230b** (92 mg, 0.15 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **236b** (66 mg, 85 %) as a colorless oil.

R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

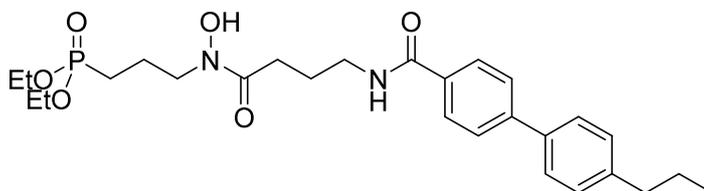
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.02 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H, POCH₂), 3.77 (t, *J* = 5.8 Hz, 4H, CH₂NOBn + CH₂NH), 2.86 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.64 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.06 – 1.91 (m, 2H), 1.90 – 1.78 (m, 2H), 1.68 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.8 (CO), 166.8 (CO), 144.0, 142.6, 137.4, 132.9, 129.0, 127.4, 127.0, 126.9, 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 47.6 (CH₂NOH), 37.7, 35.4, 32.2, 24.5, 22.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.5 Hz, PCH₂), 18.9 (PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.9 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.1.

m/z (ES⁺) 505.25 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-4-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)butanamido)propyl) phosphonate **236c**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **236c** from *O*-benzylated hydroxamate **230c** (91 mg, 0.14 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **236c** (63 mg, 81 %) as a colorless oil.

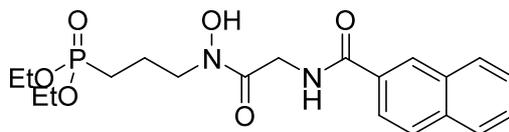
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.69 (s, 1H, NOH), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.07 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.76 (m, 2H, CH₂NOH), 3.46 (m, 2H, CH₂NH), 2.71 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.04 – 1.90 (m, 4H), 1.79 (dt, *J* = 18.6, 6.3 Hz, 2H), 1.68 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.33 – 1.22 (m, 6H, POCH₂CH₃), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9 (CO), 167.2 (CO), 143.9, 142.6, 137.4, 132.7, 129.0, 127.5, 126.9, 126.8, 62.2 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 47.6 (d, ³J_{C-P} = 8.4 Hz, CH₂NOH), 40.3, 37.7, 30.2, 24.5, 23.4, 22.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.7 Hz, PCH₂), 18.9, 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.7.

m/z (ES⁺) 519.27 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(2-(2-naphthamido)-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonate 237a

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **237a** from *O*-benzylated hydroxamate **231a** (120 mg, 0.28 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc, 100 % to EtOAc/MeOH, 90/10), to afford the desired compound **237a** (40 mg, 40 %) as a colorless oil.

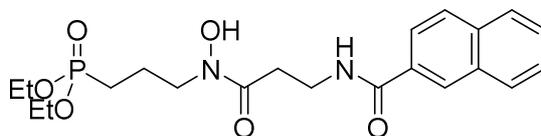
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.45 (s, 1H), 8.03 – 7.88 (m, 4H), 7.65 – 7.52 (m, 2H), 4.42 (s, 2H, CH₂NH), 4.21 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.74 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.03 – 1.75 (m, 4H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 171.4 (CO), 170.5 (CO), 136.3, 134.0, 132.5, 130.0, 129.3, 129.0, 128.8, 128.7, 127.8, 124.9, 63.3 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 48.3 (d, ³J_{C-P} = 18.5 Hz, CH₂NOH), 42.0 (CH₂NH), 23.2 (d, ¹J_{C-P} = 141.8 Hz, PCH₂), 20.9 (d, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.7 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, Methanol-*d*₄) δ 33.0.

m/z (ES⁺) 445.16 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(3-(2-naphthamido)-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 237b

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **237b** from *O*-benzylated hydroxamate **231b** (77 mg, 0.14 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **237b** (21 mg, 27 %) as a colorless oil.

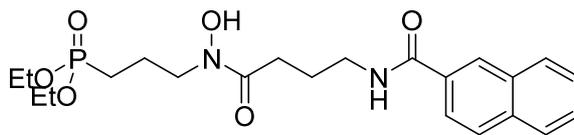
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.83 (s, 1H, NOH), 8.31 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.91 – 7.81 (m, 3H), 7.54 (pd, *J* = 6.9, 1.5 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.05 – 3.97 (m, 4H, POCH₂), 3.82 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.89 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.07 – 1.93 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.9 (CO), 167.0 (CO), 134.6, 132.6, 131.8, 128.9, 128.3, 127.6, 127.5, 127.4, 126.6, 123.6, 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 47.6 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂NOH), 35.4, 32.2, 22.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.4 Hz, PCH₂), 18.8 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.2.

m/z (ES⁺) 436.44 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(4-(2-naphthamido)-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonate 237c

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **237c** from *O*-benzylated hydroxamate **231c** (83 mg, 0.15 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **237c** (43 mg, 62 %) as a colorless oil.

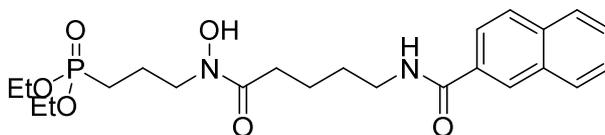
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.39 (s, 1H), 7.98 – 7.81 (m, 4H), 7.72 (s, 1H), 7.60 – 7.48 (m, 2H), 4.08 – 3.92 (m, 4H, POCH₂), 3.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.54 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂NH), 2.74 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.12 – 1.89 (m, 4H), 1.79 (dt, *J* = 18.3, 6.6 Hz, 2H), 1.26 (td, *J* = 7.0, 0.9 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9 (CO), 167.3 (CO), 134.6, 132.6, 131.7, 129.0, 128.2, 127.6, 127.6, 127.4, 126.5, 123.7, 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.6 (CH₂NOH), 40.4 (CH₂NH), 30.2 (C(O)CH₂), 23.4, 22.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.8 (PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.1.

***m/z* (ES⁺)** 473.18 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(5-(2-naphthamido)-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonate 237d

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **237d** from *O*-benzylated hydroxamate **231d** (81 mg, 0.15 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **237d** (40 mg, 59 %) as a colorless oil.

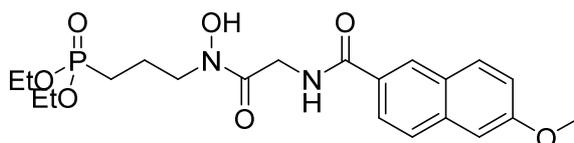
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.74 (s, 1H, NOH), 8.37 (s, 1H), 7.98 – 7.81 (m, 4H), 7.55 (pd, *J* = 6.9, 1.6 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 4.09 – 3.98 (m, 4H, POCH₂), 3.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.54 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂NH), 2.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.06 – 1.96 (m, 2H), 1.90 – 1.71 (m, 6H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9 (CO), 167.6 (CO), 134.6, 132.6, 131.9, 128.9, 128.3, 127.7, 127.5, 127.4, 126.6, 123.7, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.6 (d³*J*_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂NOH), 39.6 (CH₂NH), 31.5 (C(O)CH₂), 28.6, 22.1 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 21.6, 18.8 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

***m/z* (ES⁺)** 487.21 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-hydroxy-2-(6-methoxy-2-naphthamido)acetamido)propyl)phosphonate 238a

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **238a** from *O*-benzylated hydroxamate **232a** (100 mg, 0.18 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **238a** (65 mg, 78 %) as a colorless oil.

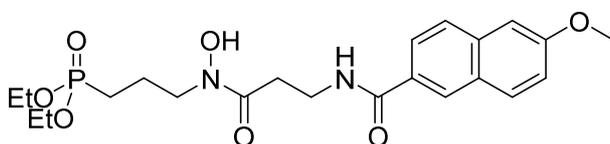
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 10.11 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.32 (m, 1H), 7.18 (dt, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH₂NH), 4.08 (m, 4H, POCH₂), 3.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 3H, OCH₃), 3.81 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.03 (dp, *J* = 18.9, 5.7 Hz, 2H), 1.86 (dt, *J* = 18.4, 6.8 Hz, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.0 (CO), 167.4 (CO), 159.0, 136.3, 130.5, 128.9, 127.9, 127.4, 127.0, 124.2, 119.6, 105.5, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 55.3 (CH₃), 48.4 (d, ³*J*_{C-P} = 10.3 Hz, CH₂NOBn), 41.6, 22.4 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.5 Hz, PCH₂), 19.3, 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 33.9.

m/z (ES⁺) 474.15 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-hydroxy-3-(6-methoxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonate 238b

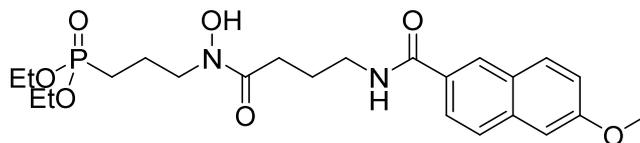
The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **238b** from *O*-benzylated hydroxamate **232b** (101 mg, 0.18 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **238b** (44 mg, 52 %) as a colorless oil.

R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.28 – 8.21 (m, 1H), 7.85 – 7.77 (m, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.20 – 7.08 (m, 2H), 4.07 – 3.94 (m, 4H, POCH₂), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (dt, *J* = 12.6, 5.9 Hz, 4H, CH₂NH + CH₂NOH), 2.88 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.06 – 1.87 (m, 2H), 1.90 – 1.73 (m, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.7 (CO), 167.2 (CO), 158.9, 136.1, 130.5, 129.5, 128.0, 127.3, 127.0, 124.2, 119.6, 105.5, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 55.3 (CH₃), 47.6 (d, ³*J*_{C-P} = 7.3 Hz, CH₂NOH), 35.4, 32.3, 22.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.7 Hz, PCH₂), 19.0 (d, ²*J*_{C-P} = 5.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.6.

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthamido)butanamido)propyl)phosphonate **238c**

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **238c** from *O*-benzylated hydroxamate **232c** (97 mg, 0.17 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **238c** (60 mg, 73 %) as a colorless oil.

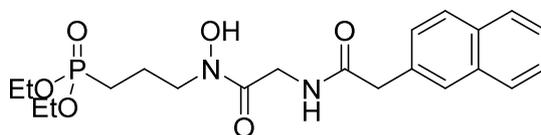
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.68 (s, 1H, NOH), 8.32 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.73 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 7.24 – 7.05 (m, 2H), 4.10 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.54 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂NH), 2.79 – 2.68 (m, 2H, C(O)CH₂), 2.13 – 1.73 (m, 6H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.9 (CO), 167.4 (CO), 158.9, 136.1, 130.5, 129.5, 128.0, 127.4, 126.9, 124.3, 119.5, 105.5, 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 55.3 (CH₃), 47.6 (d, ³J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂NOH), 40.3, 30.1, 23.5, 22.0 (d, ¹J_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.7 (d, ³J_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

m/z (ES⁺) 503.18 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)acetamido)propyl)phosphonate **239a**

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **239a** from *O*-benzylated hydroxamate **233a** (100 mg, 0.19 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **239a** (50 mg, 60 %) as a colorless oil.

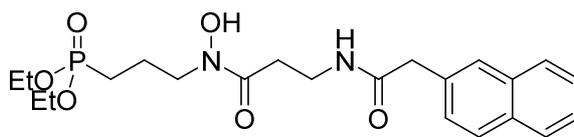
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.90 (s, 1H, NOH), 7.86 – 7.78 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.50 – 7.39 (m, 3H), 6.44 (s, 1H, NH), 4.22 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, CH₂NH), 4.11 – 3.92 (m, 4H, POCH₂), 3.78 (s, 2H), 3.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.03 – 1.84 (m, 2H), 1.85 – 1.67 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (CO), 169.6 (CO), 133.5, 132.5, 132.1, 128.6, 128.2, 127.7, 127.3, 126.2, 125.8, 62.2 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 48.1 (d, ³J_{C-P} = 10.0 Hz, CH₂N), 43.7, 41.2, 22.3 (d, ¹J_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 19.1 (PCH₂CH₂), 16.2 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.1.

m/z (ES⁺) 558.15 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-hydroxy-3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)propanamido)propyl)phosphonate 239b

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **239b** from *O*-benzylated hydroxamate **233b** (198 mg, 0.37 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **239b** (48 mg, 29 %) as a colorless oil.

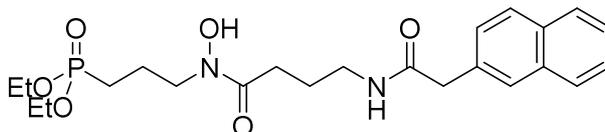
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.66 (s, 1H, NOH), 7.89 – 7.77 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 2H), 7.39 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.43 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.09 – 3.97 (m, 4H, POCH₂), 3.69 (s, 2H), 3.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.52 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NH), 2.69 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.86 (m, 2H), 1.82 – 1.71 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3 (CO), 170.9 (CO), 133.5, 132.5, 132.4, 128.5, 128.0, 127.7, 127.6, 127.3, 126.2, 125.8, 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 47.4 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, CH₂N), 44.0, 35.2, 32.3, 22.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.5 Hz, PCH₂), 18.8 (d, ²*J*_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.1.

***m/z* (ES⁺)** 473.18 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-hydroxy-4-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)butanamido)propyl)phosphonate 239c

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **239c** from *O*-benzylated hydroxamate **233c** (94 mg, 0.16 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **239c** (23 mg, 29 %) as a colorless oil.

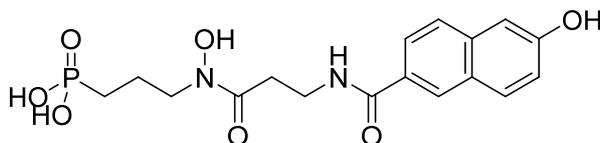
R_f = 0.30 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.49 (s, 1H, NOH), 7.88 – 7.79 (m, 3H), 7.74 (s, 1H), 7.48 (tt, *J* = 7.0, 5.0 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H, NH), 4.05 – 3.93 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.28 – 3.20 (m, 2H, CH₂NH), 2.52 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.96 – 1.83 (m, 2H), 1.81 – 1.69 (m, 4H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.3 (CO), 171.3 (CO), 133.5, 132.5, 132.5, 128.6, 128.2, 127.6, 127.4, 126.2, 125.9, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 47.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂NOH), 44.1, 39.5, 29.5, 24.0, 21.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.2 Hz, PCH₂), 18.7 (d, ²*J*_{C-P} = 5.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

***m/z* (ES⁺)** 487.20 (100%, [M+Na]⁺).

(3-(*N*-Hydroxy-3-(6-hydroxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonic acid 240b

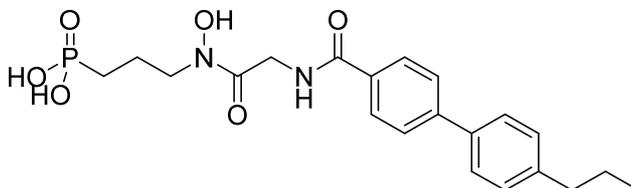
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **240b** from diethylphosphonate **235b** (47 mg, 0.10 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 38/62 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.25 (s, 1H), 7.89 – 7.66 (m, 3H), 7.20 – 7.07 (m, 2H), 3.79 – 3.65 (m, 2H of CH₂NH and 1.25 of 2H of CH₂N(OH)), 3.35 (m, 0.75 of 2H, CH₂N(OH)), 2.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 1.25 of 2H, C(O)CH₂), 2.69 (t, *J* = 6.8 Hz, 0.75 of 2H, C(O)CH₂), 2.13 – 1.65 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.2 (CO), 174.0 (CO), 170.6 (CO), 158.4, 138.2, 131.7, 131.6, 128.8, 128.7, 127.5, 125.0, 120.3, 109.8, 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.5 Hz, CH₂NOH), 37.1, 37.0, 34.7, 33.3, 25.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 139.0 Hz, PCH₂), 25.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 21.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.4 Hz, PCH₂CH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.3, 27.9.

HRMS (ES⁻) calculated for C₁₇H₂₀N₂O₇P [M]⁻: 395.1003, found; 395.0989 (100 %, [M]⁻).

(3-(*N*-Hydroxy-2-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)acetamido)propyl)phosphonic acid 241a

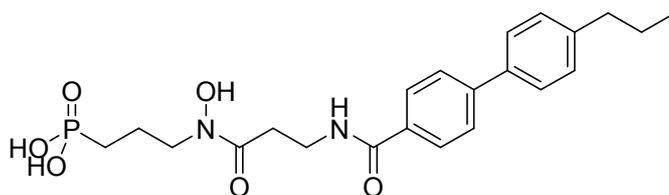
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **241a** from diethylphosphonate **236a** (25 mg, 0.05 mmol). The desired compound was obtained without further purification with only *Z* conformer.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.12 (s, 2H, CH₂NH), 3.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.70 – 2.59 (m, 2H), 2.12 – 1.94 (m, 2H), 1.92 – 1.74 (m, 2H), 1.76 – 1.59 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.1 (CO), 170.2 (CO), 145.8, 143.9, 138.6, 133.4, 130.1, 128.9, 127.9, 127.8, 52.4 (d, *J*_{C-P} = 14.8 Hz, CH₂NOH), 42.2, 38.6, 25., 25.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 139.5 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂), 14.0 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 27.4.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₁H₂₆N₂O₆P [M]⁺: 433.1534, found 433.1509 (70 %, [M]⁺).

(3-(N-Hydroxy-3-(4'-n-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)propanamido)propyl)phosphonic acid 241b

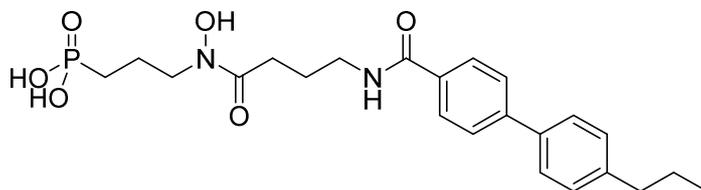
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **241b** from diethylphosphonate **236b** (59 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *other* conformers in a ratio of 20/80 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.77 – 3.61 (m, 2H of CH₂NH and 1.6H of CH₂N(OH)), 3.31 (0.6 of CH₂N(OH)), 2.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.6 of 2H, C(O)CH₂), 2.69 – 2.56 (m, 0.6 of 2H of C(O)CH₂ and 2H of CH₂CH₂CH₃), 2.03 – 1.83 (m, 2H), 1.81 – 1.60 (m, 4H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.7 (CO), 168.5 (CO), 144.2, 142.5, 137.2, 132.5, 128.7, 127.4, 126.5, 126.4, 48.2, 37.2, 35.5, 31.8, 24.2, 22.8, 20.0, 12.6.

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.6, 27.7.

HRMS (ES⁻) calculated for C₂₂H₂₈N₂O₆P [M]⁻: 447.1679, found 447.1692 (100 %, [M]⁻).

(3-(N-hydroxy-4-(4'-n-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)butanamido)propyl)phosphonic acid 241c

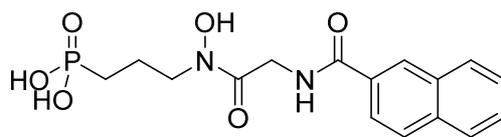
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **241c** from diethylphosphonate **236c** (56 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 10/90 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.74 – 7.67 (m, 2H), 7.63 – 7.54 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.7 Hz, 1.8 of 2H, CH₂NOH), 3.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.31 (0.2 of 2H, CH₂NOH), 2.63 (q, *J* = 8.5, 8.0 Hz, 2H of CH₂CH₂CH₃ and 1.8 of C(O)CH₂), 2.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 0.2 of 2H, C(O)CH₂), 1.94 (p, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.68 (dq, *J* = 14.6, 7.4 Hz, 4H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 175.7 (CO), 170.1 (CO), 145.6, 143.9, 138.6, 133.9, 130.1, 128.8, 127.9, 127.8, 40.7, 38.6, 32.2, 30.8, 25.7, 25.3 (d, ¹J_{C-P} = 140.0 Hz, PCH₂), 21.5, 18.6, 14.0.

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.9, 27.7.

HRMS (ES⁻) calculated for C₂₃H₃₀N₂O₆P [M]⁻: 461.1836, found 461.1805 (100 %, [M]⁻).

(3-(2-(2-Naphthamido)-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonic acid 242a

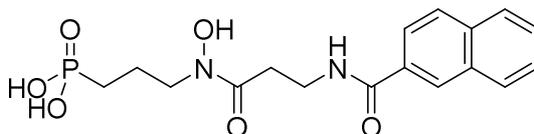
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **242a** from diethylphosphonate **237a** (35 mg, 0.08 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and unknown conformers in a ratio of 70/30 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.42 (s, 1H), 8.04 – 7.88 (m, 5H), 7.64 – 7.52 (m, 3H), 4.18 (s, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 4.16 (s, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 3.34 (m, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 3.04 (m, 0.6 of 2H, CH₂NOH), 2.14 – 1.73 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.0 (CO), 170.5 (CO), 136.4, 134.0, 132.2, 130.1, 129.4, 129.1, 128.9, 128.7, 127.9, 124.8, 52.3 (d, ³J_{C-P} = 15.4 Hz, CH₂NOH), 42.5 (CH₂NH), 41.1 (d, ³J_{C-P} = 16.8 Hz, CH₂NOH), 25.08 (d, ¹J_{C-P} = 141.0 Hz, PCH₂), 25.03 (d, ¹J_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 22.4 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 18.6 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 27.9, 27.8.

HRMS (ES+) calculated for C₁₆H₂₀N₂O₆P [M]⁺: 367.1053, found 367.1050 (100 %, [M]⁺).

(3-(3-(2-Naphthamido)-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid 242b

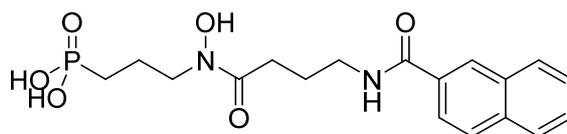
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **242b** from diethylphosphonate **237b** (21 mg, 0.05 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 55/45 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.36 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.97 (dt, *J* = 7.6, 2.5 Hz, 3H), 7.93 (dd, *J* = 11.5, 8.2 Hz, 1H), 7.86 (ddd, *J* = 8.6, 3.1, 1.8 Hz, 2H), 7.57 (pd, *J* = 6.9, 1.5 Hz, 2H), 3.72 (m, 2H, CH₂NH), 3.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 0.9 of 2H, CH₂NOH), 3.35 (m, 1.1 of 2H, CH₂NOH), 2.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 0.9 of 2H, C(O)CH₂), 2.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.1 of 2H, C(O)CH₂), 2.04-1.76 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.9 (CO), 170.3 (CO), 136.2, 134.1, 134.0, 132.6, 130.0, 129.9, 129.3, 129.3, 128.8, 128.8, 128.7, 128.7, 127.8, 124.7, 52.3 (d, ³J_{C-P} = 15.8 Hz, CH₂NOH), 37.1, 37.0, 34.7, 33.3, 25.0 (d, ¹J_{C-P} = 141.4 Hz, PCH₂), 21.4 (d, ²J_{C-P} = 3.8 Hz, PCH₂CH₂), 18.6 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.2, 27.9.

HRMS (ES-) calculated for C₁₇H₂₀N₂O₆P [M]⁻: 379.1064; found 379.1100 (100 %, [M]⁻).

