HAL
open science

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

Miyanou Rosales Hurtado

To cite this version:

Miyanou Rosales Hurtado. Approche pluridisciplinaire sur la problématique de la résistance bactérienne : conception, synthèse et évaluation de l'activité biologique de nouveaux agents antibactériens. Chimie organique. Université de Nîmes, 2019. Français. NNT : 2019NIME0003 . tel-02976570

HAL Id: tel-02976570

https://theses.hal.science/tel-02976570

Submitted on 23 Oct 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par **UNIVERSITÉ DE NÎMES**

Préparée au sein de l'école doctorale 583 – Risques et Société
Et de l'unité de recherche CHROME

Spécialité : **CHIMIE MÉDICINALE**

Présentée par **Miyanou ROSALES HURTADO**

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

Soutenue le 19 décembre 2019 devant le jury composé de

Mme. Claude Grison, Directrice de Recherche CNRS, Centre national de la recherche scientifique	Rapporteur
M. Jacques Uziel, Maître de conférences, Université de Cergy-Pontoise.	Rapporteur
Mme. Magali Szlosek, Maître de conférences, Université de Bordeaux.	Examinateur
M. Jean-François Guichou, Professeur des universités, Université de Montpellier.	Examinateur
M. Marcel Hibert, Professeur des universités, Université de Strasbourg.	Examinateur
Mme. Zohra Benfodda, Maître de conférences, Université de Nîmes.	Directrice de thèse
M. Patrick Meffre, Professeur des universités, Université de Nîmes.	Directeur de thèse

Dedicado a mi familia

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury : Mme. Claude Grison, M. Jacques Uziel, Mme. Magali Szlosek, M. Jean-François Guichou et M. Marcel Hibert qui ont accepté de juger ce travail de thèse.

Mes sincères remerciements sont destinés aux responsables d'équipe Pr. Benoît ROIG, Pr. Stéphane MUSSARD et Dr. Axelle CADIERE, qui m'ont accueilli et qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions au sein de l'équipe « Détection, Evaluation, Gestion de Risques CHROniques et éMErgents (CHROME) ».
Merci également à l'école doctorale « ED 583 : Risques et Société » pour son financement.

Ce travail de thèse ne serait pas le même sans l'encadrement de mes directeurs de thèse : Pr. Patrick Meffre et du Dr. Zohra Benfodda. Je vous remercie de votre patience et surtout de votre disponibilité. De même je vous remercie pour toutes vos remarques, vos explications et vos critiques constructives qui ont contribué à mon enrichissement non seulement scientifique mais aussi personnel tout au long de ces trois années.

Patrick, je vous remercie pour votre sagesse, vos conseils, votre patience et votre soutien. Je vous remercie également pour la confiance que vous avez m'accordée quand vous m'avez confié votre nouvelle voiture pour mes cours de conduite accompagnée.
Zohra, AKA Madame Ben**FO**dda (accent tonique à ne pas oublier). Merci pour la confiance que tu as déposé en moi et de m'avoir poussé à dépasser mes limites. Je te remercie pour ton dévouement, ta générosité et ton soutien au quotidien. Merci d'avoir enrichi mon lexique français avec des expressions françaises hors du commun. Ne t'inquiète pas Zohra, si tu as un souci tu peux appeler le Dr. Delarue qui te donnera le meilleur diagnostic. 🖐

Je remercie Patrick et Zohra de m'avoir donné l'opportunité de travailler aux côtés de Mariétou et Valentin. Mariétou, AKA toutou marié (my sister from another mister), je te remercie pour ta gentillesse et ton charisme, je n'oublierai pas ce que tu as fait pour moi quand j'ai eu la visite de mes copines. Merci pour tous les fous rires en continue et de m'avoir appris à parler le wolof. N'oublie pas de m'appeler la prochaine fois pour se faire tresser. Valentin, AKA Valou (my brother from another mother), je te remercie pour ton aide au quotidien Tu es un puits de science

et tes conseils en chimie organique ont été très précieux pour moi. Je n'oublierai jamais nos aventures passées en essayant de débrancher une cafetière ou le soutien que je t'ai apporté pendant le déménagement de Mariétou et le canapé dans ton coffre. On se connait depuis un an et j'ai l'impression que je vous connais depuis toute une vie. ♥

David, AKA Davidou, je te remercie de m'avoir sauvé à de nombreuses reprises concernant la RMN et la chromatographie flash. Je te remercie pour ta patience et tes astuces. Merci pour tes solutions efficaces à tout moment de la journée.

Je tiens également à remercier Nour Bou Karroum, AKA Nounour. Je te remercie pour toutes les gourmandises que tu m'as offertes pour me réconforter. Egalement, je remercie Gerardo, AKA Gerardito, pour tous les moments passés, tes conseils, les fous rires et ton soutien.

Je remercie également Adel et Slimane pour votre bonne humeur au quotidien et tous les muffins et brownies que vous m'avez offerts pour me réconforter.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'Université de Nîmes, Jean-Luc, les deux Maryline, Vincent, Nicolas, Audrey, Kévin, Anne, Sandrine, Martine, Fathi, merci de votre bonne humeur au quotidien.

Je tiens à remercier pareillement mes collaborateurs qui ont réalisés les évaluations biologiques : Dr. Hendrik Szurmant, Dr. Catherine Duyach-Rémy, Dr. John Stravinides, Dr. Sébastien Albrecht et Dr. Pascal Ratet.

Je remercie particulièrement mes stagiaires qui ont été exceptionnels et à l'écoute tout au long de leurs stages : Sebastian, Julien, Fatima, Mickaël, Olashadé et Alexandre.

Finalement, je remercie évidemment ma famille, mon père et ma mère pour leur soutien inconditionnel. Sans vous je n'en serais pas là. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu quand j'ai décidé de quitter le Pérou à mes 19 ans pour faire mes études supérieures en France. Vous partagez avec moi le mérite de ce travail de thèse que je vous le dédie entièrement.

¡Arriba Perú!

Sommaire

Remerciements **3**

Sommaire **5**

Abréviations et acronymes **11**

Liste des figures du chapitre 1 **13**

Liste des figures du chapitre 2 **15**

Liste des schémas du chapitre 1 **17**

Liste des schémas du chapitre 2 **18**

Liste des tableaux du chapitre 1 **20**

Liste des tableaux du chapitre 2 **20**

Introduction **21**

Chapitre 1 : Synthèse de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase **25**

I. Etude bibliographique **27**

A. Système de transduction du signal bactérien : présentation **29**

B. Système à deux composants **30**

1. Composition des systèmes à deux composants 30
2. Fonctionnement des systèmes à deux composants 31

C. Les systèmes à deux composants essentiels ou non chez la bactérie **32**

1. Système à deux composants essentiels à la survie de la bactérie 33
2. Système à deux composants impliqués dans la virulence chez la bactérie 33

D. Synthèse d'inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature **35**

1. La famille d'isothiazolone et d'imidazolium 35
2. La famille des trityles 37
3. La famille des benzoxazines 38

4. La famille des salicylanilides 41

5. La famille des diphényltriazoles 43

6. La famille des analogues d'acides anacardiques : 6-oxa isostères 45

7. La famille des dérivés terpéniques 46

8. La famille des benzimidazoles et des benzoxazoles 49

9. La famille des sulfonamides 53

10. La famille des thiazolidiones 54

11. La famille des adénines 57

12. La famille des diphénylpyrazoles 59

13. Conclusion sur les inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature 71

II. Résultats et discussion 73

A. Travaux préliminaires au laboratoire 75

1. Les objectifs des travaux 75

2. Modélisation moléculaire 75

3. Synthèse de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase 79

4. Résultats biologiques 79

a) Evaluation des molécules à inhiber des TCS 79

b) Evaluation de la toxicité 80

c) Evaluation antibactérienne 81

d) Evaluation des activités d'adjuvants d'antibiotiques 82

5. Conclusion des travaux préliminaires 82

B. Objectifs de la thèse 83

C. Les couplages pallado-catalysés dans la littérature 83

1. Les couplages croisés de Suzuki et Negishi 84

2. Les couplages croisés de Buchwald-Hartwig et Hirao 86

D. Synthèse des séries des dérivés hétérocycliques 89

1. Conception des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase 89

2. Synthèses des inhibiteurs potentiels d'histidine kinase 90

a) Optimisation des protocoles 91

b) Synthèse du composé **91** 91

c) Synthèse des séries de thiophène, des thiazoles et des furanes 93

(1) Série des nitro thiophènes 93

(a) Synthèse par couplage de Suzuki-Miyaura 93

(b) Synthèse de **122** par la réaction de Buchwald-Hartwig 96

(2) Série des nitro thiazole/nitro furanes 97

(3) Série des acides carboxyliques hétérocycliques 99

(4) Série des amino thiophènes 101

(5) Conclusion 104

3. Résultats biologiques 104

a) Evaluation comme inhibiteurs potentiels de multiples histidine kinase 104

(1) Les kinases bactériennes 104

(2) Les kinases eucaryotes 108

b) Evaluation biologique sur des souches bactériennes 109

c) Evaluation comme adjuvants d'antibiotiques 112

4. Conclusion sur la série des hétérocycles 115

E. Série des dérivés sulfonamides et des sulfonates 116

1. Sulfonamides dans le domaine médical : antibactériens 116

2. Synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels d'histidine kinase 117

a) Conception des nouveaux sulfonates et sulfonamides 117

b) Synthèse des sulfonates 119

c) Synthèse des sulfonamides 122

3. Résultats biologiques 124

a) Evaluation comme inhibiteurs d'histidine kinase 124

(1) Kinases bactériennes 125

(2) Kinases eucaryotes 127

b) Evaluation comme antibactériens ou adjuvants d'antibiotiques 128

(1) Evaluation comme antibactérien 128

(2) Evaluation comme adjuvant 129

4. Conclusion sur la série des sulfonates et des sulfonamides 130

F. Analogues d'histidine 130

1. Conception de nouveaux analogues de HK 130

2. Synthèse de nouveaux analogues de HK 134

3. Conclusion sur les analogues d'histidine 136

III. Chapitre 1 : Conclusion 137

IV. Partie expérimentale 143

A. General 145

B. General Procedure 148

C. Chemistry 152

V. Références bibliographiques 197

Chapitre 2 : Inhibition de la voie de biosynthèse de la lysine comme stratégie antibactérienne. 207

I. Etude bibliographique 209

A. La paroi bactérienne 211

1. Le peptidoglycane : Généralités 211

2. Biosynthèse du peptidoglycane 212

a) Synthèse du monomère NAG-NAM 213

b) Polymérisation de l'unité NAG-NAM-pentapeptide 215

B. Cible potentielle 217

1. Voie de biosynthèse de la lysine 217

2. La décarboxylase LysA 219

3. La déshydrogénase ddh 220

4. L'épimérase DapF 221

C. Les analogues du *méso*-DAP décrits dans la littérature 222

D. Objectifs 231

II. Résultats et discussion 233

A. Série des triazoles 235

1. Analyse rétrosynthétique 235
2. Synthèse d'acides aminés non usuels à base de triazole 236
   a) Synthèse de l'azoture 236
   b) Synthèse des alcynes 237
      (1) Protection des amines propargyliques 237
      (2) Synthèse du synthon éthynylglycine 238
   c) Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen 240
   d) Deprotection des fonctions acides, amines et alcools 243
3. Conclusion sur la série des triazoles 245

B. Série des alcynes 246

1. Analyse rétrosynthétique 246
2. Démarche entreprise pour l'alkylation 247
   a) Alkylation en milieu basique 247
   b) Alkylation par couplage organométallique 250
      (1) Couplage croisé de Sonogashira 250
      (2) Couplage croisé de Negishi 251
3. Perspectives sur l'alkylation 254
   a) Alkylation par couplage croisé de Kumada-Corriu 254
   b) Alkylation inspirée des conditions de Knochel et coll. 254

III. Chapitre 2 : Conclusion 257

IV. Partie expérimentale 261

V. Références bibliographiques 311

Résumé de la thèse 320

Abréviations et acronymes

$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique mesuré à la raie D du sodium (589 nm)
µM	Micromolaire
AcOH	Acide acétique
ADDP	1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTS-H_2O	Acide *para*-toluènesulfonique monohydraté
ATP	Adénosine triphosphate
BINAP *rac*	2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle racémique
Boc	*tert*-Butoxycarbonyle
BuOH	*n*-Butanol
CA	Domaine catalytique
CHU	Centre hospitalier universitaire
CI_{50}	Concentration inhibitrice médiane
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
d.r	Rapport diastéréoisomérique ou « diastereoisomeric ratio »
DAP	Acide diaminopimélique
DBA	Dibenzylidèneacetone
DCM	Dichlorométhane
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DHp	Domaine de dimérisation et histidine phosphotransférase
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DME	Dimethoxyethane
DMP	Dimethoxypropane
DMSO	Dimethylsulfoxide
e.e	Excès enantiomérique
Enz	Enzyme
EtOAc	Acétate d'éthyle ou « ethyl acetate »
EtOH	Ethanol
g	gramme
H_2O	Eau
HCl	Acide chlorohydrique
HK	Histidine kinase
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
Hz	Hertz
iPrOH	Isopropanol
IR	Infrarouge
KOH	Hydroxyde de posassium
M	Molaire (mol/L)
M.p	Point de fusion ou « melting point »
M/W	Chauffage micro-ondes
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
mM	Millimolaire
mol	Mole
MW	Masse molaire ou « molecular weight » (g/mol)

$NaBH_4$	Borohydrure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NAG	*N*-acéthylglucosamine
NAM	acide *N*-acéthylmuramique
NaOAc	Acétate de sodium
NEt_3	Triéthylamine
NH_3	Ammoniac
PABA	Acide *para*-amino benzoïque
pdb	« Protein date base »
PE	Ether de pétrole ou « petroleum ether »
Ph-NCS	Isothiocyanate de phényle
pM	Picomolaire
PPh_3	Triphénylphosphine
PPTS	*para*-toluènesulfonate de pyridium
R_f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RR	Régulateur de réponse
SiO_2	Silice
Sphos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl
TA	Température ambiante
TCS	Systèmes à deux composants ou « two-component systems »
THF	Tetrahydrofurane
t_R	Temps de rétention
UDP	Uridine diphosphote
UPLC	Chromatographie liquide ultra performance
UV	Ultraviolet

Liste des figures du chapitre 1

Figure 1 : Comparaison entre les différents systèmes de transduction du signal chez la bactérie ... 29
Figure 2 : Système à deux composants ... 31
Figure 3 : Fonctionnement d'un système à deux composants : Mécanisme d'autophosphorylation chez les systèmes à deux composants. **A** : Détection du signal externe ; **B** : Autophosphorylation du résidu histidine ; **C** : Transfert du groupement phosphate vers RR ; **D** : Transcription du gène cible ... 32
Figure 4 : Structure des premiers inhibiteurs de HK ... 36
Figure 5 : Structure générale des trityles ... 37
Figure 6 : Structure générale des benzoxazines ... 38
Figure 7 : Structure générale des salicylanilides ... 41
Figure 8 : Structure générale des dérivés de diphényltriazole ... 44
Figure 9 : Structure générale des acides anacardiques ... 45
Figure 10 : Structure de zerumbone **41** ... 46
Figure 11: Structure générale des analogues de Zérumbone ... 48
Figure 12 : Structure de l'indole **48** ... 49
Figure 13 : Structure de l'indole **49** ... 50
Figure 14 : Structure générale des benzimidazoles ... 50
Figure 15 : Structure générale des benzoxazoles ... 52
Figure 16 : Structure générale des thiazolidiones ... 54
Figure 17 : Structure des molécules **63** et **64.** ... 54
Figure 18 : Structure générale des adénines ... 58
Figure 19 : Structures des molécules **75**, **76**, **77** et **78** ... 58
Figure 20 : Structures des composés **82** et **83** ... 59
Figure 21 : Structure générale des hétérocycles ... 60
Figure 22 : Interaction entre le site actif et l'ATP ... 76
Figure 23 : Interaction de la Gyrase B et son inhibiteur le pyrrolamide ... 76
Figure 24 : Représentation des interactions favorables (boules bleues) et défavorables (boules rouges) entre le pyrrolamide **89** et le site catalytique ... 77
Figure 25 : Stratégie entreprise pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase ... 78
Figure 26 : Structure générale des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase et sa position au sein du site catalytique. Les interactions favorables sont représentées par des boules bleues. ... 78

Figure 27 : Structures des inhibiteurs de HK **90-97** 80
Figure 28 : Méthode de diffusion de Kirby-Bauer sur les molécules **90** à **97** 81
Figure 29 : Réaction de couplages pallado-catalysés 84
Figure 30 : Structure générale des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase 89
Figure 31 : Conception des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase 90
Figure 32 : Conception d'une nouvelle série non aromatique **122** 97
Figure 33 : Spectre RMN du proton du composé **148** 102
Figure 34 : Evaluation des composés sur l'inhibition de l'autophosphorylation de multiples HK. + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; - : L'autophosphorylation n'a pas lieu ; +/- : inhibition partielle observée ; C : Contrôle (HK + ATP en absence d'inhibiteur). 105
Figure 35 : Conception d'un pharmacophore potentiel 107
Figure 36 : Inhibiteurs présentant une activité inhibitrice sur WalK et PhoR 108
Figure 37 : Résultats d'inhibition des molécules sur la capacité d'inhibition sur les kinases eucaryotes **111-122**, **129-133**, **140-147** et **149** ; + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; C : Contrôle (IreK + ATP en absence d'inhibiteur). 109
Figure 38 : Evaluation de l'activité antibactérienne des 26 molécules sur *B. subtilis* par la méthode de diffusion de Kirby-Bauer. 110
Figure 39 : Structure des molécules présentant une activité antibactérienne par méthode de Kirby-Bauer sur *B. subtilis*. 110
Figure 40 : Structure de Protonsil® 116
Figure 41 : Structures des sulfapyridines, sulfacetamide et sulfathiazole 117
Figure 42 : Comparaison des similarités rencontrées entre le *para*-aminobenzoïque (PABA) et le sulfanilamide 117
Figure 43[96] : Exemples de sulfonamides avec des activités antibactériennes de la littérature 118
Figure 44 : Inhibiteurs d'histidine kinase appartenant à la famille des sulfonamides (**62**) et des salicylanilides 118
Figure 45 : Démarche entreprise pour la conception de la série des sulfonates et sulfonamides ... 119
Figure 46 : Evaluation des composés sur l'inhibition de l'autophosphorylation de multiples HK. + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; - : L'autophosphorylation n'a pas lieu ; +/- : inhibition partielle observée ; C : Contrôle (HK + ATP en absence d'inhibiteur). 125
Figure 47 : Structures des sulfonates et des sulfonamides présentant des activités inhibitrices 127
Figure 48 : Résultats d'inhibition des molécules sur la capacité d'inhibition sur les kinases eucaryotes **152-161** et **162-171** ; + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; C : Contrôle (IreK + ATP en absence d'inhibiteur). 128

Figure 49 : Méthode de diffusion de Kirby-Bauer sur les séries des sulfonates et des sulfonamides 129
Figure 50 : Structures des molécules ayant un faible halo d'inhibition de la croissance bactérienne. 129
Figure 51 : Analogue de phosphohistidine **172** de type furane **173** ou pyrrole **174** de la littérature 131
Figure 52 : Analogue de phosphohistidine **172** de type triazole **175-180** de la littérature 132
Figure 53 : Analogue de phosphohistidine **172** de type thiophosphate **181**..... 132
Figure 54 : Analogue de phosphohistidine de type sulfonamide **184** et triazole **182-183** de la littérature 133
Figure 55 : Analogue de phosphohistidine de type pyrazole **185-186** de la littérature..... 133
Figure 56 : Analogue de phosphohistidine de type thiophène..... 134
Figure 57 : Isomère de notre analogue **187** de phosphohistidine de type thiophène 134
Figure 58 : Inhibiteurs hétérocycliques de HK (**119** et **149**) et adjuvant d'antibiotique (**151**) 139
Figure 59 : Dérivés furanes ayant une activité antibactérienne 140

Liste des figures du chapitre 2

Figure 1 : Structure et schéma du monomère du peptidoglycane..... 212
Figure 2 : Schéma d'une bactérie Gram positif et Gram négatif..... 212
Figure 3 : Structure du bloc UDP-NAG..... 213
Figure 4 : Actions des enzymes MurA et MurB dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane.. 214
Figure 5 : Synthèse de l'unité UDP-NAM-pentapeptide catalysée par les ligases MurC-F 215
Figure 6 : Biosynthèse du peptidoglycane..... 216
Figure 7 : Structure du phosphate de pyridoxal..... 219
Figure 8 : Action de la décarboxylase sur le méso-DAP **10** pour obtenir la lysine **11** 219
Figure 9 : Réaction de décarboxylation du méso-DAP catalysée par la décarboxylase LysA..... 220
Figure 10 : Réaction catalysée par le méso-DAP déshydrogénase..... 221
Figure 11 : Epimérisation menée par l'épimérase DapF 221
Figure 12 : Epimérisation sélective de LL-DAP **9**..... 222
Figure 13 : Mécanisme d'inhibition proposé par les auteurs par LysA et DapF..... 223
Figure 14 : Structure de la molécule **20** et sa constante d'inhibition..... 223
Figure 15 : Structure de la molécule **21** et ses concentrations inhibitrices respectives 224
Figure 16 : Structures des molécules **22** et **23** avec leurs constantes d'inhibitions respectives 224

Figure 17 : Intermédiaires proposés par les auteurs responsables de l'inhibition de **22** et **23** sur LysA. **A** : Liaison du substrat naturel ; **B** : Possible intermédiaire pour **22** ; **C** : Possible intermédiaire pour **23**..... 224
Figure 18 : Mécanisme d'inhibition de **22** proposé par les auteurs 225
Figure 19 : Structure de la molécule **25** et sa concentration d'inhibition..... 225
Figure 20 : Mécanisme d'inhibition simplifié de **25** proposé par les auteurs sur DapF 226
Figure 21 : Structures des molécules **27** à **30** et leurs CI_{50} respectives..... 226
Figure 22 : Mécanisme d'inhibition simpliqué de DapF des molécules **27-30** 227
Figure 23 : Structure de l'azi-DAP **31** 227
Figure 24 : Mécanisme d'inhibition de l'azi-DAP **31** sur l'épimérase DapF..... 227
Figure 25 : Structure de l'isoxazoline **32** et sa concentration inhibitrice..... 228
Figure 26 : Structures des molécules **33** et **34** avec leurs activités inhibitrices respectives..... 228
Figure 27 : Mécanisme d'inhibition de **33-34** proposé par les auteurs sur l'épimérase DapF 229
Figure 28 : Structures des molécules **35** et **36** avec la valeur de concentration d'inhibition de DapF et ddh..... 229
Figure 29 : Mécanisme d'inhibition de **36** sur l'épimérase DapF 229
Figure 30 : Structure de la molécule **37** 230
Figure 31 : Structures de molécules **38** et **39**..... 230
Figure 32 : Structure de *meso*-DAP et L,L-DAP..... 231
Figure 33 : Conception de nouveaux analogues de *méso*-DAP et Lysine..... 232
Figure 34 : Proposition de mécanisme d'inhibition pour les dérivés de la série des alcynes..... 232
Figure 35 : Structure générale de la série des triazoles 235
Figure 36 : Analyse rétrosynthétique des nouveaux analogues du DAP. 235
Figure 37 : Structure de l'aminoéthoxyvinylglycine (AVG)..... 246
Figure 38 : Structure générale de la série des alcynes 246
Figure 39 : Analyse rétrosynthétique pour la synthèse de la série des alcynes 247

Liste des schémas du chapitre 1

Schéma 1 : Synthèse du composé **7** 36
Schéma 2 : Synthèse des composés **11** et **14** ;..... 38
Schéma 3 : Synthèse des composés **24a**, **24b** et **24c** 40
Schéma 4 : Synthèse des composés **27a-d** 42
Schéma 5 : Synthèse des composés **32a,b** 43
Schéma 6 : Synthèse des diphényltraizoles **36a,b** 44
Schéma 7 : Synthèse des composés **40a-c** 46
Schéma 8 : Synthèse du composé **43** 47
Schéma 9 : Synthèse du composé **47a.** 48
Schéma 10 : Synthèse des composés **52a-f** 51
Schéma 11 : Synthèse des composés **52a,b** 52
Schéma 12 : Synthèse du composé **62** 53
Schéma 13 : Synthèse des composés **68a,b** 56
Schéma 14 : Synthèse pour le composé **74a** 57
Schéma 15 : Synthèse du composé **81** 59
Schéma 16 : Synthèse des composés **88a-c** 61
Schéma 17 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura 79
Schéma 18 : Couplage croisé de Negishi 85
Schéma 19 : Réaction de Suzuki Miyaura 85
Schéma 20 : Couplage croisé de Negishi (**A**) et de Suzuki Miyaura (**B**) 86
Schéma 21 : Réaction de Hirao 87
Schéma 22 : Couplage croisé de Hirao 87
Schéma 23 : Réaction de Buchwald-Hartwig 88
Schéma 24 : Couplage croisé de Buchwald-Hartwig 88
Schéma 25 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura 91
Schéma 26[89] : Synthèse du composé **91** 91
Schéma 27 : Statégie de synthèse des composés **111-121** 93
Schéma 28 : Synthèse du composé **122** par couplage de Buchwald-Hartwig 97
Schéma 29 : Synthèse des composés **129** à **133** 98
Schéma 30 : Synthèse des composés **140** à **147** 99
Schéma 31 : Réduction du groupement nitro du composé **91** 102

Schéma 32 : Formation du chlorohydrate **149** 103
Schéma 33 : Synthèse du composé **151** 103
Schéma 34 : Métabolisation du Protonsil 116
Schéma 35 : Synthèse des sulfonates **152** à **161** 120
Schéma 36 : Synthèse des sulfonamides **162** à **171** 123
Schéma 37 : Représentation du transfert du groupement phosphate de l'histidine sur l'aspartate 130
Schéma 38 : Synthèse du composé **194** 135
Schéma 39 : Synthèse du composé **195** 135

Liste des schémas du chapitre 2

Schéma 1 : Voie de biosynthèse du peptidoglycane 218
Schéma 2 : Synthèse des azotures (*S*)-**44a** et (*R*)-**44b** 237
Schéma 3 : Protection des fonctions amines des amines propargyliques **46** et **48** 238
Schéma 4 : Synthèse de l'aldéhyde de Garner (*S*)-**52a** et (*R*)-**52b** 239
Schéma 5 : Synthèse du réactif de Bestmann-Ohira **55** et réaction d'homologation 240
Schéma 6 : Synthèses des triazoles **58a-g**, **60a-d** et **61a-d** 241
Schéma 7 : Déprotection **58a-g**, **60a-d** et **61a-d** en milieu acide 244
Schéma 8 : Première stratégie de synthèse pour la formation de l'alcyne (*2S, 6R*)-**65** 247
Schéma 9 : Synthèse du dérivé chloré par réaction d'Appel 248
Schéma 10 : Possible réaction secondaire lors de l'alkylation 248
Schéma 11 : Possible protonation de l'alcynure par le dérivé halogéné 249
Schéma 12 : Première tentative d'alkylation en milieu basique 249
Schéma 13 : Synthèse du (*S*)-**67** par réaction d'Appel 250
Schéma 14 : Deuxième tentative d'alkylation en milieu basique 250
Schéma 15 : Tentative d'alkylation par couplage croisé de Sonogashira 251
Schéma 16 : Synthèse de la molécule **71** par couplage de Negishi décrite par Lilley et ses collaborateurs[48] 251
Schéma 17 : Stratégie de synthèse envisagée par couplage de Negishi 252
Schéma 18 : Synthèse de (*R*)-**73** décrite par Ayed et ses collaborateurs 252
Schéma 19 : Tentative d'iodation du synthon ethynylglycine 252
Schéma 20 : Synthèse du composé (*R*)-**73** 253
Schéma 21 : Tentative d'alkylation par couplage de Negishi 253

Schéma 22 : Stratégie de synthèse de l'alcyne par couplage de Kumada-Corriu 254
Schéma 23 : Stratégie de synthèse du composé **82**..... 255
Schéma 24 : Perspective de synthèse afin d'atteindre l'analogue du *méso*-DAP 255

Liste des tableaux du chapitre 1

Tableau 1 : Les systèmes à deux composants impliqués dans la virulence 34
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature ainsi que leurs concentration inhibitrice minimale (CI_{50}). 62
Tableau 3 : Tableau récapitulatif de valeurs obtenues de CMI et CMB pour les composés **91** et **92** 81
Tableau 4 : Comparatif entre les conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du composé **91**.....92
Tableau 5 : Thiophènes synthétisés **111-121** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs.....94
Tableau 6 : Nitro furane et nitro thiazole synthétisés **129-133** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs.....98
Tableau 7 : Série des acides carboxyliques synthétisés **140-147** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs.....99
Tableau 8 : Conditions utilisées pour réduire le groupement nitro 101
Tableau 9 : Valeurs de CMI et CMB réalisées sur huit bactéries sensibles des molécules **120**, **129**, **130** et **132**. 111
Tableau 10 : Résultats obtenus sur l'activité d'adjuvant d'antibiotiques 114
Tableau 11 : Sulfonates **152-161** synthétisés et leurs rendements respectifs.....120
Tableau 12 : Sulfonates **162-171** synthétisés et leurs rendements respectifs.....123
Tableau 13 : Valeurs des CI_{50} pour les inhibiteurs potentiels d'histidine kinase issus de la série des sulfonates et des sulfonamides 126

Liste des tableaux du chapitre 2

Tableau 1 : Structures et rendements des triazoles protégés **58a-g**, **60a-d** et **61a-d**. 242
Tableau 2 : Structures et rendements des triazoles déprotégés **62a-g**, **63a-d** et **64a-d** 244

Introduction

La découverte des antibiotiques est considérée comme la principale avancée thérapeutique du 20ème siècle. Les antibiotiques ont sauvé de nombreuses vies et continuent à être le principal traitement pour guérir les infections bactériennes. Le succès clinique connu par les β- lactames, en particulier la pénicilline G, découverte en 1940 par Sir Alexander Fleming, a permis le développement de nombreux agents antibactériens.[1]

En revanche, la bactérie a démontré qu'elle possède la capacité de s'adapter en fonction de son environnement en développant des mécanismes de résistances multiples face aux antibiotiques. En effet, suite à l'administration d'un antibiotique, les bactéries soit modifient la cible de l'antibiotique (1), soit empêchent la pénétration des molécules dans la cellule (2), soit évacuent l'antibiotique pour qu'il soit en faible quantité dans la bactérie *via* les pompes à efflux (3) soit désactivent l'antibiotique avant même qu'il n'atteigne sa cible.[2,3]

Cette émergence de la résistance bactérienne est d'autant plus accentuée par le mauvais usage des antibiotiques combinée au manque d'intérêt de l'industrie pharmaceutique. En 2004, les antibiotiques représentaient moins de 2% des médicaments en développement clinique par les 15 plus grandes sociétés pharmaceutiques.[4,5] Le problème de la résistance est si grave que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en a fait une de ses priorités. Si aucune action n'est mise en place, la quasi-totalité des antibiotiques actuels seront inefficaces d'ici 2050 pour guérir les infections bactériennes.[6]

Plus que jamais, il est primordial et urgent de trouver de nouvelles cibles et de nouveaux agents antibactériens pour lutter contre les bactéries multirésistantes. La combinaison de médicaments antimicrobiens a déjà été utilisée en thérapie clinique pour couvrir un large spectre de bactéries afin d'obtenir une meilleure efficacité et vaincre la résistance au traitement.[7] Cependant, la résistance ne cesse pas de se développer, ce qui pousse les chercheurs à développer d'autres stratégies. Par exemple, combiner des antibiotiques avec des molécules dépourvues ou ayant une faible activité antibactérienne, connues sous le nom d'adjuvant, pour obtenir un effet synergique.[8–11]

C'est dans ce contexte que l'objectif de mes travaux de thèse s'inscrit. En effet, au cours de ces 3 années, j'ai travaillé sur une double thématique afin de répondre à la problématique de la résistance bactérienne :

- L'inhibition des voies de signalisation de la bactérie en ciblant les systèmes à deux composants par la synthèse d'adjuvants antibiotiques (Chapitre I) : Synthèse de nouveaux hétérocycles, sulfonamides et analogues d'histidine comme inhibiteurs potentiels d'histidine kinase.
- L'inhibition de la voie de biosynthèse de la paroi bactérienne (Chapitre II) : Synthèse d'acides aminés non usuels à base de triazoles ou d'alcynes comme inhibiteurs potentiels de la voie de biosynthèse de la lysine.

Les molécules synthétisées au cours de cette thèse ont été évaluées biologiquement par nos collaborateurs afin de connaître leurs activités biologiques sur les différentes cibles.

(1) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of β-Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. **2010**, *23* (1), 160–201.
https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09.
(2) Wright, G. D. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Chem. Commun*. 2011, *47*, 4055–4061.
https://doi.org/10.1039/c0cc05111j.
(3) Lin, J.; Nishino, K.; Roberts, M. C.; Tolmasky, M.; Aminov, R.; Zhang, L. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol*. **2015**, *6* .
https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034.
(4) Stanton, T. B. A Call for Antibiotic Alternatives Research. *Trends in Microbiology*. **2013**, *21* (1), 111–113.
https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.002.
(5) Jabes, D. The Antibiotic R&D Pipeline: An Update. *Current Opinion in Microbiology*. **2011**, *14* (5), 564–569.
https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.08.002.
(6) Chellat, M. F.; Raguž, L.; Riedl, R. Targeting Antibiotic Resistance. *Angew. Chemie - Int. Ed*. **2016**, *55* (23), 6600–6626.
https://doi.org/10.1002/anie.201506818.
(7) Eliopoulos, G. M.; Eliopoulos', C. T. Antibiotic Combinations: Should They Be Tested? **1988**. *1* (2), 139-156.
https://doi.org/10.1128/cmr.1.2.139.
(8) Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology*. **2016**, *24* (11), 862–871.
https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.009.
(9) Douafer, H.; Andrieu, V.; Phanstiel, O.; Brunel, J. M. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! *J. Med. Chem*. **2019**, *62* (19), 8665–8687.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01781.
(10) González-Bello, C. Antibiotic Adjuvants – A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2017**, *27* (18), 4221–4228.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027.
(11) Melander, R. J.; Melander, C. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: An Adjuvant Approach?. *ACS Infectious Disease*. **2017**, *3* (8), 559-563.
https://doi.org/10.1007/7355_2017_10.

Chapitre 1 :
Synthèse de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

I. Etude bibliographique

A. Système de transduction du signal bactérien : présentation

Les bactéries peuvent s'adapter à des conditions hostiles telles que des changements brusques et soudains de nutriments, des conditions acides, des variations drastiques de température et de la pression osmotique, etc. Cela est rendu possible par la présence de mécanismes cellulaires qui permettent de transformer des signaux environnementaux en réponses intracellulaires adaptées permettant à la bactérie d'ajuster son comportement ou sa physiologie. Ce système de régulation est connu sous le nom de transduction du signal.[1,2,3]

Chez la bactérie, il peut exister trois types de système de transduction du signal : les systèmes à un composant, les systèmes à deux composants et les systèmes de phosphorelais (Figure 1).

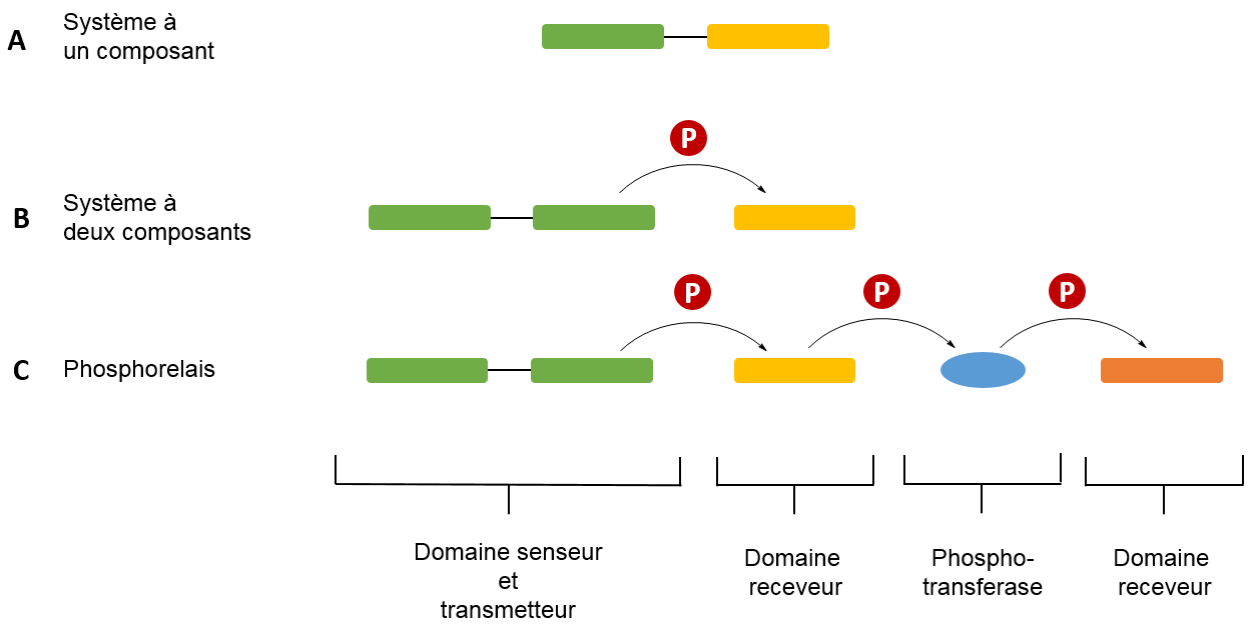


Figure 1 : Comparaison entre les différents systèmes de transduction du signal chez la bactérie

Le système à un composant (Figure 1, **A**) est le plus simple des systèmes de transduction du signal dans lequel la transcription du gène est régulée par une seule et même protéine qui contient à la fois le domaine senseur et le domaine de liaison à l'ADN appelé le domaine receveur. En effet, la liaison d'un ligand modifie la conformation de la protéine permettant ainsi la liaison en amont de son promoteur cible et activer ou réprimer la transcription du gène adéquat.[4]

Il existe de même les systèmes de transduction du signal à deux composants (Figure 1, **B**). Celui-ci, à la différence du premier, est composé de deux protéines. Cette communication entre les

protéines est généralement assurée par un mécanisme du type phosphorylation-déphosphorylation. La première va permettre de détecter et de transmettre le signal perçu *via* un mécanisme de phosphorylation à une deuxième protéine qui elle va se lier au domaine de liaison de l'ADN afin de déclencher la réponse cellulaire adéquate.[5]

Finalement, un troisième système plus complexe, connu sous le nom de système de phosphorelais (Figure 1, **C**) est aussi employé par la bactérie pour répondre à son environnement. Il résulte d'un mécanisme multi-étapes de transmission du groupement phosphate par le biais des domaines intermédiaires. Il s'agit d'une variante des systèmes à deux composants.[6–8]

Ces systèmes de transduction du signal traduisent la capacité des cellules à mieux répondre à leur environnement. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons principalement sur les systèmes à deux composants.

B. Système à deux composants

Les mécanismes de transduction du signal les plus communément utilisés par les cellules procaryotes (bactéries et archées) sont les systèmes à deux composants ou en anglais « Two-component system (TCS) ». Ils sont composés de deux protéines : une histidine kinase (HK) qui sert de capteur transmembranaire et une deuxième protéine appelée régulateur de réponse (RR), qui agit le plus souvent comme facteur de transcription (Figure 2).[9]

1. Composition des systèmes à deux composants

Les histidines kinases sont des protéines homodimériques stables et sont composées d'un domaine de détection ou domaine senseur de signaux extra-cytoplasmiques se situant sur l'extrémité *N*-terminale (*N*-Term).[1,10]
Au niveau cytoplasmique, elle est de même constituée de deux domaines : un domaine directement lié aux domaines extra-cytoplasmiques appelé « dimérisation et histidine phosphotransférase (DHp) » et un domaine de liaison à l'ATP sur l'extrémité *C*-terminal (*C*-Term), appelé « domaine catalytique (CA) ». En effet, un stimulus détecté par le domaine *N*-terminal (*N*-Term) ou domaine senseur est traduit en un changement de conformation dans le domaine DHp ce qui conduit ensuite à une modification du taux d'autophosphorylation.[11] (Figure 2)

Le régulateur de réponse (RR) est le deuxième composant qui assure la médiation de la réponse adaptative. Il existe de nombreuses architectures, mais le plus souvent, le RR a une architecture à deux domaines avec un domaine receveur situé à l'extrémité *N*-terminale et un domaine de liaison à l'ADN ou domaine effecteur situé à l'extrémité *C*-terminale. Le domaine receveur catalyse sa propre autophosphorylation entraînant ensuite un changement de conformation et une activation du domaine de liaison à l'ADN (domaine effecteur).[12,13] (Figure 2)

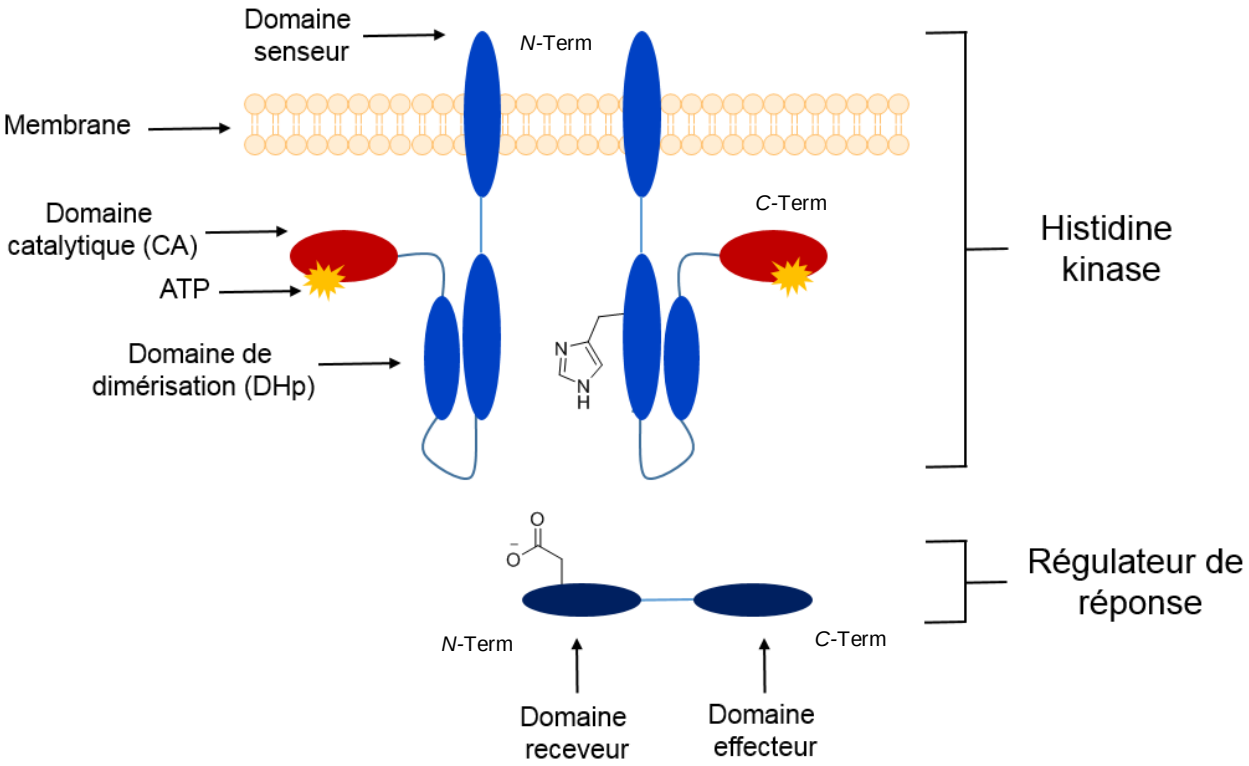


Figure 2 : Système à deux composants

2. Fonctionnement des systèmes à deux composants

Le mode de fonctionnement de ces systèmes à deux composants est divisé en plusieurs étapes. Suite à un signal externe perçu par la partie extra-cytoplasmique ou domaine senseur de l'histidine kinase (Figure 3, **A**), un résidu histidine situé dans le domaine de dimérisation va s'autophosphoryler en présence d'ATP (Figure 3, **B**).[14] Des études ont montré que cette étape peut s'effectuer soit en « *cis* » soit en « *trans* » à savoir soit l'autophosphorylation s'effectue directement sur la même histidine kinase (Figure 3, **1**) soit c'est l'autre monomère qui phosphoryle le résidu d'histidine. (Figure 3, **1** et **2**)

Le groupement phosphate sur le résidu histidine est ensuite transféré sur le domaine receveur du régulateur de réponse et plus précisément sur l'aspartate (Figure 3, **C**). Ce transfert va permettre d'activer la transcription du gène cible (Figure 3, **D**).[1,10]

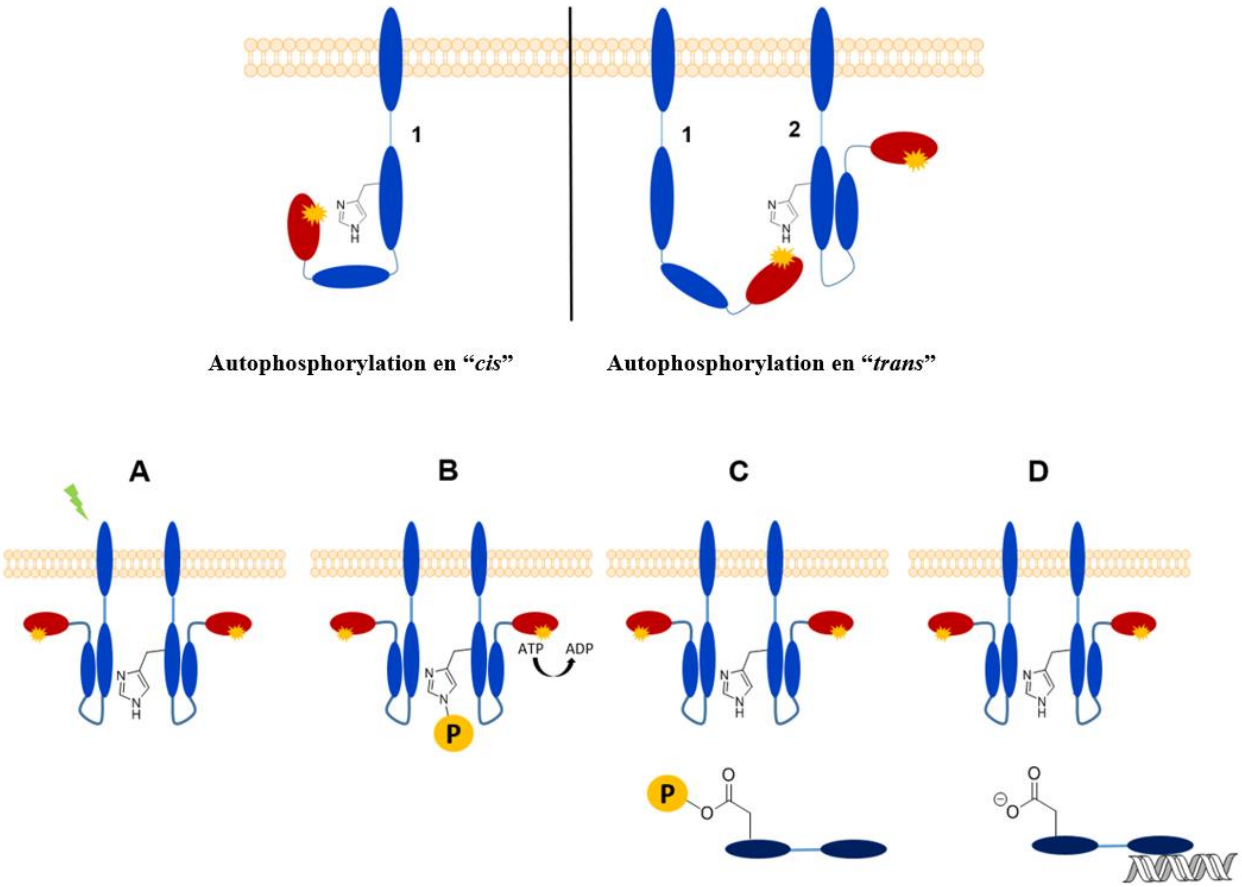


Figure 3 : Fonctionnement d'un système à deux composants : Mécanisme d'autophosphorylation chez les systèmes à deux composants. **A** : Détection du signal externe ; **B** : Autophosphorylation du résidu histidine ; **C** : Transfert du groupement phosphate vers RR ; **D** : Transcription du gène cible

C. Les systèmes à deux composants essentiels ou non chez la bactérie

Les systèmes à deux composants sont le système de transduction de signal le plus répandu chez les bactéries, ce qui permet une multitude de décisions importantes en matière d'adaptation et de développement. Comme mentionné précédemment, ils contrôlent directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes responsables non seulement de l'homéostasie de la paroi cellulaire, de l'adaptation au stress, de la régulation de la motilité, de l'adaptation à la privation de nutriments mais aussi leur implication dans la sporulation, la virulence bactérienne, la résistance aux antibiotiques, etc.[15] Malgré leur importance pour l'adaptation et le conditionnement physique des bactéries, seuls quelques-uns se sont avérés essentiels à la viabilité cellulaire.[16,17]

1. Système à deux composants essentiels à la survie de la bactérie

Le système à deux composants YycG/YycF, également connu sous les noms de WalK/WalR ou de VicK/VicR ou de MicA/MicB, est le système le plus répandu chez les bactéries à Gram-positif.[16,18,19] Il a été démontré que ces TCS sont essentiels chez *B. subtilis, S. aureus, E. faecalis, S. pneumoniae* et *S. mutans*, où ils jouent un rôle crucial dans la croissance cellulaire, le renouvellement de la paroi cellulaire et l'homéostasie.[20,21] Compte tenu de son caractère essentiel chez la bactérie, ces TCS ont été la cible de plusieurs études pour le développement de nouveaux inhibiteurs potentiels à caractère antibactériens. Cette partie sera plus détaillée dans la section Chapitre 1, I.D.

2. Système à deux composants impliqués dans la virulence chez la bactérie

Bien que la plupart des TCS ne soient pas indispensables à la viabilité cellulaire, ils peuvent jouer un rôle essentiel dans la virulence des bactéries car celles-ci doivent s'adapter à leur environnement. Les bactéries pathogènes expriment des réponses spécifiques à l'environnement et cette réponse dépend dans de nombreux cas des TCS. Une voie importante des TCS est la voie de sporulation des *Bacilli* et des *Clostridia* conduisant au développement d'endospores.[22] La sporulation a principalement été étudiée chez *Bacillus subtilis* où plusieurs HK, dont la KinA, phosphorylent le RR Spo0R.[23–25] Au-delà de la formation de spores, la voie contribue également à la formation de biofilms qui sont à l'origine de plusieurs infections bactériennes. L'éradication des biofilms est devenue une préoccupation majeure dans le traitement clinique et l'inactivation de cette histidine kinase pourrait être une solution possible.[26,27]

De ce fait, il existe d'autres TCS qui ont été moins étudiés que les premiers mentionnés mais qui participent à la virulence de la bactérie. Ces TCS sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Les systèmes à deux composants impliqués dans la virulence

Systèmes à deux composants		**Bactérie dans laquelle le TCS est exprimé**	**Responsable pour**
Histidine kinase	**Régulateur de réponse**		
PhoP	PhoQ	*Salmonella typhimurium*	Régulation de la réponse génétique en fonction des niveaux de Mg^{2+}.[28]
PhoR	PhoB	Bactéries à Gram-negatif	Régulation des niveaux de phosphate.[29]
ResE	ResD	*B. subtilis*	Régulation de l'aptitude de la bactérie à survivre dans des conditions aérobies et anéaérobiques.[30]
EnvZ	OmpR	Bactéries à Gram-negatif	Régulation de la pression osmotique suite à un stress environmental.[31]
AlgR2	AlgR1	*P.aeruginosa*	Production de grandes quantités d'alginate, importantes pour la protection des bactéries contre les antibiotiques et le système immunitaire humain.[32]
VanS	VanR	*E. faecium*	Expression des gènes responsables de la résistance à la vancomycine. Ce système détecte directement la présence de vancomycine dans l'environnement.[33]
QseC	QseB	*E. coli*	Propagation des épidémies de diarrhée sanglante, de syndrome hémolytique et urémique causé par *E. Coli entéro-hémorragique*.[34,35]
CheA	CheY	*Helicobacter pylori*	Se trouve dans la plupart des bactéries mobiles et agit comme réponse à la motilité chimiotactique. Le CheY RR n'est pas un facteur de transcription, mais interagit plutôt avec le flagelle et modifie sa rotation pour coordonner la nage directionnelle.[36]

NtrB ou NR_I	NtrC ou NR_{II}	Bactéries à Gram-negatif	Régulation de l'expression des gènes du régulon *Ntr*, importants pour l'assimilation de l'ammoniac et l'utilisation de composés azotés alternatifs.[37]

Parce qu'ils sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques et dans la virulence, les systèmes à deux composants représentent une cible prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments antibactériens.[15]

D. Synthèse d'inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature

Compte tenu de l'importance désormais reconnue des systèmes à deux composants pour la survie et l'adaptation des bactéries, de nombreux groupes de recherche ont travaillé à la découverte de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase afin d'identifier de nouveaux agents antibactériens. La synthèse d'inhibiteurs de HK de chaque famille présentant la meilleure activité inhibitrice sera décrite dans les prochains paragraphes de ce manuscrit. Enfin, une revue est en cours de révision concernant la synthèse d'inhibiteurs d'histidine kinase et leurs propriétés biologiques dans le journal *Medicinal Research Reviews*.

1. La famille d'isothiazolone et d'imidazolium

Les premiers inhibiteurs de HK décrits dans la littérature sont les isothiazolones et les sels d'imidazoliums.[38] Ces inhibiteurs ont été décrits pour la première fois en 1993 par Roychoudhury et ses collaborateurs, à la recherche de nouveaux inhibiteurs de AlgR2/AlgR1 (impliqué dans la production d'alginate).[39]

Sur environ 25 000 composés recherchés pour l'inhibition de l'histidine kinase, seuls 15 composés semblaient être efficaces. Parmi ces 15 composés, quatre (**1**, **2**, **3** et **4,** Figure 4) ont présenté une inhibition significative de AlgR2/AlgR1 avec une CI_{50} de 1 à 2 µM (Tableau 2, p.62). Les isothiazolones **1** et **2** ont un effet significatif sur l'autophosphorylation de AlgR2 et les composés **3** et **4** ont également fortement inhibé l'activité d'autophosphorylation des histidine kinases CheA (impliquées dans la motilité), NR_{II} (impliquées dans la fixation de l'azote) et de KinA (impliquées dans la sporulation).[39,40] En revanche, ces composés ne bloquaient pas efficacement la croissance bactérienne et leur synthèse n'a pas été décrite par Roychoudhury. (Figure 4)

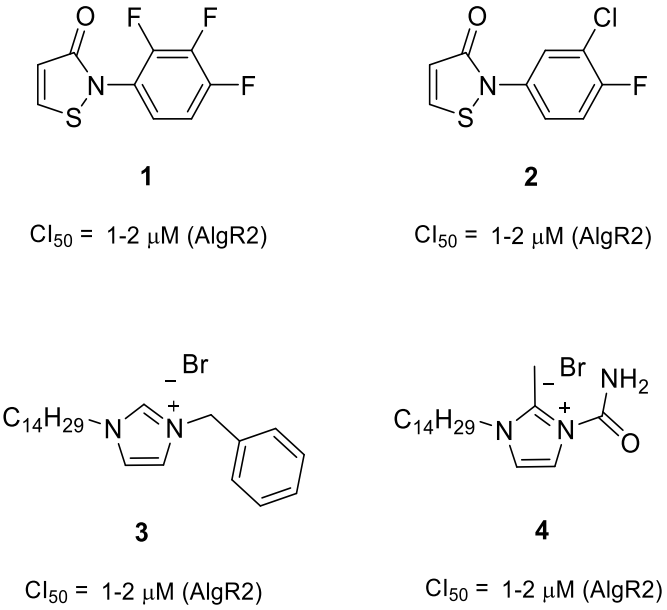


Figure 4 : Structure des premiers inhibiteurs de HK

En 2000, Yamamoto et ses collaborateurs ont synthétisé vingt analogues d'imidazolium **3** (Figure 4) afin d'évaluer leur activité antibactérienne.[41] Sur les vingt composés synthétisés, un seul composé **7**, connu sous le nom de NH125, a présenté des résultats prometteurs comme inhibiteur de YycG (impliqué dans le développement de la paroi bactérienne) avec une CI_{50} d'environ 6,6 µM (Tableau 2, p.62).[42]

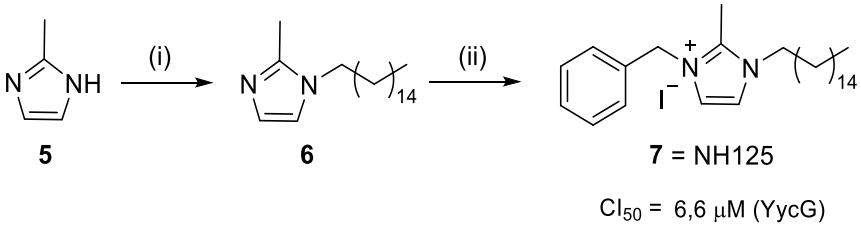


Schéma 1 : Synthèse du composé **7**
(i) $C_{16}H_{33}Br$, $CHCl_3$, 70°C ; (ii) KI, bromure de benzyle, $CHCl_3$, 70°C.

La synthèse du sel d'imidazolium **7** est illustrée dans le schéma 1. La première étape est l'alkylation du méthylimidazole **5** conduisant à **6**. Ensuite, une seconde alkylation à l'aide de bromure de benzyle, en présence d'iodure de potassium conduit au sel d'imidazolium souhaité **7** (Schéma 1).[41] Aucun rendement n'a été indiqué pour cette synthèse.

2. La famille des trityles

En 1995 et 1998, Demers et Barrett ont développé une nouvelle série de molécules ayant une activité inhibitrice sur le système de sporulation KinA/Spo0F.[43–45] Quarante-neuf inhibiteurs potentiels de la série des trityles (Figure 5) ont été synthétisés afin d'améliorer les résultats obtenus précédemment avec la série des imidazoliums.

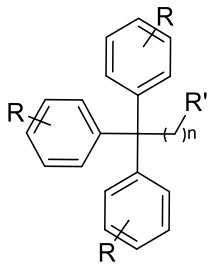


Figure 5 : Structure générale des trityles

La plupart des inhibiteurs potentiels présentaient une activité inhibitrice, mais seuls 2 composés, **11** (nommé RWJ-49815) et son analogue **14**, présentaient des résultats prometteurs sur l'inhibition de KinA/Spo0F avec des valeurs de CI_{50} de 5 µM et de 6 µM respectivement (Tableau 2, p.62).

La synthèse des molécules **11** et **14** est décrite dans le schéma 2. La première étape est une réaction de Mitsunobu entre le triphénylpropanol **8** et le phénol approprié (**9a** ou **9b**) pour conduire aux composés **10a** et **10b** avec des rendements respectifs de 31% et de 58%. Le composé **10a** est déprotégé en présence d'anisole et de HCl anhydre conduisant à la guanidine **11**. Aucun rendement n'est indiqué pour cette étape. La réduction de **10b** à l'aide du borohydrure de sodium, conduit au composé **12** avec un rendement de 97%. Le composé **12** réagit avec le chlorure de sulfuryle, dans le benzène, pour conduire au dérivé chloré **13** avec un rendement de 83%. Enfin, le chlorure de pyridinium **14** est préparé à partir de **13** en utilisant de la pyridine avec un rendement de 86%. (Schéma 2)

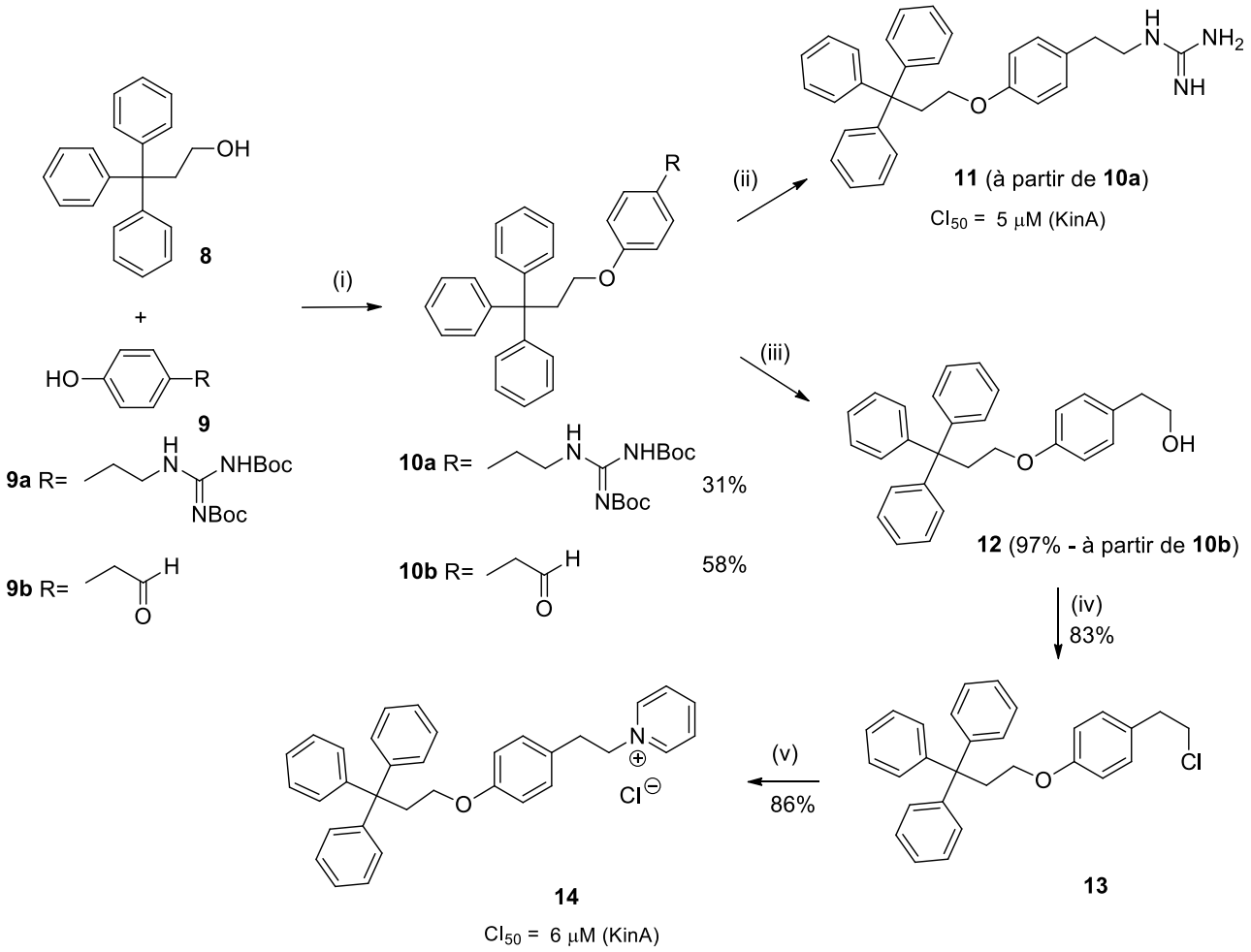


Schéma 2 : Synthèse des composés **11** et **14** ;
(i) PPh_3, DEAD, THF anhydre, -15°C ; (ii) Anisole, HCl anhydre, iPrOH, 50°C ; (iii) $NaBH_4$, EtOH ; (iv) SO_2Cl_2, Benzène, reflux ; (v) Pyridine, reflux.

3. La famille des benzoxazines

Par la suite, en 1997, Frechette et ses collaborateurs ont découvert une série de dérivés de benzoxazine (Figure 6) qui inhibent le transfert du phosphate dans le système bactérien.[46]

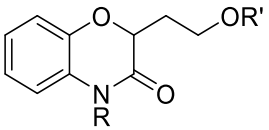


Figure 6 : Structure générale des benzoxazines

Ils ont synthétisé 144 inhibiteurs potentiels d'histidine kinases en utilisant la stratégie décrite dans le schéma 3. Ces 144 dérivés de benzoxazine ont été évalués pour leur inhibition de l'activité de phosphorylation (autophosphorylation de KinA et transphosphorylation de Spo0F).[47] Dans ce

système, la plupart des composés présentaient une activité inhibitrice modérée mais trois molécules **24a**, **24b** et **24c** présentaient des valeurs de CI_{50} autour de 15 µM (Tableau 2, p.62). La synthèse de **24a-c** est décrite dans le schéma 3.[46]

Les dérivés nitrophénols commerciaux **15** réagissent avec l'α-bromo-γ-butyrolactone **16** dans des conditions basiques pour conduire aux composés **17** avec un rendement compris entre 60% et 70%. La réduction du groupement nitro en fonction amine s'effectue par hydrogénation catalytique soit à l'aide de H_2/Pd/C dans EtOH, soit à l'aide de $NaBH_4$, $NiCl_2.6H_2O$ dans MeOH, pour conduire aux hétérocycles de benzoxazine **18** obtenus avec des rendements variant de 45 à 87%. La protection des alcools **18** avec du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle dans le DMF conduit aux composés **19** avec des rendements variant de 44 à 91%. Ensuite, l'alkylation du lactame **19** est effectuée à l'aide de NaH et du chlorure correspondant (R_1Cl) pour conduire aux composés **20**, qui sont utilisés sans purification supplémentaire dans l'étape suivante. La déprotection de la fonction alcool des composés **20** s'effectue avec du fluorure de tétrabutylammonium [1 M] dans le THF et conduit aux alcools déprotégés respectifs **21** avec un rendement moyen de 45% pour ces deux dernières étapes de déprotection. Une réaction de couplage des alcools **21**, par réaction de Mitsunobu, avec le 4-(2-aminoéthyl)phénol protégé **22** conduit aux éthers **23** avec un rendement variant de 34% à 52% selon les composés. Enfin, les guanidines **23** sont déprotégées dans des conditions acides pour conduire aux composés souhaités **24a**, **24b** et **24c** avec des rendements de 28%, 79% et 72% respectivement (Schéma 3).[46,48]

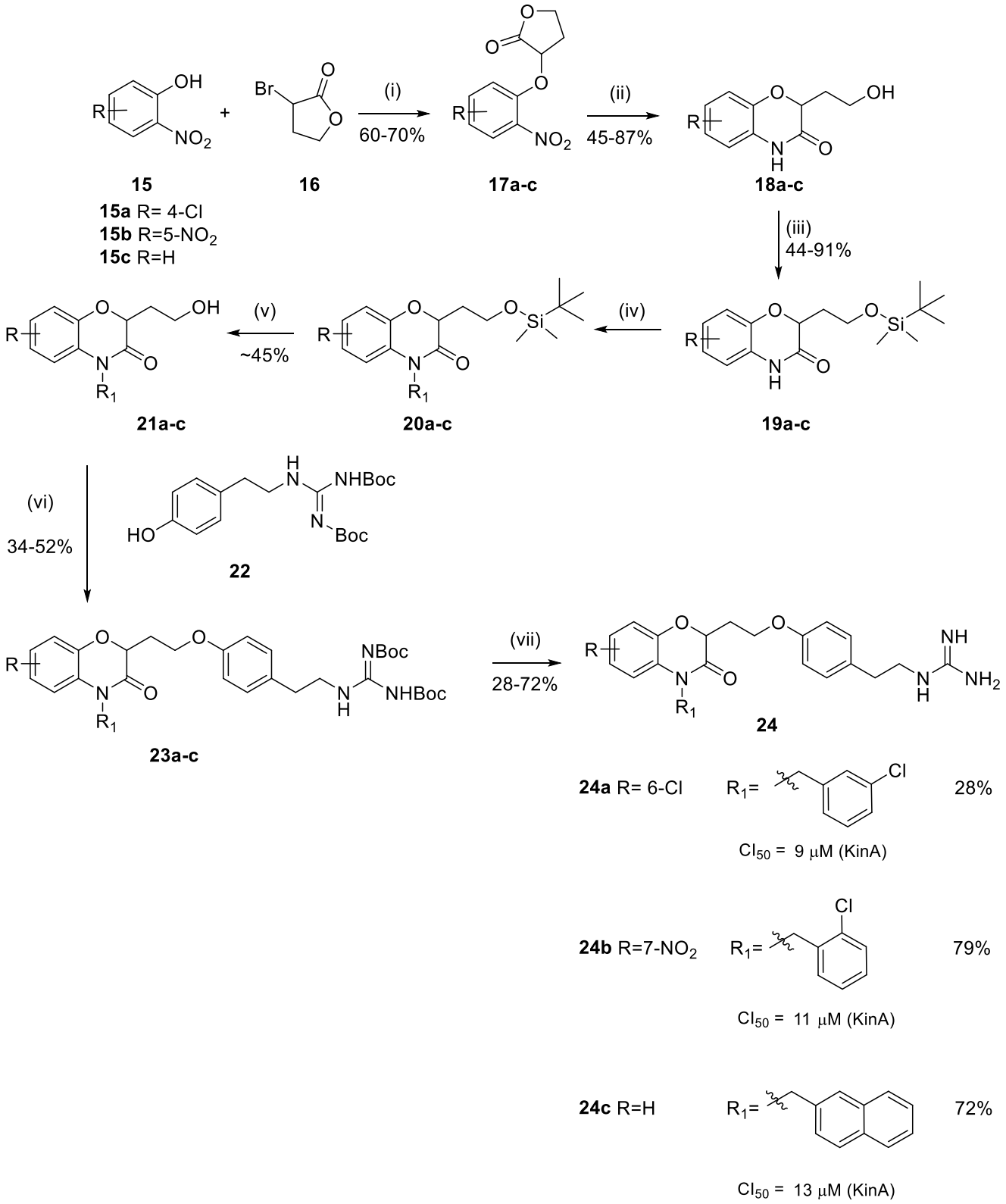


Schéma 3 : Synthèse des composés **24a**, **24b** et **24c**
(i) K_2CO_3, DMF, TA ; (ii) H_2, Pd/C, EtOH ou $NaBH_4$, $NiCl_2.6H_2O$, MeOH ; (iii) Chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle, imidazole, DMF, N_2 ; (iv) NaH, R_1Cl, DMF ; (v) Fluorure de tetrabutylammonium [1 M], THF, TA ; (vi) *n*-Bu_3P, ADDP, Benzène, 0°C ; (vii) HCl, iPrOH, TA.