(3-(4-(2-Naphthamido)-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonic acid 242c

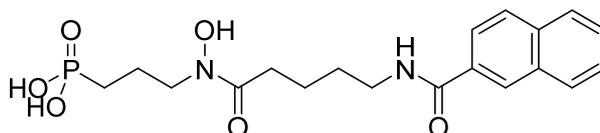
The general procedure L was applied to synthesize the compound **242c** from diethylphosphonate **237c** (37 mg, 0.08 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 50/50 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.37 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.01 – 7.90 (m, 3H), 7.91 – 7.84 (m, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 2H), 3.71 (t, *J* = 6.7 Hz, 1 of 2H, CH₂NOH), 3.49 (dt, *J* = 9.4, 6.9 Hz, 2H, CH₂NH), 3.39 – 3.31 (m, 1 of 2H, CH₂NOH), 2.64 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.10 – 1.69 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.3, 174.0, 169.0, 134.9, 134.8, 132.6, 128.6, 127.9, 127.9, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 126.4, 126.4, 123.4, 50.9 (d, ³*J*_{C-P} = 15.9 Hz, CH₂NOH), 39.4, 39.0, 30.8, 29.3, 24.4, 24.2, 23.7 (d, ¹*J*_{C-P} = 136.0 Hz, PCH₂), 23.6 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.6 Hz, PCH₂), 19.9 (d, ²*J*_{C-P} = 2.6 Hz, PCH₂CH₂), 17.2 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.8, 28.1.

HRMS (ES⁻) calculated for C₁₈H₂₂N₂O₆P [M]⁻: 393.1210, found 393.1241 (100 %, [M]⁻).

(3-(5-(2-Naphthamido)-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonic acid 242d

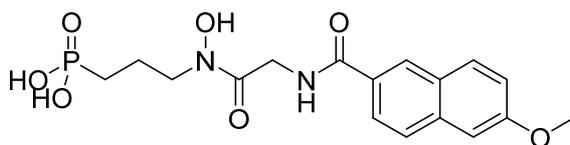
The general procedure L was applied to synthesize the compound **242d** from diethylphosphonate **237d** (40 mg, 0.09 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 30/70 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.37 (m, 1H), 8.01 – 7.90 (m, 3H), 7.91 – 7.84 (m, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.7 Hz, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 3.46 (dt, *J* = 8.5, 6.4 Hz, 2H, CH₂NH), 3.34 (m, 0.6 of 2H, CH₂NOH), 2.64 – 2.55 (m, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 2.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 2.12 – 1.66 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 176.1 (CO), 175.7 (CO), 170.4 (CO), 136.2, 134.0, 130.0, 129.9, 129.3, 128.8, 128.7, 128.7, 127.8, 124.8, 124.8, 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.4 Hz, CH₂NOH), 40.7 (d, ³*J*_{C-P} = 19.9 Hz, CH₂NOH), 34.3, 32.7, 30.0, 29.9, 25.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 136.7 Hz, PCH₂), 25.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.4 Hz, PCH₂), 23.4, 23.3, 21.4 (d, ²*J*_{C-P} = 2.5 Hz, PCH₂CH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.3, 27.9.

HRMS (ES⁻) calculated for C₁₉H₂₄N₂O₆P [M]⁻: 407.1410, found 407.1410 (100 %, [M]⁻).

(3-(*N*-Hydroxy-2-(6-methoxy-2-naphthamido)acetamido)propyl)phosphonic acid 243a

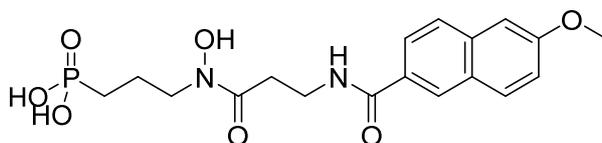
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **243a** from diethylphosphonate **238a** (52 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification with only *Z* conformer.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.35 (s, 1H), 7.92 – 7.82 (m, 3H), 7.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H, CH₂NH), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (m, 2H, CH₂NOH), 2.03 (tt, *J* = 14.6, 7.3 Hz, 2H), 1.82 (dt, *J* = 18.4, 7.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.2 (CO), 170.6 (CO), 160.8, 138.0, 131.5, 129.9, 129.4, 128.8, 128.1, 125.3, 120.7, 106.6, 55.9 (OCH₃), 52.4 (d, ³*J*_{C-P} = 14.3 Hz, CH₂NOH), 42.3, 25.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.5 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 27.2.

HRMS (ES+) calculated for C₁₇H₂₂N₂O₇P [M]⁺: 397.1159, found 397.1197 (10 %, [M]⁺).

(3-(*N*-Hydroxy-3-(6-methoxy-2-naphthamido)propanamido)propyl)phosphonic acid 243b

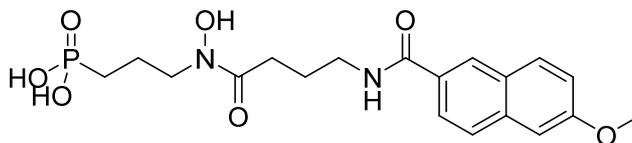
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **243b** from diethylphosphonate **238b** (56 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 55/45 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.28 (s, 1H), 7.90 – 7.81 (m, 3H), 7.30 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H of CH₂NH and 0.9 of 2H of CH₂N(OH)), 3.32 (s, 1.1 of 2H, CH₂N(OH)), 2.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 0.9 of 2H, C(O)CH₂), 2.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 1.1 of 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.87 (m, 2H), 1.85 – 1.64 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.18, 173.95, 170.52, 160.8, 160.7, 138.0, 137.9, 131.53, 131.49, 130.19, 129.36, 128.71, 128.64, 128.20, 128.16, 125.29, 120.8, 120.7, 106.67, 55.91, 52.31 (d, ³*J*_{C-P} = 15.6 Hz, CH₂NOH), 37.11, 37.08, 34.73, 33.32, 25.18 (d, ¹*J*_{C-P} = 138.6 Hz, PCH₂), 25.01 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 21.40 (d, ³*J*_{C-P} = 3.6 Hz, PCH₂CH₂), 18.59 (d, ³*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.1, 27.8.

HRMS (ES-) calculated for C₁₈H₂₂N₂O₇P [M]⁺: 409.1159 found 409.1126 (100 %, [M]⁺).

(3-(*N*-Hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthamido)butanamido)propyl)phosphonic acid 243c

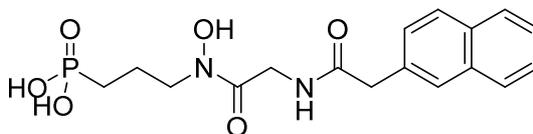
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **243c** from diethylphosphonate **238c** (56 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 50/50 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.29 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.91 – 7.80 (m, 3H), 7.30 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H, OCH₃), 3.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 of 2H, CH₂NOH), 3.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.35 (m, 1 of 2H, CH₂NOH), 2.62 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.04 (m, 1 of 2H), 1.95 (m, 3H), 1.84 (m, 1 of 2H), 1.78 – 1.67 (m, 1 of 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.6 (CO), 160.7 (CO), 137.9, 131.5, 129.3, 128.6, 128.1, 125.3, 120.7, 106.6, 55.9 (CH₃), 50.9, 40.7, 40.3, 32.2, 30.8, 25.8, 20.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 151.6 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.1, 27.8.

HRMS (ES⁻) calculated for C₁₉H₂₄N₂O₇P [M]⁻: 423.1316, found 423.1272 (100 %, [M]⁻).

(3-(*N*-Hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)acetamido)propyl)phosphonic acid 244a

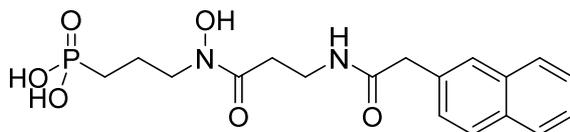
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **244a** from diethylphosphonate **239a** (39 mg, 0.09 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 55/45 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.85 – 7.80 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 7.51 – 7.40 (m, 3H), 4.19 (s, 0.9 of 2H, C(O)CH₂), 3.96 (s, 1.1 of 2H, C(O)CH₂), 3.79 (s, 0.9 of 2H), 3.76 (s, 1.1 of 2H), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 0.9 of 2H, CH₂NOH), 3.37 – 3.30 (m, 1.1 of 2H, CH₂NOH), 2.12 – 1.98 (m, 1.1 of 2H), 1.96 – 1.89 (m, 0.9 of 2H), 1.90 – 1.79 (m, 1.1 of 2H), 1.79 – 1.67 (m, 0.9 of 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.6 (CO), 171.7 (CO), 171.2 (CO), 135.0, 134.1, 134.0, 133.9, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.4, 128.3, 127.1, 126.8, 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.6 Hz, CH₂NOH), 49.8 (d, ³*J*_{C-P} = 19.6 Hz, CH₂NOH), 43.7, 43.6, 42.1, 41.8, 25.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 21.3 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 3.6 Hz, PCH₂CH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.4, 27.8.

HRMS (ES⁺) calculated for C₁₇H₂₂N₂O₆P [M]⁺: 381.1210, found 381.1232 (100 %, [M]⁺).

(3-(N-Hydroxy-3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)propanamido)propyl)phosphonic acid 244b

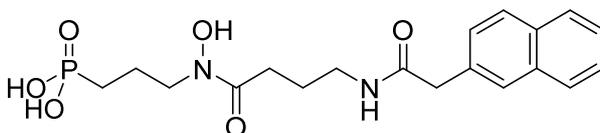
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **244b** from diethylphosphonate **239b** (46 mg, 0.1 mmol). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *other* conformers in a ratio of 60/40 respectively.

¹H NMR (500 MHz, deuterium Oxide) δ 7.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.51 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 0.8 of 2H, CH₂NOH), 3.42 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.31 (m, 1.2 of 2H, CH₂NOH), 2.67 (t, *J* = 6.6 Hz, 0.8 of 2H, C(O)CH₂), 2.53 (t, *J* = 6.6 Hz, 1.2 of 2H, C(O)CH₂), 2.00 – 1.87 (m, 2H), 1.79 – 1.65 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, deuterium oxide) δ 177.0 (CO), 175.6 (CO), 174.3 (CO), 134.1 133.7, 133.1, 129.4, 128.7, 128.6, 128.5, 128.1, 127.5, 127.1, 52.1 (d, ³*J*_{C-P} = 17.1 Hz, CH₂N), 43.4, 36.4, 36.3, 34.3, 32.5, 31.2, 25.3 (d, ¹*J*_{C-P} = 137.3 Hz, PCH₂), 18.4.

³¹P NMR (121 MHz, deuterium oxide) δ 29.4, 25.8.

HRMS (ES⁻) calculated for C₁₈H₂₂N₂O₆P [M]⁻: 393.1210, found 393.1206 (100 %, [M]⁻).

(3-(N-Hydroxy-4-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)butanamido)propyl)phosphonic acid 244c

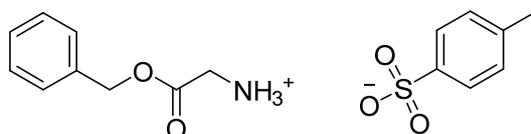
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **244c** from diethylphosphonate **239c** (16 mg, 0.03 mmol). The desired compound was obtained without further purification with only *E* conformer.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.49 – 7.37 (m, 3H), 3.66 (m, 2H), 3.64 (m, 2H, CH₂NOH), 3.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂NH), 2.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.96 – 1.82 (m, 2H), 1.83 – 1.72 (m, 2H), 1.73 – 1.60 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.1 (CO), 172.7 (CO), 133.6, 132.9, 132.5, 127.8, 127.3, 127.2, 127.2, 126.7, 125.7, 125.3, 47.8, 42.6, 38.8, 29.1, 24.8, 22.8, 20.0.

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.6.

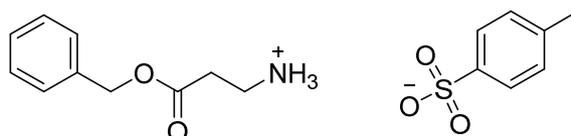
HRMS (ES⁻) calculated for C₁₉H₂₄N₂O₆P [M]⁻: 407.1366, found 407.1366 (100 %, [M]⁻).

Glycine benzylester *p*-toluenesulfonate 245a

The general procedure **N** was applied to synthesize the compound **245a** from glycine **220a** (3 g, 39.96 mmol) and benzyl alcohol (12.40 mL, 120 mmol). The desired compound was afforded without further purification as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.74 – 7.63 (m, 2H), 7.39 – 7.19 (m, 5H), 7.08 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.08 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.76 (s, 2H), 2.30 (s, 3H, CH₃).

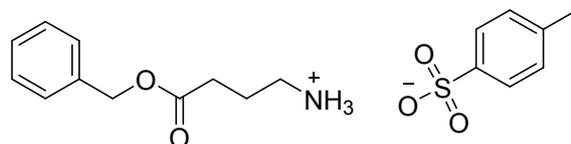
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 167.1 (CO), 141.0, 140.5, 134.4, 128.9, 128.5, 128.3, 125.8, 67.9 (OCH₂Ph), 40.2 (CH₂), 21.2 (CH₃).

 β -Alanine benzylester *p*-toluenesulfonate 245b

The general procedure **N** was applied to synthesize the compound **245b** from β -alanine **220b** (3 g, 33.7 mmol) and benzyl alcohol (10.45 mL, 101 mmol). The desired compound was afforded without further purification as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.77 – 7.67 (m, 2H), 7.34 – 7.22 (m, 5H), 7.12 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.04 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.18 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.32 (s, 3H).

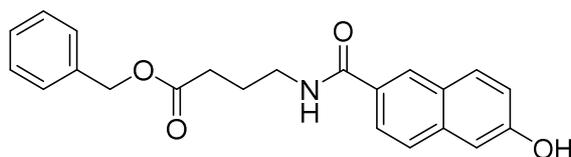
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.9 (CO), 141.1, 140.6, 135.1, 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 125.8, 66.9 (OCH₂Ph), 35.4, 30.9, 21.3 (CH₃).

Benzyl-4-aminobutyrate *p*-toluenesulfonate 245c

The general procedure **N** was applied to synthesize the compound **245c** from γ -aminobutyric acid **220c** (2.5 g, 29.1 mmol) and benzyl alcohol (9.03 mL, 87.3 mmol). The desired compound was afforded without further purification as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.76 – 7.68 (m, 2H), 7.45 – 7.24 (m, 5H), 7.13 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.05 (s, 2H, OCH₂Ph), 2.92 (m, 2H), 2.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.90 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.4 (CO), 141.1, 140.7, 135.6, 129.0, 128.5, 128.2, 128.1, 125.8, 66.5 (OCH₂Ph), 39.0, 30.9, 22.3, 21.3 (CH₃).

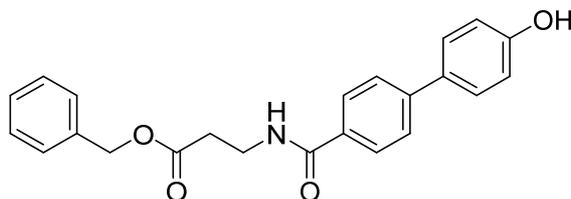
Benzyl 4-(6-hydroxy-2-naphthamido)butanoate 240c

The general procedure **O** method 2 was applied to synthesize **240c** from 6-hydroxy-2-naphthoic acid **212** (500 mg, 2.65 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245c** (971 mg, 2.65 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **240c** (253 mg, 26 %) as a solid.

R_f = 0.60 (8/2, EA/MeOH).

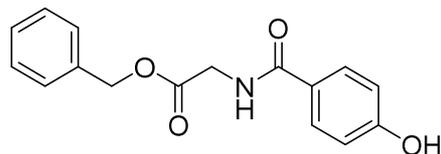
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.20 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.78 – 7.70 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 5H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.76 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.58 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.03 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.9 (CO), 168.3 (CO), 156.0, 136.5, 135.7, 130.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 127.8, 127.6, 126.9, 124.0, 119.3, 109.5, 66.7 (OCH₂Ph), 40.0, 32.1, 24.5.

Benzyl 3-(4'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)propanoate 246b

The general procedure **O** method 2 was applied to synthesize **246b** from 4-hydroxy 4-biphenylcarboxylic acid **216** (400 mg, 1.86 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245b** (629 mg, 1.86 mmol). The crude has to be purified.

R_f = 0.65 (8/2, EA/MeOH).

Benzyl (4-hydroxybenzoyl)glycinate 247a

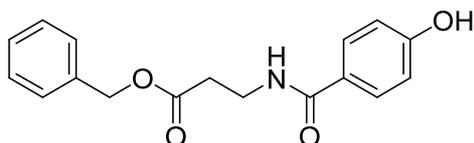
The general procedure **O** method 2 was applied to synthesize **247a** from 4-hydroxybenzoic acid **218** (500 mg, 3.6 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245a** (1.22 g, 3.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **247a** (370 mg, 36 %) as a solid.

R_f = 0.53 (8/2 EA/PE)

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.75 – 7.71 (m, 2H), 7.39 – 7.27 (m, 5H), 6.86 – 6.81 (m, 2H), 5.20 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.13 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 169.9 (CO), 168.6 (CO), 160.9, 135.8, 129.0, 128.1, 127.8, 127.8, 124.3, 114.7, 66.4 (OCH₂Ph), 41.2.

Benzyl 3-(4-hydroxybenzamido)propanoate **247b**



The general procedure **O** method 2 was applied to synthesize **247b** from 4-hydroxybenzoic acid **218** (500 mg, 3.6 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245b** (1.27 g, 3.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **247b** (732 mg, 68 %) as a solid.

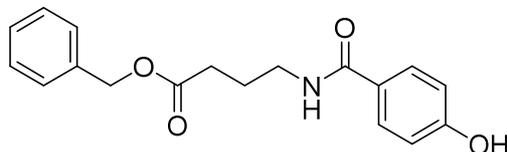
R_f = 0.53 (8/2 EA/PE)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.62 – 7.54 (m, 2H), 7.40 – 7.32 (m, 5H), 6.91 – 6.79 (m, 3H), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.73 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.71 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.7 (CO), 167.9 (CO), 160.1, 135.4, 128.9, 128.6, 128.4, 128.3, 115.5, 66.7 (OCH₂Ph), 35.4, 34.0.

***m/z* (ES⁺)** 299.33 (100 %, [M]⁺).

Benzyl 4-(4-hydroxybenzamido)butanoate **247c**



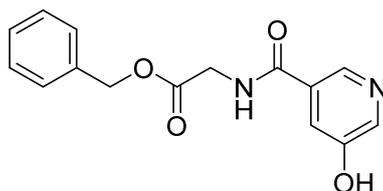
The general procedure **O** method 1 was applied to synthesize **247c** from 4-hydroxybenzoic acid **218** (500 mg, 3.6 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245c** (1.33 g, 3.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **247c** (540 mg, 48 %) as a solid.

R_f = 0.53 (8/2, EA/PE).

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 7.73 – 7.65 (m, 2H), 7.34 – 7.26 (m, 5H), 6.86 – 6.78 (m, 2H), 5.08 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.48 – 3.34 (m, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.91 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.3 (CO), 168.7 (CO), 160.6, 136.1, 128.8, 128.1, 127.8, 127.7, 125.0, 114.6, 65.9 (OCH₂Ph), 38.8, 31.1, 24.4.

***m/z* (ES⁺)** 313.35 (100 %, [M]⁺).

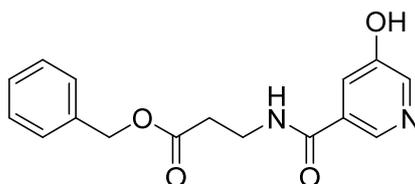
Benzyl (5-hydroxynicotinoyl)glycinate 248a

The general procedure **O** method 1 was applied to synthesize **248a** from 5-hydroxynicotinic acid **219** (500 mg, 3.6 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245a** (1.21 g, 3.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **248a** (554 mg, 54 %) as a solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.47 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 2.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.42 – 7.25 (m, 5H), 5.21 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.17 (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol- d_4) δ 171.0 (CO), 168.3 (CO), 155.7, 141.3, 139.6, 137.1, 132.2, 129.5, 129.3, 129.2, 122.9, 67.9 (OCH₂Ph), 42.5.

m/z (ES+) 286.29 (100 %, [M]⁺).

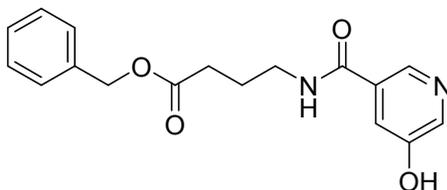
Benzyl 3-(5-hydroxynicotinamido)propanoate 248b

The general procedure **O** method 1 was applied to synthesize **248b** from 5-hydroxynicotinic acid **219** (150 mg, 1.07 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245b** (378 mg, 1.07 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **248b** (157 mg, 48 %) as a solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, chloroform- d) δ 8.37 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.34 (s, 5H), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.72 (s, 2H), 2.71 (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform- d) δ 172.7 (CO), 153.8, 141.3, 138.4, 135.4, 128.8, 128.6, 128.4, 121.5, 66.9 (OCH₂Ph), 35.5, 33.9.

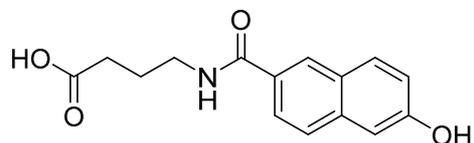
m/z (ES+) 301.12 (100 %, [M]⁺).

Benzyl 4-(5-hydroxynicotinamido)butanoate 248c

The general procedure **O** method 1 was applied to synthesize **248c** from 5-hydroxynicotinic acid **219** (500 mg, 3.6 mmol) and benzyl-4-aminobutyrate **245c** (1.31 g, 3.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE/EtOAc 50/50 to EtOAc 100), to afford the desired compound **248c** (566 mg, 50 %) as a solid.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, methanol- d_4) δ 8.42 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 2.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.37 – 7.30 (m, 5H), 5.11 (s, 2H, OCH_2Ph), 3.43 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.48 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.94 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H).

4-(6-Hydroxy-2-naphthamido)butanoic acid **249c**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **249c** from *O*-benzylated hydroxamate **240c** (253 mg, 07 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **249c** (45 mg, 24 %) as a colorless oil.

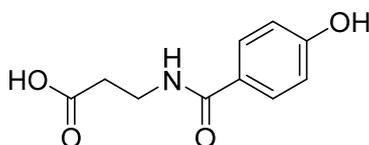
$R_f = 0.15$ (8/2, EA/MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.26 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.69 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.17 – 7.12 (m, 2H), 3.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, methanol- d_4) δ 177.2 (CO), 170.5 (CO), 158.3, 138.1, 131.7, 129.8, 128.7, 128.7, 127.4, 125.1, 120.2, 109.7, 40.4, 32.5, 25.9.

m/z (ES+) 274.11 (100 %, $[\text{M}]^+$).

3-(4-Hydroxybenzamido)propanoic acid **250b**



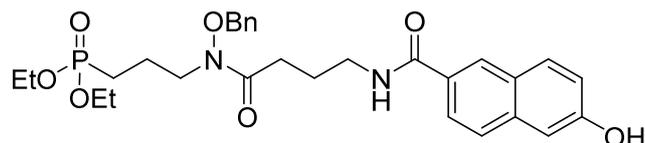
The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **250b** from *O*-benzylated hydroxamate **247b** (732 mg, 2.44 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **250b** (40 mg, 8 %) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, methanol- d_4) δ 7.76 – 7.62 (m, 2H), 6.93 – 6.65 (m, 2H), 3.60 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform- d) δ 175.4 (CO), 170.0 (CO), 162.0, 130.1, 126.2, 116.0, 34.7, 24.2.

m/z (ES+) 209.20 (100 %, $[\text{M}]^+$).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-4-(6-hydroxy-2-naphthamido)butanamido)propyl)phosphonate **251c**



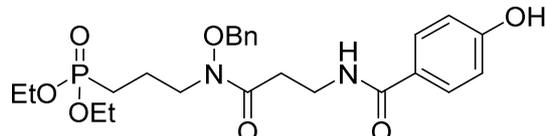
The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **251c** from acid **249c** (45 mg, 0.16 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (50 mg, 0.16 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **251c** (31 mg, 34 %) as a slightly yellow oil.

R_f = 0.40 (EA)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.21 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.78 – 7.67 (m, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.23 (m, 5H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.78 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.04 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.57 – 3.42 (m, 2H), 2.55 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.09 – 1.82 (m, 4H), 1.81 – 1.60 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.5.

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-(4-hydroxybenzamido)propanamido)propyl)phosphonate **252b**



The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **252b** from acid **250b** (31 mg, 0.14 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (45 mg, 0.14 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **252b** (13 mg, 18 %) as a colorless oil.

R_f = 0.40 (EA).

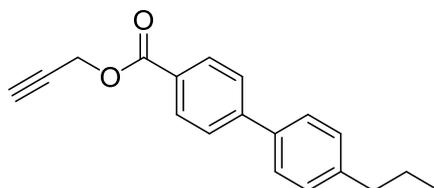
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.67 – 7.55 (m, 2H), 7.36 (d, *J* = 2.7 Hz, 5H), 7.09 (q, *J* = 5.9, 5.4 Hz, 1H), 6.91 – 6.83 (m, 2H), 4.79 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.05 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (dq, *J* = 21.8, 6.0, 5.1 Hz, 4H), 2.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.00 – 1.85 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.1 (CO), 167.3 (CO), 160.0, 133.8, 129.3, 129.2, 128.9, 128.8, 115.4 (d, *J* = 1.4 Hz), 76.5 (OCH₂Ph), 61.9 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, ³J_{C-P} = 18.5 Hz, CH₂NOBn), 35.1, 23.4, 22.8 (d, ¹J_{C-P} = 144.1 Hz, PCH₂), 20.1 (d, ²J_{C-P} = 3.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES+) 492.51 (100 %, [M]⁺).

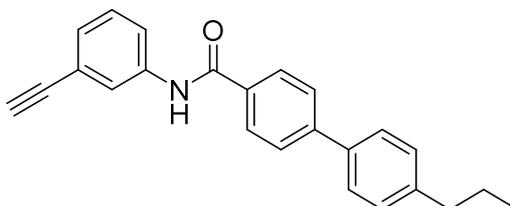
III. Partie expérimentale chapitre 3

Prop-2-yn-1-yl 4'-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylat 256

The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **256** from 4'-n-propylbiphenyl-4-carboxylic acid **213** (500 mg, 2.1 mmol) and propargyl alcohol **253** (0.12 mL, 2.1 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **256** (520 mg, 90 %) as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.16 – 8.11 (m, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, OCH₂), 3.50 (s, 1H, CH), 2.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

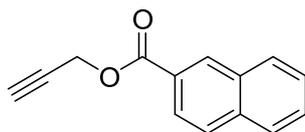
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 165.7 (CO), 146.0, 143.0, 137.1, 130.3, 129.1, 127.7, 127.1, 126.8, 77.8, 75.0, 52.4 (OCH₂), 37.7, 24.5, 13.8 (CH₃).

***N*-(3-Ethynylphenyl)-4'-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide 257**

The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **257** from 4'-n-propylbiphenyl-4-carboxylic acid **213** (500 mg, 2.1 mmol) and 3-ethynylaniline **254** (0.26 mL, 2.1 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **257** (538 mg, 76 %) as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 3H), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H), 3.10 (s, 1H, CH), 2.69 – 2.62 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

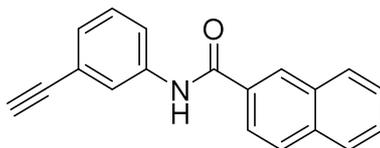
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 165.4, 144.8, 143.0, 137.9, 137.0, 132.9, 129.1, 129.1, 128.2, 127.5, 127.2, 127.0, 123.5, 122.9, 120.6, 83.1, 77.6, 36.5, 24.5, 13.9 (CH₃).

Prop-2-yn-1-yl 2-naphthoate 258

The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **258** from 2-naphthoic acid **214** (400 mg, 2.22 mmol) and propargyl alcohol **253** (0.13 mL, 2.22 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **258** as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.63 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.87 (dd, $J = 8.5, 4.4$ Hz, 2H), 7.59 (ddd, $J = 8.2, 6.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.54 (ddd, $J = 8.1, 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 4.98 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H).

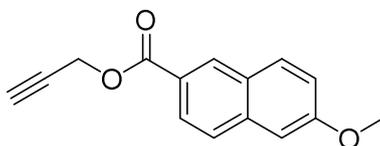
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 131.5, 129.4, 128.5, 128.2, 127.8, 126.7, 125.2, 75.1, 52.6, 30.9.

***N*-(3-ethynylphenyl)-2-naphthamide 259**

The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **259** from 2-naphthoic acid **214** (588 mg, 3.3 mmol) and 3-ethynylaniline **254** (0.41 mL, 3.3 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **259** (254 mg, 28 %) as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.39 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.97 (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 2H), 7.92 (m, 2H), 7.84 – 7.81 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.65 – 7.56 (m, 2H), 7.37 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.31 (dt, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 3.11 (s, 1H, CH).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.67 (Co), 165.7, 138.0, 134.9, 132.6, 132.0, 131.8, 129.1, 128.9, 128.8, 128.3, 128.0, 127.8, 127.5, 127.0, 123.5, 123.4, 123.0, 120.7, 83.1, 77.6.

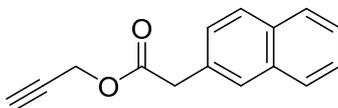
Prop-2-yn-1-yl 6-methoxy-2-naphthoate 260

The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **230** from 6-methoxy-2-naphthoic acid **215** (200 mg, 1.1 mmol) and propargyl alcohol **253** (0.06 mL, 1.1 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **230** (232 mg, qqt) as a colorless solid.

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.63 – 8.56 (s, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, OCH₂), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 2.55 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH).

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.1 (CO)_z, 159.7, 137.3, 131.2, 130.9, 127.8, 126.9, 125.9, 124.3, 119.7, 105.6, 77.9, 74.9, 55.4, 52.4 (CH₃).

Prop-2-yn-1-yl 2-(naphthalen-2-yl)acetate **261**

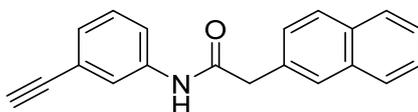


The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **261** from 2-naphthylacetic acid **217** (500 mg, 2.6 mmol) and propargyl alcohol **253** (0.15 mL, 2.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **261** (541 mg, 73 %) as a colorless solid.

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.86 – 7.79 (m, 3H), 7.77 – 7.73 (s, 1H), 7.48 (hept, J = 4.9 Hz, 2H), 7.43 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 2.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.86 (s, 2H, CH₂), 2.49 (t, J = 2.5 Hz, 1H, CH).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 170.7 (CO), 133.4, 132.5, 130.128.3, 128.0, 127.7, 127.6, 127.2, 126.2, 125.9, 77.4, 75.1, 52.4 (OCH₂), 41.1.

N-(3-Ethynylphenyl)-2-(naphthalen-2-yl)acetamide **262**

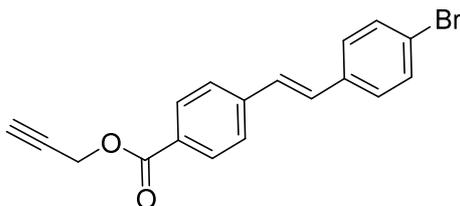


The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **262** from 2-naphthylacetic acid **217** (500 mg, 2.7 mmol) and 3-ethynylaniline **254** (0.33 mL, 2.7 mmol). The crude product was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **262** as a slightly brown solid.

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.89 – 7.84 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.45 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 7.09 – 7.03 (brs, 1H, NH), 3.92 (s, 2H), 3.03 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.9 (CO), 137.5, 133.6, 132.7, 131.5, 129.2, 128.9, 128.5, 128.1, 127.8, 127.7, 127.1, 126.7, 126.3, 123.1, 120.3, 83.0, 77.5, 45.0 (CH₂).

Prop-2-yn-1-yl (*E*)-4-(4-bromostyryl)benzoate **263**



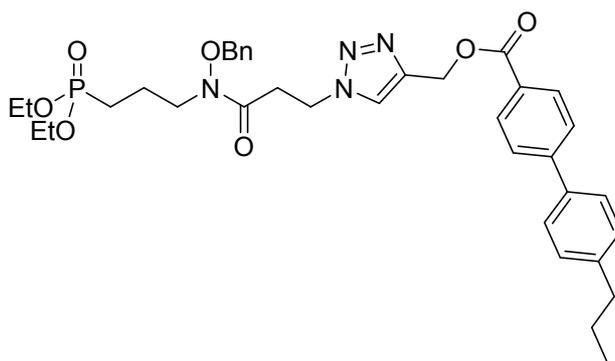
The general procedure **P** was applied to synthesize the compound **263** from 4'-bromostilbene-4-carboxylic acid (500 mg, 2.1 mmol) and propargyl alcohol **253** (0.12 mL, 2.1 mmol). The crude product

was purified by column chromatography (PE 100 % to EA 100 %) to afford the desired compound **263** (520 mg, 90 %) as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.07 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.20 – 7.08 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.94 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.54 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{CH}\equiv\text{C}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 165.50 (CO), 141.85, 135.63, 131.94, 130.33, 130.19, 128.36, 128.25, 128.17, 126.43, 122.15 (CBr), 77.75 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.01 ($\text{CH}\equiv\text{C}$), 52.47 (CH_2).

(1-(3-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate 264b



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **264b** from azide **150b** (109 mg, 0.27 mmol) and alkyne **256** (76 mg, 0.27 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **264b** (167 mg, 63 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

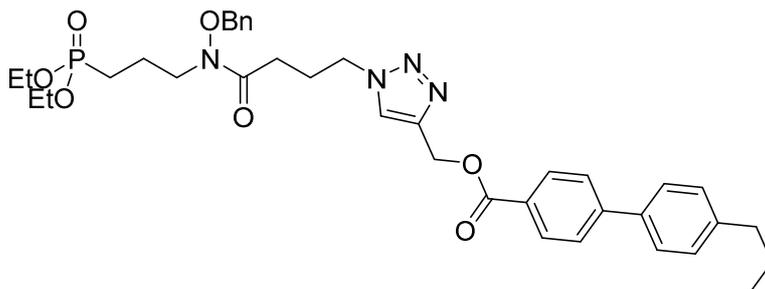
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.77 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7.66 – 7.60 (m, 2H), 7.56 – 7.51 (m, 2H), 7.39 – 7.30 (m, 5H), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.47 (s, 2H, CH_2O), 4.73 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.63 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2N), 4.17 – 3.99 (m, 4H, POCH_2), 3.71 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2NOBn), 3.00 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.68 – 2.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.00 – 1.82 (m, 2H, PCH_2CH_2), 1.77 – 1.60 (m, 4H, PCH_2 and CH_2CH_3), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH_2CH_3), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (NC(O)), 166.2 (OC(O)), 145.8, 142.9, 142.7, 137.2, 133.8, 130.2, 129.3, 129.2, 129.1, 128.8, 128.2, 127.1, 126.8, 125.0 ($\text{CH}=\text{C}$), 76.5 (OCH_2Ph), 61.67 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, POCH_2), 58.0 (CH_2O), 45.6 (CH_2NOBn), 45.4 (CH_2N), 37.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 32.9 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 24.5 (CH_2CH_3), 22.9 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 143.2$ Hz, PCH_2), 20.1 (PCH_2CH_2), 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH_2CH_3), 13.8 (CH_3).

$^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.19.

m/z (ES+) 677.31 (100%, $[\text{M}]^+$).

(1-(4-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate 264c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **264c** from azide **150c** (114 mg, 0.28 mmol) and alkyne **256** (67 mg, 0.28 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **264c** (175 mg, 62 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

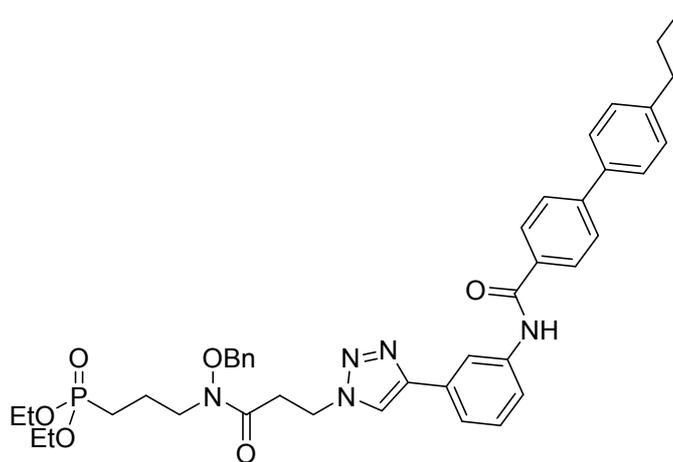
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H, CH=C), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 5.1, 1.7 Hz, 3H), 7.33 – 7.30 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 5.48 (s, 2H, CH₂O), 4.75 (s, 2H, CH₂O^{Ph}), 4.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.15 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.69 – 2.59 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.25 – 2.12 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.93 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.71 (m, 4H, PCH₂ and CH₂CH₃), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.4 (NC(O)), 166.3 (OC(O)), 145.8 143.0, 143.0, 137.2, 134.0, 130.2, 129.3, 129.1, 129.0, 128.7, 128.1, 127.0, 126.8, 124.0 (CH=C), 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂CH₃), 58.1 (CH₂O), 49.5 (CH₂N), 45.7 (CH₂NOBn), 37.7 (CH₂CH₂CH₃), 28.7 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 24.5 (CH₂CH₃), 23.1 (d, ¹J_{C-P} = 142.7 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

***m/z* (ES⁺)** 691.33 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-(4-(3-(4'-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonate **265b**



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **265b** from azide **150b** (113 mg, 0.28 mmol) and alkyne **257** (96 mg, 0.28 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **265b** (40 mg, 16 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

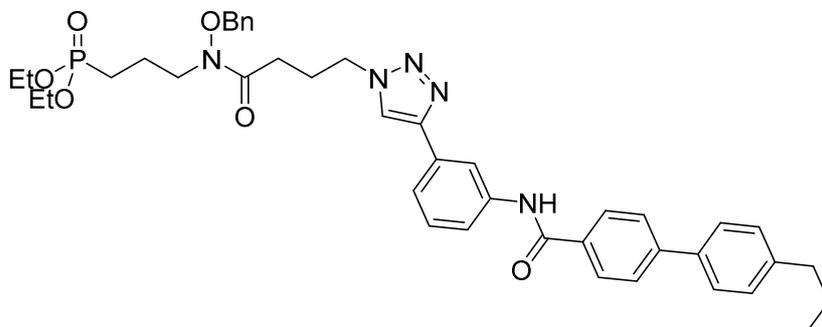
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.09 (s, 1H, NH), 8.17 – 8.03 (m, 3H), 7.85 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.72 – 7.64 (m, 3H), 7.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.45 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.29 (m, 7H), 4.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, OCH₂Ph et CH₂N), 4.04 – 3.89 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.72 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.99 – 2.89 (m, 2H, C(O)CH₂), 2.71 – 2.60 (m, 2H), 2.00 – 1.80 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.80 – 1.58 (m, 4H, PCH₂ et CH₂CH₃N), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.5 (NC(O)), 165.8 (OC(O)), 147.5, 144.3, 142.8, 139.1, 137.3, 133.7, 133.5, 131.2, 129.6, 129.9, 129.3, 129.0, 128.8, 128.0, 126.9, 126.9, 121.5, 120.7, 120.2, 117.4, 76.6 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.9 (d, ³J_{C-P} = 18.6 Hz, CH₂NOBn), 45.4 (CH₂N), 37.7 (C_{Ar}CH₂), 33.1 (C(O)CH₂), 24.5 (CH₂CH₃), 23.1 (d, ¹J_{C-P} = 142.7 Hz, PCH₂), 20.3 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.7.

m/z (ES+) 738.34 (60%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-4-(4-(3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonate 265c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **265c** from azide **150c** (120 mg, 0.29 mmol) and alkyne **257** (98 mg, 0.29 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **265c** (135 mg, 51 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

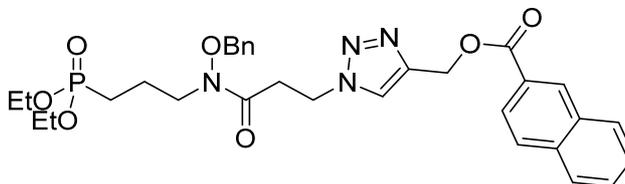
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.70 (br s, 1H, NH), 8.06 – 7.98 (m, 3H), 8.01 – 7.91 (m, 1H), 7.78 (s, 1H, CH=C), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.36 – 7.26 (m, 7H), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.46 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 4.09 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.73 – 2.56 (m, 2H), 2.37 (t, J = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.24 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.03 – 1.83 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.80 – 1.62 (m, 4H, PCH₂ et CH₂CH₃), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.4 (NC(O)), 165.7 (OC(O)), 147.3, 144.5, 142.8, 139.0, 137.2, 134.0, 133.3, 131.2, 129.6, 129.2, 129.0, 128.7, 127.8, 127.0, 127.0, 121.4, 120.2, 119.9, 117.1, 76.4 (OCH₂Ph), 61.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂CH₃), 49.3 (CH₂N), 45.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 18.7 Hz, CH₂NC(O)), 37.7, 28.2 (C(O)CH₂), 24.7, 24.5, 23.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.7 Hz, PCH₂), 20.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.2 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.14.

m/z (ES+) 752.35 (100%, [M]⁺).

(3-(4-(4-(3-(2-Naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-hydroxybutanamido)propyl) phosphonic acid 266b



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **266b** from azide **150b** (111 mg, 0.25 mmol) and alkyne **258** (59 mg, 0.25 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **266b** (149 mg, 88 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.61 (s, 1H), 8.05 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.58 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.39 – 7.29 (m, 5H), 5.52 (s, 2H, OCH₂), 4.72 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.64 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂N), 4.15 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.70 (t, J

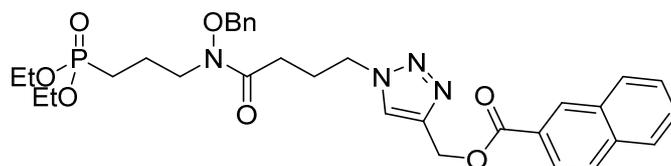
= 7.2 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.01 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2, 166.5, 142.7, 135.6, 133.8, 132.4, 131.3, 129.4, 129.3, 129.2, 128.8, 128.4, 128.2, 127.7, 126.9, 126.6, 125.2, 125.1, 76.46 (OCH₂Ph), 61.66 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.2 (CH₂O), 45.5 (CH₂N(OH)), 45.4 (CH₂N), 32.96 (C(O)CH₂), 22.97 (d, ¹*J*_{C-P} = 143.1 Hz, PCH₂), 20.15 (d, ²*J*_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.46 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

m/z (ES+) 609.24 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-naphthoate 266c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **266c** from azide **150c** (100 mg, 0.24 mmol) and alkyne **258** (51 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **266c** (157 mg, qtt) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

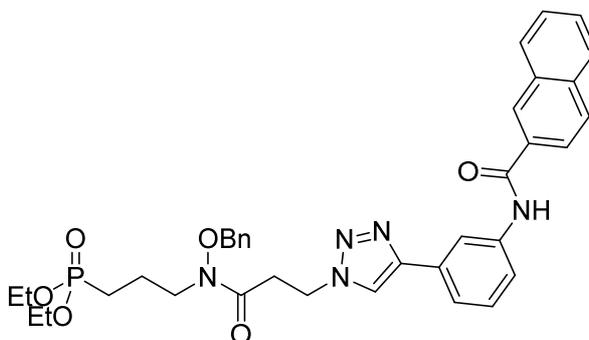
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.60 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 5H), 5.53 (s, 2H, OCH₂), 4.73 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.15 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.18 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.97 – 1.86 (m, 2H), 1.78 – 1.61 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2, 166.5, 143.0, 135.6, 134.0, 132.4, 131.4, 129.4, 129.3, 129.1, 128.7, 128.4, 128.2, 127.7, 126.9, 126.7, 125.2, 124.1, 76.4 (OCH₂Ph), 61.63 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.2 (CH₂O), 49.5 (CH₂N), 45.6 (d, ³*J*_{C-P} = 14.4 Hz, CH₂NOBn), 28.7 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 23.06 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.8 Hz, PCH₂), 20.24 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.47 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.30 (s).

m/z (ES+) 623.26 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-(4-(3-(2-naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-(benzyloxy)propanamido)propyl)phosphonate 267b



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **267b** from azide **150b** (109 mg, 0.27 mmol) and alkyne **259** (74 mg, 0.27 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **267b** (159 mg, 59 %) as a colorless oil.

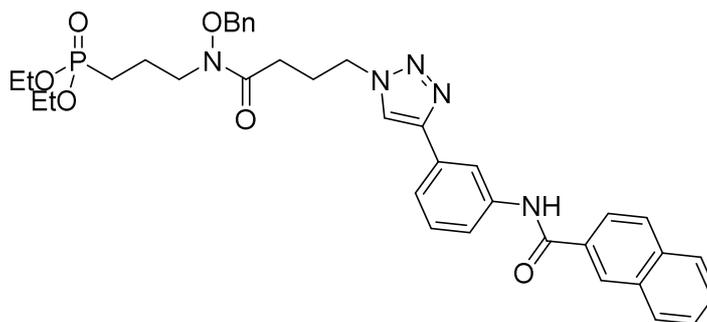
Rf = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.30 (brs, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.04 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.89 (m, 5H), 7.71 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.63 – 7.51 (m, 2H), 7.46 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.41 – 7.28 (m, 5H), 4.71 (s, 4H, CH₂N + OCH₂Ph), 3.87 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.98 – 2.89 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.80 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.5, (CO) 166.2 (CO), 147.5, 139.1, 134.7, 133.7, 132.6, 132.5, 131.2, 129.6, 129.3, 129.3, 129.0, 128.8, 128.3, 127.9, 127.7, 127.7, 126.6, 124.1, 121.6, 120.7, 120.2, 117.4, 76.62 (OCH₂Ph), 61.69 (d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, POCH₂), 46.02 (d, $^3J_{C-P} = 20.7$ Hz, CH₂NOBn), 45.4 (CH₂N), 33.1 (C(O)CH₂), 23.0 (d, $^1J_{C-P} = 141.6$ Hz, PCH₂), 20.3 (d, $^2J_{C-P} = 5.1$ Hz, PCH₂CH₂), 16.2 (d, $^3J_{C-P} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

***m/z* (ES⁺)** 670.29 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-(4-(3-(2-naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(benzyloxy)butanamido)propyl)phosphonate 267c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **267c** from azide **150c** (104 mg, 0.24 mmol) and alkyne **259** (66 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **267c** (160 mg, 93 %) as a colorless oil.