4. La famille des salicylanilides

En 1998, Hlasta et ses collaborateurs ont trouvé par criblage que l'agent vétérinaire Closantel **27a** et l'un de ses analogues, le 3,3',4',5-tétrachlorosalicylanilides **27b** appartenant tous les deux à la famille des salicylanilides (Figure 7), pouvaient inhiber l'autophosphorylation de KinA/Spo0F avec une CI_{50} de 3,8 µM et de 45 µM, respectivement (Tableau 2, p.62).[49]

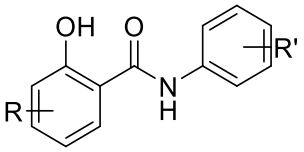


Figure 7 : Structure générale des salicylanilides

À partir de cette étude, 12 nouveaux analogues de **27a** et de **27b** ont été synthétisés afin d'évaluer la relation structure-activité. Ils ont constaté que le remplacement des halogènes sur le cycle salicyloyle par des atomes de chlore (**27c**) ou des atomes d'iode (**27d**) (CI_{50} de 4,8 µM et 22 µM respectivement) permettait d'obtenir des valeurs de CI_{50} sur KinA/Spo0F voisines, voire meilleures que celle obtenues avec **27a** et **27b** (CI_{50} de 3,8 µM et de 45 µM) (Tableau 2, p.62).

Ils ont utilisé la méthode décrite en 1977 par Janssen[50] et ses collaborateurs pour synthétiser les composés **27a-d**. Ces composés ont été préparés par une réaction d'acylation d'une amine **25** avec les chlorures d'acide **26** correspondants, dans le 1,4-dioxane, pour conduire aux composés **27a-d** avec un rendement variant de 45 à 91% (Schéma 4).[49,50]

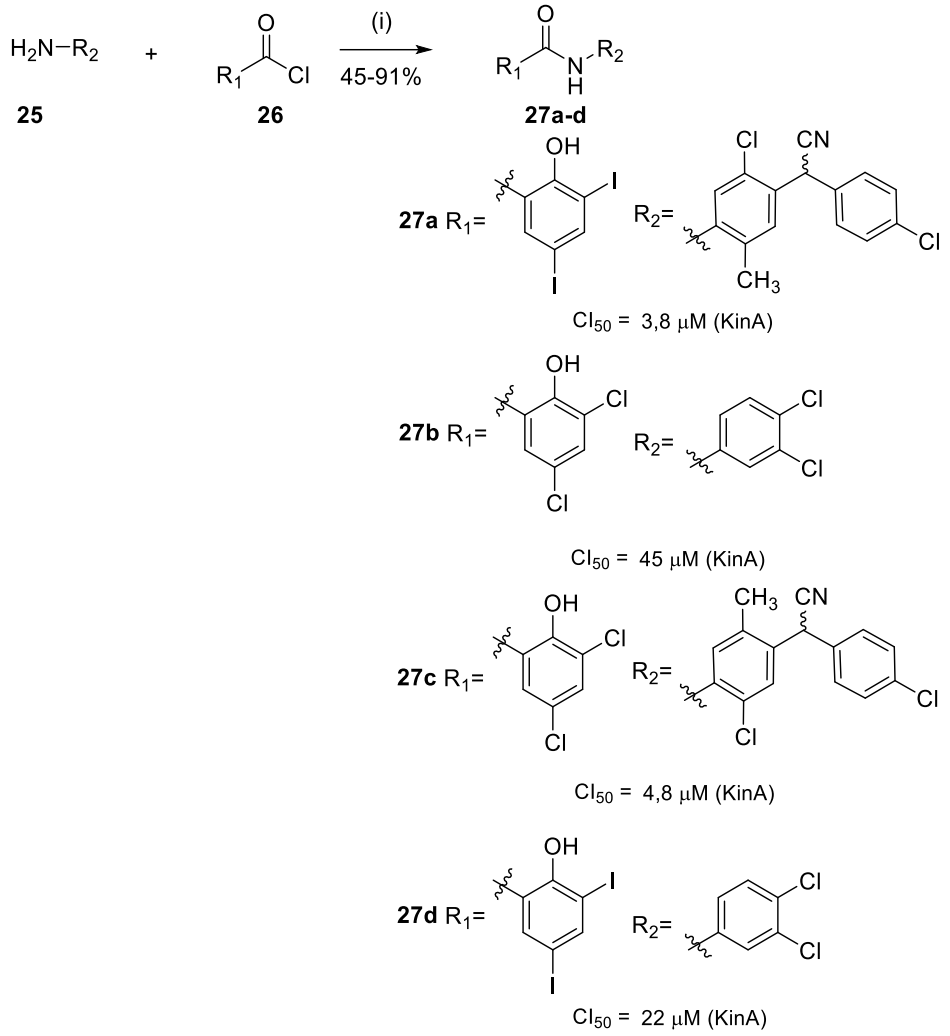


Schéma 4 : Synthèse des composés **27a-d**
(i) 1,4-dioxane, 50°C.

Néanmoins, les salicylanilides pourraient interagir avec la phosphorylation des mitochondries, ce qui peut être problématique pour les cellules de mammifères. En 1998, Macielag et ses collaborateurs ont essayé de surmonter cet effet secondaire indésirable. Ils ont développé deux séries d'analogues de chaque composé. Au total, 22 dérivés de **27a** et de **27b** ont été synthétisés par acylation comme décrit ci-dessus avec de légères modifications.[51] Les salicylanilides **31** sont synthétisés en deux étapes. Tout d'abord, le composé **28**, en présence de chlorure d'oxalyle et de DMF catalytique conduit à un chlorure d'acyle intermédiaire **29** qui est utilisé sans purification et qui réagit avec l'aniline **30** appropriée en présence de pyridine pour conduire aux salicylanilides **31**. Aucun rendement n'est indiqué pour cette étape. Enfin, les salicylanilides déprotégés souhaités **32a** et **32b** sont obtenus par déméthylation des groupes méthoxy avec du chlorhydrate de pyridinium avec des rendements respectifs de 10% et de 20% (Schéma 5).[51]

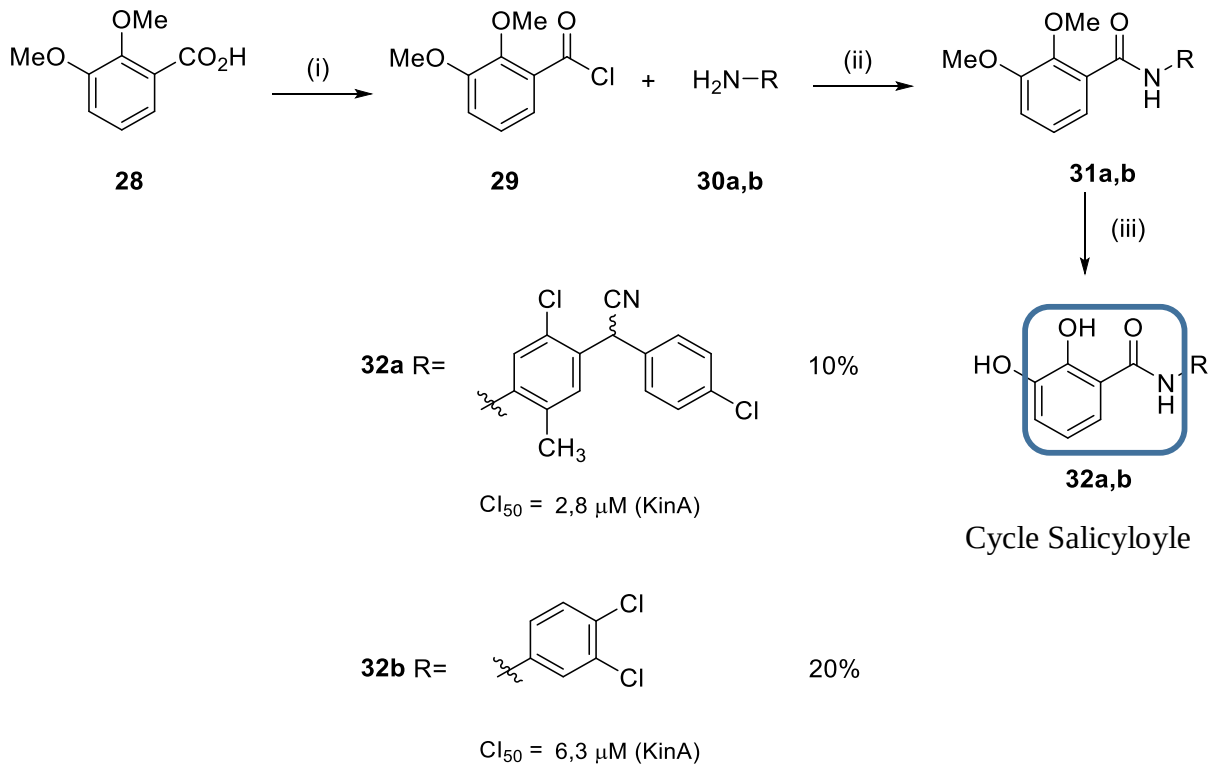


Schéma 5 : Synthèse des composés **32a,b**
(i) $(COCl)_2$, 60 °C ; DMF (cat.), THF ; (ii) Pyridine, THF, 50 °C ; (iii) Chlorohydrate de pyridinium, 190 °C.

Les auteurs ont montré que la présence de substituants volumineux (*tert*-butyle, méthoxy) sur le cycle salicyloyle réduisait ou supprimait complètement l'activité. De ce fait, la substitution du cycle salicyloyle par des groupes hydroxy (conduisant aux catéchols **32a-b**) a permis d'améliorer l'activité inhibitrice sur KinA/Spo0F avec une CI_{50} de 2,8 à 6,3 µM.[51]

5. La famille des diphényltriazoles

Les séries de diphényltriazole (Figure 8) ont été développées par Sui et ses collaborateurs en 1998 et ont été conçues à partir des dérivés de salicylanilide présentés précédemment, afin d'améliorer l'activité biologique et d'éviter les propriétés oxydantes de la série des salicylanilides.[52] Les triazoles (Figure 8) ont été choisis en raison de leur similarité structurelle avec la liaison amide, de leur solubilité dans l'eau relativement plus élevée et de leur aptitude à créer des liaisons hydrogène.[53,54]

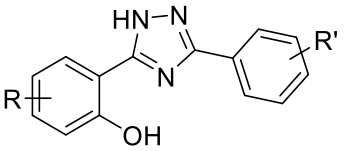


Figure 8 : Structure générale des dérivés de diphényltriazole

Sui et ses collaborateurs ont synthétisé 17 dérivés de triazole des composés **27a** et **27b** afin d'éviter les effets indésirables observés dans la série des salicylanilides. Cependant, seules deux molécules **36a** et **36b** ont présenté une inhibition compétitive par rapport à celles obtenues avec les salicylanilides **27a** et **27b**. Les triazoles **36a** et **36b** ont inhibé KinA/Spo0F avec une CI_{50} de 8 µM et de 16 µM respectivement (Tableau 2, p.62) et NR_{II}/NR_{I} avec une CI_{50} de 28 µM et de 65 µM respectivement (Tableau 2, p.62).[52]

Les diphényltriazoles **36** ont été synthétisés par la voie indiquée sur le schéma 6. Les intermédiaires **35** sont préparés par *O*-acylation de salicylanilides **33** avec des chlorures de benzoyle **34** en présence de pyridine dans du xylène à reflux. Aucun rendement n'est indiqué pour cette étape. Ensuite, la préparation des triazoles **36a** et **36b** est effectuée par ouverture du noyau benzoxazinone **35** en présence d'hydrazine suivi par une cyclisation avec un rendement compris entre 40% et 70%.[52] (Schéma 6)

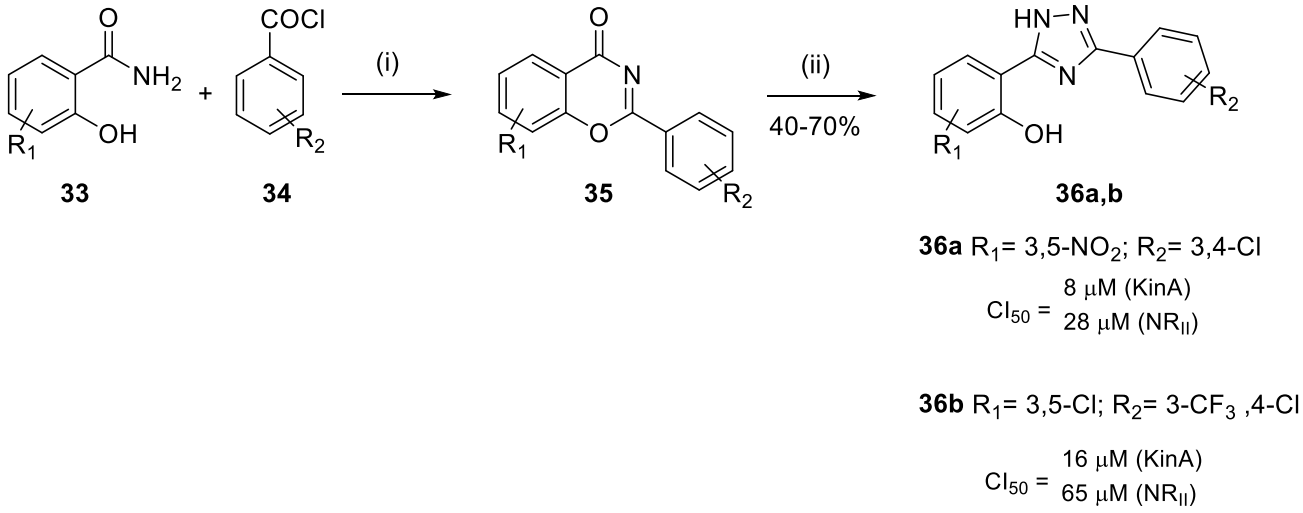


Schéma 6 : Synthèse des diphényltraizoles **36a,b**
(i) Pyridine, Xylène ; (ii) NH_2NH_2, EtOH

6. La famille des analogues d'acides anacardiques : 6-oxa isostères

En 1999, Kanojia et ses collaborateurs ont décidé d'étudier des analogues acides anacardiques pour déterminer leur activité inhibitrice sur les protéines HK (Figure 9). Les acides anacardiques sont des composés naturels présents dans les plantes et dans la coque des noix de cajou. Des études antérieures avaient montré que les acides anacardiques présentaient une activité antibactérienne sur plusieurs bactéries à Gram positif mais leur mécanisme d'action était inconnu. Kanojia a émis l'hypothèse que son activité était due à l'inhibition des TCS.[55]

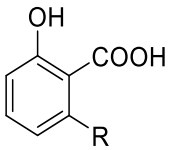


Figure 9 : Structure générale des acides anacardiques

Au total, 17 nouveaux inhibiteurs potentiels de HK, analogues d'acides anacardiques, ont été synthétisés, mais seules trois molécules **40a**, **40b** et **40c** ont présenté les résultats les plus prometteurs en tant qu'inhibiteurs de TCS sur les systèmes KinA/Spo0F avec une CI_{50} de 2,2 µM, de 3,0 µM et de 4,4 µM respectivement (Tableau 2, p.62). Ils ont également évalué ces composés sur des TCS NR_{II}/NR_{I} et les composés **40a**, **40b** et **40c** ont également présenté une activité inhibitrice avec une CI_{50} de 5,0 µM, de 1,5 µM et de 17 µM, respectivement.[55]

La synthèse des composés **40a-c** est décrite dans le Schéma 7. L'ester **38** est obtenu à partir de l'acide γ-résorcyclique **37** par estérification dans le méthanol en milieu acide. Aucun rendement n'est indiqué pour cette étape. Les réactions de Mitsunobu pour la mono-*O*-alkylation sélective de l'ester γ-résorcylique **38** conduisent à l'alkoxy-2-hydrobenzoate **39** avec un rendement variant de 15 à 55%. Enfin, les composés **39** ont été déprotégés par saponification du groupe ester pour obtenir les composés **40** avec un rendement compris entre 45 et 95% (Schéma 7).[55]

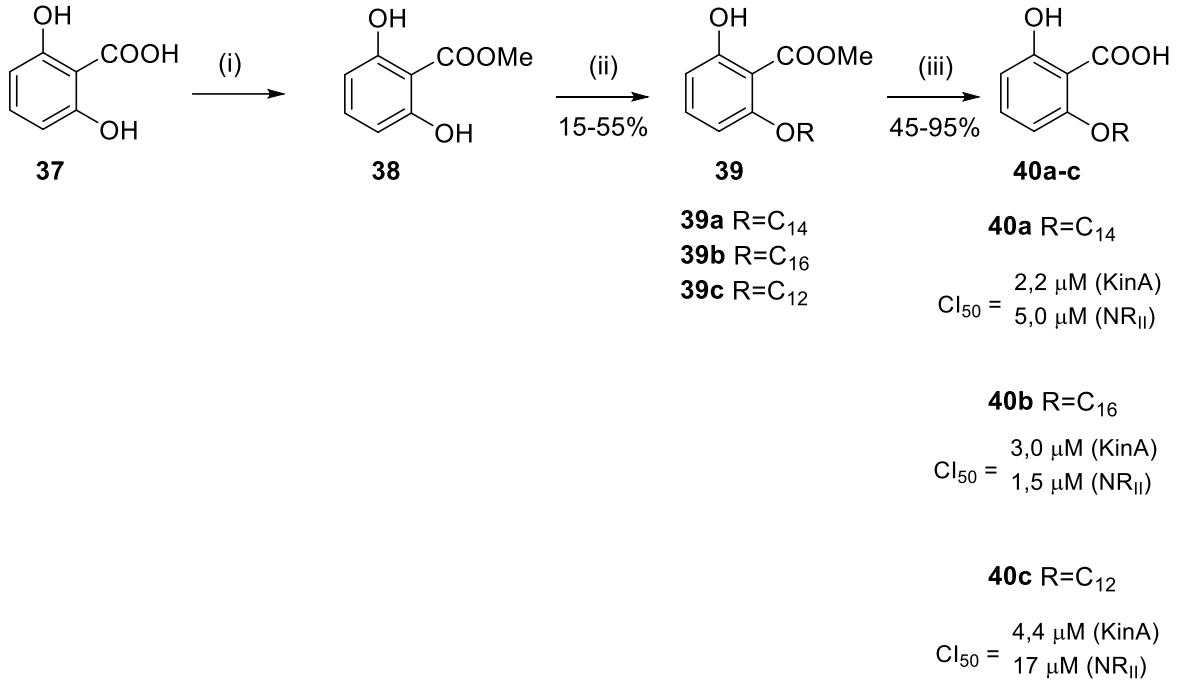
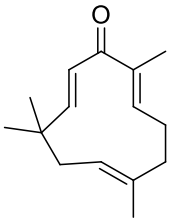


Schéma 7 : Synthèse des composés **40a-c**
(i) MeOH, H_2SO_4 ; (ii) DEAD, PPh_3, R-OH, THF ; (iii) KOH/EtOH, reflux.

7. La famille des dérivés terpéniques

En 1999, Yamamoto et Kitayama se sont intéressés au zerumbone **41** (Figure 10), un composé naturel présent dans le gingembre sauvage. Il a déjà été signalé que le zerumbone présentait diverses activités biologiques comme anticancéreux, inhibiteur du VIH, anti-inflammatoire et régulateur de la croissance des plantes. Yamamoto et Kitayama ont émis l'hypothèse que le zerumbone pourrait présenter aussi une activité biologique antibactérienne. Ce groupe a mis au point une méthode simple pour isoler cette molécule naturelle par distillation à la vapeur et recristallisation, ce qui a permis de déduire une structure cristallographique de la molécule **41**.[56]



41

Figure 10 : Structure de zerumbone **41**

Par la suite, ils ont synthétisé un grand nombre de dérivés de zérumbone qui ont été évalués comme nouveaux agents antibactériens.

En 2001, Kitayama et ses collaborateurs ont développé 100 dérivés du zerumbone **41**. En revanche, la voie de synthèse n'est pas décrite dans l'article.[57] Les dérivés du zérumbone ont été évalués comme inhibiteurs de l'autophosphorylation de deux histidines kinases : EnvZ et PhoQ. Les dérivés du zerumbone **41** ne présentaient pas d'activité inhibitrice des protéines HK. Néanmoins, un seul dérivé de cycle ouvert, **43** de configuration determinée (E/Z = 3/2 par ^{1}H RMN), inhibe sélectivement ces deux kinases, mais les valeurs d'inhibition ne sont pas reportées dans cet article. Au même moment, Yamamoto et ses collaborateurs ont trouvé que le même composé **43** (E/Z = 3/2) présentait également une activité inhibitrice sur l'autophosphorylation de YycG/YycF avec une CI_{50} de 750 µM.[42,57]

Pour synthétiser ces composés, la bromation régiospécifique d'une double liaison du zérumbone **41** est réalisée pour conduire au composé **42** avec un rendement de 95%. L'ouverture du cycle et la déshydrobromation de **42** en présence d'une solution aqueuse de KOH et de α-cyclodextrine conduit au composé **43** avec un rendement de 90% (C10, 10E/10Z = 3/2) (Schéma 8).[57]

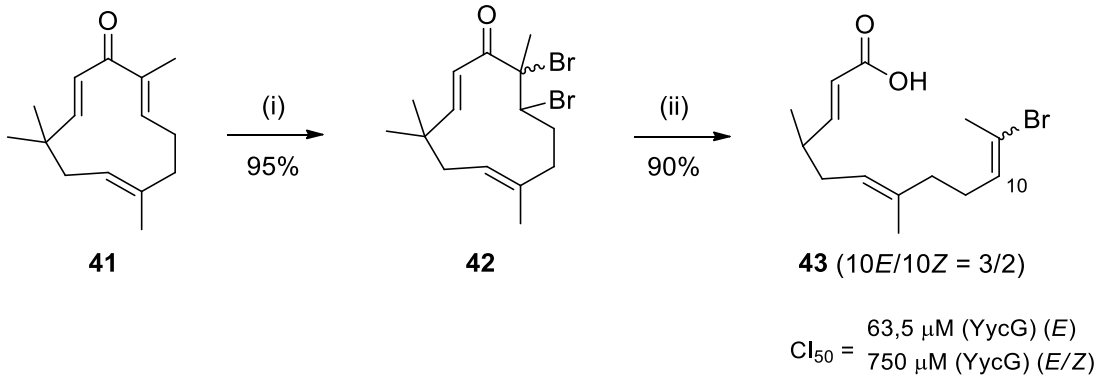


Schéma 8 : Synthèse du composé **43**
(i) Br_2, CCl_4 ; (ii) KOH aqueux, α-cyclodextrine, CH_3CN.

Les travaux sur une nouvelle série de dérivés ouverts ont été poursuivis. En 2004, Kitayama et ses collaborateurs ont isolé l'isomère (*E*)-**43**[58] et ils ont évalué l'activité inhibitrice de chaque isomère sur YycG/YycF. Ils ont remarqué que **43** de configuration *E* présentaient une activité inhibitrice supérieure à celle du mélange *E*/*Z* sur YycG/YycF avec une CI_{50} de 63,5 µM.[42,58,59] Néanmoins, le composé (*E*)-**43** et le zérumbone **41** ne présentaient pas de bonnes propriétés antibactériennes car les molécules n'arrivaient pas à pénétrer la paroi cellulaire. Par conséquent, Kitayama et ses collaborateurs ont décidé, en 2007, de développer une nouvelle série de dérivés de la molécule

(*E*)-**43** dans le but d'améliorer l'activité antibactérienne. De ce fait, 17 dérivés d'acides aminés (AA) **47** (Figure 11) ont été synthétisés en suivant la voie de synthèse décrite dans le Schéma 9.

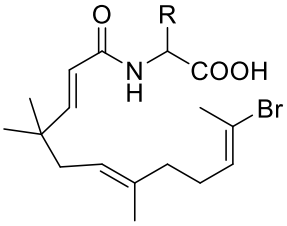


Figure 11: Structure générale des analogues de Zérumbone

Le composé (*E*)-**43** réagit avec $SOCl_2$ dans CCl_4 pour conduire au chlorure d'acyle **44**. Le composé **44** est utilisé sans aucune purification dans l'étape suivante. Le chlorure d'acide **44** réagit avec les amines **45** en présence de pyridine dans CH_3CN, pour conduire aux amides **46** avec un rendement compris entre 33% et 92%. La fonction ester méthylique des composés **46** a été saponifiée avec une solution aqueuse de NaOH dans de l'acétonitrile pour obtenir les dérivés d'acide carboxylique **47** correspondants après acidification avec un rendement variant de 32 à 99% .[59] (Schéma 9)

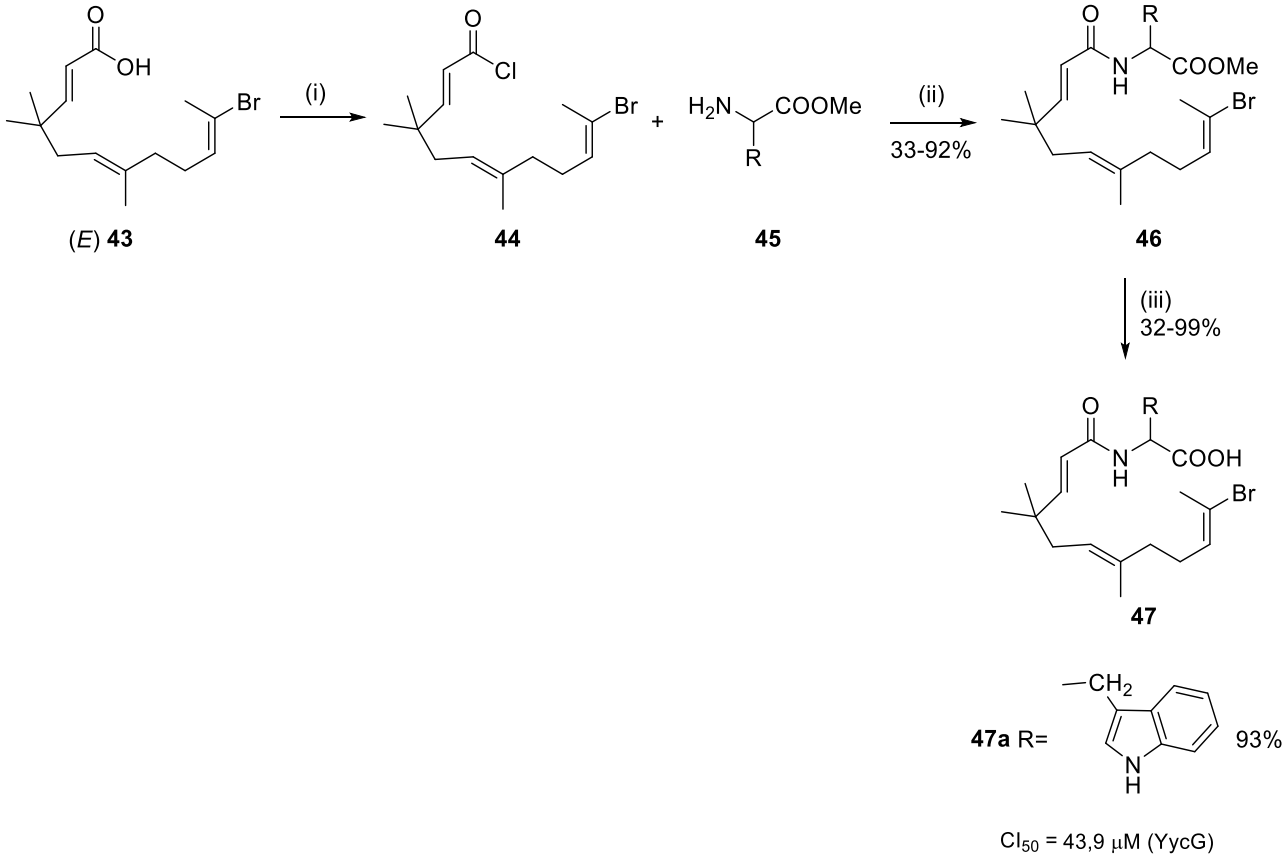
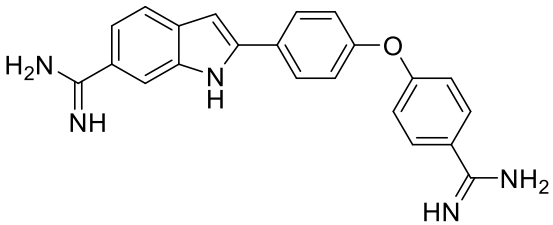


Schéma 9 : Synthèse du composé **47a.**
(i) $SOCl_2$, CCl_4 ; (ii) pyridine, CH_3CN, TA, 24h ; (iii) NaOH (aq), CH_3CN, TA, 18h.

Ces dérivés ont été évalués pour l'inhibition de l'autophosphorylation de HK (YycG/YycF). Sur l'ensemble des 17 dérivés AA synthétisés, le tryptophane **47a** substitué était le seul dérivé présentant une activité inhibitrice sur YycG/YycF avec une CI_{50} de 43,9 µM (Tableau 2, p.62) légèrement supérieure à celle de (*E*)-**43**.[59]

8. La famille des benzimidazoles et des benzoxazoles

En 2000, Weidner-Wells et ses collaborateurs ont identifié, par des études de criblage, l'indole **48** (Figure 12) comme inhibiteur principal du KinA/Spo0F avec une CI_{50} de 31 µM. Il a été signalé que cette classe de molécules avait des propriétés antibactériennes et antifongiques et qu'elle était structurellement apparentée à la classe des ligands de l'ADN bisbenzamidine.



48

CI_{50} = 31 µM (KinA)

Figure 12 : Structure de l'indole **48**

Afin d'éviter la liaison à l'ADN due à la similarité avec la bisbenzamidine, Weidner-Wells et ses collaborateurs ont développé une série de dérivés d'indole pour étudier la relation structure-activité comme inhibiteur de HK.[60]

Dans un premier temps, ils ont conçu une matrice simplifiée de la molécule **48** par suppression d'un des deux groupes amidine pour réduire la liaison potentielle avec l'ADN. Ceci a conduit à la molécule **49** et l'activité inhibitrice de KinA/Spo0F a été augmentée avec des valeurs CI_{50} autour de 7,7 µM.[60] (Figure 13)

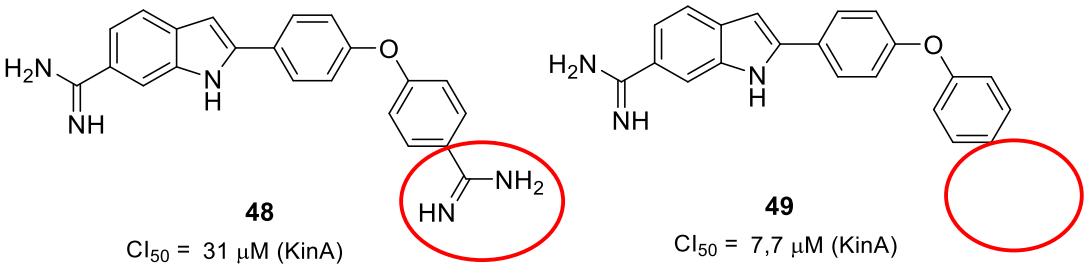


Figure 13 : Structure de l'indole **49**

Cependant, ils n'ont pas synthétisé la série des indoles en raison des faibles rendements, de ce fait ils ont préféré développer les dérivés du benzimidazole **52** (Figure 14) dont la synthèse s'effectue en une seule étape avec des bons rendements.

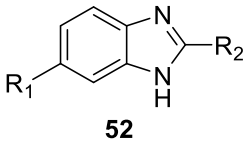


Figure 14 : Structure générale des benzimidazoles

Les composés **52** ont été synthétisés en une seule étape de réaction par condensation du produit d'addition bisulfitique du benzaldéhyde substitué **51** avec de la benzène-1,2-diamine substituée **50** dans de l'EtOH avec un rendement de 44%.[60,61] (Schéma 10)

Plusieurs stratégies ont été entreprises pour évaluer les relations structure-activité, telles que le raccourcissement de la chaîne latérale, le changement de substituants sur le cycle phényle ainsi que la substitution au niveau du cycle benzimidazole. Seules 6 molécules (**52a-f**) présentent de bons résultats en tant qu'inhibiteurs de l'histidine kinase KinA. L'analogue **52a** de la molécule **49** était moins puissant avec une CI_{50} = 42 µM (Tableau 2, p.62). Cependant, l'introduction de groupes volumineux tels que les groupes diphénylamino, *tert*-butyle ou hydroxyle a augmenté l'activité inhibitrice de la HK jusqu'à une CI_{50} = 17 µM (**52b**), 12 µM (**52c**) et 6 µM (**52d**) respectivement sur KinA/Spo0F (Tableau 2, p.62). En ce qui concerne la substitution du cycle benzimidazole, comme démontré par les composés **52e** (CI_{50} = 10 µM) et **52f** (CI_{50} = 10 µM) (Tableau 2, p.62), la présence d'atomes capables de former des liaisons hydrogène est essentielle, notamment la présence d'un atome d'azote. Ces résultats ont montré que la présence de groupement hydrophobes ainsi que des groupements capables de former des liaisons hydrogène amélioreraient les activités inhibitrices des composés benzimidazoles.

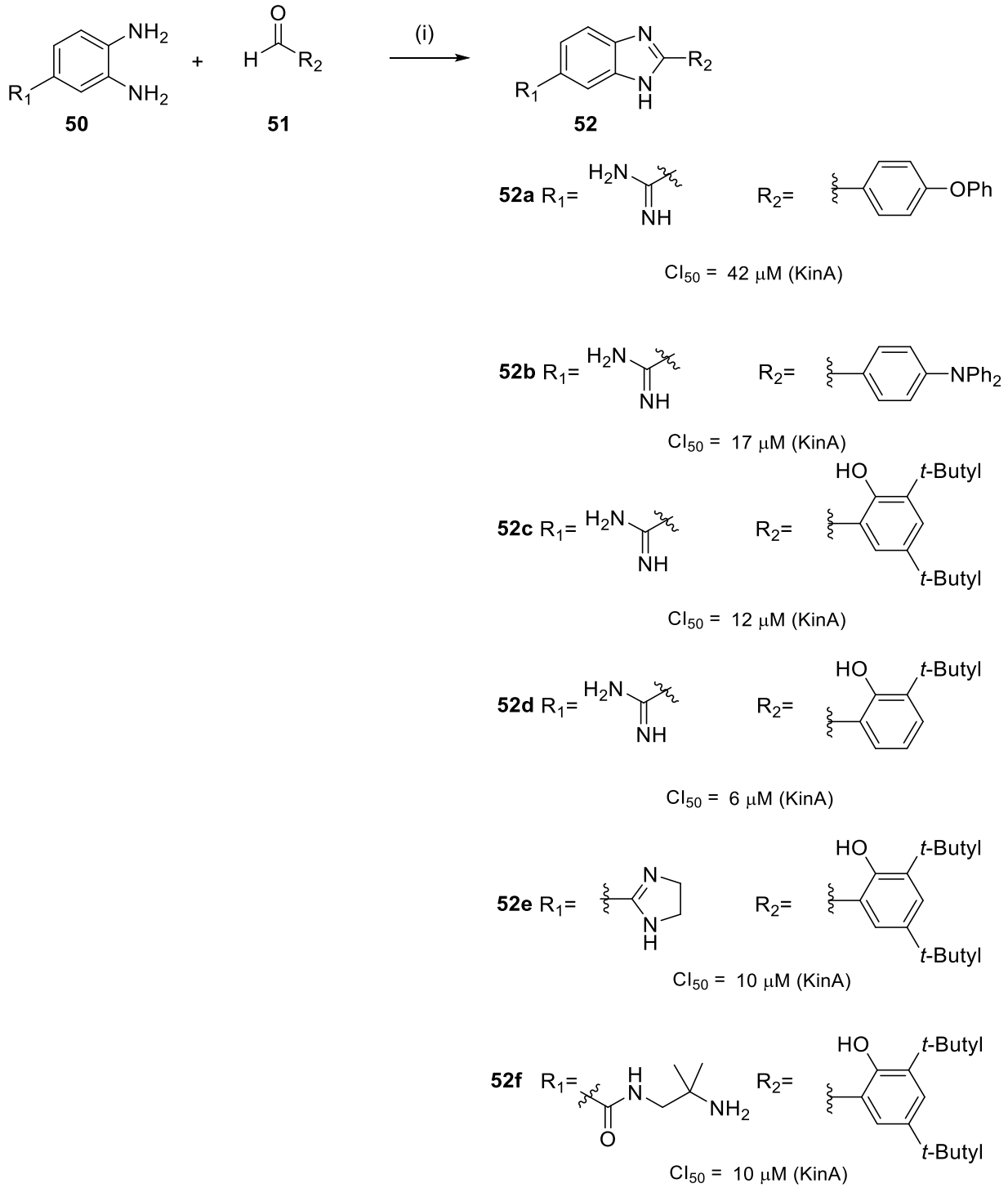


Schéma 10 : Synthèse des composés **52a-f**
(i) 40% aq $NaHSO_3$, EtOH, 80°C.

Dans un deuxième temps, les auteurs ont décidé de remplacer le noyau benzimidazole par un noyau benzoxazole (Figure 15) afin d'évaluer l'importance de l'hétérocycle ; la synthèse est représentée dans le schéma 11.

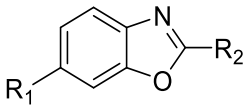


Figure 15 : Structure générale des benzoxazoles

La réduction du groupement nitro du composé **53** par le formiate d'ammonium en présence de Pd/C dans le THF conduit à **54** avec un rendement de 94%. La fonction amine du composé **54** réagit avec des chlorures d'acides benzoïques dans le 1,4-dioxane pour conduire aux dérivés **55** avec un rendement variant de 90% à 95%. La fonction amide du composé **55** est ensuite cyclisée en benzoxazole **56** avec du *p*-toluènesulfonate de pyridinium (PPTS) dans du xylène à reflux pour conduire au composé **56** avec un rendement variant de 75 à 80%. Enfin, les amidines **57** sont obtenues par aminolyse des composés **56**, dans des conditions acides, avec un rendement variant de 65 à 75%.[60] (Schéma 11)

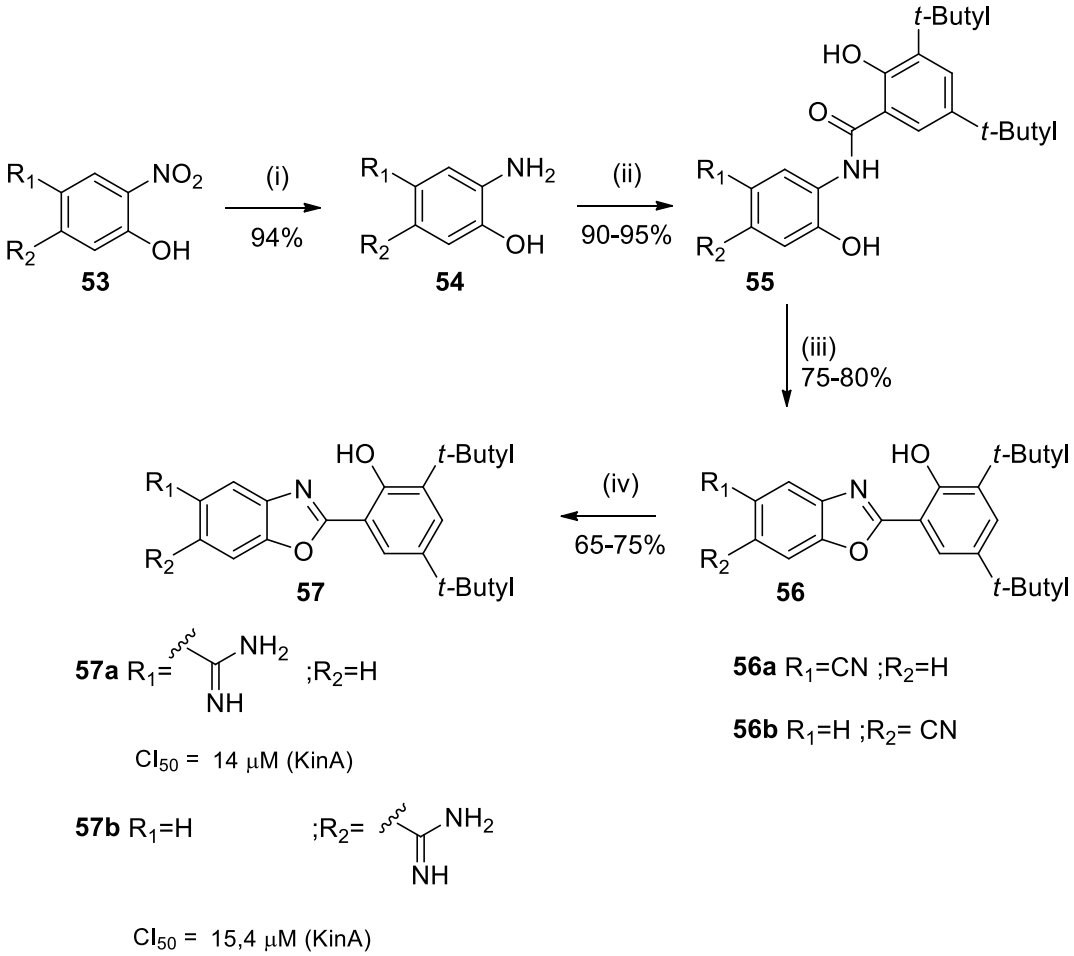


Schéma 11 : Synthèse des composés **52a,b**
(i) $NH_4OC(O)H$, Pd/C, THF ; (ii) ArC(O)Cl, 1,4-dioxane, 100°C ; (iii) PPTS, xylènes, reflux ; (iv) HCl/EtOH, 0°C ; NH_3/EtOH, reflux ; [1 M] HCl.

Le benzimidazole **52c** (12 µM) et les benzoxazoles **57a** (14 µM) et **57b** (15,4 µM) (Tableau 2, p.62) ont présenté une activité inhibitrice comparable sur KinA/Spo0F, indiquant ainsi que la fonction amine NH de la série des benzimidazoles **52** n'est pas essentielle à l'activité.

9. La famille des sulfonamides

En 2008, un criblage de 150 000 molécules a été effectué par Rasko et ses collaborateurs, pour trouver un inhibiteur spécifique du TCS QseC/QseB (également impliqué dans l'expression du facteur de virulence).[62] Parmi toutes les molécules évaluées, seuls 75 composés ont présenté une activité inhibitrice (CI_{50}) égales ou inférieure à 10^{-5} M. Les dérivés ont été synthétisés en utilisant la voie de synthèse générale présentée dans le schéma 12, mais ici, seule la synthèse du *N*-phényl-4 (3-phénylthiouréido) benzènesulfonamide (LED 209) **62** sera décrite. 5 pM du composé **62** pourrait inhiber l'autophosphorylation de QseC.[62,63] Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) du composé **62** ne sont pas indiquées dans l'article. Le composé **62** n'a eu aucune toxicité chez la souris et n'a pas interféré avec les récepteurs β-adrénergiques humains.

Le chlorure de *N*-acétylsulfanilyle **58** réagit avec l'aniline **59**, en présence d'acétate de sodium, pour conduire au composé **60** avec un rendement de 60%. L'hydrolyse de l'acétamide **60** a été effectuée dans EtOH dans des conditions acides fortes pour conduire au composé **61** avec un rendement de 65%. Enfin, le composé **61** réagit avec la triéthylamine et l'isothiocyanate de phényle dans le THF, conduisant au composé **62** (LED 209) avec un rendement de 35%. [62,64] (Schéma 12)

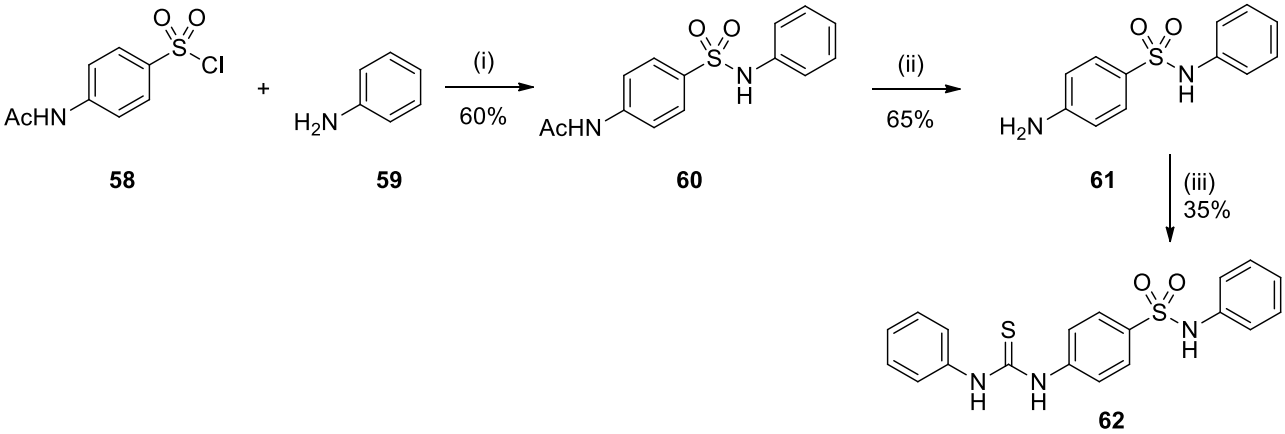


Schéma 12 : Synthèse du composé **62**
(i) CH_3CO_2Na, TA ; (ii) [6 M] HCl, reflux ; (iii) NEt_3, Ph-NCS, reflux.

10. La famille des thiazolidiones

En 2006, Qin et ses collaborateurs ont identifié des inhibiteurs potentiels de YycG/YycF en utilisant un criblage virtuel. Ils ont découvert sept inhibiteurs appartenant à différentes classes de structures chimiques: trois dérivés de la famille des thiazolidiones (Figure 16), deux dérivés de la famille des benzamides et un dérivé du furane.

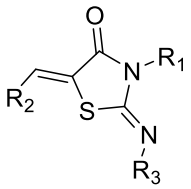


Figure 16 : Structure générale des thiazolidiones

D'une part, ils ont démontré que les thiazolidiones **63** (29 µM) et **64** (14 µM) inhibaient l'autophosphorylation de YycG/YycF (Tableau 2, p.62), ils ont également une activité antibactérienne puissante et exercent une activité anti-biofilm sur *S. epidermidis* (bactéries pouvant former des biofilms dans les dispositifs médicaux si elles étaient présentes). D'autre part, ils ont évalué l'activité hémolytique et la cytotoxicité sur les cellules de mammifères et les thiazolidiones **63** et **64** n'ont montré aucune toxicité.[65] (Figure 17)

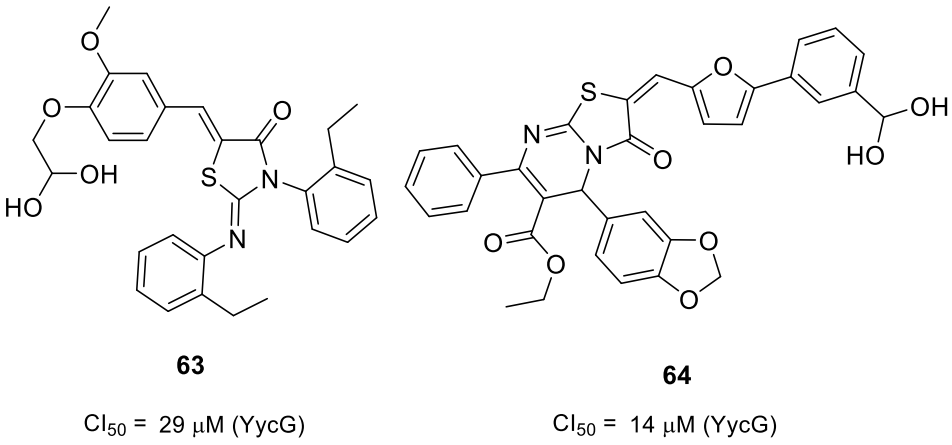


Figure 17 : Structure des molécules **63** et **64.**

Ces inhibiteurs sont considérés comme des composés prometteurs pour la mise au point de nouveaux antibactériens.[65] Quelques années plus tard, le même groupe synthétisait des structures similaires à celles des thiazolidiones **63** et **64**.

Deux stratégies différentes ont été développées pour trouver les inhibiteurs de la famille des thiazolidiones les plus efficaces sur le système YycG. (Schéma 13 et Schéma 14)

Tout d'abord, en 2010 et 2011, Pan et ses collaborateurs ont synthétisé une série d'analogues de la molécule **63** afin d'améliorer l'activité inhibitrice sur YycG/YycF.[66,67] Vingt-quatre dérivés ont été synthétisés à partir de la voie réactionnelle décrite dans le schéma 13 afin d'évaluer les relations structure-activité. En 2012, Huang et ses collaborateurs ont évalué l'activité inhibitrice potentielle de ces molécules. Seules deux molécules **68a** et **68b** ont montré des résultats similaires ou légèrement meilleurs que ceux de **63** avec une CI_{50} de 34,8 µM et de 22,1 µM[68] respectivement (la CI_{50} du composé **63** est de 29 µM[65] sur le système YycG/YycF) (Tableau 2, p.62). Il semble que l'introduction d'un noyau furane sur la double liaison augmenterait la rigidité de la structure et pourrait ainsi stabiliser la thiazolidione dans la poche de liaison.[68]

La synthèse des composés **68a**, **b** a été décrite dans les références (66, 67), bien que les rendements ne soient donnés qu'en référence (67). Une réaction « one-pot » avec les *o*- et *p*- toluidines (R1) **65**, le disulfure de carbone et la triéthanolamine substituée de manière appropriée, catalysée par le lac Sulfur, conduit au 1,3-diarylthiourée **66**. La formation du cycle thiazolidione **67**, à partir des thiourées symétriques di-substituées **66** est réalisée à l'aide d'acide chloracétique et de NaOAc conduisent au composé **67**. Aucun rendement n'est indiqué pour ces deux étapes. Une condensation aldolique de l'arylaldéhyde substitué avec une quantité équivalente de la molécule **67** en utilisant la *β*-alanine dans des conditions acides conduit aux molécules **68a** et **68b** avec des rendements respectifs de 90% et de 93%.[66,67] (Schéma 13)

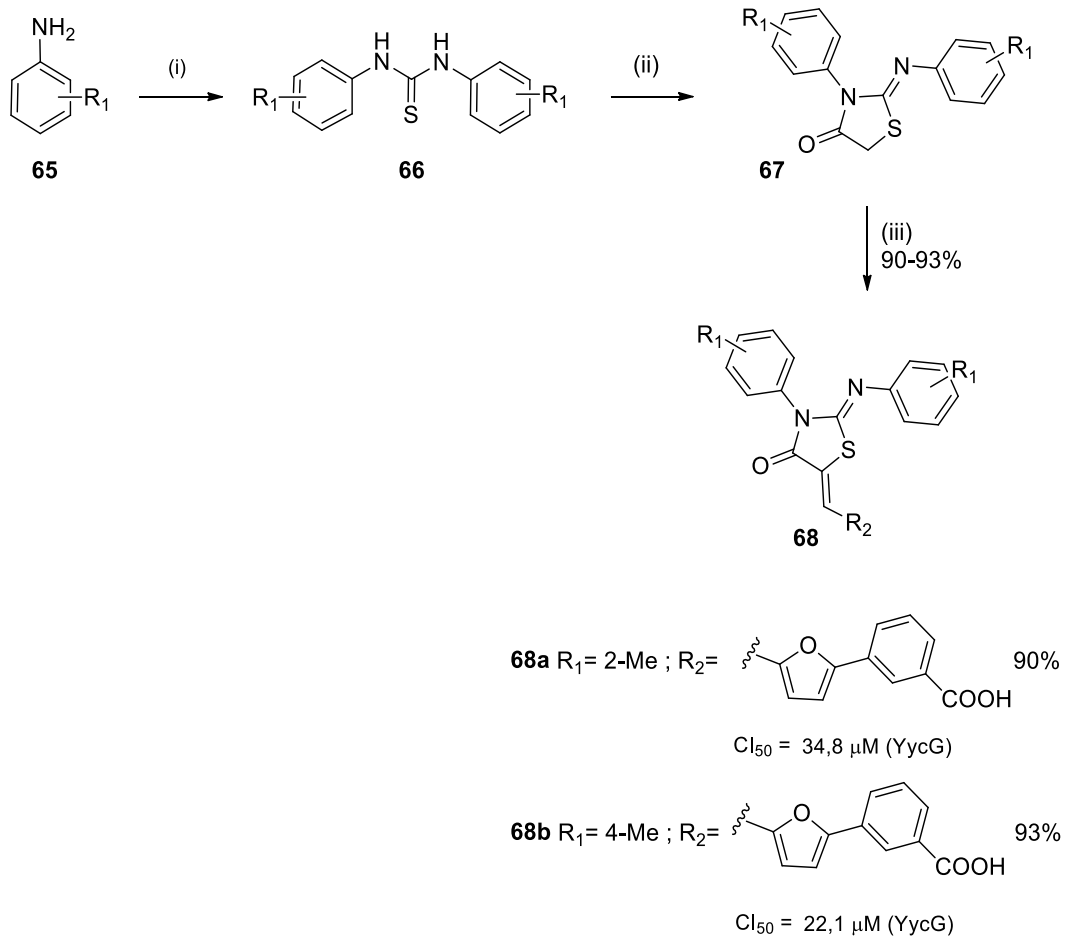


Schéma 13 : Synthèse des composés **68a,b**
(i) CS_2, Lac.Sulfur, triéthanolamine, H_2O, reflux, 6 h ; (ii) $ClCH_2COOH$, NaOAc, EtOH abs, reflux, 10 h, (iii) R_2CHO, *β*-alanine, acide acétique, reflux.

En 2014, Zhao et ses collaborateurs ont poursuivi les travaux sur la famille des thiazolidiones.[65] Suivant la stratégie rationnelle utilisée pour le composé **63**, ils ont dérivé la molécule **64** (CI_{50} = 14 µM sur le système YycG/YycF, Tableau 2, p.62).[65] Ils ont développé une série d'analogues de la molécule **64** afin d'améliorer l'activité inhibitrice du YycG/YycF inspirée des résultats *in silico*.

Afin d'améliorer l'activité biologique, 18 nouveaux dérivés ont été synthétisés avec plusieurs modifications structurelles et différentes substitutions du cycle aromatique.[67] En particulier, l'introduction de l'atome de chlore dans l'un des noyaux phényle a considérablement amélioré l'activité inhibitrice sur YycG/YycF avec une CI_{50} de 12,6 µM (Tableau 2, p.62) avec une activité très similaire, voire meilleure, à celle obtenue avec la molécule **64**.[65,69] La synthèse du composé **74** est décrite dans le Schéma 14.

La synthèse de **72** consiste en une réaction « one-pot » de Biginelli à partir des aldéhydes **69**, de la thiourée **70** et du benzoylacétate d'éthyle **71** qui conduit à la dihydropyrimidine **72**. Aucun rendement n'est indiqué pour cette étape. La cyclisation avec l'acide bromoacétique conduit à la molécule **73** avec un rendement de 72%. Une condensation aldolique de l'arylaldéhyde substitué par catalyse acide, avec un équivalent de **73**, conduit à **74** avec un rendement de 92% .[67] (Schéma 14)

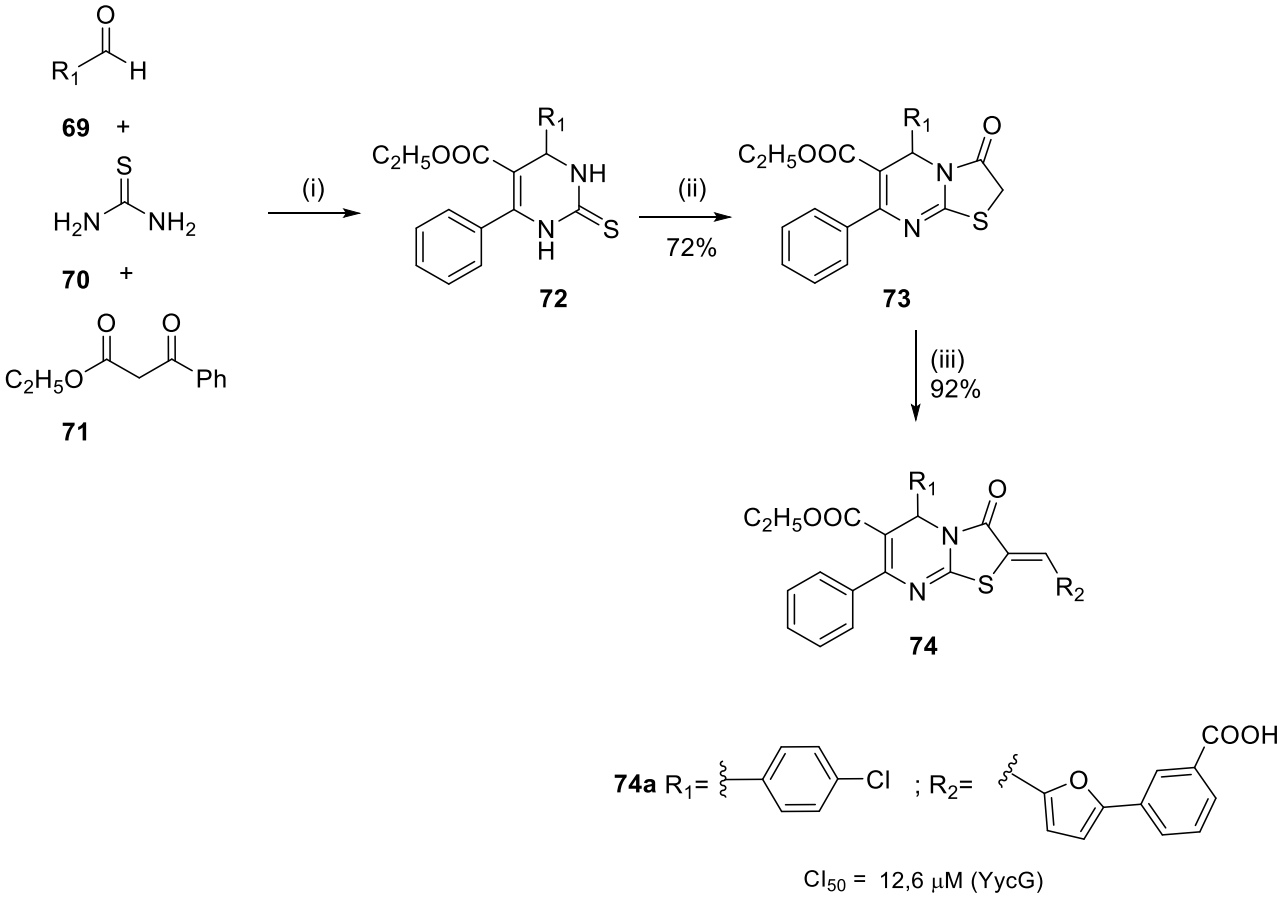


Schéma 14 : Synthèse pour le composé **74a**

(i) $SnCl_2 .2H_2O$, EtOH, reflux ; (ii) Acide bromoacétique, NaOAc, AcOH/Ac_2O, reflux ; (iii) *β*-alanine, acide acétique, reflux.

11. La famille des adénines

En 2015, Wilke et ses collaborateurs ont conçu rationnellement une structure à base d'adénine (Figure 18).[70]

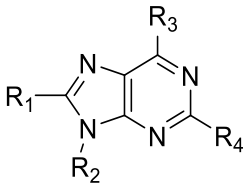
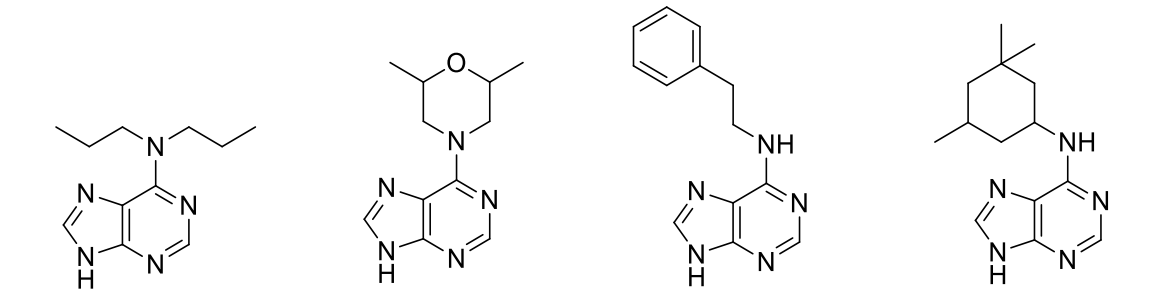


Figure 18 : Structure générale des adénines

Les auteurs ont eu comme stratégie d'inactiver plusieurs HK simultanément pour une activité antibiotique à large spectre (cette partie sera plus détaillée par la suite ; section Chapitre 1, II.A). Tout d'abord, Wilke et ses collaborateurs ont identifié 119 composés potentiellement inhibiteurs de HK853 (*Thermotoga maritima*). Parmi ces 119 composés, seuls neuf étaient capables d'inhiber de multiples protéines HK. Ils ont remarqué que, parmi les neuf, quatre avaient une structure possédant un noyau d'adénine.[70,71] (Figure 19)



CI_{50} = 49,6 µM (HK853) CI_{50} = 95,3 µM (HK853) CI_{50} = 145 µM (HK853) CI_{50} = 131 µM (HK853)

Figure 19 : Structures des molécules **75**, **76**, **77** et **78**.

Cette série de purines avait déjà été décrite comme inhibiteurs potentiels de HK qui rentre en compétition avec l'ATP,[72] ce résultat n'était donc pas surprenant. Sur la base de ce résultat, Goswami et ses collaborateurs ont étudié en 2017 la relation structure-activité de cette série d'adénine. Ils ont évalué la substitution sur le noyau pyrimidine (R_3 et R_4, figure 18), l'addition du ribose (R_2, figure 18) et la substitution d'imidazole (R_1, figure 18). Les meilleurs résultats ont été obtenus par la substitution sur R_3, avec une activité inhibitrice CI_{50} de 7,3 µM (Tableau 2, p.62) pour le composé **81a**.[71,73] Enfin, ils ont montré que la purine **81a** ne présentait aucune activité inhibitrice sur les kinases de mammifère (Ser/Thr, Tyr) et Hsp90, ils ont donc prouvé que leurs composés avaient une bonne sélectivité pour les protéines HK bactériennes.[71]

Pour synthétiser cette classe de molécules, ils ont utilisé la stratégie suivante (Schéma 15). L'adénine **81** est synthétisée par substitution nucléophile de la chloropurine **79** et de l'amine substituée **80** pour obtenir les composés **81** avec des rendements variants de 55 à 85%.[71,72]

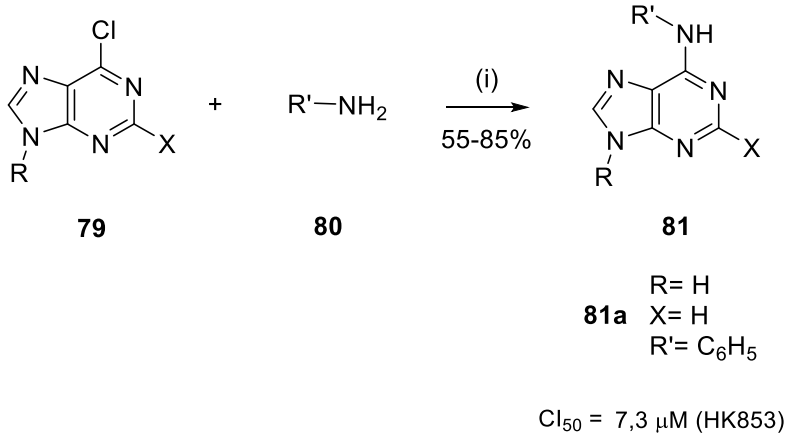


Schéma 15 : Synthèse du composé **81**
(i) EtOH, reflux.

12. La famille des diphénylpyrazoles

En 2017, Vo et ses collaborateurs ont cherché de nouveaux inhibiteurs de HK en utilisant la même homologie structurelle et de séquence dans le pli de Bergerat de HK (détaillée en section II.A.1) et de Hsp90. Leur conception était basée sur six inhibiteurs de Hsp90 disponibles dans le commerce et évalués sur CckA (*Caulobacter crescentus*) qui est essentiel pour contrôler la progression du cycle cellulaire ainsi que pour la transcription de plus de 90 gènes.[74] Ils ont constaté que deux inhibiteurs commerciaux de Hsp90 **82** et **83** (Figure 20) avaient une bonne activité inhibitrice sur CckA avec une CI_{50} de 7,3 µM et de 28 µM respectivement (Tableau 2, p.62).[74]

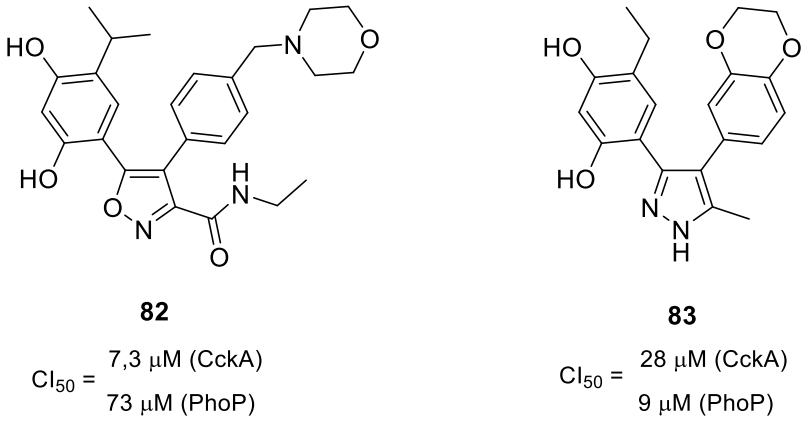


Figure 20 : Structures des composés **82** et **83**

Les deux composés présentaient une similarité structurelle avec un hétérocycle central et deux cycles aromatiques (Figure 21).

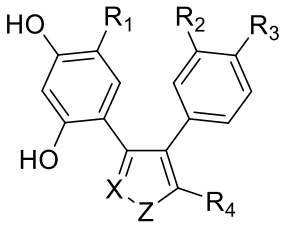
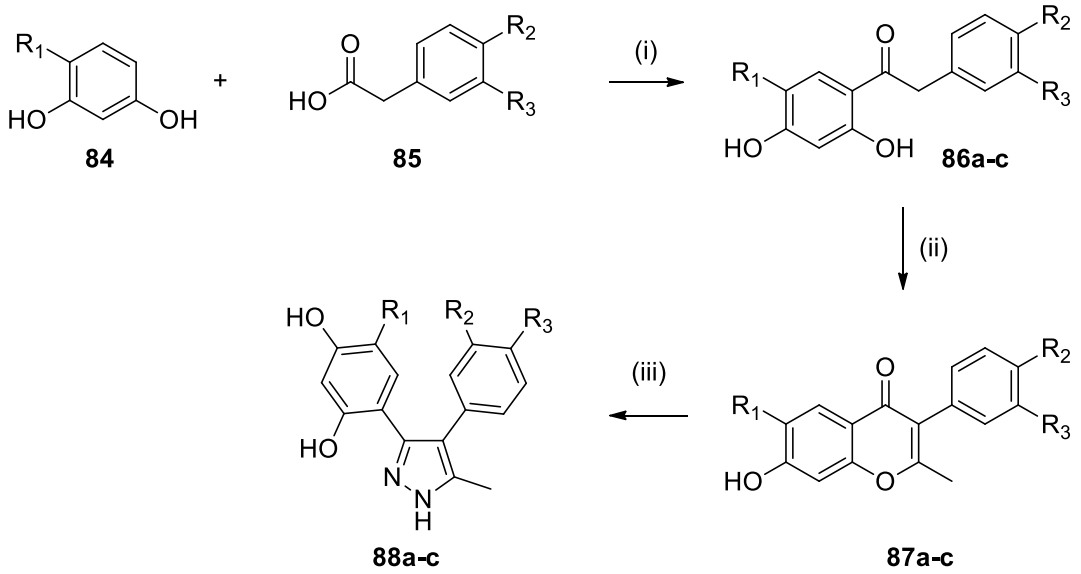


Figure 21 : Structure générale des hétérocycles

Sur la base de cette structure générale, ils ont synthétisé neuf inhibiteurs potentiels de HK et seuls trois composés de pyrazole **88a**, **88b** et **88c** ont présenté une activité inhibitrice sur CckA avec une CI_{50} de 12,3 µM, 17,5 µM et 11,2 µM, respectivement, et sur PhoQ avec une CI_{50} de 66 µM, 45 µM et 35 µM respectivement (Tableau 2, p.62).