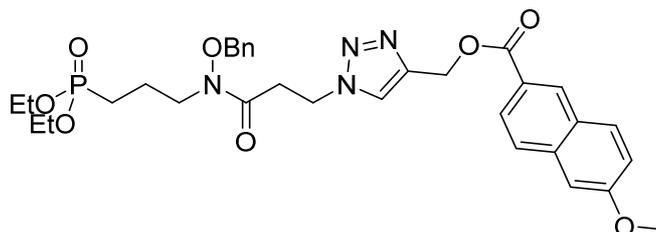
Rf = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.97 (s, 1H), 8.43 – 8.37 (s, 1H), 8.02 – 7.93 (m, 3H), 7.85 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.39 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.29 – 7.17 (m, 5H), 4.68 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.38 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂N), 4.00 – 3.84 (m, 4H, POCH₂), 3.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.42 (s, 1H), 2.30 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.21 – 2.08 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.4 (CO), 166.2 (CO), 147.4, 139.12, 134.8, 132.5, 132.2, 131.2, 129.6, 129.2, 129.0, 129.0, 128.7, 128.4, 127.8, 127.8, 127.7, 126.7, 123.9, 121.4, 120.2, 120.0, 117.2, 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, POCH₂), 49.3, 45.4 (d, $^3J_{C-P} = 19.6$ Hz, CH₂NOBn), 28.2, 25.3, 23.0 (d, $^1J_{C-P} = 142.8$ Hz, PCH₂), 20.2, 16.3 (d, $^3J_{C-P} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform -*d*) δ 31.1.

***m/z* (ES⁺)** 684.28 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-methoxy-2-naphthoate 268b

The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **268b** from azide **150b** (111 mg, 0.27 mmol) and alkyne **260** (67 mg, 0.27 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **268b** (153 mg, 52 %) as a colorless oil.

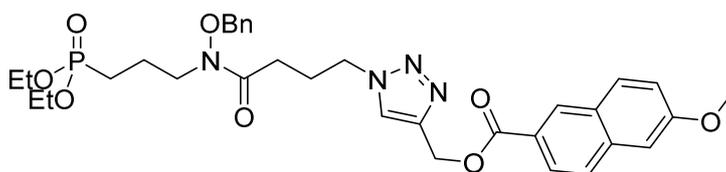
Rf = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.53 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.83 – 7.78 (m, 2H), 7.74 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 5H), 7.19 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H, CH₂O), 4.73 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂N), 4.14 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.01 (t, J = 6.4 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.98 – 1.85 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.73 – 1.61 (m, 2H, PCH₂), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2 (NC(O)), 166.6 (OC(O)), 159.6, 142.8, 137.2, 133.7, 131.1, 130.9, 129.3, 129.2, 128.7, 127.8, 126.8, 125.9, 125.0, 124.7, 119.6, 105.6 (CHCOCH₃), 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 58.0 (CH₂O), 55.4 (OCH₃), 45.6 (CH₂NOBn), 45.4 (CH₂N), 32.9 (C(O)CH₂), 22.9 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.8 Hz, PCH₂), 20.1 (PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

***m/z* (ES+)** 661.25 (100%, [M+Na]⁺).

(1-(4-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-methoxy-2-naphthoate 268c

The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **268c** from azide **150c** (118 mg, 0.29 mmol) and alkyne **260** (58 mg, 0.29 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **268c** (185 mg, 58 %) as a colorless oil.

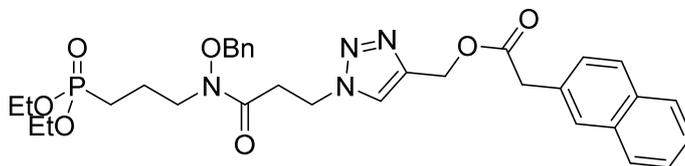
Rf = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.44 (s, 1H), 7.93 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.28 (dt, J = 4.6, 1.8 Hz, 3H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 7.10 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H, CH₂O), 4.66 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.33 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.11 – 3.92 (m, 4H, POCH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.32 (t, J = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.11 (p, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.94 – 1.75 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.72 – 1.57 (m, 2H, PCH₂), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3 (NC(O)), 166.7 (OC(O)), 159.6, 143.1, 137.2, 134.0, 131.1, 130.9, 129.3, 129.0, 128.7, 127.8, 126.8, 125.9, 124.6, 124.0, 119.6, 105.6 (CHCOCH₃), 76.3 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 58.0 (CH₂O), 55.3 (OCH₃), 49.4 (CH₂N), 45.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 18.7 Hz, CH₂NOBn), 28.6 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 23.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.8 Hz, PCH₂), 20.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.
m/z (ES+) 653.28 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-(naphthalen-2-yl)acetate 269b



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **269b** from azide **150b** (114 mg, 0.28 mmol) and alkyne **261** (64 mg, 0.28 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **269b** (156 mg, 49 %) as a colorless oil.

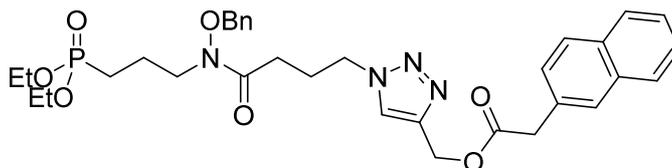
R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.83 – 7.76 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.46 (q, *J* = 5.2, 3.8 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 3H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 5.24 (s, 2H, CH₂O), 4.72 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.57 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 4.16 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.81 (s, 2H), 3.69 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂NC(O)), 2.97 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.97 – 1.84 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.72 – 1.61 (m, 2H, PCH₂), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.4 (CO), 171.4, 142.3, 133.4, 132.4, 131.1, 129.3, 129.2, 128.8, 128.2, 128.0, 127.6, 127.6, 127.3, 126.2, 125.8, 124.8, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 58.1 (OCH₂), 45.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 17.7 Hz, CH₂NC(O)), 45.3 (CH₂N), 41.2, 32.8 (C(O)CH₂), 22.9 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 142.7 Hz, PCH₂), 20.1 (PCH₂CH₂), 16.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.
m/z (ES+) 623.26 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-(naphthalen-2-yl)acetate 269c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **269c** from azide **150c** (80 mg, 0.19 mmol) and alkyne **261** (43 mg, 0.19 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **269c** (81 mg, 35 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.78 (dd, *J* = 16.8, 8.7 Hz, 3H), 7.69 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 4H), 7.33 – 7.28 (m, 2H), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 4.73 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.14 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.78 (s, 2H), 3.71 (s, 2H, CH₂NOBn), 2.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.13 – 2.05 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.99 – 1.88 (m, 2H), 1.78 – 1.66 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

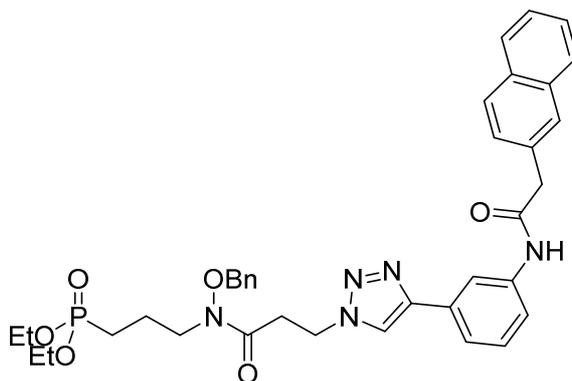
^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2, 171.4, 142.7, 134.0, 133.4, 132.5, 131.1, 129.3, 129.1, 128.8, 128.2, 128.1, 127.6, 127.6, 127.4, 126.2, 125.9, 123.8, 76.3 (OCH₂Ph), 61.7 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 58.1 (OCH₂), 49.4 (CH₂N), 45.5 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 18.5 Hz, CH₂NOBn), 41.2, 28.6 (C(O)CH₂), 24.9

(CH₂CH₂N), 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 142.7 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (122 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

m/z (ES+) 637.28 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonate 270b



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **270b** from azide **150b** (115 mg, 0.29 mmol) and alkyne **262** (82 mg, 0.29 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **270b** (171 mg, 62 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

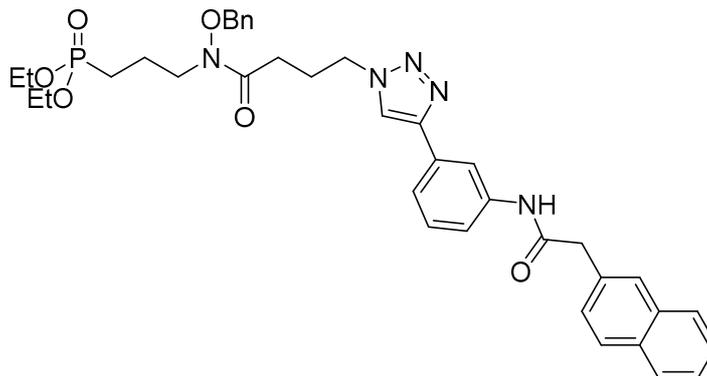
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.51 (s, 1H), 7.83 (dt, *J* = 10.2, 4.6 Hz, 5H), 7.78 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 3H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 4.71 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.68 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.13 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.91 (s, 2H), 3.72 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.95 – 2.89 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.91 (m, 2H), 1.80 – 1.62 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.4, 169.4, 147.4, 138.8, 133.7, 133.6, 132.6, 132.4, 131.1, 129.6, 129.4, 129.3, 128.8, 128.7, 128.1, 127.7, 127.7, 127.3, 126.3, 125.9, 121.5, 120.8, 119.6, 116.7, 76.6 (OCH₂Ph), 61.8 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.9 (d, ³J_{C-P} = 19.2 Hz, CH₂NOBn), 45.3 (CH₂N), 44.7, 33.1 (C(O)CH₂), 23.1 (d, ¹J_{C-P} = 143.0 Hz, PCH₂), 20.3 (d, ²J_{C-P} = 4.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.9.

m/z (ES+) 684.30 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-4-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonate **270c**



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **270c** from azide **150c** (111 mg, 0.24 mmol) and alkyne **262** (69 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **270c** (154 mg, 82 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

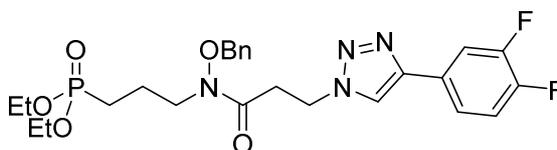
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.98 (s, 1H), 7.91 – 7.77 (m, 4H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.71 – 7.67 (m, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 3H), 7.36 – 7.31 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 3H), 7.26 (s, 2H), 4.72 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 4.11 – 4.02 (m, 4H, POCH₂), 3.92 (s, 2H), 3.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.21 – 2.15 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.99 – 1.89 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.80 – 1.67 (m, 2H, PCH₂), 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2, 169.3, 147.3, 138.5, 133.9, 133.6, 132.6, 132.1, 131.1, 129.6, 129.2, 129.1, 128.9, 128.7, 128.3, 127.7, 127.7, 127.2, 126.4, 126.1, 121.4, 120.1, 119.5, 116.6, 76.4 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 49.3 (CH₂N), 45.5 (d, ³*J*_{C-P} = 16.0 Hz, CH₂NOBn), 44.9, 28.3 (C(O)CH₂), 24.7 (CH₂CH₂N), 23.1 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.7 Hz, PCH₂), 20.3 (d, ²*J*_{C-P} = 3.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

m/z (ES⁺) 698.31 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-(4-(3,4-difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido) propyl) phosphonate **271b**



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **271b** from azide **150b** (203 mg, 0.5 mmol) and alkyne **255** (0.094 mL, 0.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **271b** (240 mg, 57 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.84 (s, 1H, CH=C), 7.70 – 7.60 (m, 1H), 7.55 – 7.47 (m, 1H), 7.34 (s, 5H), 7.18 (q, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.13 – 3.97 (m, 4H, POCH₂), 3.71 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.01 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.02 – 1.81 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.77 – 1.59 (m, 2H, PCH₂), 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

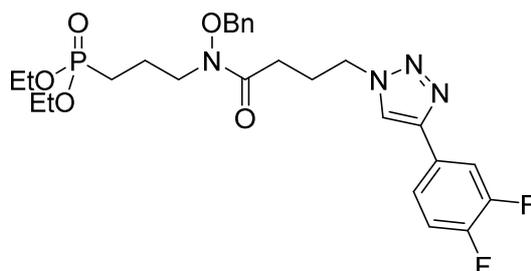
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2 (CO), 151.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 66.1, 12.8 Hz, C-F), 149.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 67.3, 12.9 Hz, C-F), 145.6, 133.7, 129.3, 129.2, 128.7, 127.8 (dd, *J*_{C-F} = 6.7, 3.9 Hz), 121.6 (dd, *J*_{C-F} = 6.3,

3.6 Hz), 121.2, 117.6 (d, $^2J_{C-F}$ = 17.6 Hz, C-C-F), 114.7 (d, $^2J_{C-F}$ = 18.7 Hz, C-C-F), 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 17.9 Hz, CH₂NOBn), 45.3 (CH₂N), 33.0 (C(O)CH₂), 23.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.6 Hz, PCH₂), 20.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.0 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.0.

m/z (ES+) 537.21 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-4-(4-(3,4-difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonate 271c



The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **271c** from azide **150c** (200 mg, 0.48 mmol) and alkyne **255** (0.058 mL, 0.48 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **271c** as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

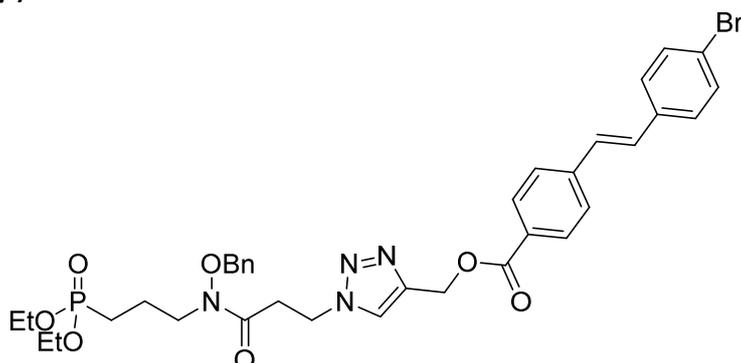
^1H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 7.76 (s, 1H, CH=C), 7.67 (ddd, J = 11.3, 7.6, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dddd, J = 8.6, 4.3, 2.1, 1.4 Hz, 1H), 7.39 – 7.27 (m, 5H), 7.22 (dt, J = 10.1, 8.4 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.44 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.09 (dq, J = 7.9, 7.1, 2.5 Hz, 4H, POCH₂), 3.74 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.42 (t, J = 6.8 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.22 (p, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.06 – 1.85 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.83 – 1.65 (m, 2H, PCH₂), 1.31 (td, J = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3 (CO), 151.4 (dd, $^1J_{C-F}$ = 61.2, 12.9 Hz, C-F), 149.4 (dd, $^1J_{C-F}$ = 62.5, 12.8 Hz, C-F), 146.0, 134.0, 129.3, 129.1, 128.8, 127.8 (dd, J_{C-F} = 6.7, 4.1 Hz), 121.7 (dd, J_{C-F} = 6.4, 3.5 Hz), 119.9, 117.7 (d, $^2J_{C-F}$ = 17.5 Hz, C-C-F), 114.8 (d, $^2J_{C-F}$ = 18.8 Hz, C-C-F), 76.41 (OCH₂Ph), 61.66 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.5 Hz, POCH₂), 49.6 (CH₂N), 45.6 (d, $^3J_{C-P}$ = 18.0 Hz, CH₂NOBn), 28.6 (C(O)CH₂), 25.02, 23.1 (d, $^1J_{C-P}$ = 142.9 Hz, PCH₂), 20.3 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

^{19}F NMR (282 MHz, chloroform-*d*) δ -138.16 (d, J = 21.2 Hz), -139.35 (d, J = 21.3 Hz).

m/z (ES+) 551.22 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl (E)-4-(4-bromostyryl)benzoate 272b

The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **272b** from azide **150b** (32 mg, 0.08 mmol) and alkyne **263** (50 mg, 0.08 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **272b** (50 mg, 50 %) as a colorless oil.

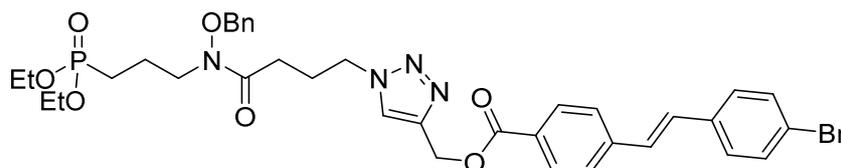
R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (s, 1H, NCH), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.43 – 7.30 (m, 8H), 7.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, CH=CH), 5.46 (s, 2H, CH₂O), 4.74 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.64 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂N), 4.17 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 3.01 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.02 – 1.83 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.77 – 1.60 (m, 2H, PCH₂), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.20 (NC(O)), 166.06 (OC(O)), 142.66, 141.65, 135.64, 133.80, 131.92, 130.25, 130.05, 129.33, 129.25, 128.81, 128.76, 128.23, 128.20, 126.38, 125.03, 122.09 (CBr), 76.49 (OCH₂Ph), 61.67 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.10 (CH₂O), 45.40 (CH₂NOBn et CH₂N), 32.96 (C(O)CH₂), 22.99 (d, ¹J_{C-P} = 143.9 Hz, PCH₂), 20.14 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.48 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.1.

m/z (ES⁺) 471.18 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((Benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl (E)-4-(4-bromostyryl)benzoate 272c

The general procedure **Q** was applied to synthesize the compound **272c** from azide **150c** (33 mg, 0.08 mmol) and alkyne **263** (50 mg, 0.08 mmol). The crude product was purified by column chromatography (100 % EA to 90/10 EA/MeOH) to afford the desired compound **272c** (45 mg, 74 %) as a colorless oil.

R_f = 0.49 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CHAr), 7.70 (s, 1H, NCH), 7.56 – 7.47 (m, 4H, CHAr), 7.44 – 7.32 (m, 5H, CHAr), 7.30 (m, 2H, CHAr), 7.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH=CH), 5.47 (s, 2H, CH₂O), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.17 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.18 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.03 – 1.84 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.81 – 1.65 (m, 2H, PCH₂), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

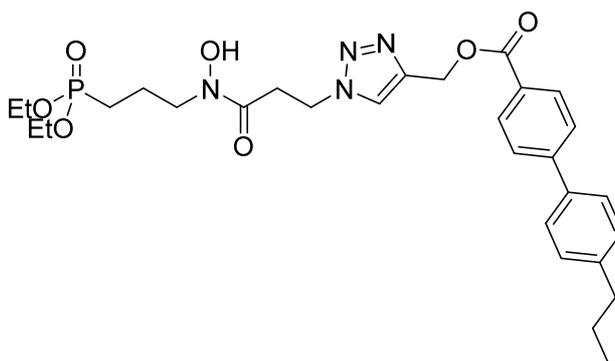
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.03 (NC(O)), 166.13 (OC(O)), 142.99, 141.67, 135.64, 134.06, 131.92, 131.52, 130.48, 130.25, 130.06, 129.33, 129.12, 128.77, 128.71, 128.23, 128.19, 126.37, 124.06 (CBr), 122.10, 76.40 (OCH₂Ph), 61.64 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.11 (CH₂O), 49.51 (CH₂N),

45.61 (d, $^3J_{C-P} = 13.3$ Hz, CH_2NOBn) 28.70 (C(O)CH₂), 24.94 (CH₂CH₂N), 23.08 (d, $^1J_{C-P} = 142.8$ Hz, PCH₂), 20.24 (d, $^2J_{C-P} = 4.3$ Hz, PCH₂CH₂), 16.48 (d, $^3J_{C-P} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

m/z (ES+) 755.20 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate 273b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **273b** from *O*-benzylated hydroxamate **264b** (140 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **273b** (85 mg, 70 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

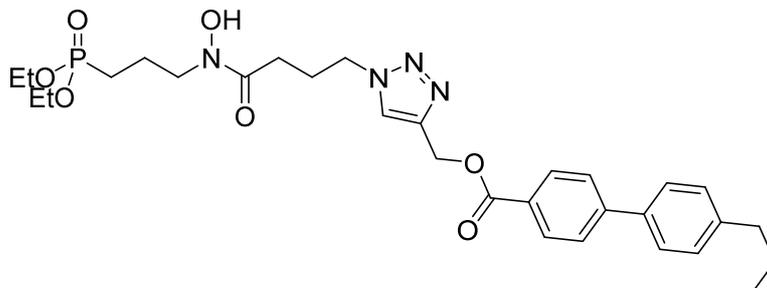
1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.91 (s, 1H, OH), 8.13 – 8.04 (m, 2H), 7.88 (s, 1H, CH=C), 7.69 – 7.59 (m, 2H), 7.58 – 7.50 (m, 2H), 7.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.46 (s, 2H, CH₂O), 4.69 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂N), 4.08 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.79 – 3.69 (m, 2H, CH₂NOH), 3.19 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.69 – 2.59 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.01 – 1.89 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.83 – 1.74 (m, 2H, PCH₂), 1.73 – 1.63 (m, H, CH₂CH₃), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (NC(O)), 166.2 (OC(O)), 145.8, 142.9, 142.5, 137.2, 130.2, 129.0, 128.1, 127.0, 126.7, 125.0 (CH=C), 62.3 (d, $^2J_{C-P} = 6.8$ Hz, POCH₂), 58.0 (CH₂O), 47.7 (d, $^3J_{C-P} = 6.5$ Hz, CH₂NOH), 45.6 (CH₂N), 37.7 (CH₂CH₂CH₃), 33.1 (C(O)CH₂), 24.5 (CH₂CH₃), 22.1 (d, $^1J_{C-P} = 140.6$ Hz, PCH₂), 18.9 (d, $^2J_{C-P} = 5.4$ Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, $^3J_{C-P} = 5.9$ Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.63.

m/z (ES+) 587.27 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate 273c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **273c** from *O*-benzylated hydroxamate **264c** (152 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **273c** (85 mg, 64 %) as a colorless oil.

Rf = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

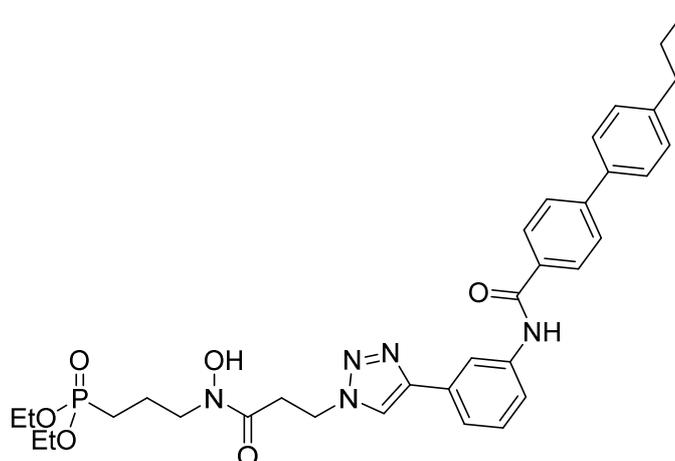
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.13 (s, 1H, CH=C), 8.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H, CH₂O), 4.49 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.15 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.65 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.20 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.92 – 1.82 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.82 – 1.73 (m, 2H, PCH₂), 1.67 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.32 (NC(O)), 166.08 (OC(O)), 145.91, 142.86, 142.72, 136.98, 129.82, 128.79, 128.03, 126.65, 126.44, 124.67 (CH=C), 61.89 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂CH₃), 57.36 (CH₂O), 49.46 (CH₂N), 37.26 (CH₂CH₂CH₃), 28.48 (C(O)CH₂), 24.96 (CH₂CH₂N), 24.26 (CH₂CH₃), 21.81 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.3 Hz, PCH₂), 19.57 (d, ²*J*_{C-P} = 4.5 Hz, PCH₂CH₂), 15.31 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 12.68 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 32.9.

***m/z* (ES⁺)** 601.28 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-3-(4-(3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonate **274b**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **274b** from *O*-benzylated hydroxamate **265b** (32 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **274b** (18 mg, 64 %) as a colorless oil.