La préparation des composés **88a-c** est décrite dans le schéma 16. L'acylation de Friedel-Crafts des résorcinols respectifs **84** et de l'acide phénylacétique substitué **85** en utilisant du diéthylétherate de trifluorure de bore comme catalyseur acide de Lewis, conduit aux dihydroxyphénylcétones correspondantes **86a-c**. Les cétones **86** réagissent avec l'anhydride acétique en milieu basique et conduisent aux isoflavones alkylées **87a-c**. Enfin, les composés **87** sont chauffés en présence d'hydrazine pour conduire aux diaryl pyrazoles **88a-c** souhaités avec un rendement global de 24% (**88a**), de 3% (**88b**) et de 8% (**88c**) sur les trois étapes.[74] (Schéma 16)



88a: R_1= Cl; R_2= OCH_3; R_3= H 24%

CI_{50} = 12,3 µM (CckA)
66 µM (PhoP)

88b: R_1= Cl; R_2= H; R_3= H 3%

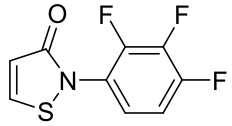
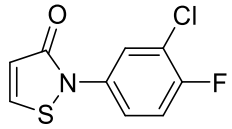
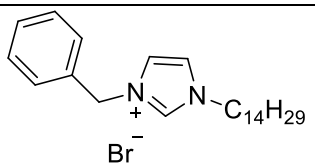
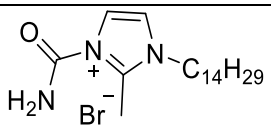
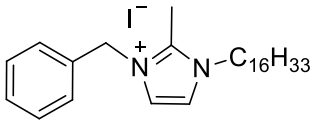
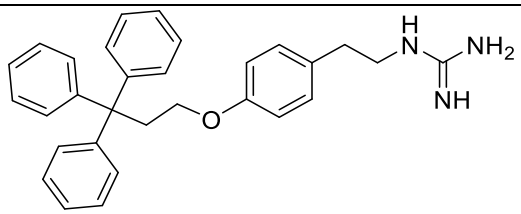
CI_{50} = 17,5 µM (CckA)
45 µM (PhoP)

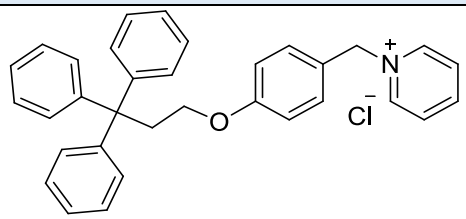
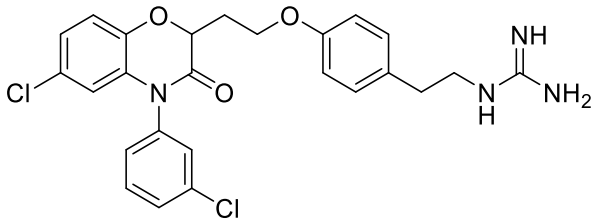
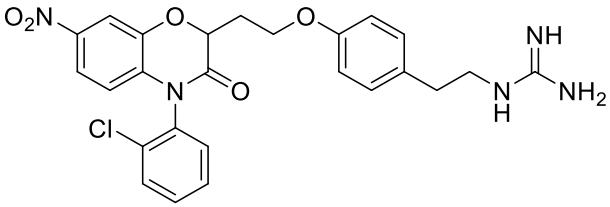
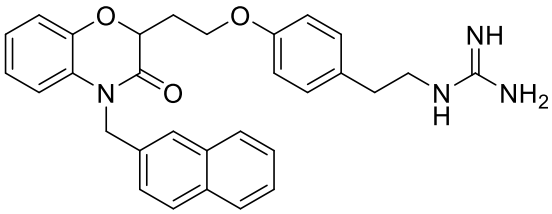
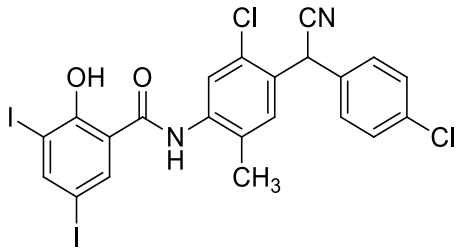
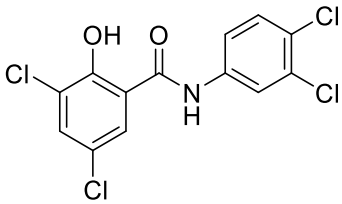
88c: R_1= Cl; R_2,R_3 = OCH_2CH_2O 8%

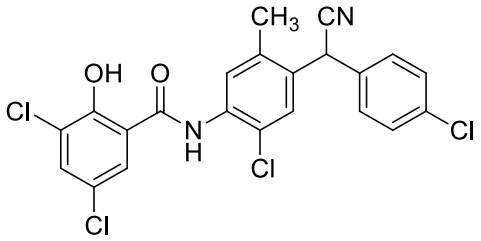
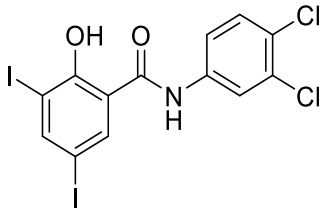
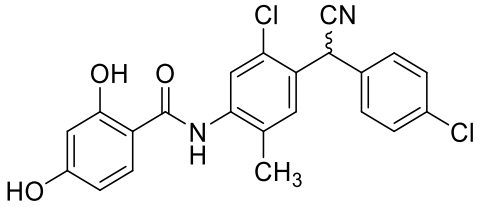
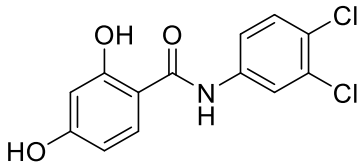
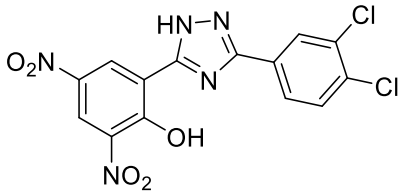
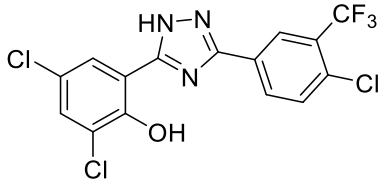
CI_{50} = 11,2 µM (CckA)
35 µM (PhoP)

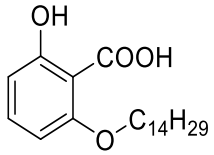
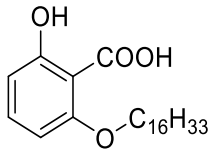
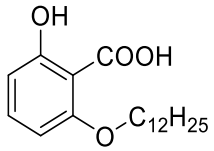
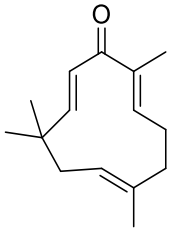
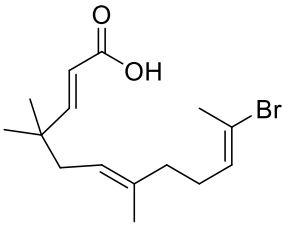
Schéma 16 : Synthèse des composés **88a-c**
(i) $BF_3.OEt_2$, 80°C ; (ii) anhydride acétique, K_2CO_3, DMF, 160°C ; (iii) hydrate d'hydrazine, EtOH, 60°C, 1 h.

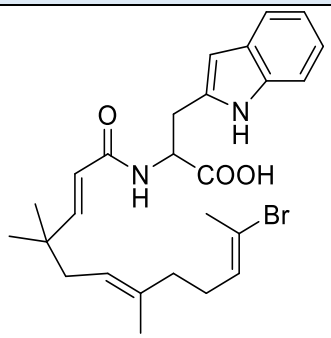
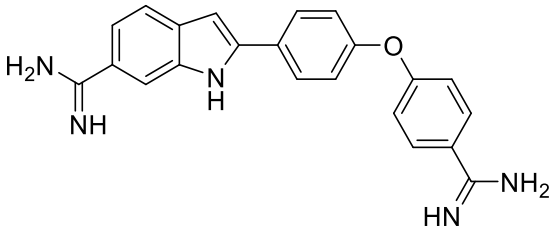
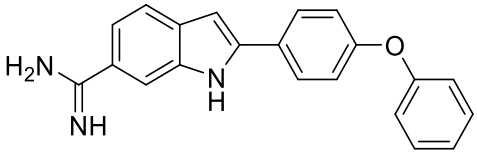
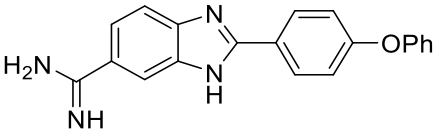
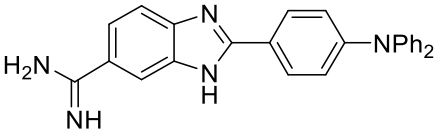
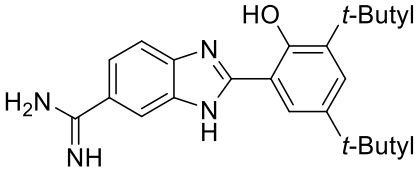
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature ainsi que leurs concentration inhibitrice minimale (CI_{50}).

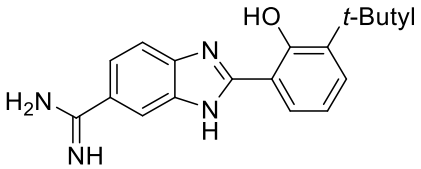
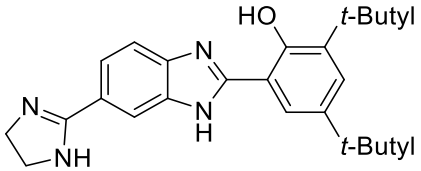
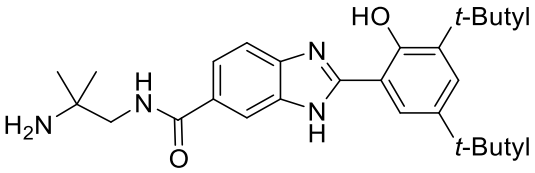
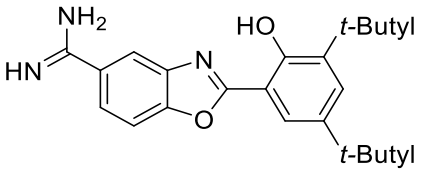
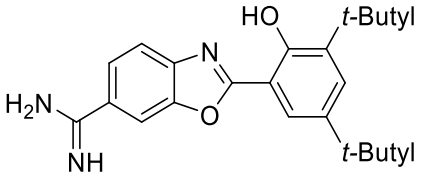
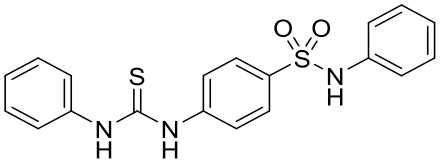
Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **1**	1-2[39] (AlgR2/ AlgR1)
 **2**	1-2[39] (AlgR2/ AlgR1)
 **3**	1-2[39] (AlgR2/ AlgR1)
 **4**	1-2[39,40] (AlgR2/ AlgR1)
 **7a**	6,6[42] (WalK/WalR)
 **11**	5[43,44] (KinA/Spo0F) 1,6[45] (KinA/Spo0F)

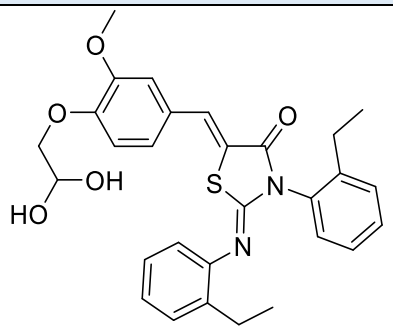
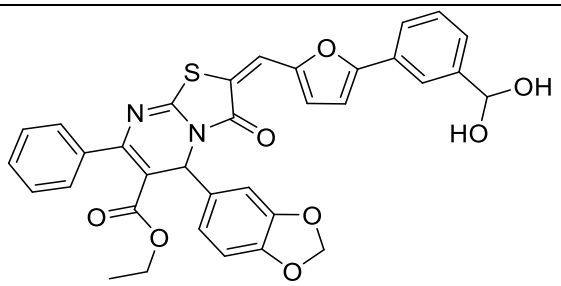
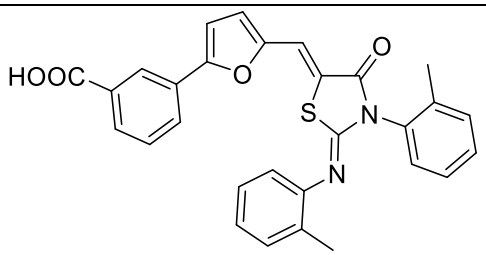
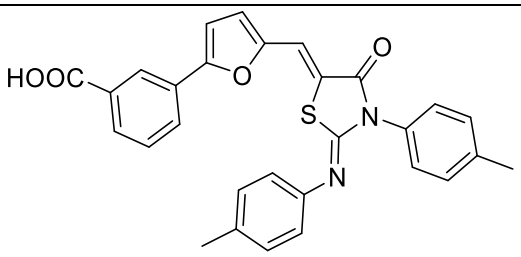
Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **14**	6[43,44] (KinA/Spo0F)
 **24a**	9[46] (KinA/Spo0F)
 **24b**	11[46] (KinA/Spo0F)
 **24c**	13[46] (KinA/Spo0F)
 **27a**	3,8[49] (KinA/Spo0F)
 **27b**	45[49] (KinA/Spo0F)

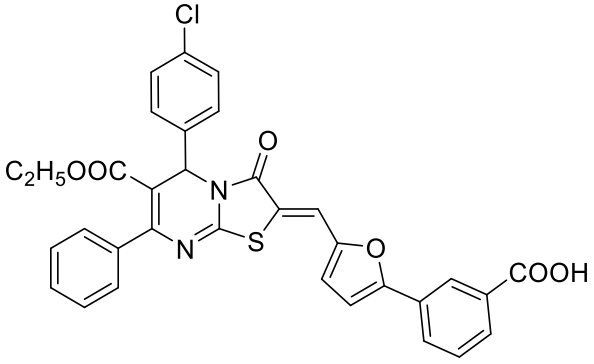
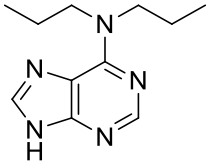
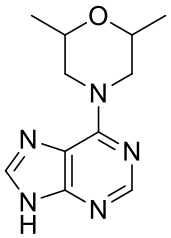
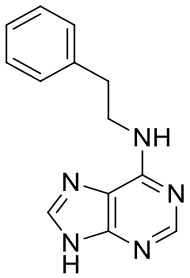
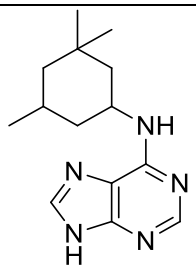
Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **27c**	4,8[49] (KinA/Spo0F)
 **27d**	22[49] (KinA/Spo0F)
 **32a**	2,8[51] (KinA/Spo0F)
 **32b**	6,3[51] (KinA/Spo0F)
 **36a**	8[52] (KinA/Spo0F) 28[52] (NR_{II}/NR_{I})
 **36b**	16[52] (KinA/Spo0F) 65[52] (NR_{II}/NR_{I})

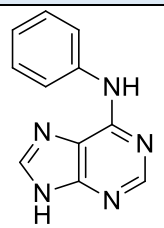
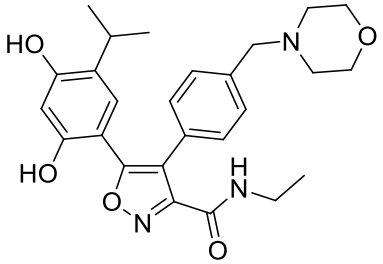
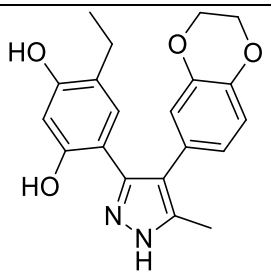
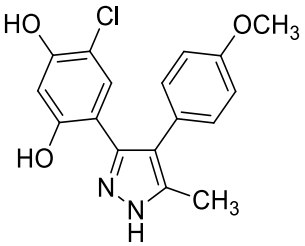
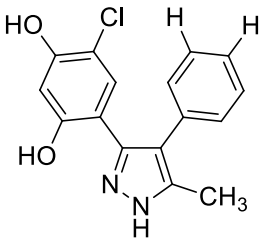
Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **40a**	2.2[55] 5.0[55] (KinA/Spo0F) (NR$_{II}$/NR$_{I}$)
 **40b**	3.0[55] 1,5[55] (KinA/Spo0F) (NR$_{II}$/NR$_{I}$)
 **40c**	4,4[55] (KinA/Spo0F) 17[55] (NR$_{II}$/NR$_{I}$)
 **41**	-[56] (WalK/WalR)
 **43**	63,5[58] (*E*) (WalK/WalR) 750[45] (*E/Z*) (WalK/WalR)

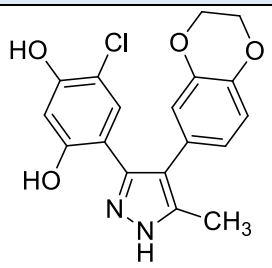
Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **47a**	43,9[59] (WalK/WalR)
 **48**	31[60] (KinA/Spo0F)
 **49**	7,7[60] (KinA/Spo0F)
 **52a**	42[60] (KinA/Spo0F)
 **52b**	17[60] (KinA/Spo0F)
 **52c**	12[60] (KinA/Spo0F)

Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **52d**	6[60] (KinA/Spo0F)
 **52e**	10[60] (KinA/Spo0F)
 **52f**	10[60] (KinA/Spo0F)
 **57a**	14[60] (KinA/Spo0F)
 **57b**	15.4[60] (KinA/Spo0F)
 **62**	-[62] (QseC/ QseB)

Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **63**	29[65] (WalK/WalR)
 **64**	14[65] (WalK/WalR)
 **68a**	34,8[68] (WalK/WalR)
 **68b**	22,1[68] (WalK/WalR)

Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **74a**	12,6[69] (WalK/WalR)
 **75**	49,6[70] (HK853)
 **76**	95,3[70] (HK853)
 **77**	145[70] (HK853)
 **78**	131[70] (HK853)

Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **81a**	7,3[71,73] (HK853)
 **82**	7,3[74] (CckA) 73[74] (PhoP/PhoQ)
 **83**	28[74] (CckA) 9[74] (PhoP/PhoQ)
 **88a**	12,3[74] (CckA) 66[74] (PhoP/PhoQ)
 **88b**	17,5[74] (CckA) 45[74] (PhoP/PhoQ)

Structure de l'inhibiteur	CI_{50} (µM)
 **88c**	11,2[74] (CckA) 35[74] (PhoP/PhoQ)

13. Conclusion sur les inhibiteurs d'histidine kinase décrits dans la littérature

Il ressort clairement de cette analyse que différentes structures chimiques peuvent conduire à l'inhibition de HK et qu'une grande variété de voies de synthèse ont été développées. Bien que plusieurs des inhibiteurs montrent également des activités antimicrobiennes prometteuses à ce jour (pas détaillées ici), aucun d'entre eux ne fait l'objet d'essais cliniques en tant que nouveaux antibactériens. L'absence de sélectivité de l'inhibiteur, l'activité hémolytique, l'agrégation des enzymes ou le manque d'activité antibactérienne empêche d'atteindre cet objectif.

Des efforts accrus sont nécessaires pour développer les inhibiteurs de HK sans effets indésirables, ayant une bonne sélectivité, corrélée à l'activité antibactérienne voire à une activité d'adjuvant antibiotique.

II. Résultats et discussion

A. Travaux préliminaires au laboratoire

L'équipe de recherche de chimie du laboratoire CHROME à l'Université de Nîmes s'est intéressée à la recherche de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase. Les premiers travaux de modélisation et de synthèse décrits ont été réalisés respectivement par le Dr. Alexandre LEBEAU, Attaché temporaire d'enseignement et de recherche pendant la période 2013-2015 et par le Dr. Thibaut BOIBESSOT, doctorant pendant la période 2013-2016.

1. Les objectifs des travaux

L'équipe a tenté de désactiver les systèmes à deux composants, en ciblant plus précisément le domaine de liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) situé au niveau du site catalytique (CA) de l'histidine kinase (voir Figure 1, p.29). A la différence des kinases eucaryotes (sérine, théonine et tyrosine kinase), le domaine de liaison de l'ATP chez l'histidine kinase est caractérisé par le pli de Bergerat ou en anglais « Bergerat fold » qui a été mis en évidence par plusieurs études cristallographiques. Il a été démontré que celui-ci était également retrouvé chez la Gyrase B bactérienne, les protéines chaperones Hsp90 et des protéines de la réparation de l'ADN MutL et cet ensemble constitue la superfamille GHKL.
Le domaine CA est un domaine que toutes les protéines d'histidine kinase possèdent et il présente un haut degré d'homologie entre protéines provenant de diverses bactéries. Il a été constaté que l'inhibition de ce domaine catalytique permettrait de bloquer de multiples TCS en simultanée et par conséquent d'empêcher le transfert du signal cellulaire. Ceci éviterait que la bactérie puisse s'adapter suite à un changement d'environnement et de propager les gènes de résistance entre autres. Cette cible permettrait donc de concevoir de nouvelles molécules capables d'inhiber plusieurs TCS en même temps et pouvoir élargir le spectre d'inhibition de la molécule.

2. Modélisation moléculaire

Par la suite, afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase, l'équipe s'est orientée vers la conception rationnelle à l'aide d'outils de modélisation. Ils sont partis, dans un premier temps, sur une structure cristalline du domaine de liaison de l'ATP de WalK chez *Bacillus subtilis* (PDB : 3SL2 ; résolution : 1,61 Å) pour repérer les interactions mises en jeu avec l'ATP (Figure 22). Il a été constaté que l'ATP interagissait *via* deux types d'interactions avec le site actif : des

liaisons hydrogène avec un résidu Asp533 et une molécule d'eau (H_2O822) et des interactions de type π-stacking avec un résidu Tyr507. Ces informations ont été essentielles pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase. (Figure 22)

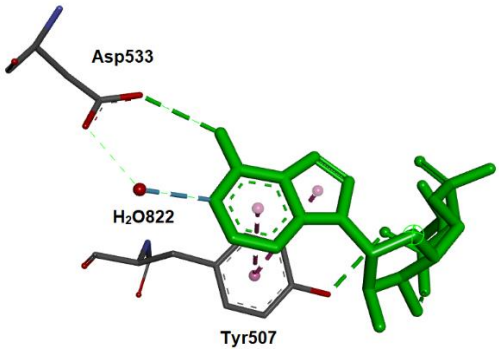


Figure 22 : Interaction entre le site actif et l'ATP

En revanche, après une recherche exhaustive dans la base de données des protéines (PDB), il a été remarqué qu'aucune structure cristalline du domaine catalytique d'un système à deux composants n'avait été décrite auparavant avec un inhibiteur au sein de sa structure.

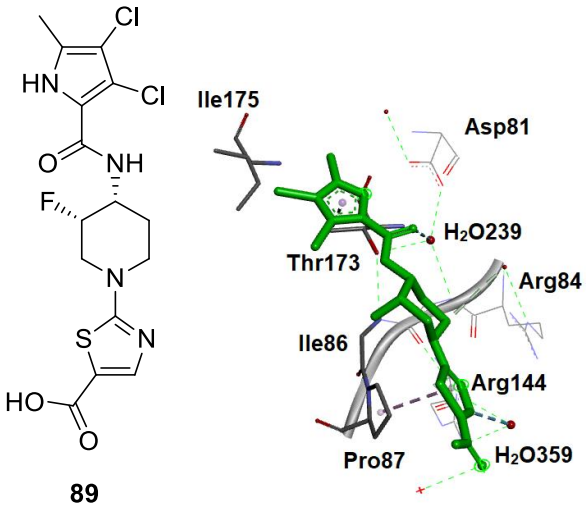


Figure 23 : Interaction de la Gyrase B et son inhibiteur le pyrrolamide

Comme mentionné précédemment, le domaine de liaison de l'ATP et plus particulièrement le pli de Bergerat est présent chez les ADN gyrases, MutL et Hsp90. De ce fait, il s'avère qu'il existe des structures cristallines du domaine catalytique de la Gyrase B et de son inhibiteur pyrrolamide **89** qui possède une activité inhibitrice à 50% (CI_{50}) de l'ordre de 4 nM. Cette structure cristalline a permis à l'équipe de s'en inspirer pour concevoir de nouveaux inhibiteurs potentiels d'histidine kinase. (Figure 23)

Dans un deuxième temps, à l'aide du logiciel ViTO et DSX, ils ont pu superposer les deux structures cristallines décrites précédemment et déterminer les interactions possibles entre le pyrrolamide et le site catalytique de WalK. Il a été constaté que le noyau pyrrole (Figure 24) de l'inhibiteur de Gyrase B pouvait effectuer des liaisons hydrogène avec les résidus Asp533 et H_2O822, ces interactions, compatibles avec le site actif, sont représentées par des boules bleues sur la figure 24. De plus, une gêne stérique relativement importante est également présente représentée sur la figure 24 par de boules rouges. Par conséquent, des changements structurels du pyrrolamide **89** ont été réalisés afin d'obtenir une structure d'inhibiteurs d'histidine kinase plus adaptée à ce système.

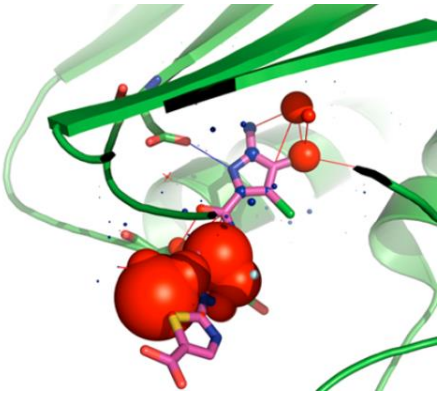


Figure 24 : Représentation des interactions favorables (boules bleues) et défavorables (boules rouges) entre le pyrrolamide **89** et le site catalytique

De ce fait, il a été décidé de rigidifier la molécule ce qui a conduit à la structure **A** (Figure 25). Ensuite, l'ajout d'un noyau aromatique est essentiel pour garder une structure plane et de permettre au nouvel inhibiteur de TCS de garder une interaction de type π-stacking avec le résidu de Tyr507 (Figure 25, **B**). Etant donné qu'une forte gêne stérique a été mise en évidence entre le pyrrolamide et le site actif, la suppression du noyau pipéridine et des centres asymétriques ont été entrepris afin de diminuer la taille de la molécule et de faciliter la synthèse chimique pour aboutir à la structure **C** (Figure 25).

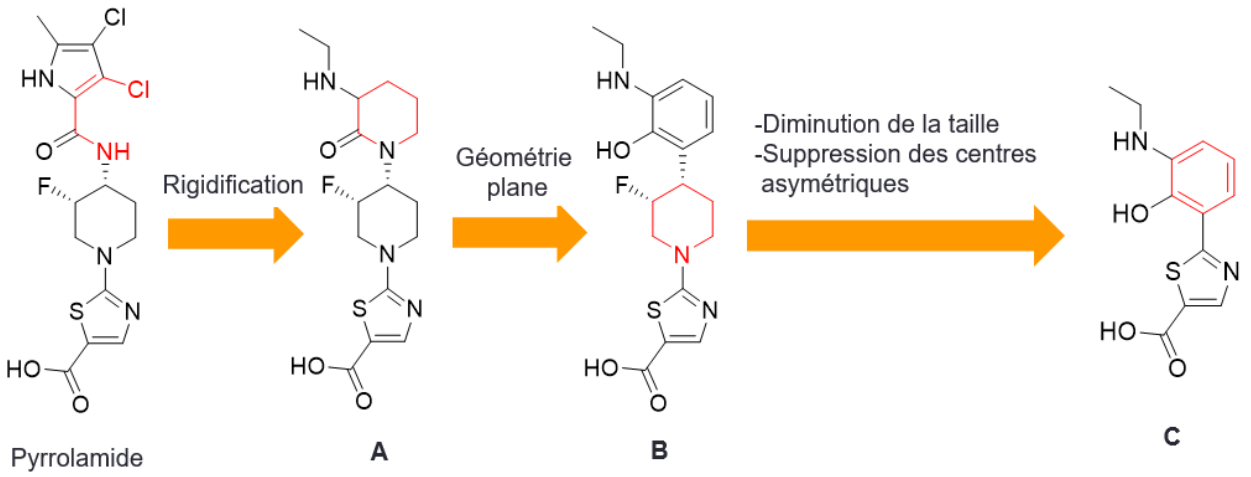


Figure 25 : Stratégie entreprise pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

Finalement, pour des questions d'accessibilité et de prix, il a été décidé de remplacer le noyau thiazole par un noyau thiophène pour arriver à la structure générale représentée sur la figure 26. De même son positionnement a été évalué au sein du site catalytique et à la différence de l'inhibiteur de pyrrolamide **89**, cette structure possède des interactions favorables avec le site catalytique de WalK et sont représentées par des boules bleues sur la Figure 26.

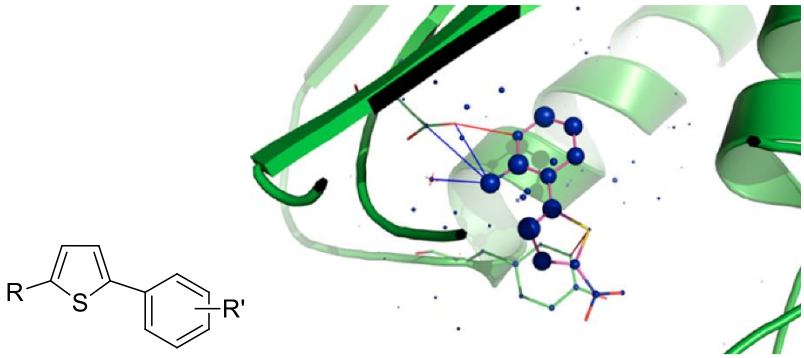


Figure 26 : Structure générale des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase et sa position au sein du site catalytique. Les interactions favorables sont représentées par des boules bleues.

Les molécules ont un cycle benzénique qui, dans l'idéal, sera substitué par différents groupements capables de faire des liaisons hydrogène avec le site catalytique comme par exemple des groupements hydroxyles ou aminés. D'un autre côté, le noyau thiophène sera de même substitué par des groupements polaires ce qui permettrait donc d'augmenter la solubilité de la molécule.

3. Synthèse de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

Suite à la modélisation moléculaire, 24 molécules ont été synthétisées par couplage de Suzuki-Miyaura en partant d'acides boroniques et des bromo thiophènes commerciaux avec des rendements variant de 17 à 77% après purification. (Schéma 17)

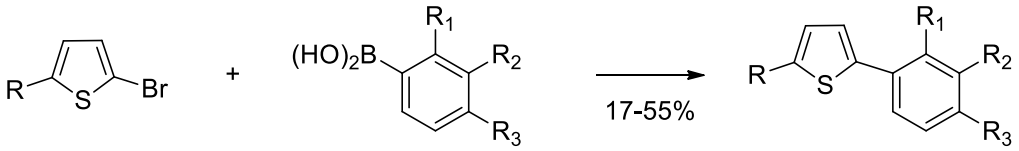


Schéma 17 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura

Les molécules ont été respectivement caractérisées par RMN du proton ^{1}H, RMN du carbone ^{13}C, IR, HRMS et par UPLC ou HPLC.

4. Résultats biologiques

Ce travail a été effectué par nos collaborateurs américains le Dr. Hendrik Szurmant et le Dr. Christopher Zschiedrich, de la Western University of Health Sciences (Pomona, Etats-Unis). Ils ont évalué la capacité des molécules à inhiber les TCS. De même, nos collaborateurs du CHU de Nîmes, le Pr. Jean-Philippe Lavigne et le Dr. Catherine Dunyach-Rémy ont évalué la capacité des molécules à être des adjuvants d'antibiotiques (partie détaillée par la suite).

a) Evaluation des molécules à inhiber des TCS

Les vingt-quatre inhibiteurs potentiels d'histidine kinase ont été évalués pour leur capacité à inhiber l'autophosphorylation de multiples TCS. Les évaluations ont été effectuées à une concentration équimolaire (1 mM) d'inhibiteur et 1 mM d'ATP. Il s'est avéré que 8 molécules (**90-97**, Figure 27) pouvaient inhiber WalK, une histidine kinase impliquée dans la formation de la paroi bactérienne. Leurs CI_{50} ont été déterminées (Figure 27).

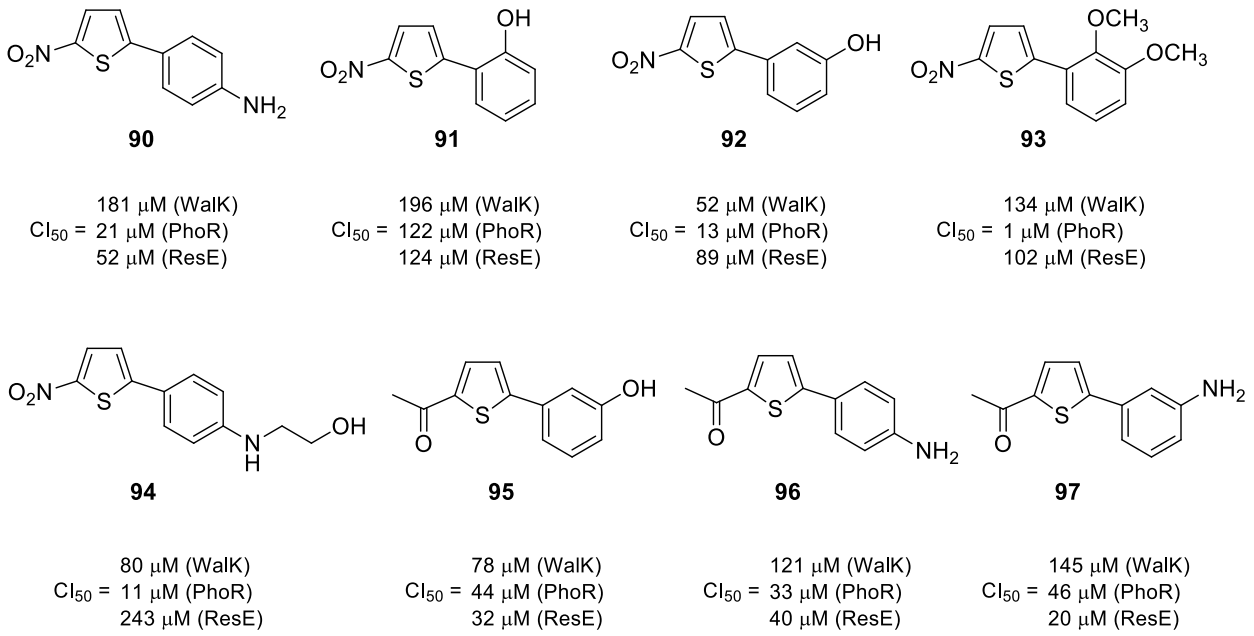


Figure 27 : Structures des inhibiteurs de HK **90-97**

Par la suite, ces dérivés thiophène ont été évalués sur deux autres TCS : PhoR impliqué dans la régulation du phosphate et ResE qui détermine la limite d'oxygène et de nitrate. Il a été montré que ces inhibiteurs avaient de même une activité inhibitrice sur ces deux autres TCS, ce qui permettrait de dire qu'ils sont des inhibiteurs d'histidine kinase à large spectre. Leur CI_{50} ont été également déterminées (Figure 27).

Par conséquent, il restait à savoir si ces inhibiteurs étaient sélectifs de HK et s'ils pouvaient potentiellement inhiber l'ADN gyrase étant donné que la conception des nouvelles structures a été conçue à partir d'un inhibiteur de cet enzyme. Après évaluation aucune molécule n'était inhibitrice de la gyrase bactérienne. Enfin aucune des molécules n'inhibaient les sérine-thréonine kinases eucaryotes d'*Escherichia faecalis* (IreK) : ce qui permet de conclure que les 8 molécules sont des inhibiteurs sélectifs de HK.

b) Evaluation de la toxicité

Dans la littérature, plusieurs inhibiteurs de HK possèdent des effets secondaires parmi lesquels se trouve la possible hémolyse des globules rouges. Les évaluations hémolytiques sur des globules rouges de mouton ont permis de déduire que ces nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase ne possèdent pas de toxicité même à des concentrations très élevées (au-delà de 1 mM d'inhibiteur).

c) Evaluation antibactérienne

Après ces résultats prometteurs, ces inhibiteurs ont été évalués pour leurs activités antibactériennes par la méthode de diffusion de Kirby-Bauer sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. (Figure 28)

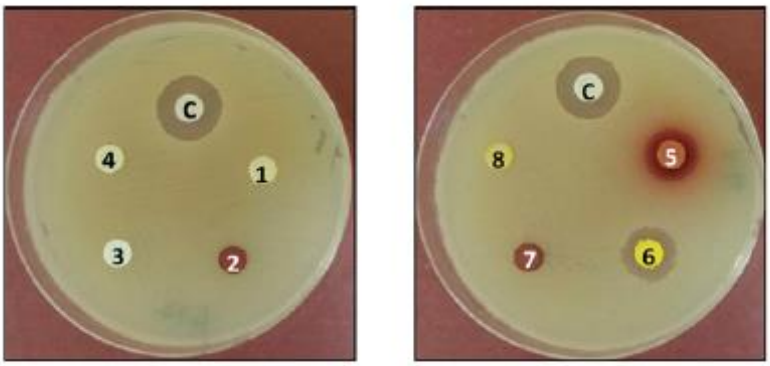


Figure 28 : Méthode de diffusion de Kirby-Bauer sur les molécules **90** à **97**
1) **97** ; 2) **90** ; 3) **95** ; 4) **93** ; 5) **91** ; 6) **92** ; 7) **94** ; 8) **96**.

Seuls les composés **91** et **92** ont montré une activité antibactérienne par cette méthode. Par la suite ces composés ont été mis en présence de différentes bactéries pathogènes Gram+ et Gram- chez l'humain, pour déterminer leurs concentrations inhibitrices minimales (CMI) et leurs concentrations bactéricides minimales (CMB). (Tableau 3)

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de valeurs obtenues de CMI et CMB pour les composés **91** et **92**

	91		**92**	
	CMI µg/mL	**CMB µg/mL**	**CMI µg/mL**	**CMB µg/mL**
B. subtilis (G +)	7	10	7	16
S. aureus (G +)	16	32	32	>32
B. anthracis (G +)	7	16	7	>32
S. pyogenes (G +)	10	32	16	32

S. agalactiae (G +)	16	>32	32	>32
L. monocytogenes (G +)	10	>64	32	>64
E. faecalis (G +)	32	>64	>64	>64
S. enterica (G -)	32	32	32	32
E. coli (G -)	32	32	32	32

Ces résultats ont permis de conclure que les composés **91** et **92** non seulement possèdent une activité inhibitrice sur différents TCS mais aussi ils possèdent une faible activité antibactérienne avec des valeurs de CMI et de CMB variant de 7 à 32 µg/mL.

d) Evaluation des activités d'adjuvants d'antibiotiques

Finalement, ces deux inhibiteurs de HK ont été évalués afin de connaître leurs capacités en tant qu'adjuvants d'antibiotiques. De ce fait ces deux molécules, **91** et **92**, ont été mises en présence de souches résistantes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* pour savoir si ces molécules sont capables de restaurer l'activité de certains antibiotiques dont la bactérie a pu développer des résistances. Il a été remarqué que seulement une seule molécule, le composé **91**, était capable de restaurer l'activité de l'antibiotique à des concentrations de 100 µM.

5. Conclusion des travaux préliminaires

Pour résumer, pendant ces travaux préliminaires, l'équipe de chimie de l'Université de Nîmes a pu concevoir de façon rationnelle des inhibiteurs d'histidine kinase. Au total 24 nouvelles molécules ont été synthétisées parmi lesquelles 8 molécules, **90-97**, sont des inhibiteurs de multiples histidine kinase. Aucune de ces molécules n'a présenté d'activité hémolytique. Seules les molécules **90** et **97** ont présenté des faibles activités antibactériennes sur des souches bactériennes sensibles. Une seule la molécule **91** est un adjuvant d'antibiotique. Ce travail a conduit à la publication d'un article scientifique : « The Rational Design, Synthesis, and

Antimicrobial Properties of Thiophene Derivatives That Inhibit Bacterial Histidine Kinases », *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, 59, 8830-8847.

Cependant, même si ces résultats sont prometteurs et que les molécules sont synthétisées en une seule étape, il s'avère que celles-ci possèdent dans la plupart des cas des rendements faibles et leur temps de réaction est élevé (24 h). Par ailleurs, ces molécules sont peu solubles dans un milieu aqueux et cela est un obstacle pour la réalisation des évaluations biologiques effectuées par nos collaborateurs.

B. Objectifs de la thèse

Les systèmes à deux composants sont devenus des cibles potentielles pour divers traitements thérapeutiques pour lutter contre les résistances bactériennes. Ainsi, le développement de molécules fortement sélectives de ces systèmes, capables de bloquer le transfert du signal cellulaire, a été intensifié. Ce travail de thèse est donc basé sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs potentiels d'histidine kinase à activité d'adjuvant d'antibiotiques potentielle en se basant sur les résultats obtenus précédemment et qui représentera la continuité de travaux initiés auparavant au sein de l'équipe de recherche.

Dans un premier temps, la partie chimie sera abordée : il s'agira de présenter la démarche envisagée concernant la conception et la synthèse chimique des nouveaux inhibiteurs des systèmes de deux composants. Dans un deuxième temps, des tests biologiques seront réalisés : l'évaluation de l'activité inhibitrice de HK des nouvelles molécules, l'évaluation de l'activité antibactérienne et finalement leur propriété d'adjuvant d'antibiotiques.

C. Les couplages pallado-catalysés dans la littérature

De nos jours, les couplages croisés pallado-catalysés représentent une des méthodes les plus utilisées pour la formation de nouvelles liaisons. Ces réactions ont pu mettre en œuvre de nouvelles stratégies de synthèse rendant possibles des réactions, qui auparavant, étaient seulement faisables par des synthèses multi-étapes ou voire impossibles. Cette avancée chimique débute dans la deuxième moitié du XXème siècle et plus précisément dans les années 70. Des travaux de recherche de différentes équipes ont mis en évidence la capacité de métaux de transition en l'occurrence, le palladium, à former des liaisons C-C. (Figure 29) Ces réactions mettent en jeu des dérivés

organométalliques ou alcènes ou alcynes, des dérivés halogénés ainsi qu'un catalyseur en général à base de palladium.

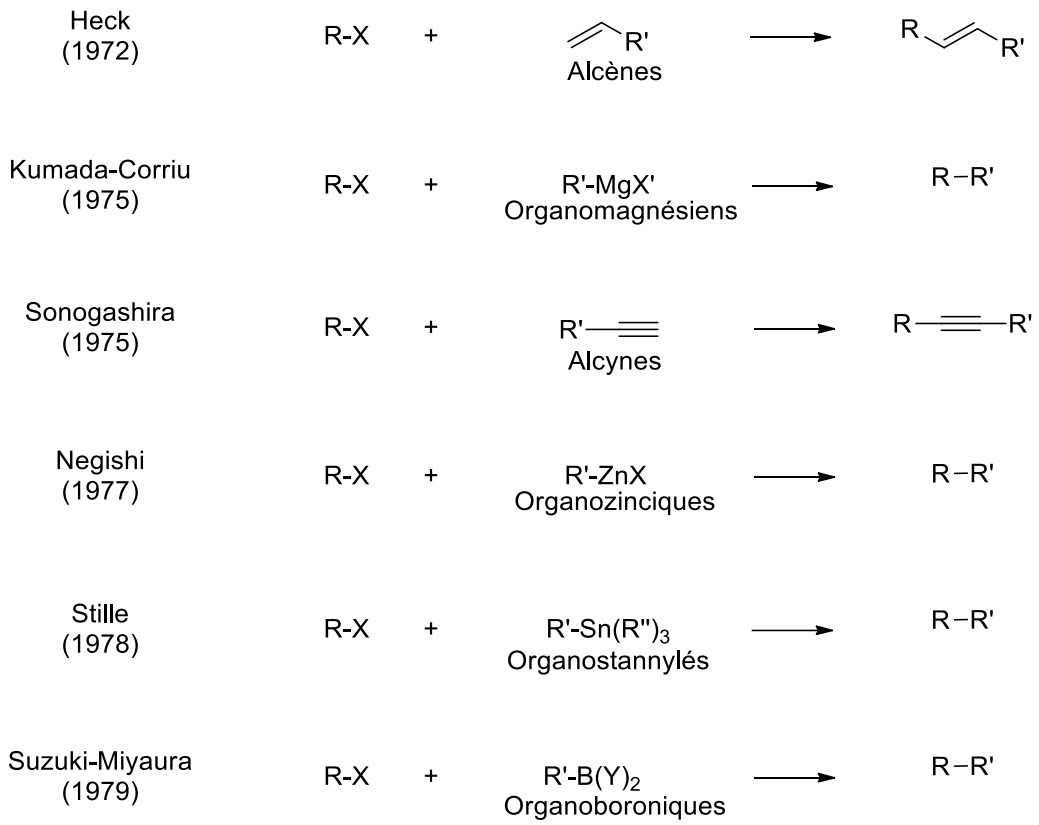


Figure 29 : Réaction de couplages pallado-catalysés

L'attribution du prix Nobel de chimie en 2010 a récompensé Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi et Akira Suzuki pour leurs contributions remarquables aux couplages croisés pallado-catalysés en synthèse organique.

1. Les couplages croisés de Suzuki et Negishi

Les travaux de Negishi en 1976 ont mis en évidence l'utilisation de catalyseur à base de nickel pour former des alcènes substitués par des phényles et des chaînes aliphatiques. La même année, il a démontré que l'utilisation de palladium comme catalyseur permet d'obtenir une meilleure sélectivité sur la configuration des alcènes.[75,76] En 1977, Negishi introduit l'utilisation des dérivés organozinciques en couplage croisé pour la synthèse de biaryles asymétriques en utilisant des halogénures d'aryle catalysé par du palladium ou le nickel. [77,78] (Schéma 18)

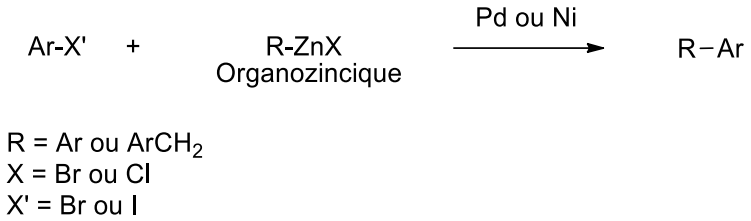


Schéma 18 : Couplage croisé de Negishi

L'introduction des organozinciques a permis d'obtenir de bons rendements et des réactions plus sélectives à la différence des réactifs de Grignard. De plus, ils sont compatibles avec de nombreux groupes fonctionnels tels que les esters, les cétones, les amines, etc…

Par ailleurs, deux ans plus tard, Suzuki et Miyaura ont travaillé conjointement sur l'utilisation des composés organoborés dans la synthèse stéréosélective de diènes de configuration (*E*). La synthèse se divise en deux étapes : dans un premier temps, la formation du dérivé boré à partir de l'hydroboration d'un alcyne suivie ensuite par le couplage croisé en présence d'une base et d'un catalyseur comme le palladium.[79,80] (Schéma 19)

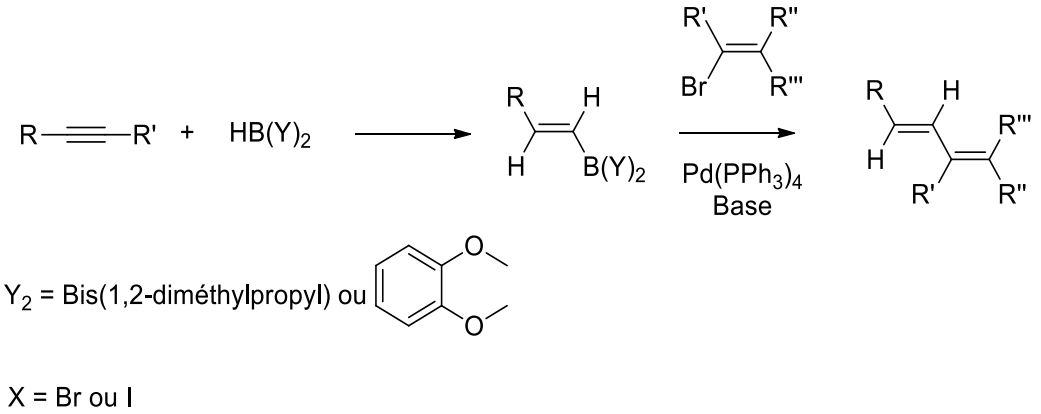


Schéma 19 : Réaction de Suzuki Miyaura

L'utilisation du couplage de Suzuki-Miyaura est devenue essentielle pour la formation de liaison C-C, il s'agit du couplage pallado-catalysé le plus répandu dans la littérature. A la différence des autres couplages croisés, celui-ci utilise des dérivés borés stables à l'air et à l'eau et se réalisant dans des conditions douces (pas forcément anhydre). De plus, l'accessibilité des dérivés borés (acides et esters boroniques commerciaux) ainsi que la faible toxicité des réactifs de départ et des sous-produits font du couplage de Suzuki-Miyaura un choix judicieux pour la synthèse de nombreux dérivés.

D'un point de vue mécanistique, ces deux couplages possèdent des cycles catalytiques très similaires. Ils sont tous les deux composés de trois étapes clés :

- Une étape d'addition oxydante des dérivés halogénés sur le Pd^0, qui oxyde le Pd^0 en Pd^{II} et conduit à la formation du complexe R-Pd^{II}-X.
- Une étape de transmétallation dans laquelle le composé organométallique (Zinc ou bore), réagit avec le complexe R-Pd^{II}-X permettant ainsi l'insertion du deuxième groupement organique R'.
- Une élimination réductrice est produite lors de la libération du produit de couplage et qui réduit le Pd^{II} en Pd^0.[81,82] (Schéma 20)

En ce qui concerne le couplage croisé de Suzuki-Miyaura, la base joue un rôle essentiel dans le cycle catalytique car elle facilite l'étape de transmétallation.[83,84] (Schéma 20)

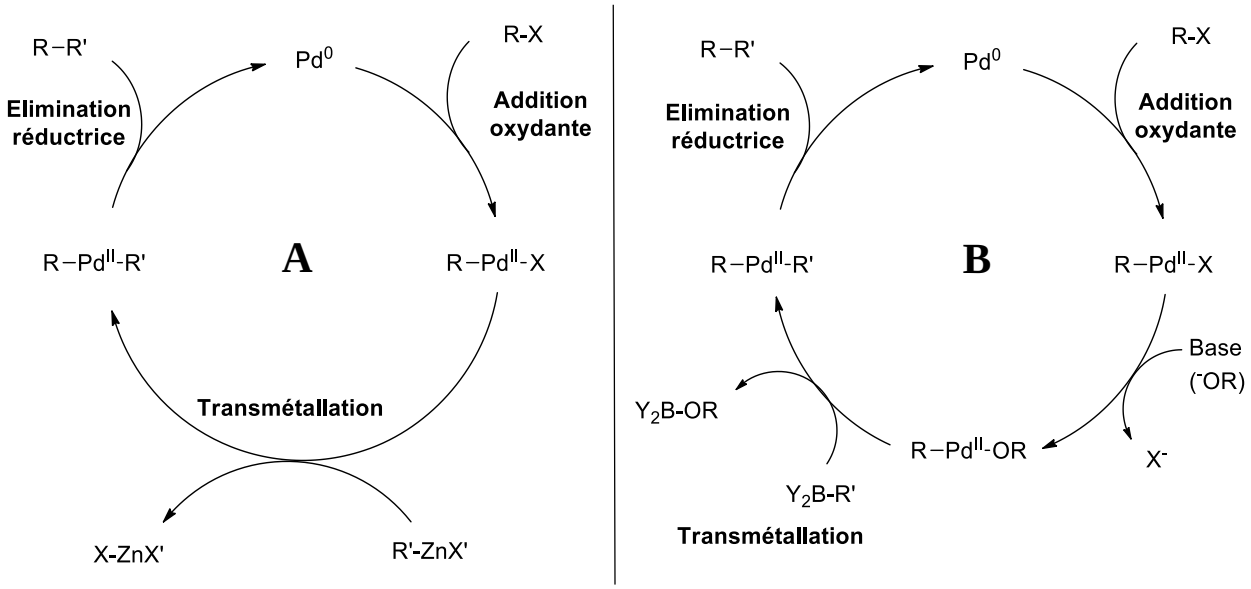


Schéma 20 : Couplage croisé de Negishi (**A**) et de Suzuki Miyaura (**B**)

2. Les couplages croisés de Buchwald-Hartwig et Hirao

Par ailleurs, les travaux réalisés ont servi d'inspiration pour des travaux ultérieurs. En effet, d'autres équipes de recherche se sont penchées sur la possibilité de créer d'autres liaisons que les liaisons C-C.

En 1980, Hirao et ses collaborateurs ont mis au point une méthodologie par couplage croisé pour former la liaison C-P par l'utilisation des organophosphorés. Les composés organophosphorés ont connu un grand essor dû à leurs applications dans les domaines industriel, agrochimique et en chimie médicinale.[85] En effet, Hirao a mis en évidence l'utilisation des organophosphorés pour la synthèse stéréosélective de vinylphosphonates. Cette synthèse utilise un dérivé halogéné aromatique et un dérivé organophosphoré, en présence d'un catalyseur à base de palladium.[86] (Schéma 21)

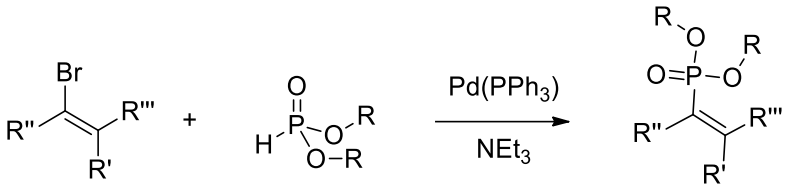


Schéma 21 : Réaction de Hirao

Son cycle catalytique possède également une étape d'addition oxydante, une transmétallation et une élimination réductrice.[86] (Schéma 22)

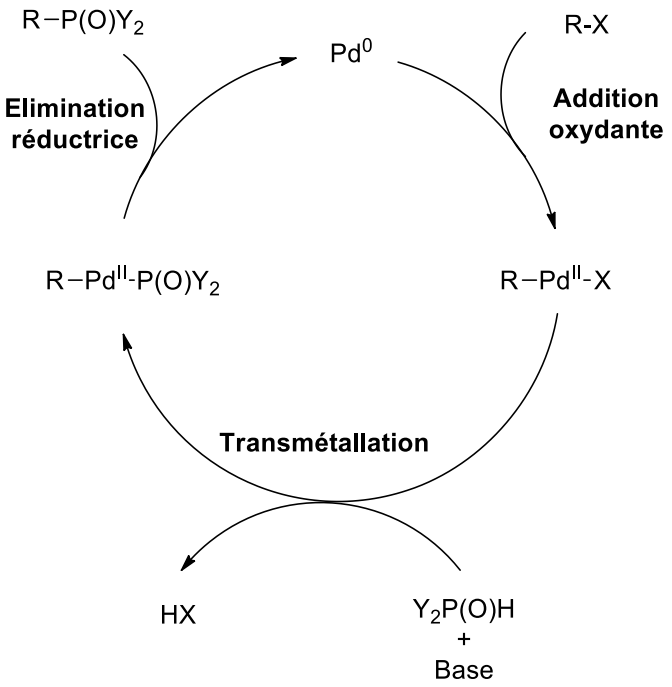
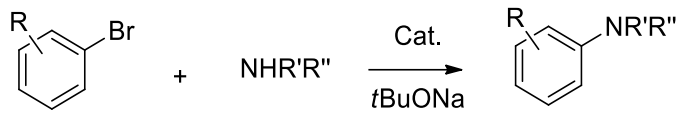


Schéma 22 : Couplage croisé de Hirao

En 1995, Buchwald et Hartwig ont travaillé sur les dérivés aminés. En effet, ils ont pu synthétiser de composés ayant des liaisons C-N par couplage pallado-catalysé. Ils ont mis en évidence la

formation de liaisons C-N lors de la réaction entre des dérivés halogénés aromatiques et des dérivés aminés (amines primaires ou secondaires) en présence d'un catalyseur et d'une base. [87,88] (Schéma 24)



Catalyseur : $[Pd(dba)_2]/_2$ $P(o\text{-}tolyl)_3$ ou $[PdCl_2(P(o\text{-}tolyl)_3)_2]$

Schéma 23 : Réaction de Buchwald-Hartwig

Ce couplage, comme tous les autres, possède trois grandes étapes : une addition oxydante, une transmétallation et une élimination réductrice. (Schéma 24) Cette réaction en particulier, nécessite l'utilisation d'un catalyseur ayant des ligands très encombrés et riches en électrons car ceci favorise l'étape d'addition oxydante ainsi que l'étape d'élimination réductrice. Cependant, si des catalyseurs non encombrés sont utilisés, une réaction de β-élimination peut être observée et la réaction n'aboutira pas au produit désiré. (Schéma 24)

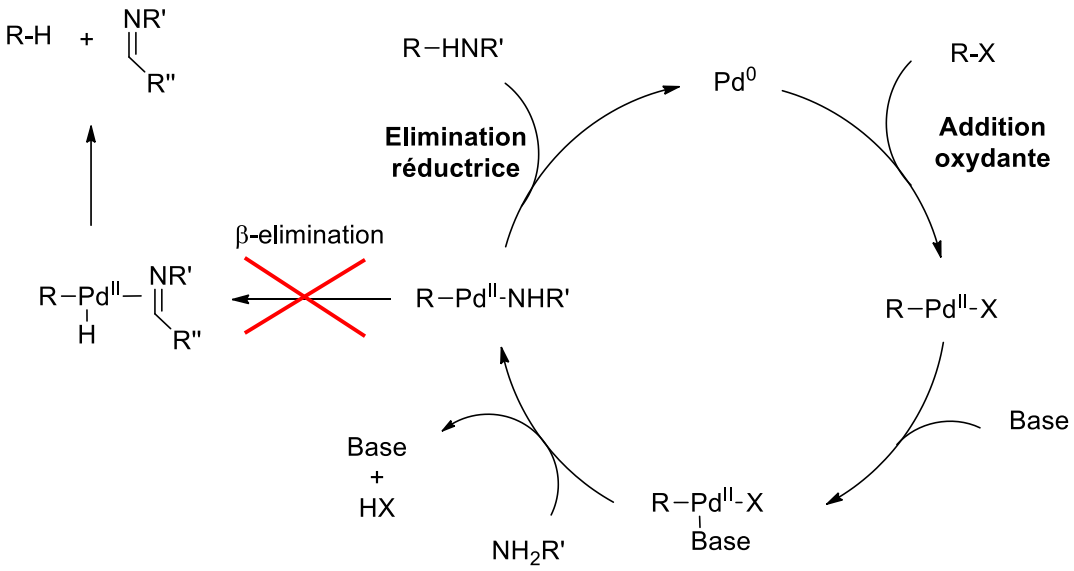
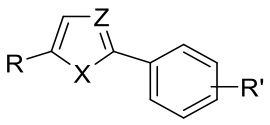


Schéma 24 : Couplage croisé de Buchwald-Hartwig

D. Synthèse des séries des dérivés hétérocycliques

1. Conception des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

Ce projet de thèse vise à concevoir et à synthétiser de nouvelles molécules comme inhibiteurs potentiels d'histidine kinase à activité adjuvante potentielle. La démarche de recherche suivie par l'équipe est articulée autour d'une plate-forme moléculaire, définie comme un synthon hétérocyclique de base et qui sert de dénominateur commun à toutes les modulations chimiques ultérieures. Ainsi, il a été envisagé de concevoir et de synthétiser de nouveaux hétérocycles diversement substituées. Dans cette première partie, la conception de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase est basée sur la structure générale (Figure 30) et qui servira comme base pour des études de Relations Structure-Activité (RSA) pouvant améliorer l'activité biologique. En effet, le départ de notre modélisateur, le Dr. Alexandre LEBEAU, nous a conduit à effectuer des modifications chimiques empiriques.



X = S, O
Z = CH, N

Figure 30 : Structure générale des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

Nous nous sommes intéressés à effectuer différentes modulations chimiques à partir de la structure de base (Figure 31, **A**) s'inspirant de la molécule **91** qui présentait la meilleure activité d'inhibition de HK et qui était adjuvante d'antibiotiques. Nous avons envisagé :

- La modification des substituants et leurs positions sur le noyau phényle (Figure 31, **B**) ce qui permettrait d'évaluer l'impact de ces modifications sur l'activité biologique.
- L'introduction d'un lien carboné entre l'hétérocycle et le noyau phényle (Figure 31, **C**) ce qui permettrait de connaître l'importance du positionnement du noyau phényle dans le site actif.
- Le remplacement du noyau thiophène par un thiazole ou un furane (Figure 31, **D**) ce qui permettrait de former des interactions de type π-stacking avec le résidu de Tyr507 ainsi que la création de liaisons hydrogène avec d'autres résidus dans le site actif. De plus, cette modification mettrait en évidence le rôle de l'hétérocycle dans l'activité biologique.

- Le remplacement du noyau phényle par une pyridine (Figure 31, **E**) ce qui permettrait l'interaction avec d'autres résidus du site actif *via* des liaisons hydrogène.
- Le changement du groupement nitro par des fonctions acides carboxyliques (Figure 31, **F**) ce qui permettrait de garder le même effet électroattracteur.
- La réduction du groupement nitro en amine (Figure 31, **G**) ce qui permettrait de former des liaisons hydrogène avec des résidus de la cavité.

Tous ces groupements bioisostères permettront d'évaluer les activités biologiques des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase et d'établir une analyse de relations structure-activité.

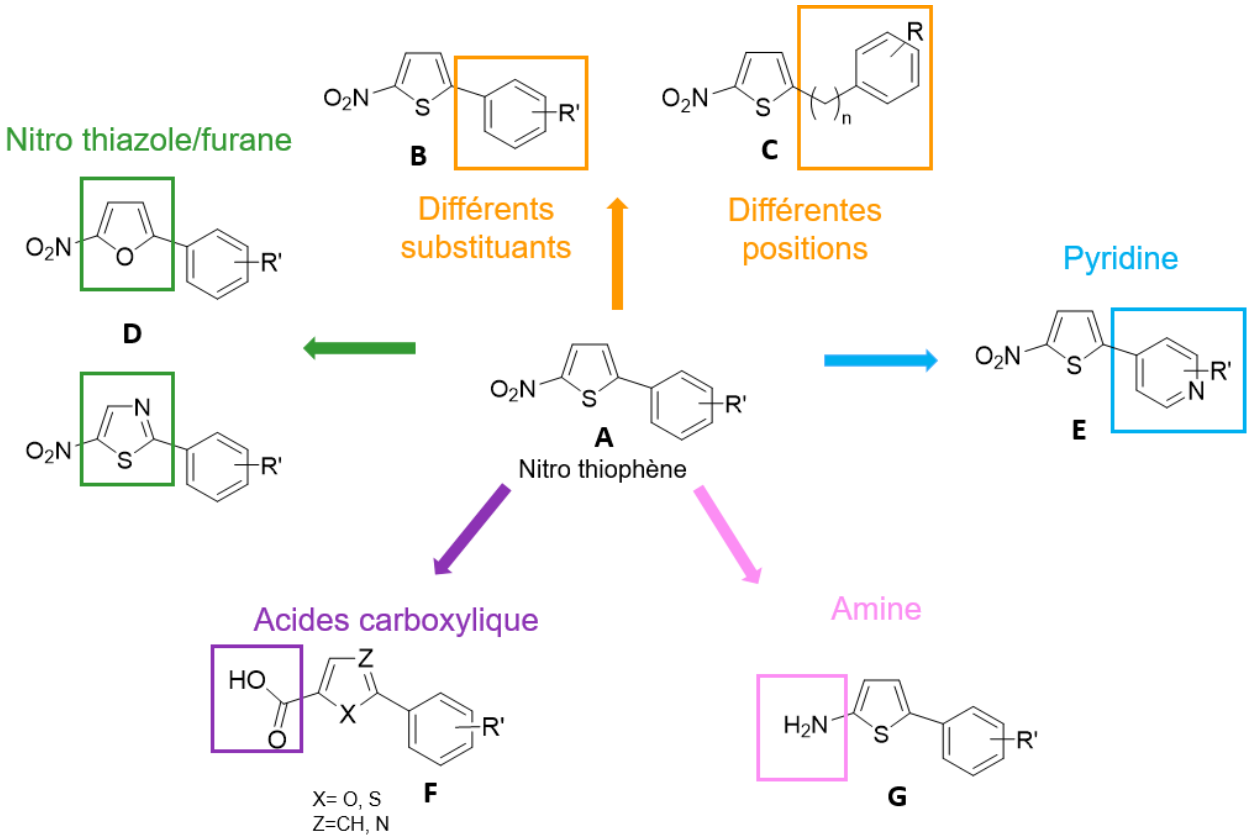


Figure 31 : Conception des nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase

2. Synthèses des inhibiteurs potentiels d'histidine kinase

Etant donné que les structures envisagées sont similaires à celles déjà synthétisées lors des travaux préliminaires, il a été de même imaginé de synthétiser ces nouvelles séries par couplage croisé de Suzuki-Miyaura. Cette seule et unique étape consiste en une réaction métallo-catalysée de Suzuki-Miyaura à partir d'un dérivé bromé commercial mis en réaction avec l'acide boronique correspondant en présence d'une base et d'un solvant. (Schéma 25)

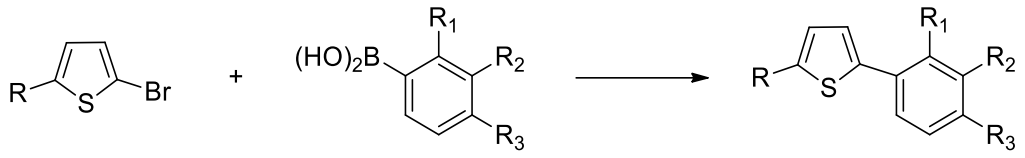


Schéma 25 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura

Les détails de cette réaction seront explicités par la suite.

a) Optimisation des protocoles

Il a été montré que les composés même s'ils possèdent des résultats biologiques prometteurs et leurs synthèses réalisables en une seule étape par couplage croisé de Suzuki-Miyaura, leurs synthèses étaient de longue durée, avec des rendements moyens (17-77%).[89] (Schéma 17)
De ce fait, dans un premier temps, il a été envisagé d'optimiser cette synthèse par chauffage micro-ondes.

*b) Synthèse du composé **91***

Les résultats préliminaires précédemment exposés montrent qu'un seul composé **91** possédait des résultats biologiques prometteurs. Le Dr. Thibaut Boibessot l'avait synthétisé par couplage de Suzuki-Miyaura en partant du 2-bromo-5-nitro-thiophène et de l'acide 2-hydroxy-phénylboronique en présence d'une solution de carbonate de potassium à [2 M] dans du 1,4-dioxane à chaud. (Schéma 26)

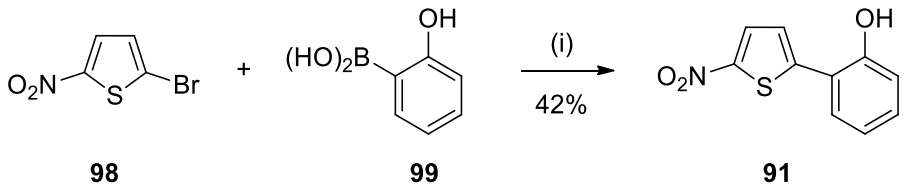


Schéma 26[89] : Synthèse du composé **91**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), K_2CO_3 [2 M], 1,4-dioxane, 80 °C.

La molécule **91** a été obtenue avec un rendement de 42% et une durée de réaction de 15 heures. Même si ce résultat est convenable, il a été envisagé de réduire ce temps de réaction mais également d'augmenter les rendements chimiques.

Pour cela, plusieurs conditions ont été entreprises. Dans un premier temps, j'ai réalisé la manipulation (Expérience 1, Tableau 4), dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Il s'avère que le composé **91** a été obtenu avec un rendement moindre (30%) pour une durée plus longue (16h) par chauffage conventionnel. De ce fait, d'autres conditions par chauffage micro-ondes ont été envisagées afin d'augmenter le rendement chimique et de diminuer les temps de réaction. Trois conditions micro-ondes ont été utilisées et sont résumées dans le Tableau 4. Le volume de solvant a été de même modifié car il serait préférable de favoriser la rencontre entres les réactifs mis en jeu. Dans un premier temps, le composé **91** a été obtenu avec un rendement de 49% en conditions stœchiométriques (Expérience 2, Tableau 4, 1 mmol d'acide boronique et 1 mmol de bromo thiophène) dans un temps de 10 minutes. Ensuite, ce rendement a été amélioré en atteignant un rendement de 72% lorsque le temps de réaction a été légèrement augmenté à 20 min. Finalement, j'ai décidé d'augmenter la quantité molaire de **99** (Expérience 4, Tableau 4, 1,5 équivalent d'acide boronique) afin de favoriser l'avancement de la réaction. Cela a permis d'obtenir le composé **91** avec un rendement de 76% après purification en 20 minutes.

Tableau 4 : Comparatif entre les conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du composé **91**

	Type de chauffage	Temps	Volume de solvant	Rendement après purification	Commentaires
Expérience 1	Chauffage conventionnel	16 h	20 mL	30%	Quantité stœchiométriques
Expérience 2	Chauffage micro-ondes	10 min	6 mL	49%	Quantité stœchiométriques
Expérience 3	Chauffage micro-ondes	20 min	6 mL	72%	Quantité stœchiométriques
Expérience 4	Chauffage micro-ondes	20 min	6 mL	76%	1,5 éq d'acide boronique

Ces expériences ont permis d'optimiser la réaction de Suzuki-Miyaura pour cette série des nitro thiophènes et cette méthode a été extrapolée à d'autres dérivés hétérocycliques.

c) Synthèse des séries de thiophène, des thiazoles et des furanes

(1) Série des nitro thiophènes

En étudiant les résultats prometteurs obtenus précédemment, il a été constaté que la plupart des inhibiteurs possèdent un groupement nitro (Figure 27). Par conséquent dans un premier temps, il a été envisagé de conserver ce groupement nitro et le noyau thiophène. Les changements ont été effectués respectivement sur le groupement phényle et sur ses substituants.

(a) Synthèse par couplage de Suzuki-Miyaura

La synthèse de ces dérivés a été effectuée par couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant la méthode micro-ondes décrite précédemment (Tableau 4, Expérience 4). Le 2-bromo-5-nitro-thiophène **88** a été mis en réaction avec des acides boroniques correspondants (**100-110**) en présence d'une solution de carbonate de potassium à [2 M] dans du 1,4-dioxane. Au total 11 dérivés de nitro thiophène ont été synthétisés par cette méthode avec de rendements variant de 32% à 90% après purification par chromatographie sur gel de silice. (Schéma 27, Tableau 5)

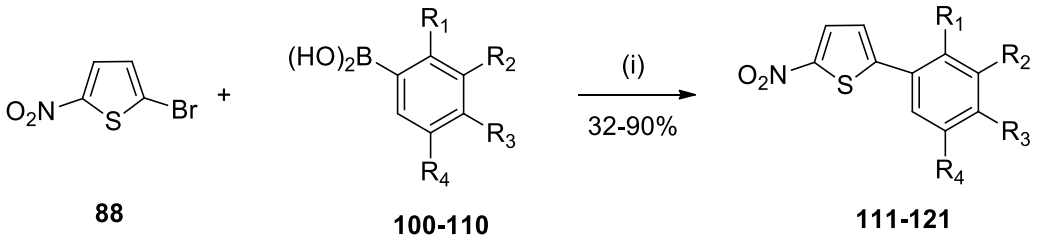
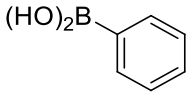
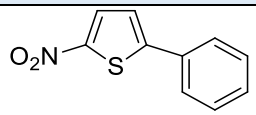
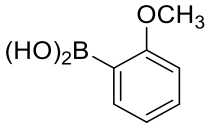
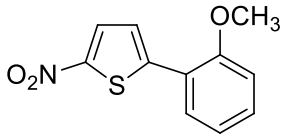
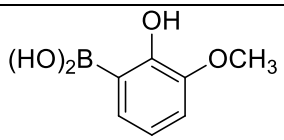
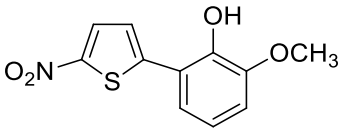
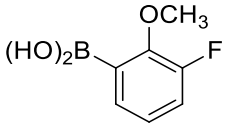
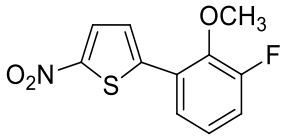
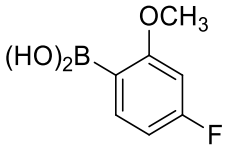
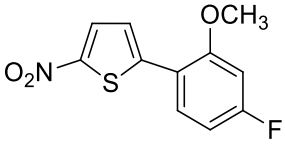
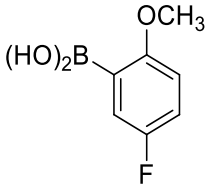
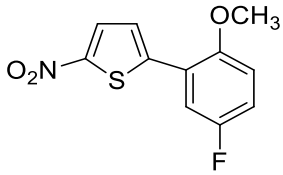
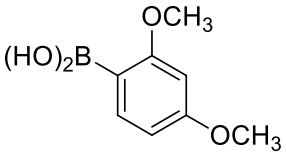
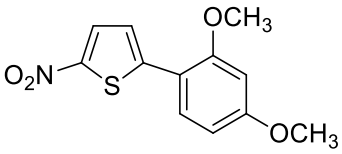
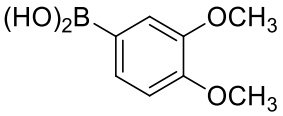
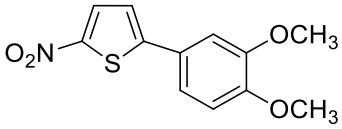
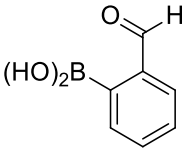
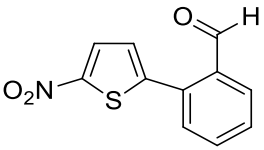
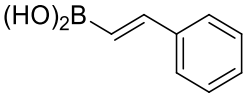
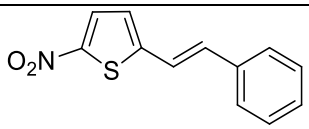
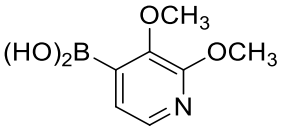
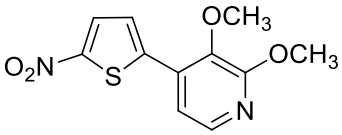


Schéma 27 : Statégie de synthèse des composés **111-121**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), K_2CO_3 [2 M], 1,4-dioxane, M/W.