Rf = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

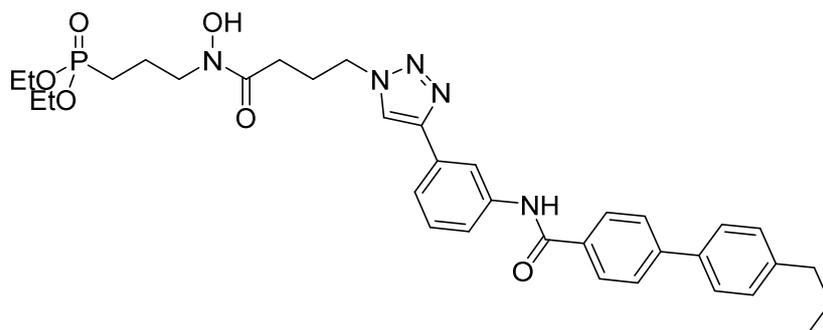
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.97 (s, 1H, NH), 8.53 – 8.35 (brs, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H), 7.41 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.33 – 7.23 (m, 2H), 4.72 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 3.96 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, POCH₂CH₃), 3.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.65 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.83 – 1.72 (m, 2H, PCH₂), 1.74 – 1.64 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (NC(O)), 165.7 (OC(O)), 146.9, 144.6, 142.8, 138.8, 137.2, 133.1, 131.2, 129.6, 129.0, 127.7, 127.1, 127.0, 121.6, 121.3, 120.1, 117.2, 62.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂CH₃), 47.9 (d, ³*J*_{C-P} = 9 Hz, CH₂NOH), 45.7 (CH₂N), 37.7, 33.2 (C(O)CH₂), 24.5 (CH₂CH₃), 22.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.6 Hz, PCH₂), 19.1 (d, ²*J*_{C-P} = 5.2 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃), 13.8 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.4.

***m/z* (ES⁺)** 648.30 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-4-(4-(3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonate 274c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **274c** from *O*-benzylated hydroxamate **265c** (100 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **274c** (64 mg, 56 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

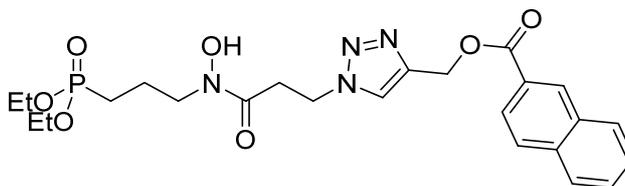
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.36 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.76 – 7.73 (m, 1H), 7.65 – 7.58 (m, 3H), 7.46 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.08 (m, 4H, POCH₂), 3.68 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.73 – 2.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.26 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.96 – 1.85 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.85 – 1.75 (m, 2H, PCH₂), 1.70 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.3 (NC(O)), 167.2 (OC(O)), 147.2, 144.5, 142.6, 139.2, 137.1, 133.0, 131.0, 129.0, 128.7, 127.8, 126.5, 126.4, 121.4, 121.1, 120.7, 117.9, 61.9 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂CH₃), 49.5 (CH₂N), 48.0 (CH₂NC(O)), 37.2 (CH₂CH₂CH₃), 28.5 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 24.3 (CH₂CH₃), 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 19.5 (d, ²J_{C-P} = 4.7 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 12.6 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 33.0.

***m/z* (ES⁺)** 662.31 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-naphthoate 275b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **275b** from *O*-benzylated hydroxamate **266b** (117 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **275b** (65 mg, 65 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.90 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.05 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.91 (s, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.65 – 7.48 (m, 1H), 5.51 (s, 2H, OCH₂), 4.70 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 4.01 (p, *J* = 7.6 Hz, 4H, POCH₂), 3.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.01 – 1.88 (m, 2H), 1.85 – 1.71 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

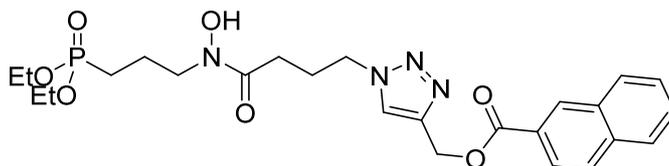
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1, 166.5, 142.5, 135.6, 132.4, 131.4, 129.4, 128.3, 128.1, 127.7, 127.0, 126.6, 125.3, 125.1, 62.3 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 58.1, 47.8 (d, ³J_{C-P} = 6.6 Hz, CH₂NOH),

45.7 (CH₂N), 33.15 (C(O)CH₂), 22.13 (d, ¹J_{C-P} = 143.1 Hz, PCH₂), 18.91 (d, ²J_{C-P} = 6.0 Hz, PCH₂CH₂), 16.34 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.88 (s).

m/z (ES+) 519.20 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-naphthoate 275c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **275c** from *O*-benzylated hydroxamate **266c** (110 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **275c** (56 mg, 60 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

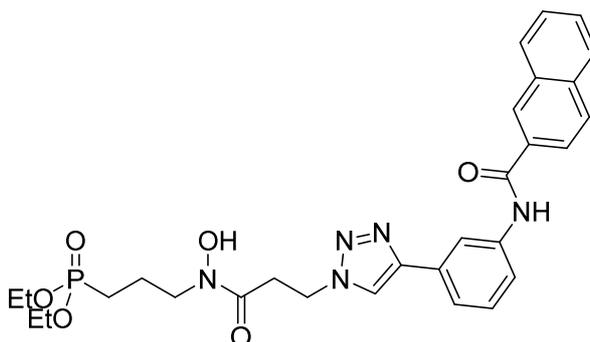
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.67 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 1H), 5.54 (s, 2H, OCH₂), 4.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂N), 4.14 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.79 – 3.74 (m, 2H, CH₂NOH), 2.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.26 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.06 – 1.90 (m, 2H), 1.88 – 1.79 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.3, 166.6, 142.8, 135.6, 132.4, 131.4, 129.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.0, 126.6, 125.3, 124.1, 62.35 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 58.2 (CH₂O), 49.8 (CH₂N), 47.6 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH₂NOH), 28.9 (C(O)CH₂), 25.4 (CH₂CH₂N), 22.08 (d, ¹J_{C-P} = 140.2 Hz, PCH₂), 18.77 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, PCH₂CH₂), 16.35 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 35.5.

m/z (ES+) 555.20 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(3-(4-(3-(2-naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 276b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **276b** from *O*-benzylated hydroxamate **267b** (136 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **276b** (85 mg, 72 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

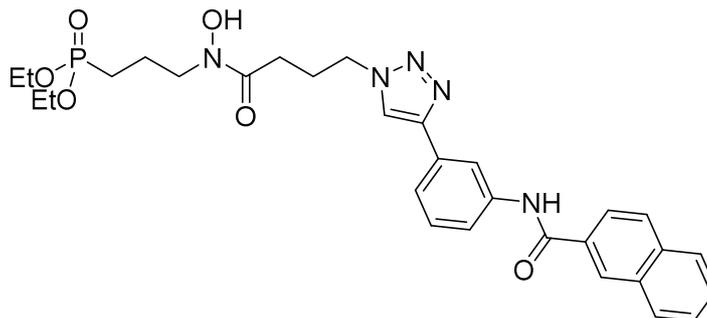
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 10.04 (s, 1H), 8.84 (brs, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.07 – 7.76 (m, 6H), 7.71 – 7.33 (m, 4H), 4.69 (s, 4H, CH₂NH), 3.92 (m, 4H, POCH₂), 3.73 (s, CH₂NOH), 3.18 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.92 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (CO), 166.2 (CO), 146.9, 138.9, 134.8, 132.5, 132.1, 129.6, 129.0, 127.8, 127.7, 126.8, 123.9, 121.6, 121.4, 120.3, 117.42, 62.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, POCH₂), 47.9, 45.7, 33.1, 22.2 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 138$ Hz, PCH₂), 19.3, 16.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.9$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 33.8.

m/z (ES+) 580.24 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-(4-(3-(2-naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxybutanamido) propyl) phosphonate 276c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **276c** from *O*-benzylated hydroxamate **267c** (112 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **276c** (34 mg, 35 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

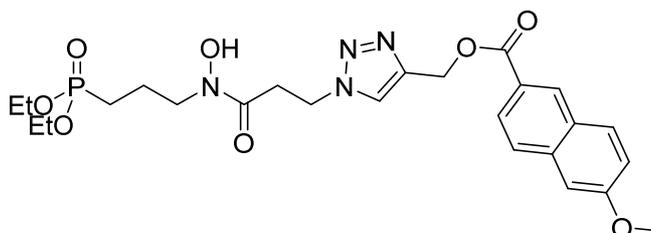
^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.72 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.92 (dt, $J = 19.1, 7.6$ Hz, 3H), 7.86 (s, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 1H), 7.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H), 4.46 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂N), 4.08 – 3.93 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.74 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂NOH), 2.59 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.26 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.01 – 1.89 (m, 2H, PCH₂), 1.87 – 1.76 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.4 (CO), 166.1 (CO), 147.3, 138.9, 135.0, 132.7, 132.20 131.4, 129.8, 129.1, 128.7, 128.0, 127.9, 127.0, 123.9, 121.8, 120.4, 120.2, 117.4, 62.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, POCH₂), 49.9, 47.9 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, CH₂NOH), 29.0, 25.4, 22.3 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.6$ Hz, PCH₂), 19.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.4$ Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.8.

m/z (ES+) 594.25 (100%, [M]⁺).

1-(3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-methoxy-2-naphthoate 277b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **277b** from *O*-benzylated hydroxamate **268b** (139 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **277b** (68 mg, 57 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

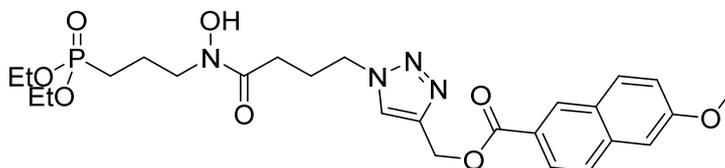
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.91 (s, 1H, OH), 8.52 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H, CH₂O), 4.69 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 4.09 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NC(O)), 3.19 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.93 (dp, *J* = 19.7, 6.5 Hz, 2H, PCH₂CH₂), 1.76 (dt, *J* = 18.5, 6.7 Hz, 2H, PCH₂), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, PCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1 (NC(O)), 166.6 (OC(O)), 159.6, 142.5, 137.2, 131.1, 130.9, 127.8, 126.8, 125.9, 125.0, 124.7, 119.6, 105.7 (CHCOCH₃), 62.30 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂CH₃), 58.0 (CH₂O), 55.3 (OCH₃), 47.7 (d, ³*J*_{C-P} = 7.7 Hz, CH₂NOH), 45.7 (CH₂N), 33.1 (C(O)CH₂), 22.1 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.8 Hz, PCH₂), 18.9 (d, ²*J*_{C-P} = 5.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.8.

***m/z* (ES⁺)** 548.19 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-methoxy-2-naphthoate 277c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **277c** from *O*-benzylated hydroxamate **268c** (118 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **277c** (72 mg, 71 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

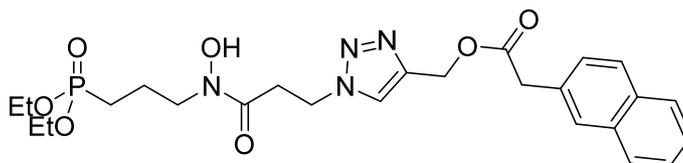
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.52 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.00 – 7.94 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H, CH₂O), 4.50 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.14 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.21 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.92 – 1.82 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.82 – 1.70 (m, 2H, PCH₂), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.3 (NC(O)), 166.5 (OC(O)), 159.9, 142.8, 137.5, 130.5, 130.5, 127.8, 126.7, 125.2, 124.6, 124.5, 119.4, 105.3 (CHCOCH₃), 61.8 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 57.3 (CH₂O), 54.5 (OCH₃), 49.4 (CH₂N), 47.9 (d, ³*J*_{C-P} = 18.8 Hz, CH₂NOH), 28.4 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 21.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.1 Hz, PCH₂), 19.5 (d, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 32.98.

***m/z* (ES⁺)** 563.22 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-(naphthalen-2-yl)acetate 278b

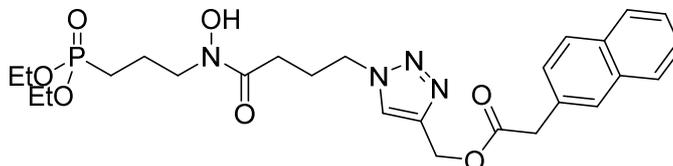


The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **278b** from *O*-benzylated hydroxamate **269b** (121 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **278b** (55 mg, 53 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

m/z (ES⁺) 493.14 (100%, [M]⁺).

(1-(4-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 2-(naphthalen-2-yl)acetate 278c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **278c** from *O*-benzylated hydroxamate **269c** (71 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **278c** (46 mg, 75 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

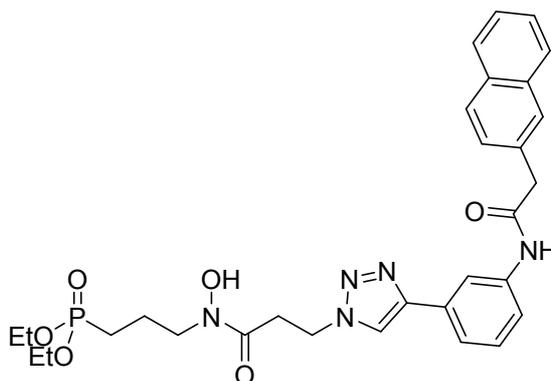
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.67 (s, 1H), 7.86 – 7.75 (m, 3H), 7.72 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 2H), 7.40 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 4.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂N), 4.12 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.81 (s, 2H), 3.78 – 3.70 (m, 2H, CH₂NOH), 2.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.23 – 2.09 (m, 2H, CH₂CH₂N), 2.03 – 1.92 (m, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2, 171.4, 142.6, 133.4, 132.4, 131.1, 128.2, 128.1, 127.6, 127.6, 127.3, 126.2, 125.8, 123.9, 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 58.1 (OCH₂), 49.7 (CH₂N), 47.6 (d, ³*J*_{C-P} = 18.5 Hz, CH₂NC(O)), 41.3, 28.8 (C(O)CH₂), 25.3 (CH₂CH₂N), 22.1 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.2 Hz, PCH₂), 18.8 (d, ²*J*_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.2.

m/z (ES⁺) 547.23 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-hydroxy-3-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonate 279b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **279b** from *O*-benzylated hydroxamate **270b** (146 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **279b** (84 mg, 66 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 10.05 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.83 (m, 4H), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.52 – 7.44 (m, 3H), 7.42 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.33 – 7.19 (m, 1H), 4.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂N), 4.03 – 3.91 (m, 4H, POCH₂), 3.90 (s, 2H), 3.71 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.14 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.01 – 1.83 (m, 2H), 1.83 – 1.67 (m, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

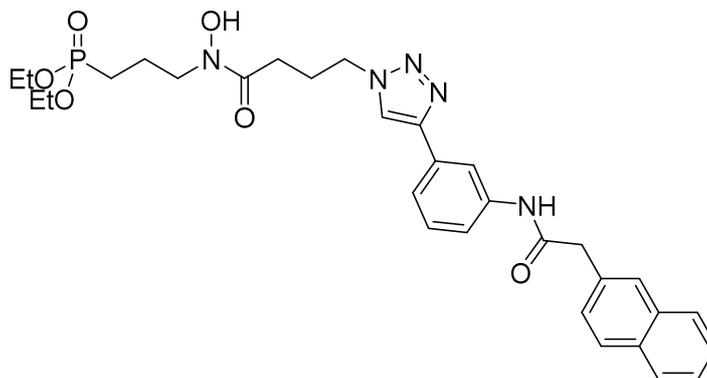
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.1, 169.6, 146.8, 138.6, 133.6, 132.6, 132.2, 130.9, 129.5, 128.8, 128.2, 127.7, 127.7, 127.3, 126.4, 126.0, 121.5, 121.4, 119.9, 116.8, 62.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz,

POCH₂), 47.9 (d, ³J_{C-P} = 11.5 Hz, CH₂NOH), 45.7 (CH₂N), 44.7, 33.1 (C(O)CH₂), 22.3 (d, ¹J_{C-P} = 140.8 Hz, PCH₂), 19.4 (PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 33.62.

m/z (ES+) 594.25 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(*N*-hydroxy-4-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonate 279c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **279c** from *O*-benzylated hydroxamate **270c** (129 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **279c** (55 mg, 49 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

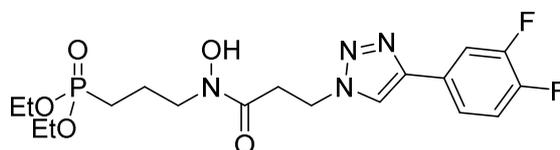
¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.71 (s, 1H), 7.91 – 7.77 (m, 5H), 7.75 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.55 – 7.41 (m, 4H), 4.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 4.10 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.92 (s, 2H), 3.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.22 (p, *J* = 6.0, 5.3 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.04 – 1.74 (m, 4H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2, 169.3, 147.1, 138.3, 133.6, 132.7, 131.8, 131.2, 129.5, 129.1, 128.4, 127.7, 127.2, 126.5, 126.2, 121.6, 120.2, 119.5, 116.7, 62.3 (t, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, POCH₂), 49.7 (CH₂N), 47.7 (CH₂NC(O)), 45.0, 28.8 (C(O)CH₂), 25.3 (CH₂CH₂N), 22.2 (d, ¹J_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.9 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.6.

m/z (ES+) 608.26 (35%, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-(4-(3,4-difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 280b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **280b** from *O*-benzylated hydroxamate **289b** (182 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **280b** (93 mg, 70 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.93 (s, 1H, OH), 7.97 (s, 1H, CH=C), 7.65 (ddd, *J* = 11.3, 7.6, 2.1 Hz, 1H), 7.56 – 7.47 (m, 1H), 7.19 (dt, *J* = 10.1, 8.3 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂N), 4.07 – 3.90 (m, 4H,

POCH₂), 3.78 – 3.70 (m, 2H, CH₂NOH), 3.19 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.95 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.86 – 1.72 (m, 2H, PCH₂), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

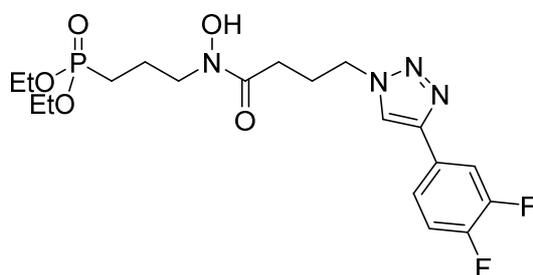
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.2 (CO), 151.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 68.6, 12.8 Hz, C-F), 149.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 69.8, 12.8 Hz, C-F), 145.5, 127.9 (dd, *J*_{C-F} = 6.7, 3.8 Hz), 121.7 (dd, *J*_{C-F} = 6.3, 3.6 Hz), 121.3, 117.7 (d, ²*J*_{C-F} = 17.6 Hz, C-C-F), 114.7 (d, ²*J*_{C-F} = 18.7 Hz, C-C-F), 62.3 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, POCH₂), 47.9 (d, ³*J*_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂NOH), 45.6 (CH₂N), 33.2 (C(O)CH₂), 22.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.8 Hz, PCH₂), 19.0 (d, ²*J*_{C-P} = 5.4 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.5.

¹⁹F NMR (282 MHz, chloroform-*d*) δ -137.31 (d, *J* = 21.2 Hz), -138.60 (d, *J* = 21.2 Hz).

m/z (ES+) 446.15 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(4-(4-(3,4-difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-hydroxybutanamido) propyl) phosphonate **280c**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **280c** from *O*-benzylated hydroxamate **271c** (267 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **280c** (203 mg, 90 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 9.77 (s, 1H, NOH), 7.87 (s, 1H, CH=C), 7.70 – 7.51 (m, 1H), 7.56 – 7.42 (m, 1H), 7.25 – 7.07 (m, 1H), 4.50 – 4.39 (m, 2H, CH₂N), 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.62 – 2.49 (m, 2H, C(O)CH₂), 2.31 – 2.16 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.99 – 1.84 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.77 (m, 2H, PCH₂), 1.26 (m, 6H, POCH₂CH₃).

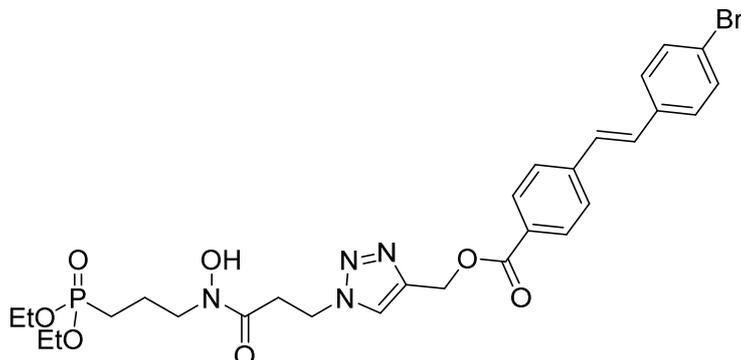
¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.1 (CO), 151.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 62.5, 12.7 Hz, C-F), 149.3 (dd, ¹*J*_{C-F} = 63.8, 12.7 Hz, C-F), 145.8, 128.7 (m), 121.7 (dd, *J*_{C-F} = 6.3, 3.6 Hz), 120.3 (d, *J*_{C-F} = 3.0 Hz), 117.7 (d, ²*J*_{C-F} = 17.5 Hz, C-C-F), 114.7 (dd, ²*J*_{C-F} = 18.8, 2.5 Hz, C-C-F), 62.21 (dd, ²*J*_{C-P} = 7.1, 3.8 Hz, POCH₂), 49.8 (CH₂N), 47.8 (d, ³*J*_{C-P} = 12.6 Hz, CH₂NOH), 28.8 (C(O)CH₂), 25.3, 22.2 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.9 Hz, PCH₂), 19.2 (d, ²*J*_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 34.0.

¹⁹F NMR (282 MHz, chloroform-*d*) δ -138.30 (d, *J* = 21.2 Hz), -139.46 (d, *J* = 21.3 Hz).

m/z (ES+) 461.18 (100%, [M]⁺).

(1-(3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)(hydroxy)amino)-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl (E)-4-(4-bromostyryl)benzoate 281b



The general procedure **K2** was applied to synthesize the compound **281b** from *O*-benzylated hydroxamate **272b** (43 mg). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20), to afford the desired compound **281b** (11 mg, 29 %) as a colorless oil.

R_f = 0.36 (9/1, EA/MeOH).

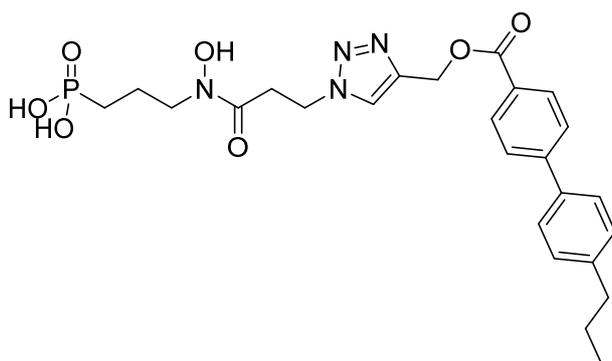
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.90 (s, 1H, NCH), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.48 (m, 2H), 7.43 – 7.37 (m, 2H), 7.12 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH=CH), 5.46 (s, 2H, CH₂O), 4.70 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 4.03 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H, POCH₂), 3.78 – 3.71 (m, 2H, CH₂NOH), 3.20 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.02 – 1.91 (m, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 171.09 (NC(O)), 166.05 (OC(O)), 141.64, 135.65, 131.91, 130.29, 130.03, 128.73, 128.22, 126.36, 125.23, 122.08 (CBr), 62.40 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 57.89 (CH₂O), 47.75 (d, ³J_{C-P} = 4.5 Hz, CH₂NC(O)), 45.86 (CH₂N), 33.13 (C(O)CH₂), 22.11 (d, ¹J_{C-P} = 140.3 Hz, PCH₂), 18.81 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 16.36 (d, ³J_{C-P} = 5.9 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

m/z (ES⁺) 689.09 (100%, [M+K]⁺).

(3-(*N*-hydroxy-3-(4-(((4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonic acid 282b



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **282b** from diethylphosphonate **273b** (71 mg). The desired compound was obtained without further purification only with *E* conformer.

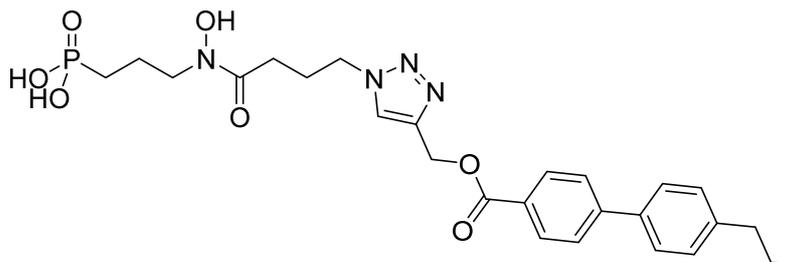
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.13 (s, 1H, CH=C), 8.11 – 8.04 (m, 2H), 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H, CH₂O), 4.72 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 3.66 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NC(O)), 3.17 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.78 – 2.57 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.95 – 1.83 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.75 – 1.60 (m, 4H, PCH₂ and CH₂CH₃), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 170.8 (NC(O)), 166.2 (OC(O)), 145.9, 142.8, 136.9, 129.8, 128.8, 127.9, 126.6, 126.4, 125.2 (CH=C), 57.3 (CH₂O), 48.4 (CH₂NOH), 45.6 (CH₂N), 37.2 (CH₂CH₂CH₃), 32.2 (C(O)CH₂), 24.2 (CH₂CH₃), 23.9 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 138.8$ Hz, PCH₂), 19.9 (PCH₂CH₂), 12.6 (CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 29.51.

HRMS (ES+) calculated for C₂₅H₃₂N₄O₇P [M]⁺: 531.2003 found 531.2033 (100%, [M]⁺)

(3-(*N*-hydroxy-4-(4-(((4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanido)propyl)phosphonic acid 282c



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **282c** from diethylphosphonate **273c** (72 mg). The desired compound was obtained without further purification only with *E* conformer.

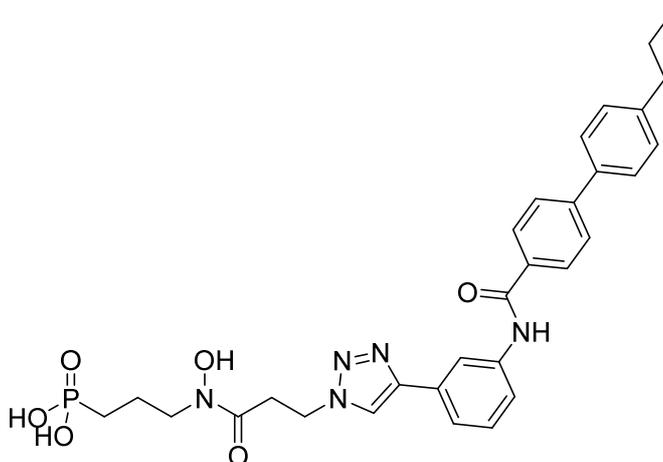
^1H NMR (300 MHz, methanol- d_4) δ 8.18 (s, 1H, CH=C), 8.11 – 8.05 (m, 2H), 7.76 – 7.69 (m, 2H), 7.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.47 (s, 2H, CH₂O), 4.51 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂N), 3.66 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂NOH), 2.70 – 2.58 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.54 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.23 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, PCH₂CH₂), 1.77 – 1.60 (m, 4H, PCH₂ and CH₂CH₃), 0.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 173.2 (NC(O)), 166.1 (OC(O)), 145.9, 142.8, 136.9, 129.8, 128.7, 127.9, 126.6, 126.4, 124.9 (CH=C), 65.4 (CH₂O), 57.0 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, CH₂NC(O)), 49.4 (CH₂N), 37.2 (CH₂CH₂CH₃), 29.9 (C(O)CH₂), 25.0 (CH₂CH₂N), 24.2 (CH₂CH₃), 23.6 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 141.3$ Hz, PCH₂), 17.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.3$ Hz, PCH₂CH₂), 12.6 (CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 29.6.

HRMS (ES+) calculated for C₂₆H₃₄N₄O₇P [M]⁺: 545.2160; found 545.2190 (100%, [M]⁺)

(3-(*N*-hydroxy-3-(4-(3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonic acid 283b

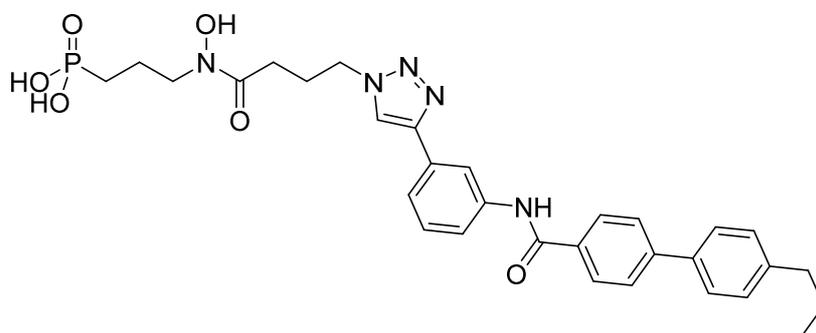


The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **283b** from diethylphosphonate **274b** (13 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 25/75 respectively.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.49 (s, 1H), 8.32 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.5, 2.7 Hz, 2H), 7.86 – 7.81 (m, 3H), 7.71 – 7.65 (m, 2H), 7.54 (dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 7.43 (td, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 2H), 4.62 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 1.5 of 2H, CH₂NOH), 3.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 0.5 of 2H, CH₂NOH), 3.07 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.5 of 2H, C(O)CH₂), 2.97 (t, *J* = 6.8 Hz, 0.5 of 2H, C(O)CH₂), 2.68 – 2.56 (m, 2H), 1.82 – 1.45 (m, 6H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

HRMS (ES⁺) calculated for C₃₀H₃₃N₅O₆P [M]⁺: 590.2174 found 590.2141 (100%, [M]⁺)

(3-(*N*-Hydroxy-4-(4-(3-(4'-*n*-propyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonic acid 283c



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **283c** from diethylphosphonate **274c** (56 mg). The desired compound was obtained without further purification only with *E* conformer.

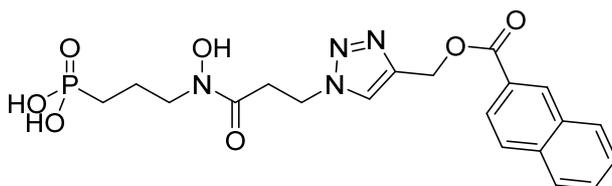
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.39 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.87 – 7.75 (m, 3H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.59 – 7.51 (m, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 3.53 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.69 – 2.58 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.18 – 2.02 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.82 – 1.59 (m, 4H, PCH₂CH₂ and CH₂CH₃), 1.58 – 1.39 (m, 2H, PCH₂), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2 (NC(O)), 165.6 (OC(O)), 146.7, 143.5, 142.7, 140.2, 136.9, 133.7, 131.6, 129.6, 129.5, 128.8, 127.2, 126.7, 121.8, 121.1, 120.2, 117.5, 49.6 (CH₂N), 48.6 (CH₂NOH), 37.3 (CH₂CH₂CH₃), 29.1 (C(O)CH₂), 25.7 (d, ¹J_{C-P} = 138.5 Hz, PCH₂), 25.4 (CH₂CH₂N), 24.5 (CH₂CH₃), 20.6 (PCH₂CH₂), 14.1 (CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.54.

HRMS (ES⁺) calculated for C₃₁H₃₅N₅O₆P [M]⁺: 604.2319; found 604.2349 (100%, [M]⁺)

(3-(3-(4-(((2-Naphthoyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-*N*-hydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid 284b



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **284b** from diethylphosphonate **275b** (44 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 30/70 respectively.

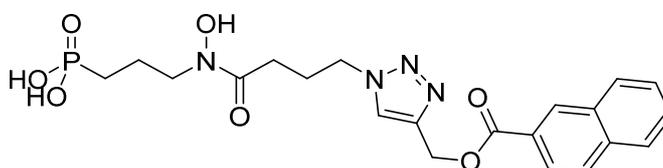
^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.63 (s, 1H), 8.28 (dd, J = 16.8, 6.5 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 14.3, 8.4 Hz, 2H), 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.63 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.52 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 4.80 – 4.72 (m, 2H), 3.66 (t, J = 6.7 Hz, 1.4 of 2H, CH_2N), 3.37 – 3.33 (m, 0.6 of 2H, CH_2N), 3.20 (t, J = 6.3 Hz, 1.6 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 3.04 (t, 6.4 Hz, 0.6 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.13-1.60 (m, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 170.7, 166.2, 141.6, 135.7, 132.5, 130.9, 129.0, 128.3, 128.0, 127.4, 126.6, 124.6, 56.9, 56.7 (CH_2O), 50.9 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 15.4 Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{OH})$), 49.6 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 18.7 Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{OH})$), 46.4 (CH_2N), 46.1 (CH_2N), 33.4 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 32.0 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 23.8 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 139.7 Hz, PCH_2), 23.61 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 141.2 Hz, PCH_2), 19.9 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 4.3 Hz, PCH_2CH_2), 17.2 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 4.4 Hz, PCH_2CH_2).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 29.9, 27.8.

HRMS (ES+) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M}]^+$: 463.1377; found 463.1357 (100%, $[\text{M}]^+$)

(3-(4-(4-(((2-Naphthoyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxybutanamido)propyl) phosphonic acid 284c



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **284c** from diethylphosphonate **275c** (49 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 70/30 respectively.

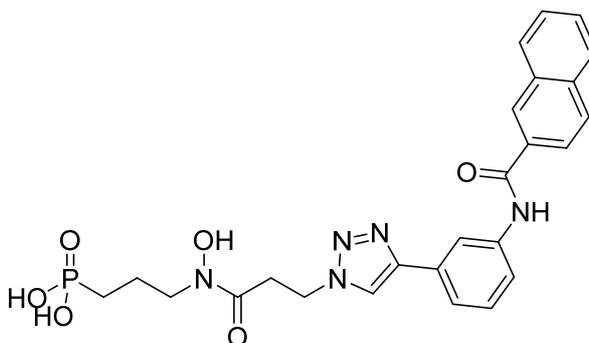
^1H NMR (500 MHz, chloroform- d) δ 8.65 (s, 1H), 8.46 (dd, J = 18.7, 5.5 Hz, 1H), 8.04 (dt, J = 8.7, 1.6 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.98 – 7.92 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 1H), 5.57 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 4.64 – 4.57 (m, 2H, CH_2N), 3.65 (t, J = 6.6 Hz, 0.6 of 2H, CH_2NOH), 3.37 – 3.33 (m, 1.4 of 2H, CH_2NOH), 2.59 (t, J = 7.0 Hz, 0.6 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.43 (t, J = 7.1 Hz, 1.4 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.26 (p, J = 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.05 (tt, J = 14.8, 8.0 Hz, 1.4 of 2H), 1.85 (dt, J = 18.5, 7.7 Hz, 1.4 of 2H + 0.6 of 2H), 1.78 – 1.62 (m, 0.6 of 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform- d) δ 174.2 ($\text{NC}(\text{O})$), 167.5 ($\text{OC}(\text{O})$), 142.7, 137.2, 133.8, 132.4, 130.4, 129.7, 129.4, 128.8, 128.0, 127.9, 127.7, 125.9, 57.6 (CH_2O), 52.3 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 15.7 Hz, CH_2NOH), 51.8 (CH_2N), 31.3 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 26.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 25.0 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 141.2 Hz, PCH_2), 18.6 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 4.4 Hz, PCH_2CH_2).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 30.2, 27.9.

HRMS (ES+) calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M}]^+$: 477.1534 found 477.1568 (100%, $[\text{M}]^+$)

(3-(3-(4-(3-(2-Naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxypropanamido) propyl) phosphonic acid 285b



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **285b** from diethylphosphonate **276b** (65 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 70/30 respectively.

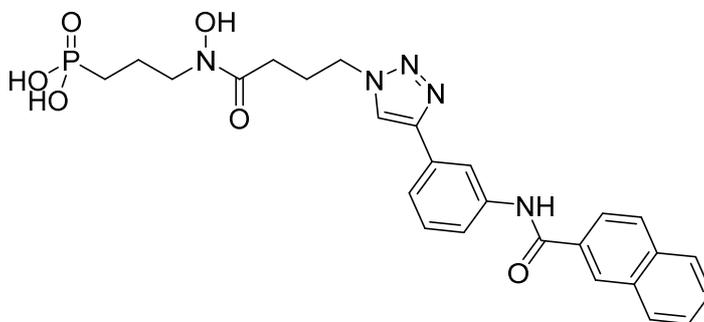
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.71 – 8.52 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.03 (m, 3H), 7.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (m, 3H), 7.53 (m, 1H), 4.86 – 4.81 (m, 2H, CH₂N), 3.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 0.6 of 2H, CH₂NOH), 3.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 3.30 (m, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 3.13 (t, *J* = 5.9 Hz, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 2.05 (dp, *J* = 14.8, 7.7 Hz, 1.4 of 2H, PCH₂CH₂), 1.98 – 1.89 (m, 0.6 of 2H, PCH₂CH₂), 1.85 (dt, *J* = 18.6, 7.8 Hz, 1.4 of 2H, PCH₂), 1.78 – 1.67 (m, 0.6 of 2H, PCH₂).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 171.0 (CO), 167.5 (CO), 145.8, 139.5, 135.0, 132.6, 131.8, 129.4, 128.7, 128.0, 127.8, 127.6, 127.4, 126.5, 123.7, 122.9, 121.6, 118.2, 50.9 (d, ³*J*_{C-P} = 15.5 Hz, CH₂NOH), 45.7 (CH₂N), 33.2 (C(O)CH₂), 23.6 (d, ¹*J*_{C-P} = 141 Hz, PCH₂), 17.2 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.8, 27.8.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₅H₂₇N₅O₆P [M]⁺: 524.1693, found 524.1694 (60%, [M]⁺).

(3-(4-(4-(3-(2-Naphthamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxybutanamido)propyl) phosphonic acid 285c



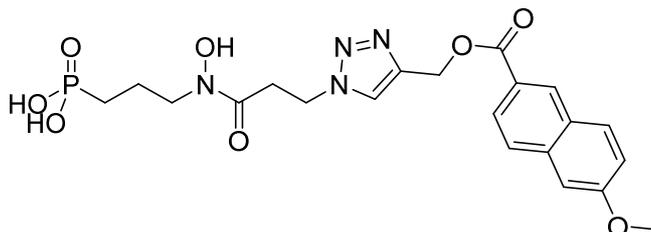
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **285c** from diethylphosphonate **276c** (27 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 30/70 respectively.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, NOH), 8.64 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.39 (q, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.12 – 8.01 (m, 4H), 7.87 – 7.79 (m, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 2H), 7.59 – 7.55 (m, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.45 (td, *J* = 7.0, 2.4 Hz, 2H, CH₂N), 3.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 3.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 0.6 of 2H, CH₂NOH), 2.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 2.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 2.16 – 2.06 (m, 2H), 1.89 – 1.44 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.6 (N(OH)C(O)), 171.7 (N(OH)C(O)), 165.6 (NHC(O)), 146.3, 139.8, 134.3, 132.1, 132.1, 131.3, 129.2, 128.9, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 126.9, 124.5, 121.4, 120.7, 119.8, 117.1, 49.2, 48.8, 30.41, 28.54, 24.9 (d, ¹*J*_{C-P} = 137.7 Hz, PCH₂), 20.42.

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.6, 27.7.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₆H₂₉N₅O₆P [M]⁺: 538.1850 found 538.1895 (100%, [M]⁺)

(3-(N-hydroxy-3-(4-(((6-methoxy-2-naphthoyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonic acid 286b

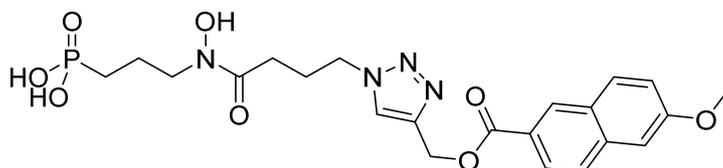
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **286b** from diethylphosphonate **277b** (68 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 15/85 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.54 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H, CH₂O), 4.77 (dt, *J* = 12.6, 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (t, *J* = 6.8 Hz, 1.7 of 2H, CH₂NC(O)), 3.35 (m, 0.3 of 2H, CH₂NC(O)), 3.22 (t, *J* = 6.3 Hz, 1.7 of 2H, C(O)CH₂), 3.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 0.3 of 2H, C(O)CH₂), 2.04 (m, 0.3 of 2H), 1.95 – 1.79 (m, 1.7 of 2H + 0.3 of 2H), 1.74 – 1.62 (m, 1.7H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 170.7 (NC(O)), 168.67 (NC(O)), 166.3 (OC(O)), 160.0 (COCH₃), 137.63, 130.70, 130.53, 127.84, 126.81, 125.23, 119.52, 105.38 (CHCOCH₃), 56.31 (CH₂O), 54.55 (OCH₃), 46.60 (CH₂NC(O)), 31.93 (C(O)CH₂), 23.80 (d, ¹*J*_{C-P} = 139.4 Hz, PCH₂), 19.93 (d, ²*J*_{C-P} = 4.0 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 33.8.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₁H₂₆N₄O₈P [M]⁺: 493.1483; found 493.1488 (100%, [M]⁺).

(3-(N-Hydroxy-4-(4-(((6-methoxy-2-naphthoyl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonic acid 286c

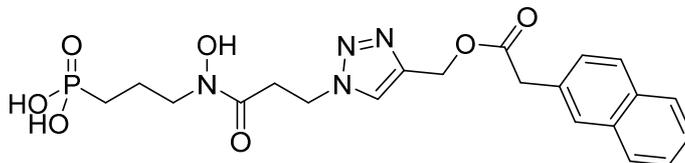
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **286c** from diethylphosphonate **277c** (65 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 30/70 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.55 (s, 1H), 8.43 – 8.34 (m, 1H), 7.99 (dt, *J* = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂O), 4.58 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂N), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (t, *J* = 6.7 Hz, 1.4 of 2H, CH₂NOH), 3.38 – 3.33 (m, 0.6 of 2H, CH₂NC(O)), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 2.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 2.25 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.13 – 1.86 (m, 2H (PCH₂CH₂)), 1.86 – 1.66 (m, 2H, PCH₂).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.1 (NC(O)), 166.3 (OC(O)), 160.1, 141.6, 137.6, 130.7, 130.5, 127.8, 126.8, 126.0, 125.2, 124.1, 119.5, 105.3 (CHCOCH₃), 56.2 (CH₂O), 54.6 (OCH₃), 50.9 (d, ³*J*_{C-P} = 15.5 Hz, CH₂NOH), 50.7 (CH₂N), 48.2 (d, ³*J*_{C-P} = 19.2 Hz, CH₂NOH), 29.9 (C(O)CH₂), 28.4 (C(O)CH₂), 24.9 (CH₂CH₂N), 24.6 (CH₂CH₂N), 23.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.0 Hz, PCH₂), 23.6 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 20.0 (d, ²*J*_{C-P} = 3.7 Hz, PCH₂CH₂), 17.2 (d, *J*_{C-P} = 4.4 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 30.1, 27.8.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₂H₂₈N₄O₈P [M]⁺: 507.1639; found 507.1645 (100%, [M]⁺)

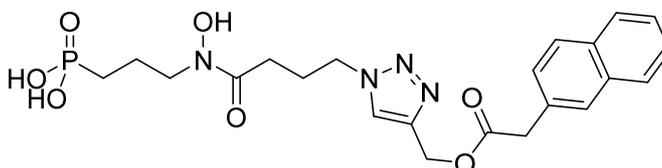
(3-(*N*-hydroxy-3-(4-((2-(naphthalen-2-yl)acetoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonic acid 287b

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **287b** from diethylphosphonate **278b** (51 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of three *Z*, *E* and *other* conformers in a ratio of 12/28/60 respectively.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.45 (s, 0.3 of 1H, NOH), 8.11 (s, 0.7 of 1H, NOH), 7.81 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 5.24 (s, 1.4 of 2H, CH₂O), 4.85 (m, 0.6 of 2H, CH₂N), 4.79 (s, 0.6 of 2H, CH₂O), 4.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 1.4 of 2H, CH₂N), 3.84 (s, 1.4 of 2H, CH₂), 3.81 (s, 0.6 of 2H, CH₂), 3.64 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂NC(O)), 3.25 (d, *J* = 5.9 Hz, 0.6 of 2H, C(O)CH₂), 3.14 (t, *J* = 6.1 Hz, 1.4 of 2H, C(O)CH₂), 1.95 – 1.81 (m, 2H), 1.66 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.6 (NC(O)), 171.5 (NC(O)), 170.7 (OC(O)), 170.3 (OC(CO)), 145.4, 145.1, 141.7, 133.5, 133.4, 132.5, 131.7, 131.4, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 127.2, 127.2, 127.0, 125.8, 125.7, 125.6, 125.5, 125.4, 125.4, 125.2, 56.7 (CH₂O), 53.6, 53.4, 50.9 (d, ³*J*_{C-P} = 15.5 Hz, CH₂NC(O)), 48.1 (d, ³*J*_{C-P} = 18.4 Hz, CH₂NC(O)), 40.4, 40.3, 32.8 (C(O)CH₂), 31.5 (C(O)CH₂), 23.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 139.6 Hz, PCH₂), 23.6 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 19.9 (d, ²*J*_{C-P} = 4.2 Hz, PCH₂CH₂), 17.2 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.87 , 29.71 , 27.71 .

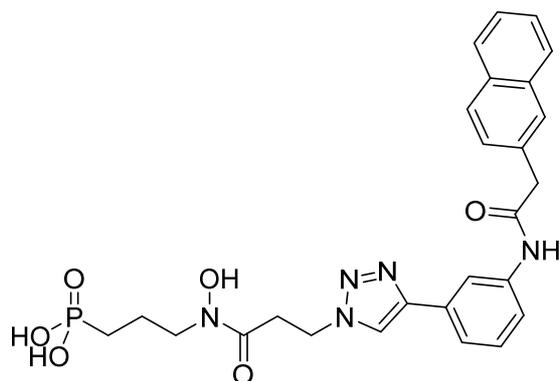
(3-(*N*-hydroxy-4-(4-((2-(naphthalen-2-yl)acetoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonic acid 287c

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **287c** from diethylphosphonate **278c** (65 mg). The desired compound was obtained without further purification with only *Z* conformer.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.87 – 7.77 (m, 3H), 7.77 – 7.71 (m, 1H), 7.50 – 7.37 (m, 3H), 4.80 (s, 2H), 4.64 (tt, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 2H, CH₂N), 3.82 (s, 2H), 3.37 – 3.32 (m, 2H, CH₂NC(O)), 2.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.27 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.11 – 1.98 (m, 2H), 1.84 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.3, 174.0, 146.8, 134.9, 133.9, 133.2, 129.1, 128.9, 128.6, 128.6, 128.4, 127.2, 126.8, 126.4, 54.9, 52.8, 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.6 Hz, CH₂NOH), 41.8, 31.1, 25.9, 25.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.2 Hz, PCH₂), 18.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 27.7.