Tableau 5 : Thiophènes synthétisés **111-121** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs

Acide boronique	Structure du produit	Rendement (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
 **100**	 **111**	73	97
 **101**	 **112**	85	100
 **102**	 **113**	32	100
 **103**	 **114**	80	100
 **104**	 **115**	75	100
 **105**	 **116**	90	99

 **106**	 **117**	89	100
 **107**	 **118**	68	98
 **108**	 **119**	53	95
 **109**	 **120**	62	99
 **110**	 **121**	53	100

Dans l'objectif d'établir des relations structure-activité, les différentes structures des molécules ont été conçues pour les raisons suivantes :

- La molécule **111** a été imaginée dans l'objectif de connaître si les substituants sur le noyau phényle jouent un rôle important dans l'activité biologique.
- Les molécules **112** et **113** se sont inspirées de la molécule **93** (p.80). En effet, la molécule **93** est inhibitrice d'histidine kinase. Elle possède deux groupements méthoxy en *ortho* et en *méta*. La molécule **112** ne possède qu'un seul groupement méthoxy en *ortho* afin de connaître l'impact de la suppression du deuxième groupement sur l'activité biologique. **113** plus précisément a été conçu à partir des molécules **91** et **93**. Il a été démontré que le groupement hydroxy en *ortho* a une importance sur l'activité biologique. De ce fait, **113** est disubstituée : en *ortho* par un groupement hydroxy et en *méta* par un groupement méthoxy.

- Les molécules **114-116** possèdent un groupement méthoxy en position *ortho* et elles sont de même substituées par un fluor en trois positions différentes. L'introduction de cet atome de fluor permettrait de savoir s'il est possible d'atteindre une poche hydrophobe ou un résidu du site actif, ce qui augmenterait l'activité biologique par des interactions hydrophobes.
- Les composés **117** et **118**, disubstitués par deux groupements méthoxy en différentes positions nous permettront d'établir une relation structure-activité avec la molécule **93**.
- La molécule **119** est substituée en *ortho* par une fonction aldéhyde. Cette fonction change le type d'interaction avec le site actif par rapport au composé **91** par le remplacement d'un groupement éléctro-donneur (hydroxy) par un groupement électroattracteur (aldéhyde).
- La molécule **120** ajoute un lien carboné à deux chaînons entre le thiophène et le phényle, par l'introduction d'un alcène de configuration *E*. Celle-ci permettrait de connaître l'importance de la position du noyau phényle sur l'activité biologique.
- Finalement, la molécule **121** est un analogue de la molécule **93** mais le phényle a été remplacé par un noyau pyridine. Ce noyau peut établir des interactions avec le site actif *via* des liaisons hydrogène.

(b) Synthèse de **122** par la réaction de Buchwald-Hartwig

L'équipe s'est inspirée du pyrrolamide **89**, inhibiteur de la Gyrase B, pour concevoir les inhibiteurs d'histidine kinase. Avant d'arriver à la structure finale, un intermédiaire s'est avéré intéressant pour la conception de nouveaux inhibiteurs. Il s'agit de l'intermédiaire **B** qui ne possède pas une structure planaire ce qui permettrait de connaître l'importance de l'interaction de type π-stacking avec le site catalytique. Par conséquent, la molécule **122** a été imaginée, qui allie les caractéristiques de l'intermédiaire **B** et des inhibiteurs de la série des nitro thiophènes. (Figure 32)

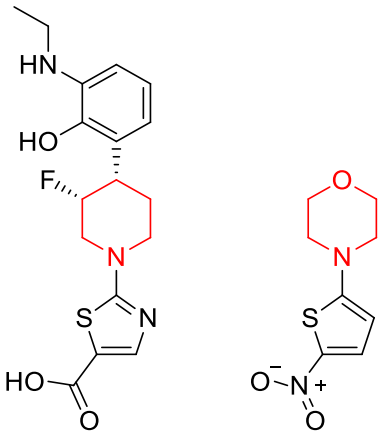


Figure 32 : Conception d'une nouvelle série non aromatique **122**

Cette molécule **122** a été synthétisée par couplage croisé de Buchwald-Hartwig. Le 2-bromo-5-nitrothiophène **98** et la morpholine **123** ont été mis en réaction en présence d'un catalyseur $Pd_2(dba)_3$ et de BINAP *racémique* avec du carbonate de césium dans du toluène pour conduire au composé **122** avec un rendement de 72% après purification par chromatographie flash. (Schéma 28)

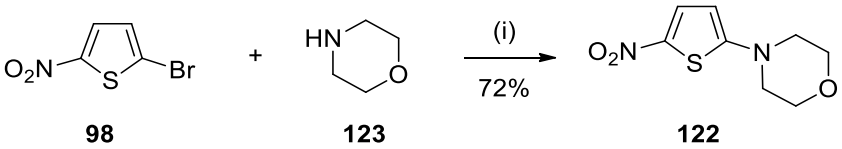


Schéma 28 : Synthèse du composé **122** par couplage de Buchwald-Hartwig
(i) $Pd_2(dba)_3$ (5 mol%), BINAP *rac*, $CsCO_3$, toluène.

(2) Série des nitro thiazole/nitro furanes

Le remplacement du thiophène par un noyau thiazole ou furane permettra de mieux comprendre quel rôle joue l'atome de soufre au sein de l'inhibiteur. Cette série a été synthétisée également par couplage croisé de Suzuki-Miyaura. Le 2-bromo-5-furane **124** ou le 2-bromo-5-nitrothiazole **125** sont mis en présence de l'acide boronique correspondant (**99**, **126-128**), en présence du $Pd(PPh_3)_4$ et d'une base dans le solvant correspondant. Au total 5 dérivés de nitro furane et de nitro thiazole ont été synthétisés par cette méthode et ils ont été obtenus avec des rendements allant de 7-65% après purification par chromatographie sur gel de silice. (Schéma 29, Tableau 6)

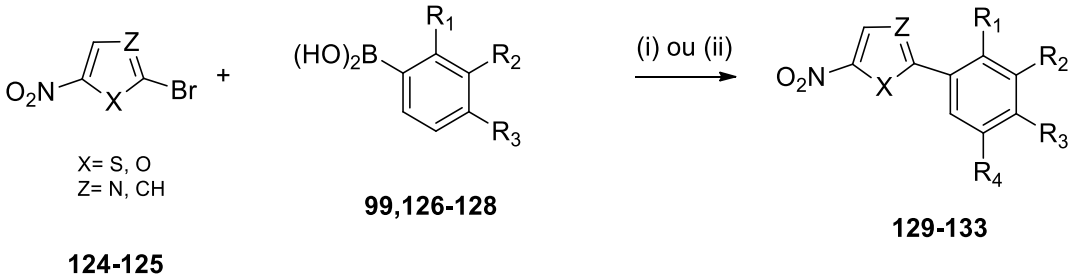


Schéma 29 : Synthèse des composés **129** à **133**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), Na_2CO_3 [2 M], DME, M/W (série des furanes) ; (ii) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), K_2CO_3 [2 M], 1,4-dioxane, M/W (série des thiazoles).

Tableau 6 : Nitro furane et nitro thiazole synthétisés **129-133** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs

Dérivé hétérocyclique	Acide boronique	Structure du produit	Rendement (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
O2N, O, Br **124**	OH, (HO)2B **99**	OH, O2N, O **129**	39	100
	(HO)2B, OH **126**	OH, O2N, O **130**	40	100
	(HO)2B, OH **127**	OH, O2N, O **131**	20	98
	OCH3, (HO)2B, OCH3 **128**	OCH3, OCH3, O2N, O **132**	65	100
N, O2N, S, Br **125**	OH, (HO)2B **99**	OH, N, O2N, S **133**	7	99

Les molécules **129**, **130** et **132** sont des analogues furane respectifs des molécules **91**, **92** et **93**. Afin d'établir des relations structures activité, le furane avec un hydroxy en position *para* du phényle **131**, a été de même synthétisé. Le thiazole **133** a été de même synthétisé pour connaître l'importance du noyau thiophène.

(3) Série des acides carboxyliques hétérocycliques

Finalement, il est de même intéressant de connaître l'impact de la suppression du groupement nitro sur l'activité biologique. De ce fait, une série d'acides carboxyliques a été préparée. Cette fonction permettrait d'interagir avec le site actif *via* des liaisons hydrogène. Comme les séries précédentes, les composés ont été obtenus par couplage croisé de Suzuki-Miyaura. Au total 8 dérivés d'acide carboxylique, **140-147**, ont été synthétisés par cette voie. (Schéma 30, Tableau 7)

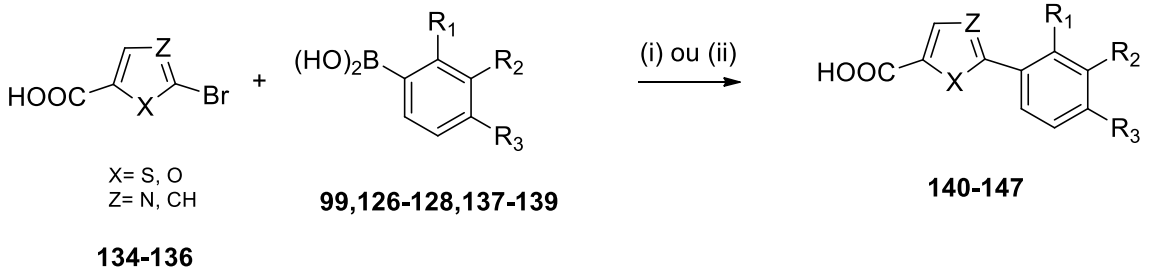
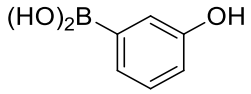
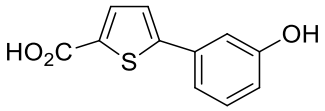
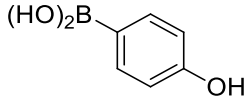
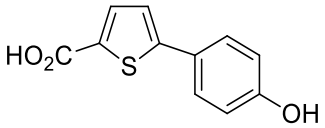
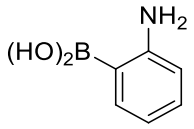
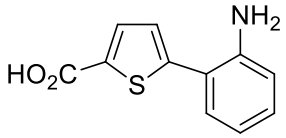
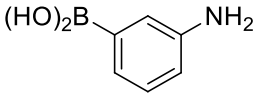
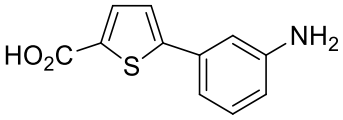
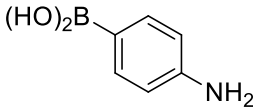
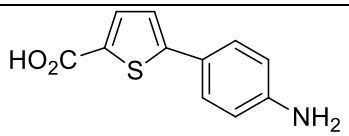
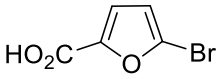
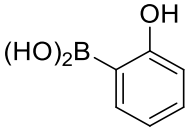
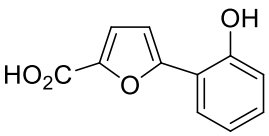
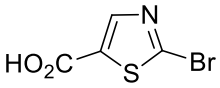
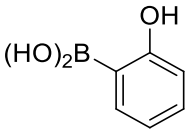
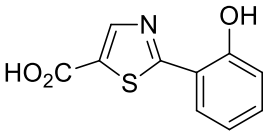


Schéma 30 : Synthèse des composés **140** à **147**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), Na_2CO_3 [2 M], DME, M/W (série des furanes) ; (ii) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), K_2CO_3 [2 M], 1,4-dioxane, M/W (série des thiophènes et thiazoles).

Tableau 7 : Série des acides carboxyliques synthétisés **140-147** par couplage de Suzuki-Miyaura et leurs rendements respectifs

Dérivé hétérocyclique	Acide boronique	Structure du produit	Rendement (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
HO_2C, S, Br **134**	$(HO)_2B$, OH **99**	HO_2C, S, OH **140**	65	100

	 **126**	 **141**	29	98
	 **127**	 **142**	39	99
	 **137**	 **143**	25	100
	 **138**	 **144**	44	100
	 **139**	 **145**	27	100
 **135**	 **99**	 **146**	45	99
 **136**	 **99**	 **147**	53	82

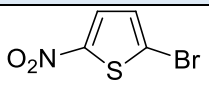
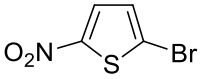
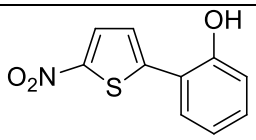
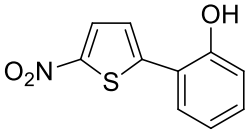
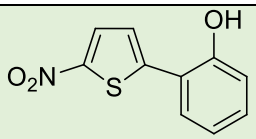
Les molécules **140** et **141** sont des analogues respectifs de molécules **91** et **92**. La molécule **142** possède un hydroxy en position para ce qui permettrait d'établir la relation structure-activité avec les molécules **140** et **141**. Les molécules **143-145** substituées par des fonctions amines sur le noyau phényle ont été également synthétisées. Le remplacement d'un hydroxy par une fonction amine permettrait de connaître leur influence sur l'activité biologique. Finalement, deux analogues de la molécule **140**, le furane **146** et le thiazole **147**, ont été synthétisés afin de déduire si le remplacement du noyau thiophène joue dans l'activité biologique.

(4) Série des amino thiophènes

Cette série a été conçue, comme pour la série des acides carboxyliques, dans l'intérêt de connaître l'importance du groupement nitro dans l'activité biologique. A la différence des séries nitro et des acides carboxyliques, la série des amino thiophène pourrait interagir comme donneur de liaisons hydrogène dans le site actif ce qui pourrait augmenter l'affinité avec celui-ci et augmenter la solubilité et peut être l'activité biologique.

De ce fait, le composé **91**, qui possède des résultats biologiques prometteurs, a été sélectionné pour débuter cette série. Cependant, la réduction de ce groupement nitro s'est avérée très problématique. En effet, plusieurs conditions ont été envisagées avant de réussir à observer le produit désiré.[90–94] Deux stratégies ont été entreprises : soit de réduire le 2-bromo-5-nitrothiophène **98** puis ensuite réaliser le couplage de Suzuki-Miyaura ou soit de réduire le produit issu du couplage **91**. (Tableau 8)

Tableau 8 : Conditions utilisées pour réduire le groupement nitro

	Réactif à réduire	Conditions	Commentaires
Expérience 1	 **98**	Fe, NH_4Cl EtOH, H_2O 90 °C, N_2[90]	Dégradation du produit de départ
Expérience 2	 **98**	Fe HCl conc 50 °C[91]	Récupération du produit de départ
Expérience 3	 **91**	Pd/C, NH_4HCO_2 AcOEt, EtOH 95 °C,N_2[92]	Récupération du produit de départ
Expérience 4	 **91**	Fe, AcOH 65 °C[93]	Dégradation du produit de départ
Expérience 5	 **91**	Pd/C $NaBH_4$ MeOH 0 °C à TA[94]	Produit désiré observé par révélation à la ninhydrine

Ces conditions ont été extraites de la littérature. Pour certaines d'entre elles, le produit de départ est soit récupéré soit il se dégrade au fur et à mesure de la réaction. Une seule condition a permis de réduire ce groupement nitro en amine.

Cette réaction a pu s'effectuer à partir du composé **91** par hydrogénation catalytique générée *in situ* en présence de palladium sur charbon et de borohydrure de sodium qui conduit à la molécule **148** avec un rendement brut de 88%. (Schéma 31)

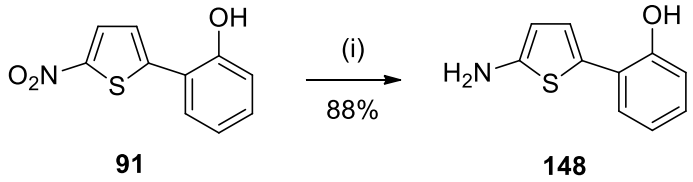


Schéma 31 : Réduction du groupement nitro du composé **91**
(i) Pd/C, $NaBH_4$, MeOH, 0 °C

La réduction du groupement nitro a été confirmée par ^{1}H RMN, UPLC et HRMS. L'analyse de la RMN du proton (Figure 33) et du carbone de cet échantillon **148** a montré la présence de groupements caractéristiques de la molécule attendue :

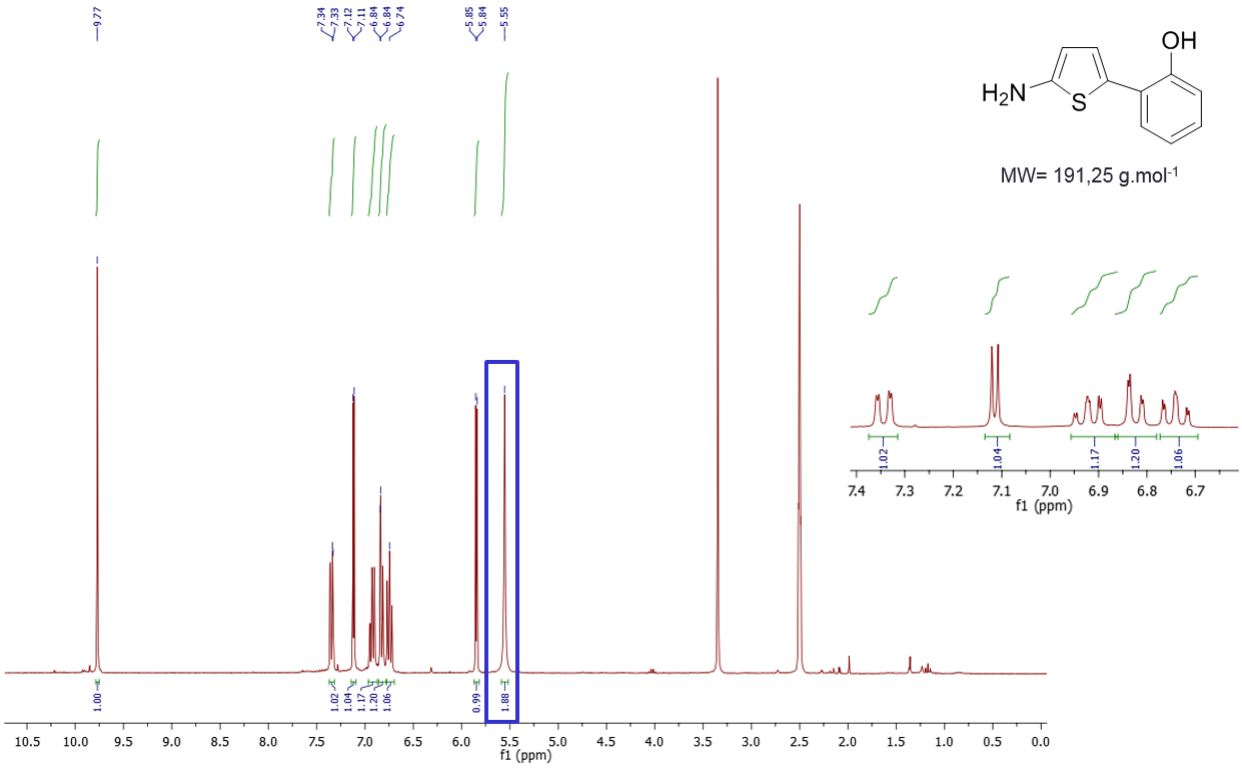


Figure 33 : Spectre RMN du proton du composé **148**

- La fonction alcool par la présence d'un singulet à 9,76 ppm en proton et 154,1 ppm en carbone.
- Le thiophène par la présence de deux doublets à 5,84 ppm et 7,11 ppm en proton et 103,9 ppm et 124,5 ppm respectivement.
- La fonction amine par la présence d'un singulet intégrant pour deux protons à 5,54 ppm en proton et 152,3 ppm en carbone.

En conclusion, ces analyses confirment bien la présence de la fonction amine au sein de la molécule **148**.

Cependant il a été constaté que **148** se dégrade en fonction du temps. Par conséquent, le chlorhydrate d'amine correspondant **149** a été synthétisé afin d'éviter cette dégradation. Au composé **148** dans du THF a été ajoutée une solution de HCl [12 M] pendant 20 min pour obtenir le composé **149** avec un rendement brut de 75%. (Schéma 32)

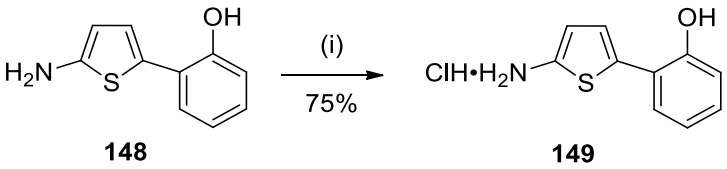


Schéma 32 : Formation du chlorohydrate **149**
(i) HCl [12 M], THF, 0 °C.

Après optimisation du protocole, la réduction du groupement nitro de la molécule **92** ainsi que la formation du sel correspondant a été effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées sur **91**. La molécule **151** a obtenu avec un rendement brut global sur deux étapes de 21%. (

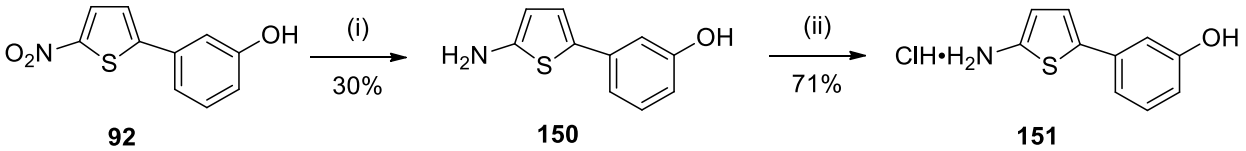


Schéma **33**)

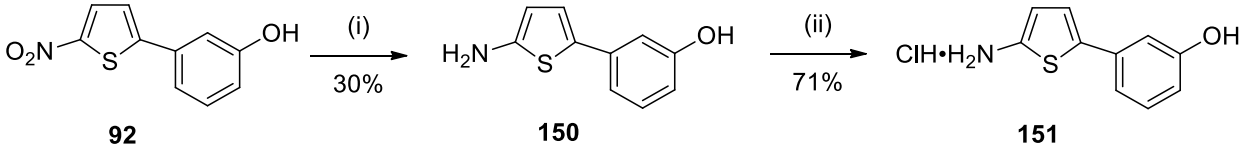


Schéma 33 : Synthèse du composé **151**

(i) Pd/C, $NaBH_4$, MeOH, 0 °C ; (ii) HCl [12 M], THF, 0 °C.

Cependant, étant donné que la molécule **151** a été synthétisée tardivement, elle n'a pas pu être évaluée comme inhibiteur potentiel d'histidine kinase. Seul les résultats obtenus sur l'activité d'adjuvant ont été réalisés et sont évoqués en section Chapitre 1, II.A.4.d).

(5) Conclusion

Au total 27 inhibiteurs potentiels d'histidine kinase ont été synthétisés. Toutes les molécules ont été purifiées sur chromatographie de gel de silice ou par chromatographie flash et obtenues avec des rendements variant de 7% à 90%. De plus, elles ont été caractérisées par RMN du proton ^{1}H, par RMN du carbone ^{13}C, par RMN du fluor ^{19}F, par IR, par UPLC et par HRMS. Finalement, elles ont été envoyées à nos collaborateurs biologistes, Dr. Hendrik Szurmant a évalué leur activité inhibitrice sur les TCS et leurs activités antibactériennes sur des souches sensibles. Par ailleurs nos collaborateurs du CHU de Nîmes, Pr. Jean-Philippe Lavigne et Dr. Catherine Dunyach-Rémy, ont évalué leurs activités d'adjuvant d'antibiotiques.

3. Résultats biologiques

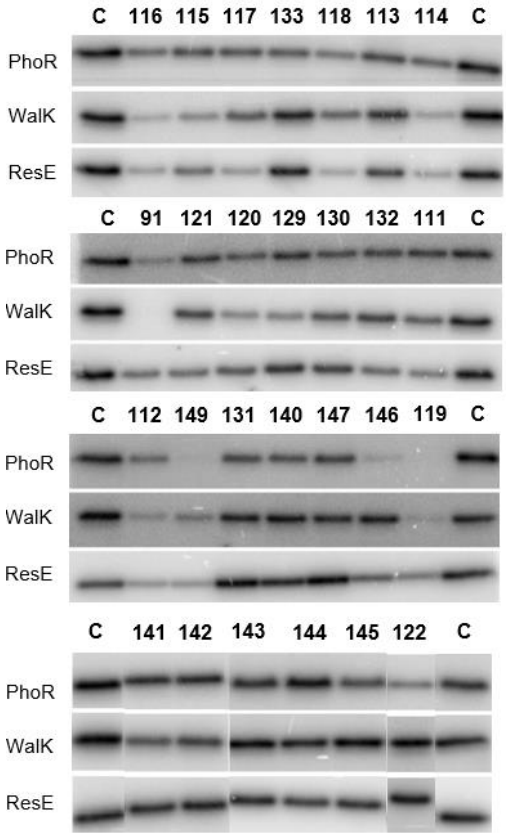
a) Evaluation comme inhibiteurs potentiels de multiples histidine kinase

(1) Les kinases bactériennes

Dans un premier temps, nos collaborateurs ont évalué, par des études *in vitro* en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel, la capacité des 26 composés à inhiber l'autophosphorylation des histidines kinases de PhoR, WalK and ResE issues de *Bacillus subtilis.* Cette évaluation a été réalisée avec une concentration équimolaire de 1 mM d'inhibiteur et d'ATP. Un contrôle (Figure 34, **C**) a été de même utilisé dans lequel aucun inhibiteur n'a été ajouté ce qui permet de contrôler si une autophosphorylation de HK est possible en présence uniquement du substrat naturel (ATP). Si le composé n'a aucun effet sur l'autophosphorylation de HK, donc il n'est pas inhibiteur, celui-ci présentera un profil comme le contrôle (**C**) et sera représenté par un signe (+). Lorsque les bandes disparaissent (représenté par un signe (-)), cela signifie que le composé empêche l'autophosphorylation de l'histidine kinase par l'ATP et donc qui possède une forte activité inhibitrice, c'est le cas de la molécule **91** sur WalK (2ème Tableau, Figure 34). Les bandes plus ou moins claires (représenté par +/-) signifient que le composé a une activité inhibitrice

d'autophosphorylation plus ou moins forte sur l'histidine kinase (Exemple : molécule **119** sur WalK ; 3ème Tableau, Figure 34).

Les résultats obtenus sont les suivants (Figure 34) :



	C	116	115	117	133	118	113	114	C
PhoR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WalK	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+
ResE	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+

	C	91	121	120	129	130	132	111	C
PhoR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WalK	+	-	+	+/-	+/-	+	+	+	+
ResE	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	C	112	149	131	140	147	146	119	C
PhoR	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+
WalK	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+
ResE	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+

	C	141	142	143	144	145	122	C
PhoR	+	+	+	+	+	+	+	+
WalK	+	+	+	+	+	+	+	+
ResE	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 34 : Evaluation des composés sur l'inhibition de l'autophosphorylation de multiples HK. + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; - : L'autophosphorylation n'a pas lieu ; +/- : inhibition partielle observée ; C : Contrôle (HK + ATP en absence d'inhibiteur).

En analysant ces nouveaux résultats, nous pouvons établir des relations structure-activité par rapport aux 8 inhibiteurs de HK décrits en section Travaux préliminaires :

- Les analogues de furane **129** et de thiazole **133**, de la molécule **91** ainsi que les furanes **130-132**, montrent un maintien de l'autophosphorylation ce qui suggère que le noyau thiophène de la molécule **91** est essentiel à l'activité biologique.
- Le composé **122** qui ne possède pas de structure planaire n'a aucun effet sur l'activité d'autophosphorylation de HK ce qui suggère que le noyau phényle et son interaction de type π-stacking avec le résidu de Tyr507 est essentiel à l'activité biologique.

- Le composé **121**, analogue de la molécule **93** qui possède une pyridine, n'influence pas l'activité biologique, laissant penser que l'ajout d'un atome d'azote n'affecte pas l'activité inhibitrice. Par ailleurs, l'ajout du lien carboné sur la molécule **120** n'empêche pas l'activité d'autophosphorylation.
- Les molécules **140-145** possédant un acide carboxylique et un noyau thiophène n'inhibent pas l'activité d'autophosphorylation alors que ceux substitués par un groupement nitro sont inhibiteurs de cette même activité.
- Les acides carboxyliques analogues de **91** avec un furane **146** et un thiazole **147** semblent ne pas avoir d'influence sur les HK WalK et ResE. Cependant, le furane **146** inhibe faiblement l'autophosphorylation de PhoR à la différence de son analogue thiazole **147**. Ceci suggère que le noyau furane substitué par un acide carboxylique (**146**) a une influence sur l'activité de la kinase PhoR et que les noyaux thiazoles ne sont pas adéquats pour la conception d'inhibiteurs de HK.
- L'absence de substituants sur le noyau phényle de **111** n'inhibe pas l'autophosphorylation confirmant que les substituants sur le noyau phényle interagissent de façon favorable avec le site actif et participent à l'activité biologique des inhibiteurs.
- La molécule **113** analogue de **93** n'affecte pas l'activité d'autophosphorylation de HK cela signifierait que le groupement méthoxy en position *méta* est certainement trop volumineux. En revanche, la molécule **112** possédant un méthoxy en position *ortho* atténue l'intensité des bandes pour WalK et ResE ce qui nous suggèrerait que l'activité est certainement due aux substituants en position *ortho*. La disubstitution par deux méthoxy en position *ortho* et *para* **117** et en *méta* et *para* **118** semblent avoir une légère influence sur l'HK ResE. Il semblerait que le groupement méthoxy en position *para*, donc un groupement volumineux et hydrophobe inhibe l'autophosphorylation pour le système ResE. La disubstitution des molécules **114-116** avec un méthoxy en position *ortho* et un atome de fluor en *ortho* **114**, en *méta* **115** et en *para* **116** du groupement méthoxy inhibe faiblement l'activité de l'ATP sur le système de WalK. De plus, **114** et **116** inhibent faiblement l'activité de ResE. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par la molécule **112** qui elle ne possède que le groupement méthoxy en *ortho*. Ces résultats suggèrent que l'activité des molécules **114-116** est due à la présence du groupement méthoxy. Pour résumer, les groupements méthoxy en position *ortho* ou *para* ont une faible influence sur l'activité d'autophosphorylation.
- Finalement, l'analogue de la molécule **91** par l'introduction d'une fonction aldéhyde en position *ortho* **119** inhibe considérablement l'activité d'autophosphorylation sur le système

de PhoR et faiblement sur WalK. Un résidu pouvant interagir *via* des liaisons hydrogène avec cet aldéhyde est à proximité et cette interaction augmente l'activité biologique.

- Le chlorhydrate d'amine **149** inhibe l'autophosphorylation de PhoR et faiblement celle de WalK et ResE. Ce groupement nous ouvre la possibilité d'interagir différemment avec le site actif par l'intermédiaire de liaison hydrogènes.

Toutes ces informations nous permettent d'imaginer la conception d'un nouveau pharmacophore. En effet, trois familles de molécules possèdent une activité inhibitrice sur l'autophosphorylation de HK : les nitro thiophènes, les acides carboxyliques possédant un furane et les chlorohydrates d'amine. (Figure 35)

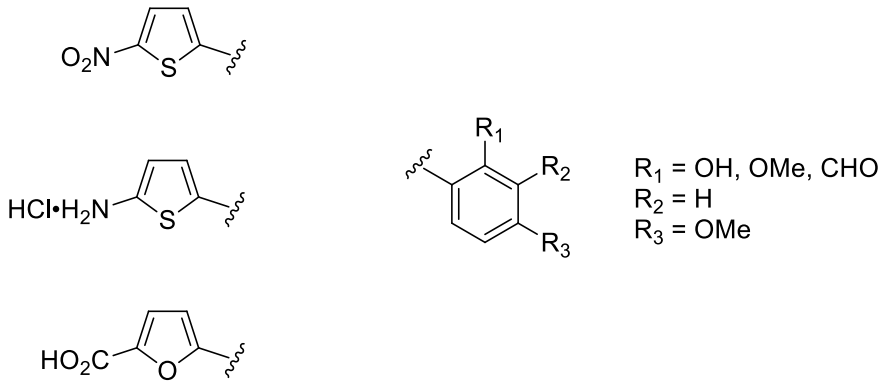
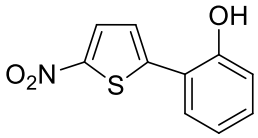


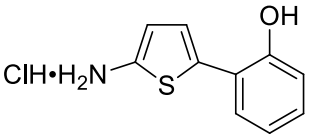
Figure 35 : Conception d'un pharmacophore potentiel

Pour avoir une valeur exacte d'inhibition des inhibiteurs, la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}) doit être déterminée. Or, du fait du coût élevé des tests biologiques, le Dr. Hendrik Szurmant nous a demandé de choisir les molécules pour lesquelles nous souhaitons déterminer les CI_{50}. Notre choix s'est porté sur les inhibiteurs que ne présentaient pas de bande ou des bandes très claires à savoir **119** sur WalK et PhoR et le composé **149** sur PhoR. Le composé **119** obtient une CI_{50} de 25,5 µM et 35,2 µM pour les systèmes de WalK et PhoR respectivement et **149** obtient une CI_{50} de 50,2 µM pour PhoR (Figure 36). Les valeurs d'inhibition du composé **91** sur PhoR et WalK ont été considérablement améliorées passant d'une CI_{50} de 196 µM[89] pour WalK et de 122 µM[89] pour PhoR à des valeurs aux alentours de 40 µM pour les analogues respectifs.