(3-(*N*-hydroxy-3-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanamido)propyl)phosphonic acid 288b

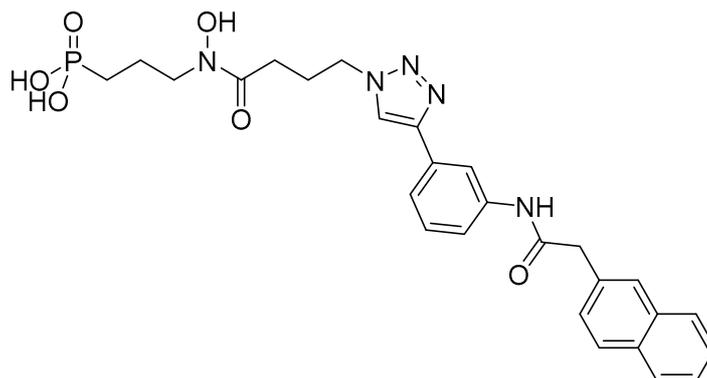
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **288b** from diethylphosphonate **279b** (56 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 25/75 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.60 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.85 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H), 7.65 – 7.40 (m, 6H), 4.85 – 4.77 (m, 2H CH₂N), 3.90 (s, 2H), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 1.5 of 2H, CH₂NOH), 3.35 (m, 0.5 of 2H, CH₂NOH), 3.26 (t, *J* = 6.3 Hz, 1.5 of 2H, C(O)CH₂), 3.10 (t, *J* = 6.5 Hz, 0.5 of 2H C(O)CH₂), 1.96 – 1.84 (m, 2H), 1.76 – 1.65 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.4, 147.4, 141.1, 135.6, 134.2, 133.9, 130.7, 129.2, 129.1, 128.9, 128.6, 128.3, 127.2, 126.8, 124.5, 124.1, 122.7, 121.8, 118.6, 52.3 (d, ³*J*_{C-P} = 15.6 Hz, CH₂NC(O)), 47.9 (CH₂N), 44.8, 34.7 (C(O)CH₂), 25.0 (d, ¹*J*_{C-P} = 140.9 Hz, PCH₂), 18.6 (PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.8, 27.8.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₆H₂₉N₅O₆P [M]⁺: 538.1850 found 538.1899 (100%, [M]⁺)

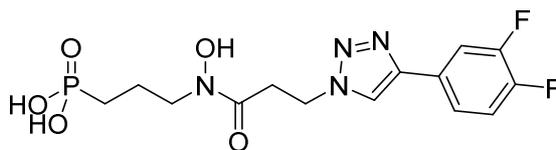
(3-(*N*-hydroxy-4-(4-(3-(2-(naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)propyl)phosphonic acid 288c

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **288c** from diethylphosphonate **279c** (65 mg). The desired compound was obtained without further purification with only *E* conformer.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.33 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 7.64 – 7.30 (m, 6H), 4.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 3.89 (s, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NC(O)), 2.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.35 – 2.15 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.88 (s, 2H, PCH₂CH₂), 1.78 – 1.62 (m, 2H, PCH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.5.

HRMS (ES⁺) calculated for C₂₇H₃₁N₅O₆P [M]⁺: 552.2006 found 552.2033 (100%, [M]⁺)

(3-(3-(4-(3,4-Difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid 289c

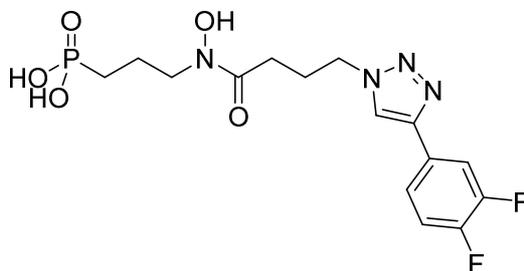
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **289c** from diethylphosphonate **280b** (71 mg). The desired compound was obtained without further purification as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a ratio of 50/50 respectively.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.66 (s, 0.5 of 1H, NOH), 8.61 (s, 0.5 of 1H, NOH), 7.82 – 7.72 (m, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 1H), 7.46 – 7.33 (m, 1H), 4.82 (m, 2H, CH₂N), 3.69 (t, *J* = 6.7 Hz, 1/2 of 2H, CH₂NOH), 3.40 – 3.33 (m, 1/2 of 2H, CH₂NOH), 3.27 (t, *J* = 6.4 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 3.11 (t, *J* = 6.5 Hz, 1 of 2H, C(O)CH₂), 2.05 (dp, *J* = 14.5, 7.7 Hz, 1 of 2H, PCH₂CH₂), 1.97 – 1.80 (m, 1 of 2H of PCH₂ and 1 of 2H of PCH₂CH₂), 1.74 (dt, *J* = 16.4, 8.2 Hz, 1 of 2H, PCH₂).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 170.97 (CO), 170.65 (CO), 151.53 (d, *J* = 14.0 Hz), 149.54 (d, *J* = 14.9 Hz), 144.06, 143.58, 124.17 – 122.04 (m), 118.44 – 117.12 (m), 115.26 – 114.45 (m), 50.89 (d, ³*J*_{C-P} = 16.3 Hz, CH₂NOH), 48.2 (d, ³*J*_{C-P} = 18.4 Hz, CH₂NOH), 47.03 (CH₂N), 46.74 (CH₂N), 33.22 (C(O)CH₂), 31.86 (C(O)CH₂), 23.65 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 23.58 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.1 Hz, PCH₂), 19.89 (d, ²*J*_{C-P} = 3.9 Hz, PCH₂CH₂), 17.17 (d, ³*J*_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.0, 32.3.

HRMS (ES⁺) calculated for C₁₄H₁₈F₂N₄O₅P [M]⁺: 391.0977; found 391.0970 (100%, [M]⁺)

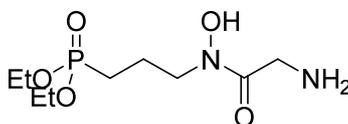
(3-(4-(4-(3,4-Difluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonic acid 289c

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **289c** from diethylphosphonate **280c** (47 mg). The desired compound was obtained without further purification only with *E* conformer.

¹H NMR (300 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.41 (s, 1H, CH=C), 7.75 (ddd, *J* = 11.7, 7.6, 2.1 Hz, 1H), 7.68 – 7.59 (m, 1H), 7.35 (dt, *J* = 10.5, 8.5 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.98 – 1.81 (m, 2H, PCH₂CH₂), 1.80 – 1.63 (m, 2H, PCH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.6.

IV. Partie expérimentale chapitre 4

Diethyl (3-(2-amino-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonate 290a

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **290a** from *O*-benzylated hydroxamate **150a** (100 mg, 0.26 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 70/30, with 1 % of formic acid added in the eluant), to afford the desired compound **290a** as a colorless oil.

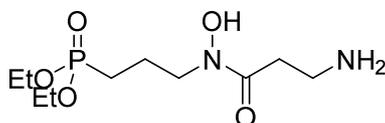
R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 4.95 (brs, 2H), 4.07 – 3.95 (m, 4H, POCH₂), 3.65 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂NOH), 3.56 (s, 2H, CH₂NH₂), 1.86 (m, 2H), 1.77 – 1.68 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2 (CO), 61.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂), 48.2 (d, ³*J*_{C-P} = 15.4 Hz, CH₂NOH), 42.1, 22.4 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.7 Hz, PCH₂), 19.5 (d, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 32.9.

m/z (ES⁺) 269.13 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-amino-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonate 290b

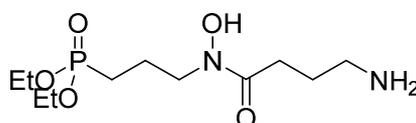
The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **290b** from *O*-benzylated hydroxamate **150b** (378 mg, 0.94 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 70/30, with 1 % of formic acid added in the eluant), to afford the desired compound **290b** as a colorless oil.

R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 4.16 – 4.04 (m, 4H, POCH₂), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 172.7 (CO), 61.8 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 47.8 (d, ³*J*_{C-P} = 19.0 Hz, CH₂NOH), 36.6, 33.8, 21.8 (d, ¹*J*_{C-P} = 142.2 Hz, PCH₂), 19.6 (d, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, ³*J*_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 31.2.

Diethyl (3-(4-amino-N-hydroxybutanamido)propyl)phosphonate 290c

The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **290c** from *O*-benzylated hydroxamate **150c** (502 mg, 1.21 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 70/30, with 1 % of formic acid added in the eluant), to afford the desired compound **290c** as a colorless oil.

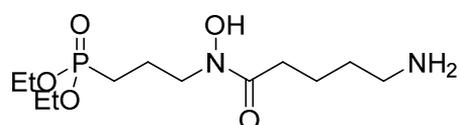
R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ 4.12 – 3.99 (m, 4H, POCH₂), 3.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.94 – 1.70 (m, 6H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 173.1 (CO), 61.8 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 48.1 (d, ³J_{C-P} = 19.7 Hz, CH₂NOH), 40.3, 29.1, 26.8, 21.9 (d, ¹J_{C-P} = 142.2 Hz, PCH₂), 19.6 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 31.2.

Diethyl (3-(5-amino-N-hydroxypentanamido)propyl)phosphonate **290d**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **290d** from *O*-benzylated hydroxamate **150d** (304 mg, 0.71 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 70/30, with 1 % of formic acid added in the eluant), to afford the desired compound **290d** as a colorless oil.

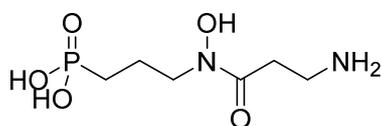
R_f = 0.23 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 4.14 – 4.03 (m, 4H, POCH₂), 3.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.93 – 1.70 (m, 2H), 1.68 – 1.58 (m, 2H), 1.53 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.33 (m, 6H POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 174.0 (CO), 61.8 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, POCH₂), 48.0 (d, ³J_{C-P} = 19.2 Hz, CH₂NOH), 40.5, 31.4, 31.3, 21.8 (d, ¹J_{C-P} = 142.3 Hz, PCH₂), 21.7, 19.6 (d, ²J_{C-P} = 5.0 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 31.2.

(3-(3-Amino-N-hydroxypropanamido)propyl)phosphonic acid **292b**



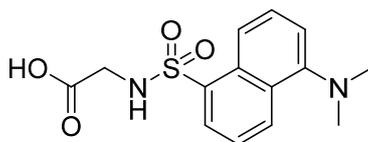
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **292b** from diethylphosphonate **290b** (50 mg, 0.17 mmol). The desired compound was obtained without further purification.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 3.76 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.30 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 170.46 (CO), 46.8 (d, ³J_{C-P} = 19.5 Hz, CH₂N), 33.7, 27.6, 22.2 (d, ¹J_{C-P} = 136.3 Hz, PCH₂), 18.2 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, PCH₂CH₂)

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 28.6.

HRMS (ES⁺) calculated for C₆H₁₄N₂O₅P [M]⁺: 225.0635, found 225.0633 (100%).

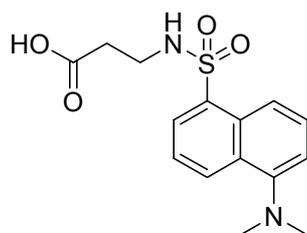
((5-(Dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)glycine 294a

The general procedure **R** was applied to synthesize the compound **294a** from dansyl chloride (300 mg, 1.1 mmol) and glycine **293a** (417 mg, 5.5 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20) to afford the desired compound **294a** (306 mg, 0.99 mmol, 81%) as a bright yellow solid.

Rf = 0.44 (EtOAc/MeOH, 8:2)

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.57 (ddd, *J* = 9.9, 8.6, 7.4 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.62 (s, 2H, CH₂NH), 3.35 (s, 6H, N(Me)₂).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 171.6 (CO), 151.7, 135.6, 129.8, 129.8, 129.61, 128.5, 127.6, 122.8, 119.3, 115.0, 48.4 (CH₂NH), 44.4 (N(Me)₂).

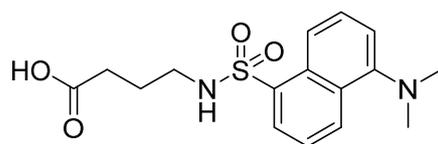
3-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanoic acid 294b

The general procedure **R** was applied to synthesize the compound **294b** from dansyl chloride (200 mg, 0.74 mmol) and β-alanine **293b** (330 mg, 3.7 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20) to afford the desired compound **294b** (228 mg, 0.70 mmol, 95%) as a bright yellow solid.

Rf = 0.44 (EtOAc/MeOH, 8:2)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.55 (dt, *J* = 19.2, 8.0 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 3.18 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 2.90 (s, 6H, N(Me)₂), 2.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, C(O)CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 175.0 (CO), 152.0, 134.6, 130.7, 129.5, 128.5, 123.2, 118.6, 115.3, 45.4 (N(Me)₂), 38.5 (CH₂N), 33.7 (C(O)CH₂).

4-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanoic acid 294c

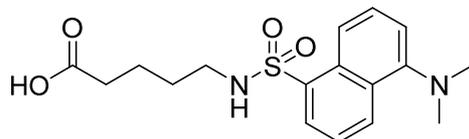
The general procedure **R** was applied to synthesize the compound **294c** from dansyl chloride (350 mg, 1.29 mmol) and γ-aminobutyric acid **293c** (670 mg, 6.48 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20) to afford the desired compound **294c** (326 mg, 0.97 mmol, 75%) as a bright yellow solid.

Rf = 0.44 (EtOAc/MeOH, 8:2)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.53 (ddd, *J* = 11.4, 8.9, 6.1 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 5.07 (s, 1H, NH), 2.95 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂N), 2.89 (s, 6H, N(Me)₂), 2.35 – 2.26 (m, 2H), 1.81 – 1.65 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 177.1 (CO), 152.0, 134.4, 130.5, 129.7, 128.5, 123.2, 118.6, 115.2, 45.4 (N(Me)₂), 42.5 (CH₂N), 30.5 (C(O)CH₂), 24.5.

5-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentanoic acid **294d**



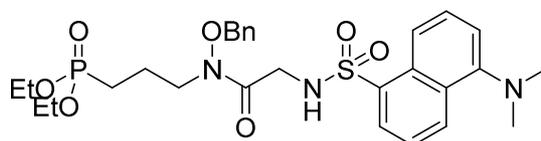
The general procedure **R** was applied to synthesize the compound **294d** from dansyl chloride (210 mg, 0.74 mmol) and 5-aminovaleric acid **293d** (434 mg, 3.7 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 80/20) to afford the desired compound **294d** (267 mg, 0.76 mmol, 98%) as a bright yellow solid.

R_f = 0.44 (EtOAc/MeOH, 8:2)

¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.58 – 7.42 (m, 2H), 7.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.84 (s, 6H, N(Me)₂), 2.83 (m, 2H, CH₂N), 2.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.53 – 1.32 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 181.4 (CO), 153.8, 132.6, 128.6, 127.8, 127.4, 127.3, 127.3, 126.4, 123.4, 49.6(N(Me)₂), 40.7 (CH₂N), 33.0 (C(O)CH₂), 26.2, 26.1.

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)acetamido)propyl)phosphonate **295a**



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **295a** from dansyl derivative **294a** (312 mg, 1.01 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (306 mg, 1.01 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **295a** (166 mg, 28 %) as a yellow oil.

R_f = 0.57 (9/1 EA/MeOH)

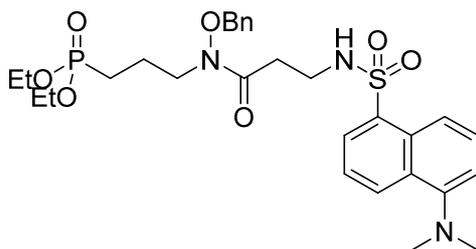
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.6, 7.3 Hz, 1H), 7.36 – 7.31 (m, 3H), 7.25 (dd, *J* = 6.6, 2.9 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, NH), 4.69 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.11 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH₂NH), 3.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.89 (s, 6H, N(Me)₂), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.57 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.9 (CO), 151.8, 134.2, 133.4, 130.6, 129.9, 129.7, 129.4, 129.3, 128.8, 128.5, 123.0, 118.9, 115.4, 76.7 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.9 (d, ³J_{C-P} = 20.0 Hz, CH₂N), 45.5 (N(Me)₂), 43.7, 22.8 (d, ¹J_{C-P} = 142.9 Hz, PCH₂), 20.0 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, PCH₂CH₂), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 30.9.

m/z (ES⁺) 592.21 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanamido)propyl) phosphonate 295b



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **295b** from dansyl derivative **294b** (218 mg, 0.67 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (204 mg, 0.67 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **295b** (164 mg, 40 %) as a yellow oil.

R_f = 0.57 (9/1 EA/MeOH)

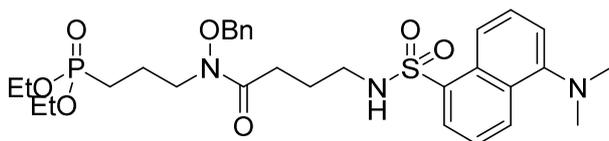
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.32 – 8.22 (m, 2H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 7.7 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 3H), 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H, NH), 4.59 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.20 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.63 (s, 2H, CH₂NOBn), 3.16 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂NH), 2.86 (s, 6H, N(Me)₂), 2.54 – 2.46 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 1.74 – 1.62 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 172.9 (CO), 151.9, 135.2, 133.8, 130.3, 129.9, 129.6, 129.3, 129.2, 129.1, 128.7, 128.4, 123.2, 118.9, 115.3, 76.4 (OCH₂Ph), 61.7 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.6 (CH₂NOBn), 45.4 (N(Me)₂), 38.7 (CH₂NH), 32.4 (C(O)CH₂), 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 142.1 Hz, PCH₂), 20.2 (d, ²J_{C-P} = 3.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.3.

m/z (ES⁺) 628.22 (100%, [M+Na]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-4-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanamido)propyl) phosphonate 295c



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **295c** from dansyl derivative **294c** (326 mg, 1.27 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (383 mg, 1.27 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **295c** (144 mg, 24 %) as a yellow oil.

R_f = 0.57 (9/1 EA/MeOH)

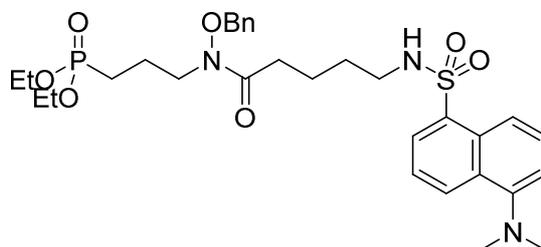
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.22 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.46 (m, 2H), 7.35 (dq, *J* = 15.7, 3.8 Hz, 5H), 7.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.35 (s, 1H, NH), 4.72 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.15 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.68 (s, 2H, CH₂NOBn), 2.90 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂NH), 2.87 (s, 6H, N(Me)₂), 2.39 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.97 – 1.85 (m, 2H), 1.77 – 1.61 (m, 4H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.3 (CO), 151.9, 134.9, 134.2, 130.2, 129.9, 129.6, 129.5, 129.3, 129.0, 128.7, 128.3, 128.2, 123.1, 118.8, 115.1, 76.4 (OCH₂Ph), 61.6 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.6 (CH₂NOBn), 45.2 (N(Me)₂), 42.9 (CH₂NH), 29.1 (C(O)CH₂), 23.8 (CH₂CH₂NH), 22.9 (d, ¹J_{C-P} = 142.8 Hz, PCH₂), 20.2 (PCH₂CH₂), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.4.

m/z (ES⁺) 620.26 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(N-(benzyloxy)-5-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentanamido)propyl) phosphonate 295d



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **295d** from dansyl derivative **294d** (230 mg, 0.76 mmol) and diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate **143** (267 mg, 0.76 mmol). The crude product was purified by automated column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10) to afford the desired compound **295d** (135 mg, 28 %) as a yellow oil.

R_f = 0.57 (9/1 EA/MeOH)

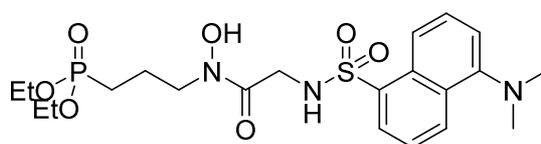
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 8.6, 7.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 5H), 7.20 – 7.17 (m, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.75 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.16 – 4.02 (m, 4H, POCH₂CH₃), 3.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂NOBn), 2.89 (s, 6H, N(Me)₂), 2.84 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NH), 2.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.96 – 1.84 (m, 2H), 1.76 – 1.64 (m, 2H), 1.50 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.40 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.5 (CO), 151.9, 134.8, 134.2, 130.3, 129.8, 129.6, 129.5, 129.2, 129.1, 128.7, 128.4, 128.3, 123.2, 118.8, 115.1, 76.3 (OCH₂Ph), 61.67 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, POCH₂), 45.5 (CH₂NOBn), 45.4 (N(Me)₂), 42.8 (CH₂NH), 31.4, 29.2, 23.0 (d, ¹J_{C-P} = 142.6 Hz, PCH₂), 20.2 (PCH₂CH₂), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 31.2.

m/z (ES⁺) 634.26 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxyacetamido)propyl) phosphonate 296a



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **296a** from *O*-benzylated hydroxamate **295a** (85 mg, 0.14 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **296a** (62 mg, 88 %) as a colorless oil.

R_f = 0.5 (9/1 EA/MeOH)

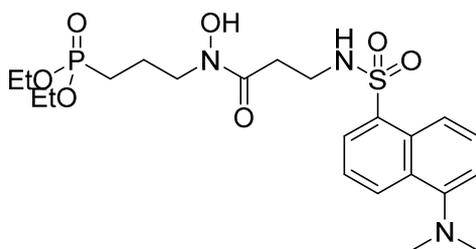
¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.89 (s, 1H, OH), 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.60 – 7.55 (m, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 1H), 7.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.76 – 5.67 (m, 1H, NH), 3.98 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, POCH₂), 3.91 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂NH), 3.62 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.88 (s, 6H, N(Me)₂), 1.97 – 1.86 (m, 2H), 1.82 – 1.71 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 168.6 (CO), 151.8, 134.2, 130.5, 129.9, 129.7, 129.6, 128.4, 123.1, 119.0, 115.2, 62.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, POCH₂), 48.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, CH₂NOH), 45.4 (N(Me)₂), 43.7 (C(O)CH₂), 22.1 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.5$ Hz, PCH₂), 18.7, 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.09.

m/z (ES⁺) 502.18 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxypropanamido)propyl) phosphonate 296b



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **296b** from *O*-benzylated hydroxamate **295b** (68 mg, 0.11 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **296b** (21 mg, 39 %) as a colorless oil.

R_f = 0.5 (9/1 EA/MeOH)

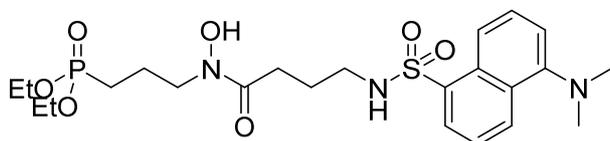
^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.71 (s, 1H, OH), 8.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.02 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH), 4.14 – 4.01 (m, 4H, POCH₂), 3.67 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH₂NOH), 3.14 (m, 2H, CH₂NH), 2.89 (s, $J = 12.6$ Hz, 6H, N(Me)₂), 2.70 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.87 – 1.76 (m, 2H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.1 (CO), 151.8, 135.1, 130.2, 129.9, 129.7, 129.2, 128.3, 123.2, 119.0, 115.2, 62.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, POCH₂), 47.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$ Hz, CH₂NOH), 45.4 (N(Me)₂), 39.1 (CH₂NH), 32.2 (C(O)CH₂), 22.0 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.3$ Hz, PCH₂), 18.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.9$ Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH₂CH₃).

^{31}P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.4.

m/z (ES⁺) 516.19 (7%, [M]⁺), 338.34 (100%, [M-C₇H₁₇O₃P]⁺).

Diethyl (3-(4-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxybutanamido)propyl) phosphonate 296c



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **296c** from *O*-benzylated hydroxamate **295c** (131 mg, 0.21 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **296c** (66 mg, 59 %) as a colorless oil.

R_f = 0.5 (9/1 EA/MeOH)

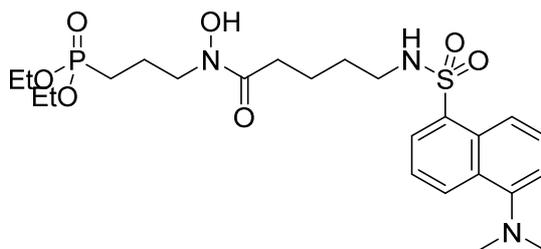
^1H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ 8.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 7.3$, 1.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.45 (m, 2H), 7.18 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.15 – 3.96 (m, 4H, POCH₂), 3.72 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH₂NOH), 2.95 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.89 (s, 6H, N(Me)₂), 2.49 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, C(O)CH₂), 2.04 – 1.84 (m, 2H), 1.85 – 1.64 (m, 4H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 173.2 (CO), 150.8, 134.1, 129.1, 128.9, 128.6, 128.3, 127.1, 122.1, 118.0, 114.1, 61.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, POCH₂), 46.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.7 Hz, CH₂NOH), 44.4 (N(Me)₂), 41.9 (CH₂NH), 28.3 (C(O)CH₂), 23.1, 21.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 140.3 Hz, PCH₂), 17.8 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.5 Hz, PCH₂CH₂), 15.3 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.0 Hz, POCH₂CH₃).

³¹P NMR (121 MHz, chloroform-*d*) δ 35.3.

***m/z* (ES⁺)** 530.21 (100%, [M]⁺).

Diethyl (3-(5-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxypentanamido)propyl) phosphonate 296d



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **296d** from *O*-benzylated hydroxamate **295d** (135 mg, 0.25 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc 100 % to EtOAc/MeOH 90/10), to afford the desired compound **296d** (56 mg, 48 %) as a colorless oil.

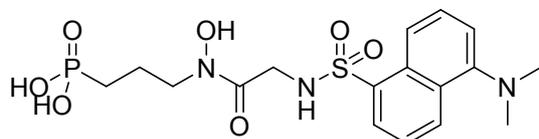
R_f = 0.5 (9/1 EA/MeOH)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 9.56 (s, 1H, OH), 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.54 (dt, *J* = 18.7, 7.6 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H, NH), 4.12 – 4.00 (m, 4H, POCH₂), 3.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂NOH), 2.89 (s, 6H, N(Me)₂), 2.88 (m, 2H, CH₂NH), 2.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C(O)CH₂), 1.99 – 1.88 (m, 2H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.57 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.46 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, POCH₂CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ 174.7 (CO), 151.9, 134.9, 130.2, 129.9, 129.6, 129.5, 128.2, 123.2, 118.9, 115.1, 62.4 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, POCH₂), 47.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 3.1 Hz, CH₂NOH), 45.4 (N(Me)₂), 42.6 (CH₂NH), 31.4, 29.1, 21.9 (d, $^1J_{C-P}$ = 140.1 Hz, PCH₂), 21.1, 18.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.8 Hz, PCH₂CH₂), 16.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.1 Hz, POCH₂CH₃).

***m/z* (ES⁺)** 544.23 (64%, [M]⁺)

(3-(2-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxyacetamido)propyl)phosphonic acid 297a



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **297a** from phosphonohydroxamate **296a** (54 mg, 0.11 mmol). The desired compound was obtained without further purification.

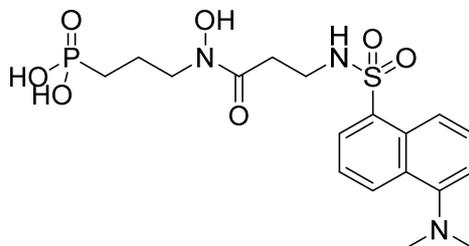
¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.95 – 7.85 (m, 2H), 3.82 (s, 2H, CH₂NH), 3.54 (s, 6H, N(Me)₂), 3.35 (m, 2H, CH₂NOH), 2.05 (dp, *J* = 15.0, 7.7 Hz, 2H), 1.85 (dt, *J* = 18.6, 7.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 171.1 (CO), 140.1, 139.2, 131.0, 130.9, 129.1, 128.5, 128.0, 127.1, 126.5, 120.6, 52.3 (d, $^3J_{C-P}$ = 15.5 Hz, CH₂NOH), 47.9 (N(Me)₂), 44.7 (CH₂NH), 25.1 (d, $^1J_{C-P}$ = 141 Hz, PCH₂), 18.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 4.4 Hz, PCH₂CH₂).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 27.7.

HRMS (ES^+) calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{PS}$ [$\text{M}]^+$: 444.0989 found 444.0986 (87%, [$\text{M}]^+$), 309.09 (100%, [$\text{M}-\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}_3\text{P}]^+$).

(3-(3-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxypropanamido)propyl) phosphonic acid 297b



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **297b** from phosphonohydroxamate **296b** (22 mg, 0.05 mmol). The desired compound was obtained without further purification.

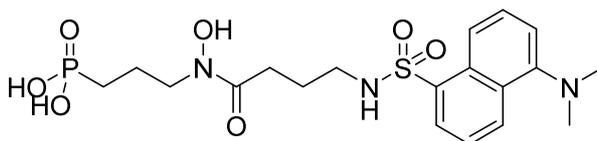
^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.01 – 7.84 (m, 2H), 3.55 (s, 6H, $\text{N}(\text{Me})_2$), 3.50 (m, 1.7 of 2H, CH_2NOH), 3.35 (m, 0.3 of 2H, CH_2NOH), 3.17 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2NH), 2.58 (t, $J = 6.9$ Hz, 1.7 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 0.3 of 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.09-1.59 (m, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 173.2 (CO), 140.0, 139.0, 131.3, 130.7, 128.9, 128.6, 128.2, 127.1, 126.4, 120.7, 52.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 15.4$ Hz, CH_2NOH), 47.9 ($\text{N}(\text{Me})_2$), 39.6 (CH_2NH), 33.6 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 25.2 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 138.7$ Hz, PCH_2), 21.4 (PCH_2CH_2).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 29.7, 27.8.

HRMS (ES^+) calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7\text{PS}$ [$\text{M}]^+$: 458.1156, found 458.1130 (100%).

(3-(4-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxybutanamido)propyl) phosphonic acid 297c



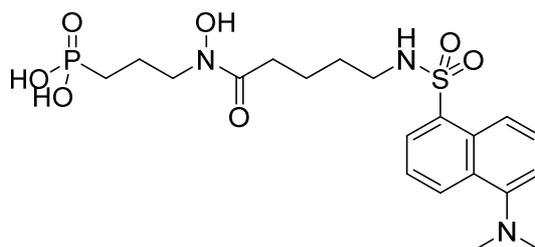
The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **297c** from phosphonohydroxamate **296c** (40 mg, 0.075 mmol). The desired compound was obtained without further purification.

^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ 8.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.40 (dd, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.96 – 7.86 (m, 2H), 3.52 (s, 6H, $\text{N}(\text{Me})_2$), 3.36 – 3.32 (m, 2H, CH_2NOH), 2.93 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2NH), 2.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.10 – 1.99 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.64 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, methanol- d_4) δ 174.9 (CO), 139.1, 131.2, 130.7, 128.6, 128.1, 127.3, 126.3, 120.5, 52.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 15.4$ Hz, CH_2NOH), 47.8 ($\text{N}(\text{Me})_2$), 43.1 (CH_2NH), 31.4 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 25.9, 25.0 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.9$ Hz, PCH_2), 18.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.4$ Hz, PCH_2CH_2).

^{31}P NMR (121 MHz, methanol- d_4) δ 27.8.

HRMS (ES^+) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7\text{PS}$ [$\text{M}]^+$: 474.1458 found 474.1444 (100%, [$\text{M}]^+$).

(3-(5-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)-N-hydroxypentanamido)propyl) phosphonic acid 297d

The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **297d** from phosphonohydroxamate **296d** (28 mg, 0.051 mmol). The desired compound was obtained without further purification.

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ 8.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.61 – 8.53 (m, 1H), 8.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.99 – 7.84 (m, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.9 Hz, 1.6 of 2H, CH₂NOH), 3.55 (d, *J* = 3.7 Hz, 6H, N(Me)₂), 3.34 (m, 0.4 of 2H, CH₂NOH), 2.92 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂NH), 2.27 (d, *J* = 6.4 Hz, 1.6 of 2H, C(O)CH₂), 2.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 0.4 of 2H, C(O)CH₂), 2.08 – 1.63 (m, 4H), 1.45 – 1.30 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, methanol-*d*₄) δ 175.6 (CO), 140.13, 139.2, 131.2, 130.7, 128.9, 128.6, 128.2, 127.1, 126.2, 120.7, 52.4 (d, *J* = 16.3 Hz, CH₂NOH), 49.1 (d, ³*J*_{C-P} = 19.1 Hz, CH₂NOH), 47.9 (N(Me)₂), 43.6 (CH₂NH), 43.4 (CH₂NH), 33.9 32.4, 30.2, 29.9, 25.10 (d, ¹*J*_{C-P} = 167.1 Hz, PCH₂), 22.8, 22.06 (d, ¹*J*_{C-P} = 154.5 Hz, PCH₂), 18.6 (PCH₂CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, methanol-*d*₄) δ 29.8, 27.8.

HRMS (ES⁻) calculated for C₂₀H₂₉N₃O₇PS [M⁻]: 486.1469 found 486.1492.

Biochemical general procedure

Purification of the DXRs from *Escherichia coli*

The DXRs were overexpressed and purified as His-tagged enzymes as described by Kuntz et al. and Ponaire et al.¹

Determination of the enzymatic activity²

The DXR enzymatic activity was determined at 37 °C in 50 mM Tris/HCl buffer, (pH 7.5) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM DTT. The concentrations of NADPH and DXP were 0.2 and 0.5 mM respectively. Initial rates were measured by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH into NADP⁺ (Uvikon 933; Kontron Instruments). The reaction was initiated by adding the His tagged DXR (2.25 µg). The protein concentration was determined by the method of Bradford, with BSA as standard.³

DXR Inhibition assay

The IC₅₀ concentrations were determined for most of the compounds. The enzymatic reaction was initiated by adding DXP after pre-incubation of the enzyme with the inhibitor in the presence of NADPH for 2 min at 37 °C for the method 1. Whereas, the enzymatic reaction was initiated by adding NADPH after pre-incubation of the enzyme with the inhibitor in the presence of DXP for 2 min at 37 °C for the method 2. Assays were performed in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM DTT. The concentrations of NADPH and DXP were 0.2 and 0.5 mM respectively. The reaction medium contained the tested inhibitor at various concentrations, depending on the inhibitor. Overall we used concentrations leading to inhibitions between 20 to 80 % of the initial rate to determine the IC₅₀ values.

Microorganisms and culture conditions

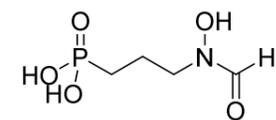
Escherichia coli XL1 Blue and an *Escherichia coli* fosmidomycin resistant strain were grown at 37 °C in Luria-Bertani medium with agitation. Solid medium contained in addition 1.5 % agar. Bacteria were plated on Petri dishes containing 1.6 % agar in addition to the medium.

Antimicrobial activity of inhibitors

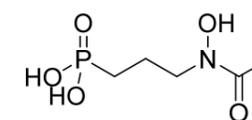
The antimicrobial activity against *E. coli* was determined using the paper disc diffusion method. Plates (10 cm-diameter) were incubated with bacteria in exponential phase. A culture of *Escherichia coli* in exponential phase was fivefold diluted and 150 µL of the suspension were used to inoculate the dishes. Inhibitors not soluble in water were dissolved in DMSO. Fosmidomycin was used as positive controls for *E. coli*. Fosmidomycin was dissolved in water at a 5 mM concentration and filter sterilized. Paper discs (Durieux no. 268, diameter 6 mm) were impregnated with the inhibitors solutions (8 µL), fosmidomycine (2 µL) and placed on Petri dishes. Growth inhibition was examined after 24 h incubation at 37 °.

- (1) Ponaire S.; Zinglé, C; Tritsch, D; Grosdemange-Billiard, C ; Rohmer, M, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 277-285.
- (2) Kuntz, L; Tritsch, D; Grosdemange-Billiard, C; Hemmerlin, A; Willem, A; Bach, T.J.; Rohmer, M. isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase, *Biochem. J.* **2005**, 386, 127-135.
- (3) Bradford, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal, Biochem.* **1976**, 75, 248-254.

Inhibiteurs naturels de la DXR

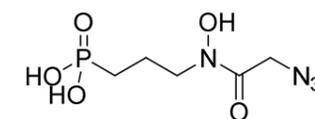


Fosmidomycine

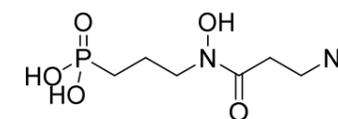


FR 900098

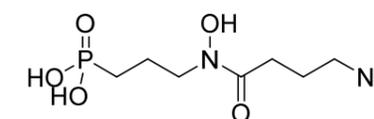
Chapitre 1 : Approche biligand



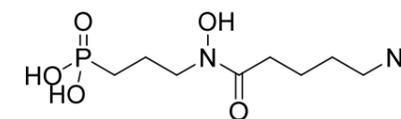
138a



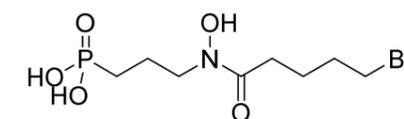
138b



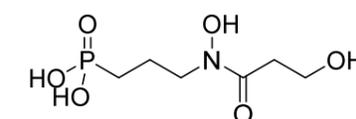
138c



138d



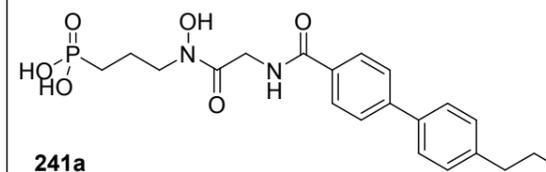
165d



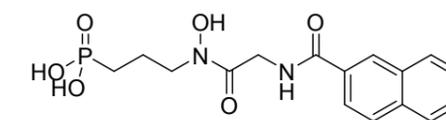
167b

Chapitre 2 : Approche bisubstrat

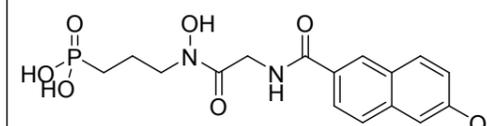
n = 1



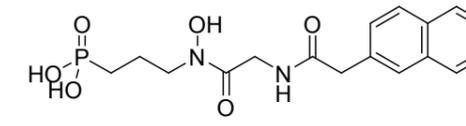
241a



242a

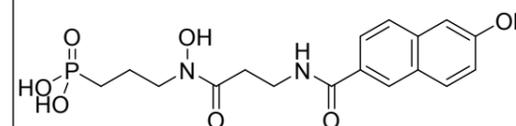


243a

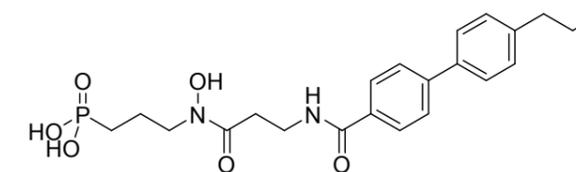


244a

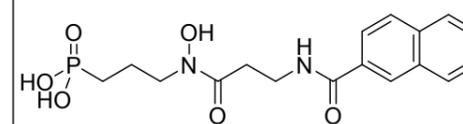
n = 2



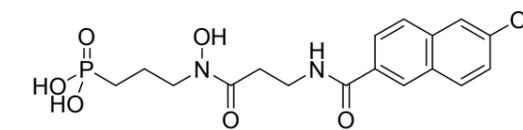
240b



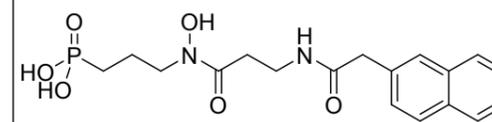
241b



242b

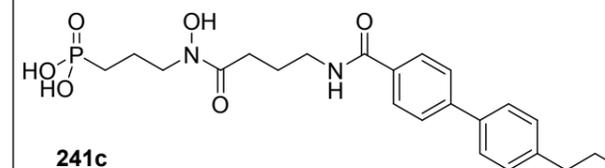


243b

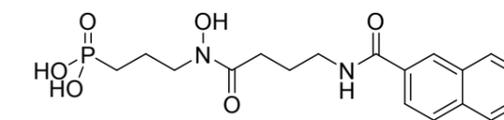


244b

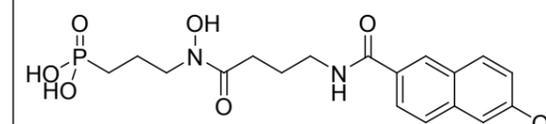
n = 3



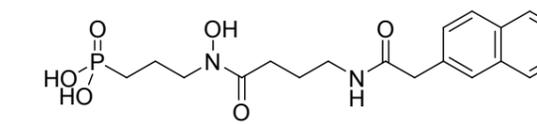
241c



242c
242d, n = 4

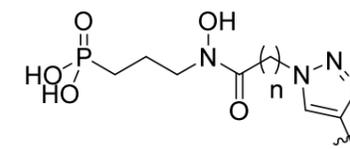


243c

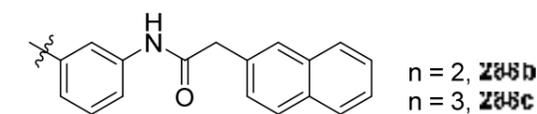
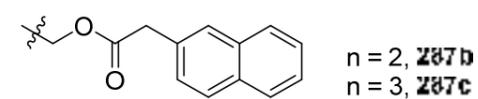
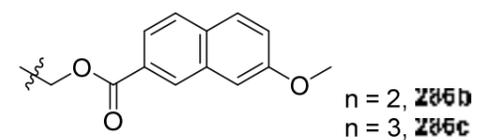
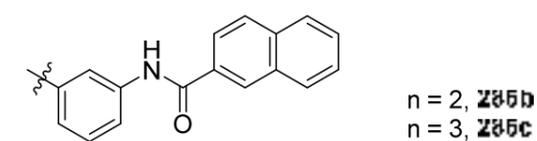
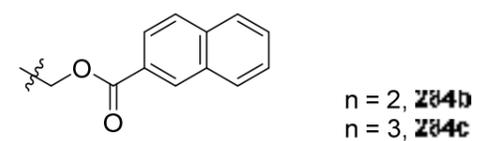
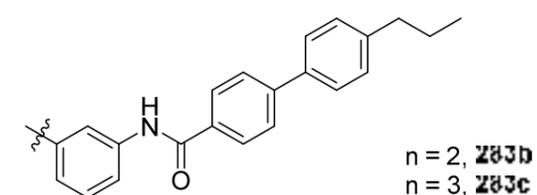
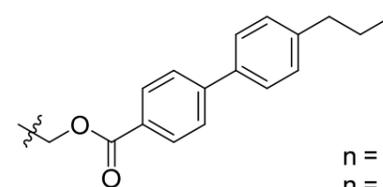


244c

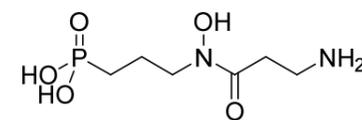
Chapitre 3 : Interface stratégie biligand et bisubstrat



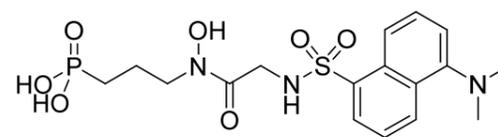
Groupements X et Y



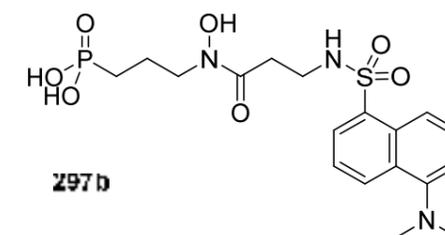
Chapitre 4 : Nouvelle cible au sein de la DXR



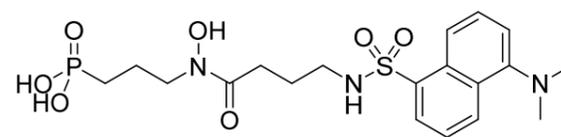
292b



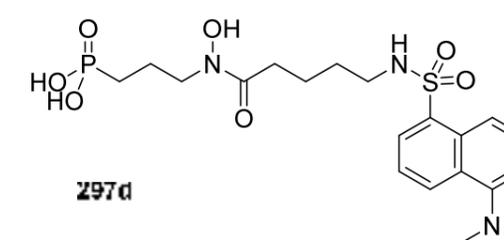
297a



297b



297c



297d



Aurore DRENEAU

Synthèse de bisubstrats et biligands pour la conception d'inhibiteurs inédits de la désoxyxylulose phosphate réducto-isomérase (DXR) : nouveaux antimicrobiens



Résumé

Le développement de nouveaux antimicrobiens devient une nécessité suite à l'augmentation de souches résistantes. Les isoprénoïdes sont une cible, car ils jouent un rôle important dans le maintien des fonctions propres à chaque organisme vivant. Ils dérivent de deux précurseurs : IPP et DMAPP, synthétisés via la voie du MVA ou du MEP. Cette dernière n'étant pas présente chez l'homme mais chez de nombreuses bactéries pathogènes, toutes les enzymes de cette voie peuvent être des cibles intéressantes et notamment la désoxyxylulose phosphate réductoisomérase (DXR). Les bactéries devenant résistantes à la fosmidomycine, un inhibiteur naturel efficace de la DXR, nous avons synthétisé des analogues de cet antibiotique, fonctionnalisés judicieusement pour cibler le site du NADPH ou une poche allostérique et le site du DXP (substrat naturel). En ciblant ces deux sites, nous devrions améliorer l'affinité et l'efficacité des inhibiteurs. Les approches biligand et bisubstrat, ont été mises en œuvre. Les composés ont montré des résultats intéressants avec des IC_{50} dans le bas micromolaire. Un inhibiteur en particulier a montré des résultats comparables à la fosmidomycine avec un IC_{50} de l'ordre du nanomolaire.

Mots clés : inhibition de la DXR, approche biligand et bisubstrat

Résumé en anglais

The development of new antimicrobial is a necessity due to the emergence of multidrug resistance. Isoprenoids are a key target as they play an essential role in the maintenance of proper functions in all living organisms. Isoprenoids derive from two precursors: IPP and DMAPP, synthesized via the MVA or MEP pathway. The last one, absent in human but present in many pathogenic bacteria, all the enzymes of the MEP pathway therefore represent efficient targets, as the desoxyxylulose phosphate reductoisomerase (DXR). Owing the rapid emergence of resistance toward fosmidomycine, an efficient inhibitor of DXR, we synthesized analogues of this antibiotic, appropriately functionalized to target the NADPH binding site or an allosteric pocket, as well as the DXP, the natural substrate of DXR. By targeting both sites, we should improve the affinity and efficiency of the inhibitors. The biligand and bisubstrate approaches, have been implemented. The compounds have shown interesting results, with IC_{50} in the low micro-molar. Notably, one inhibitor has shown comparable results to the fosmidomycine with an IC_{50} at nanomolar level.

Key words: DXR inhibition, biligand and bisubstrate approaches