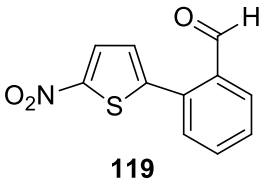
91 : Molécule publiée

CI_{50} = 196 µM (WalK)
122 µM (PhoR)



149

CI_{50} = 50,5 µM (PhoR)



119

CI_{50} = 25,5 µM (WalK)
35,2 µM (PhoR)

Figure 36 : Inhibiteurs présentant une activité inhibitrice sur WalK et PhoR

En résumé, les modifications structurelles envisagées n'ont pas forcément d'effet sur l'activité d'autophosphorylation de HK (les noyaux de furanes et de thiazole, la série des acides carboxyliques, l'ajout du lien carboné, la substitution de groupement hydrophobes, etc). Les résultats en général confirment que l'activité inhibitrice est conférée à la présence du noyau thiophène substitué par un nitro ou de furane à condition qu'il soit substitué par un acide carboxylique. De plus, la substitution du phényle en position *ortho* est essentielle à l'activité biologique. Grâce à ces modifications deux molécules sont inhibitrices de HK, **119** et **149**, et leurs valeurs de CI_{50} sont meilleurs que celles obtenues par leur analogue **91**.

(2) Les kinases eucaryotes

Ces résultats sont prometteurs, cependant il existe la possibilité que ces inhibiteurs puissent inhiber d'autres voies de signalisation en l'occurrence, des voies de signalisation chez les cellules eucaryotes. Il s'avère que les kinases possèdent une haute homologie de séquences au niveau du site catalytique. De ce fait, il serait nécessaire de vérifier si ces inhibiteurs ont une activité chez les kinases eucaryotes. Pour ce faire, ces 26 nouveaux inhibiteurs ont été évalués sur la kinase IreK (sérine/thréonine kinase) sur la souche d'*Enterococcus faecalis.* Après évaluation, il a été démontré qu'aucune molécule n'inhibe cette kinase à des concentrations au-delà de 800 µM d'inhibiteur, ce qui suggèrerait que ces nouveaux inhibiteurs sont sélectifs des HK procaryotes et qu'ils n'inhibent pas les systèmes eucaryotes. (Figure 37)

	C	116	115	117	133	118	113	114	C
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	**91**	**121**	**120**	**129**	**130**	**132**	**111**	**C**
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	**112**	**149**	**131**	**140**	**147**	**146**	**119**	**C**
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	**141**	**142**	**143**	**144**	**145**	**122**	**C**	
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	

Figure 37 : Résultats d'inhibition des molécules sur la capacité d'inhibition sur les kinases eucaryotes **111-122**, **129-133**, **140-147** et **149** ; + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; C : Contrôle (IreK + ATP en absence d'inhibiteur).

b) Evaluation biologique sur des souches bactériennes

Par la suite, les activités antibactériennes des 26 molécules ont été évaluées par essai standard de diffusion sur disque de Kirby-Bauer (Figure 38). Chaque disque en papier a été imprégné de 500 µg de chacun des composés et ils ont été placés sur des plaques contenant des souches sensibles de *B. subtilis*. Après l'incubation, des anneaux clairs d'inhibition de la croissance ont pu être observés pour huit composés : **119**, **120**, **129**, **130**, **131**, **132**, **144** et **149** (Figure 39) avec des inhibitions voisines voire supérieures à celles exprimées par le contrôle (Ampicilline : 10 µg/disque). Pour les autres composés aucune inhibition de croissance n'a été observée.

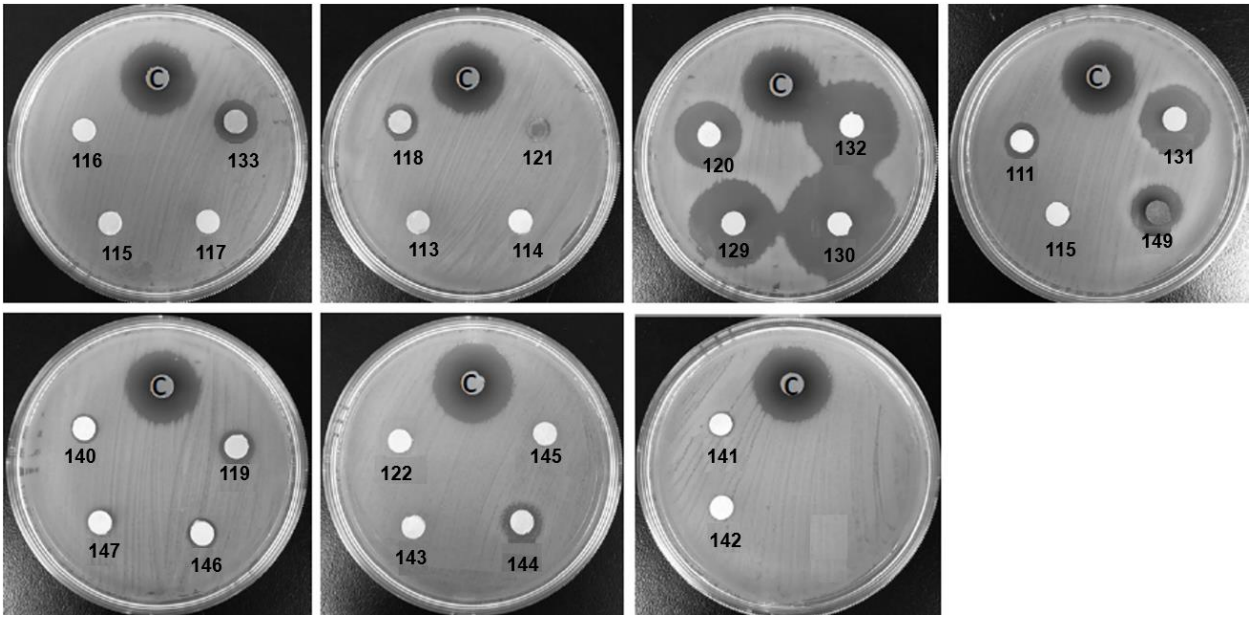


Figure 38 : Evaluation de l'activité antibactérienne des 26 molécules sur *B. subtilis* par la méthode de diffusion de Kirby-Bauer.

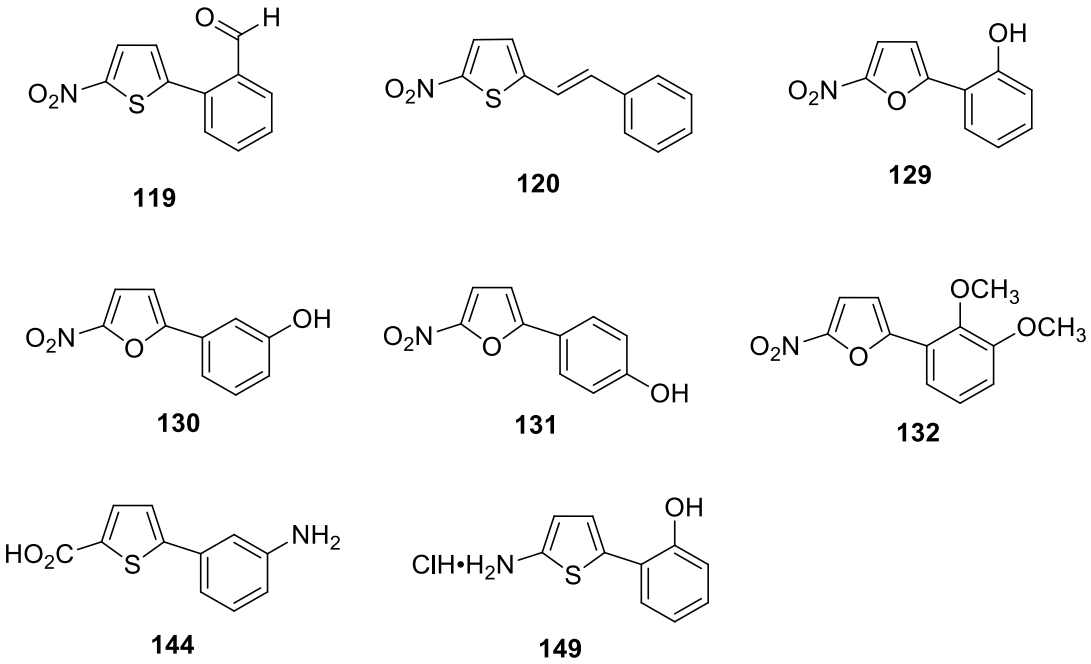


Figure 39 : Structure des molécules présentant une activité antibactérienne par méthode de Kirby-Bauer sur *B. subtilis*.

Ces résultats prometteurs ont incité, par la suite, à quantifier les activités antimicrobiennes des composés ayant un halo égal ou supérieur au contrôle et les mettre en présence d'un panel de huit souches bactériennes. Par ailleurs, l'observation de l'inhibition de la croissance bactérienne ou la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ainsi que la détermination de la

concentration bactéricide minimale de (CMB) qui est définie par la concentration où 99,99% des bactéries sont tuées, sont résumées sur le Tableau 9.

Tableau 9 : Valeurs de CMI et CMB réalisées sur huit bactéries sensibles des molécules **120**, **129**, **130** et **132**.

	120		**129**		**130**		**132**	
	CMI µg/mL	**CMB µg/mL**	**CMI µg/mL**	**CMB µg/mL**	**CMI µg/mL**	**CMB µg/mL**	**CMI µg/mL**	**CMB µg/mL**
B. subtilis (G +)	3,125	6,25	0,585	0,585	0,146	0,146	0,585	0,585
S. aureus (G +)	>25	>25	6,25	6,25	1,56	1,56	6,25	12,5
B. anthracis (G +)	3,125	3,125	0,78	0,78	0,097	0,097	0,39	0,39
S. pyogenes (G +)	18,75	>25	0,585	0,585	0,097	0,195	0,78	0,78
S. agalactiae (G +)	>200	>200	>50	>200	25	50	>200	>200
E. faecalis (G +)	>200	>200	12,5	18,75	3,125	3,125	6,25	18,75
S. enterica (G -)	>25	>25	1,56	>6,25	0,78	>0,78	12,5	>50
E. coli (G -)	>200	>200	9,375	9,375	3,125	3,125	6,25	9,375

Les molécules **129**, **130** et **132** sont les analogues respectifs des molécules **91**, **92** et **93** possédant un noyau furane. En effet, les molécules **91** et **92** possèdent des valeurs d'inhibition antibactérienne assez similaire avec une CMI variant de 7 à 32 µg/mL et une CMB variant de 10 à >64 µg/mL et le composé **93** ne présente pas d'activité antibactérienne. Les résultats obtenus avec la série des furanes **129**, **130** et **132** montrent de toute évidence, une activité antibactérienne sur les bactéries Gram positif et Gram négatif. Leurs CMI varient de 0,097 à 12,5 µg/mL ainsi que les CMB 0,097 à 18,75 µg/mL (Tableau 9). Ces valeurs sont considérablement améliorées par rapport à la série des thiophènes **91** et **92**. A la différence de son analogue thiophène **93**, le furane **132** présente une

activité antibactérienne ce qui laisse penser que cette activité surprenante est due à la présence du noyau furane. La molécule **120** qui possède un noyau thiophène et un lien carboné entre l'hétérocycle et le phényle, présente une activité antibactérienne moindre à celle observée pour la série des furanes avec des valeurs de CMI variant de 3,125 à >200 µg/mL.

Cependant aucune molécule n'est active contre la souche *S. agalactiae* cela peut être dû à une particularité de cette souche comme la perméabilité de la membrane ou peut être des protéines propres à la souche sur lesquelles les molécules n'ont aucune activité.

L'activité antibactérienne des molécules **120**, **129**, **130** et **132** n'est pas corrélée à une inhibition des HK à la différence des molécules **91** et **92**. Cela laisserait penser que cette activité antibactérienne proviendrait d'un autre mécanisme moléculaire. Une possible inhibition de gyrase procaryote ou une inhibition des pompes à efflux au niveau de la paroi bactérienne pourrait peut-être expliquer cette activité.

De plus, les molécules ne présentant pas d'activité antibactérienne, cela pourrait s'expliquer par une difficulté de l'inhibiteur à traverser les membranes.

c) Evaluation comme adjuvants d'antibiotiques

Les bactéries développent de plus en plus des résistances aux antibiotiques mis actuellement sur le marché et il est indispensable de trouver de nouvelles alternatives pour lutter contre ces résistances. En effet, une des alternatives à cette résistance pourrait provenir de l'inhibition des systèmes à deux composants. Comme démontré dans les paragraphes précédents, ce système peut être vital pour la bactérie et l'inhiber. Ce système empêcherait la bactérie d'alerter sur la présence d'un antibiotique dans le milieu. Par conséquent, aucun mécanisme de résistance ne se déploierait au sein de celle-ci et donc l'antibiotique pourrait agir efficacement, sans risque de modification. En d'autres termes, cette cible permettrait donc de concevoir de nouveaux adjuvants d'antibiotiques. Un adjuvant d'antibiotique est d'une molécule ayant une faible activité ou dépourvue d'activité antibactérienne mais qui, en présence d'antibiotique, est capable de restaurer l'activité antibactérienne de cet antibiotique pour lequel la bactérie a présenté une résistance. Cette molécule viendrait renforcer ou compléter l'action de l'antibiotique en question.

Ces travaux ont été réalisés par nos collaborateurs du CHU de Nîmes, l'équipe du Pr. Jean-Philippe Lavigne et le Dr. Catherine Dunyach-Remy.

Les vingt-sept molécules ont été envoyées à nos collaborateurs nîmois, afin d'être évaluées comme adjuvant d'antibiotiques. Dans un premier temps, elles ont été testées sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM). Ces analyses ont été effectuées dans des plaques de 96 puits. Un contrôle positif a été utilisé en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* sensible (ATTC 2993) avec un ajout de Cloxacilline à différentes concentrations. Les molécules adjuvantes potentielles ont été ajoutées à une concentration de 100 µM afin de pouvoir faire une sélection rapide. Seulement cinq composés ont montré des résultats positifs et ils sont résumés dans le Tableau 10.

La CMI de la Cloxacilline est supérieure à 16 µg/mL sur la souche résistante SARM. Cependant l'ajout de 100 µM d'inhibiteur fait diminuer cette valeur à 4 µg/mL en présence de **151**, à 0,03 µg/mL en présence de **129** et **130** et à 0,125 µg/mL en présence de **149**.

Cette même expérience a été réalisée à une concentration de 50 µM d'inhibiteur. La CMI de la Cloxacilline sur SARM n'est pas modifiée en présence du composé **129** (CMI = 16 µg/mL). Cependant en présence de 50 µM des composés **130**, **149** et **151** les résultats restent inchangés par rapport aux résultats obtenus à forte concentration (100 µM).

Ces mêmes expériences ont été également réalisées sur la souche d'*Escherichia coli* résistante à la Céfotaxine. Ces résultats montrent que lorsque les composés sont ajoutés à des concentrations de 100 µM, il est observé que les composés **129**, **130** et **132** font passer la CMI de la Céfotaxine à une valeur inférieure à 0,0125 µm/mL. Ces valeurs restent invariables lorsque la concentration d'inhibiteur est diminuée à 50 µM de composés. Il est intéressant de noter que les molécules **149** et **151** ne possèdent pas d'activité sur *E. coli*. (Tableau 10)

Tableau 10 : Résultats obtenus sur l'activité d'adjuvant d'antibiotiques

	Staphylococcus aureus (G +) résistante + Cloxacilline (µg/mL)	*Escherichia coli* (G -) résistante + Cefotaxine (µg/mL)	*Staphylococcus aureus* (G +) sensible sans antibiotique	*Escherichia coli* (G -) sensible sans antibiotique
Ajout de composé à 100 µM				
129	<0,03	<0,0125	-	-
130	<0,03	<0,0125	Pas de croissance	Pas de croissance
132	-	<0,0125	-	-
149	0,125	-	-	-
151	4	-	Croissance bactérienne	En cours
Ajout de composé à 50 µM				
129	16	<0,0125	-	-
130	<0,03	<0,0125	Pas de croissance	Pas de croissance
132	-	<0,0125	-	-
149	0,125	-	-	-
151	4	-	Croissance bactérienne	En cours

Ces résultats montrent que ces molécules **129**, **130**, **132**, **149** et **151** ont la capacité de réduire la CMI des antibiotiques en présence de souches bactériennes résistantes. Malgré ces résultats encourageants, il existe l'hypothèse que cela soit lié à un effet antibactérien propre à la molécule.

Pour la suite des analyses biologiques, seulement les molécules **130** et **151** ont été prises en compte. Les molécules **130** et **151** ont été mises en présence de souches sensibles de *S. aureus* et d'*E. coli* en absence d'antibiotiques. La molécule **130** a été évaluée sur les souches sensibles de *S. aureus* et d'*E. coli* car elle présente une inhibition de la croissance bactérienne sur les souches résistantes. En revanche la molécule **151** sera évaluée uniquement sur la souche de *S. aureus* étant

donné qu'elle présente une inhibition de la croissance sur la souche de *S. aureus* résistante. Les molécules **130** et **151** ont été ajoutées à des concentrations décroissantes (100 µM, 50 µM, 20 µM, 10 µM, 1 µM et 0,5 µM). Si l'inhibiteur possède une activité adjuvante celui-ci ne doit pas avoir d'effet sur la souche bactérienne en absence d'antibiotique. C'est le cas pour la molécule **151**. (Tableau 10) La croissance bactérienne de *S. aureus* n'est pas affectée en présence de **151** à concentrations décroissantes. Cette observation permet de déduire que la molécule **151** possède une activité adjuvante. En revanche, il a été constaté qu'aucune croissance bactérienne n'a lieu en présence de **130** à des concentrations décroissantes sur les souches de *S. aureus* et d'*E. coli* ce qui laisse imaginer que **130** possède un effet antibactérien intrinsèque.

Au vu de ces résultats, les molécules **129**, **130**, **132** et **149** ayant une activité antibactérienne ne possèdent pas d'activités d'adjuvants d'antibiotiques. La molécule **151** est un adjuvant d'antibiotique. Cependant son activité d'inhibition de HK n'est pas connue pour le moment. Des évaluations biologiques sont en cours de réalisation.

4. Conclusion sur la série des hétérocycles

Pour résumer, 27 nouveaux inhibiteurs potentiels, analogues des molécules **91**, **92** et **93** ont été synthétisés. Des modifications structurelles ont été envisagées afin d'augmenter l'activité biologique et pouvoir établir des relations de structure activité. Deux molécules se sont avérées inhibitrice de HK : **119** et **149** mais elles ne présentent pas d'activité adjuvante. De plus, d'une façon inattendue trois molécules qui ne possèdent pas d'activité inhibitrice sur HK, ont une activité antibactérienne prometteuse sur les souches sensibles ainsi que sur des souches résistantes (**129**, **130** et **132**). La molécule **151** est la seule molécule à présenter une activité d'adjuvant d'antibiotiques et l'évaluation de l'activité inhibitrice sur HK est en cours de réalisation. Par ailleurs, aucune molécule n'inhibe les kinases eucaryotes ce qui se traduit par une spécificité des molécules à inhiber les kinases procaryotes. Par la suite, nous chercherons donc à effectuer des modulations chimiques sur ces structures afin d'augmenter l'activité inhibitrice sur les HK et de même de corréler cette activité inhibitrice à une activité antibactérienne et adjuvante d'antibiotiques. La rédaction d'une publication concernant ces dérivés, inhibiteurs de la prolifération bactérienne est en cours de rédaction.

E. Série des dérivés sulfonamides et des sulfonates

1. Sulfonamides dans le domaine médical : antibactériens

L'intérêt porté sur la famille des sulfonamides débute en milieu des années 30 par la découverte du Protonsil® ou sulfamidochrysoïde présentant des propriétés antimicrobiennes. Le Protonsil® est un colorant de type sulfonamide au sein de sa structure. Gerhard Domagk essayait de sauver sa fille, atteinte d'une infection causée par un *Streptococci*. Il a donc observé que ce colorant possédait des propriétés antibactériennes et grâce à cela, le Prix Nobel en Médecine lui est accordé en 1939.[95] (Figure 40)

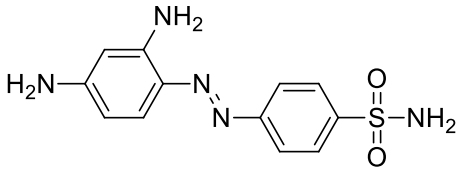


Figure 40 : Structure de Protonsil®

Le mode d'action de cette molécule a été élucidé un an plus tard par Ernest Fourneau qui a démontré qu'en effet Protonsil® était une prodrogue. Le corps humain métabolise cette molécule en aminobenzènesulfonamide (sulfanilamide) qui possède une activité antibactérienne. (Schéma 34)

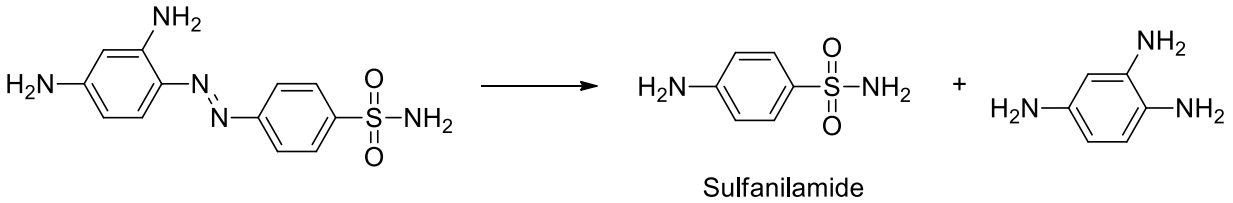


Schéma 34 : Métabolisation du Protonsil

Cette confirmation de l'activité antibactérienne des sulfanilamides a entraîné par la suite le développement de nouveaux analogues.

En 1938 les 4-amino-*N*-(pyridin-2-yl)benzenesulfonamide ou sulfapyridines ont été utilisées contre les infections causées par les pneumocoques et en 1941, les *N*-((4-aminophenyl)sulfonyl)acetamide ou sulfacetamide ont été utilisés contre les infections urinaires.

En 1942, les acides 4-oxo-4-((4-(*N*-(thiazol-2-yl)sulfamoyl)phenyl)amino)butanoïques ou succinoylsulfathiazoles ont été utilisés contre les infections gastroinstestinales et de même utilisés pendant la deuxième guerre mondiale pour les infections sur les plaies.[95] (Figure 41)

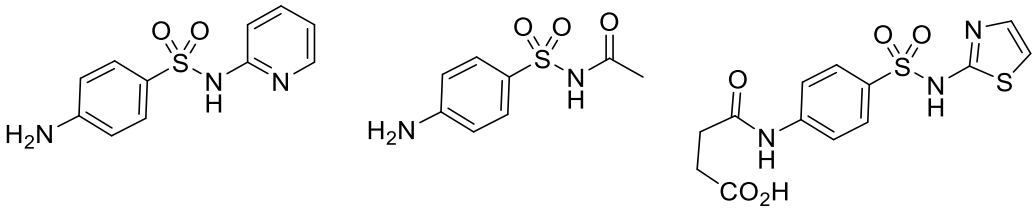


Figure 41 : Structures des sulfapyridines, sulfacetamide et sulfathiazole

Ces sulfonamides présentent des propriétés antibactériennes efficaces contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. En effet, les sulfonamides sont des antagonistes compétitifs de l'acide *para*-aminobenzoïque (PABA), le composé essentiel de l'acide folique ainsi que pour la propagation de la bactérie. Les sulfonamides bloquent la synthèse de l'acide folique ayant un effet bactériostatique sur la bactérie. [96–98] (Figure 42)

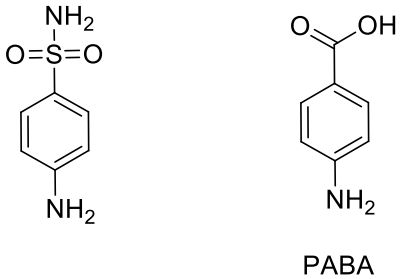


Figure 42 : Comparaison des similarités rencontrées entre le *para*-aminobenzoïque (PABA) et le sulfanilamide

2. Synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels d'histidine kinase

a) Conception des nouveaux sulfonates et sulfonamides

Même si les résultats précédents sont prometteurs, il a été envisagé de continuer la recherche de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase ayant une activité d'adjuvants d'antibiotiques potentielle.

Dans la littérature, de nombreux sulfonamides ont été conçus pour leur activité antibactérienne. La grande majorité de ces composés possèdent deux noyaux aromatiques (un d'entre eux étant un hétérocycle) reliés par un groupement sulfonamide. [96] (Figure 43)

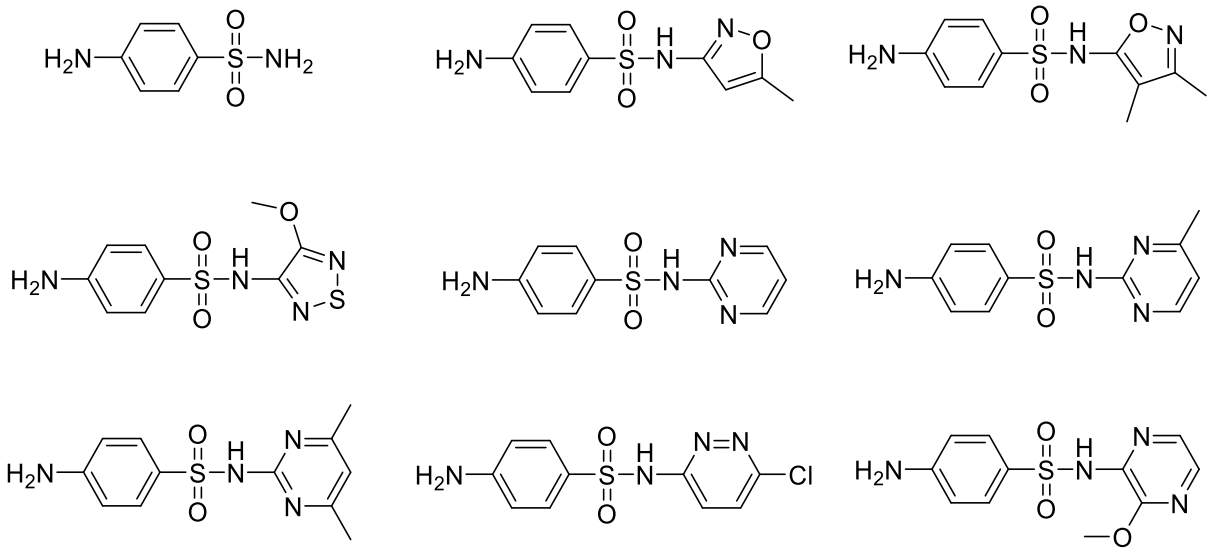


Figure 43[96] : Exemples de sulfonamides avec des activités antibactériennes de la littérature

Il a été de même constaté que certains inhibiteurs d'HK, décrits dans la littérature, possèdent des points communs. En effet, ils ont deux cycles aromatiques reliés par un lien à 2 chainons. Ce lien peut s'agir d'un sulfonamide et/ou un amide qui peuvent réaliser des liaisons hydrogène avec le site actif. [49,50,62] (Figure 44)

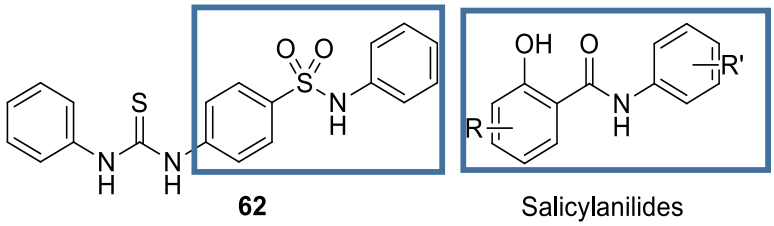


Figure 44 : Inhibiteurs d'histidine kinase appartenant à la famille des sulfonamides (**62**) et des salicylanilides

Par ailleurs, les résultats précédents obtenus au laboratoire montrent que le groupement nitro, l'hydroxyle en *ortho* du phényle **91** et la fonction amine en *para* du phényle **90**, **94** et **96** permettent d'observer une activité inhibitrice de l'autophosphorylation des HK des inhibiteurs. L'inhibiteur **119** possède un aldéhyde en position 2 du phényle pourrait permettre ainsi de réaliser des liaisons hydrogène avec le site actif. (Figure 45)

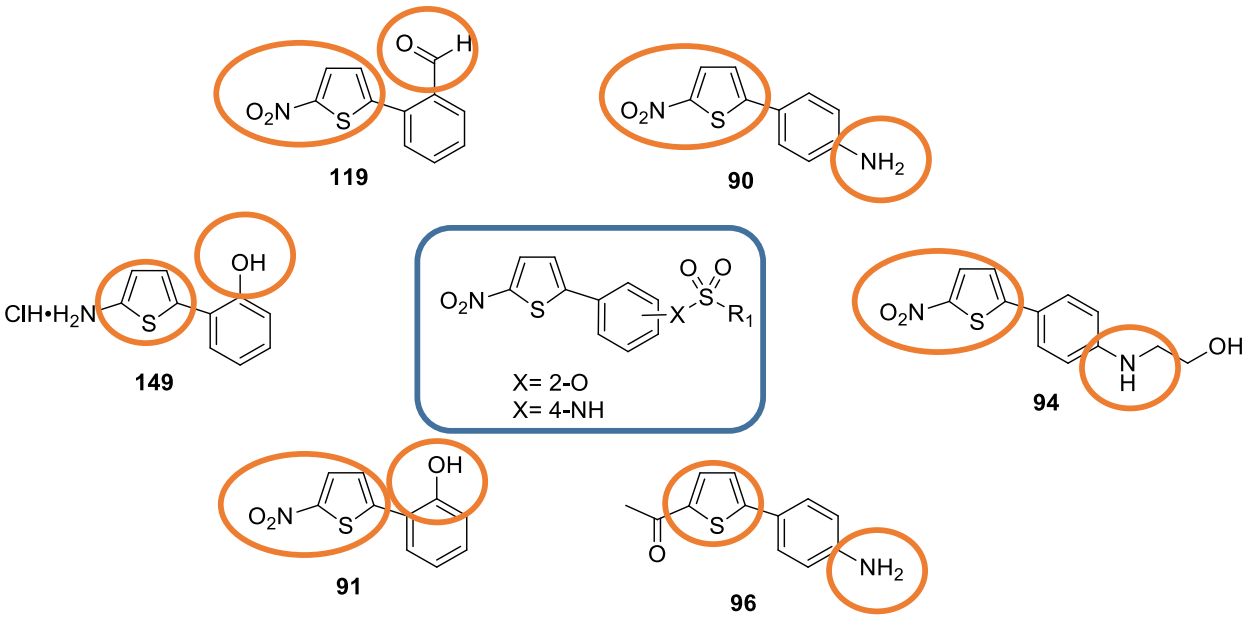


Figure 45 : Démarche entreprise pour la conception de la série des sulfonates et sulfonamides

Par conséquent, en réunissant les informations recueillies dans la littérature et les résultats obtenus précédemment au laboratoire, concevoir et synthétiser une série de sulfonamides et de sulfonates nous semblerait être un choix judicieux pour concevoir de nouveaux inhibiteurs de HK.

b) Synthèse des sulfonates

Par conséquent, la première série à être synthétisée est celle des sulfonates. Cette série est synthétisée à partir du couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura du 2-bromo-5-nitrothiophene **98** et de l'acide 2-hydroxyphénylboronique **99** en présence de $Pd(PPh_3)_4$ avec un rendement de 75% par chauffage micro-ondes. Ensuite le composé **91** est mis en présence de la triethylamine et du chlorure d'alcane sulfonyle afin d'aboutir aux sulfonates correspondants **152-161** avec des rendements variant de 49 à 93% après purification par chromatographie sur gel de silice. (Schéma 35) Les différents sulfonates ainsi que leurs rendements respectifs sont résumés dans le Tableau 11.

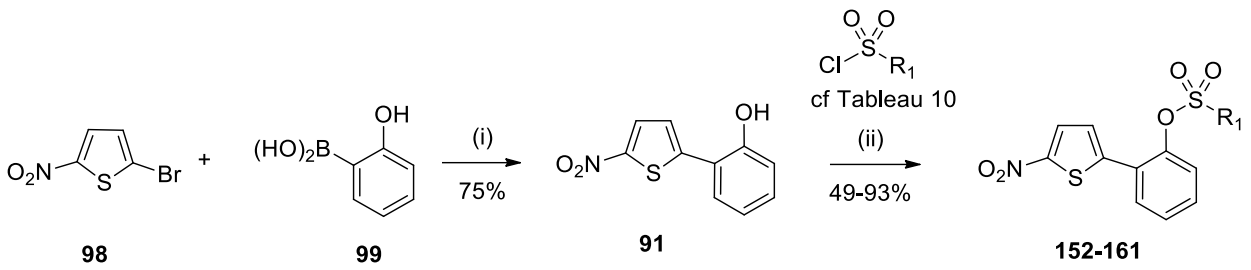
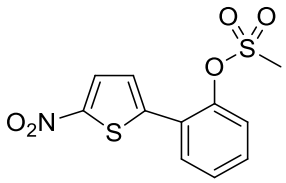
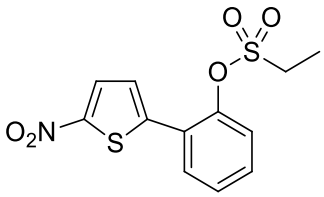
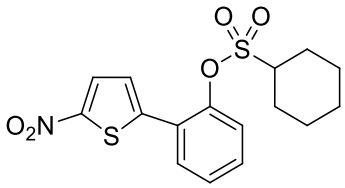
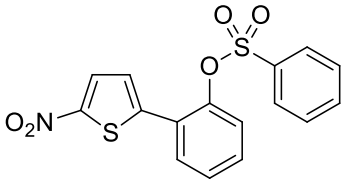
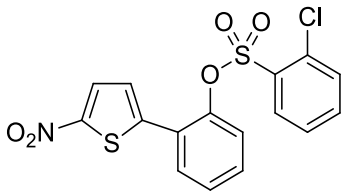
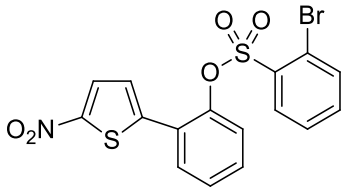
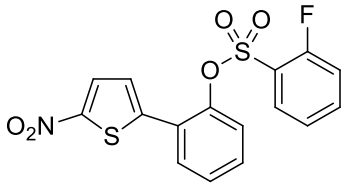
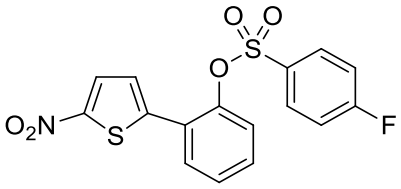
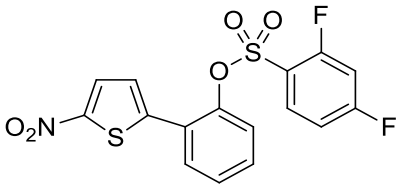
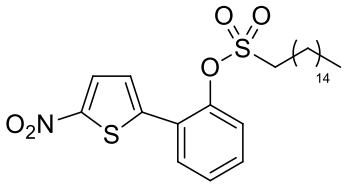


Schéma 35 : Synthèse des sulfonates **152** à **161**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), K_2CO_3 [2 M], 1,4-dioxane, M/W ; (ii) NEt_3, CH_2Cl_2, 0 °C.

Tableau 11 : Sulfonates **152-161** synthétisés et leurs rendements respectifs

R_1	Structure du produit	Rendement (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
$-CH_3$	 **152**	66	98
$-CH_2CH_3$	 **153**	93	99
$-C_6H_{11}$	 **154**	79	98
$-C_6H_5$	 **155**	80	100

-2-Cl-C_6H_5	 **156**	84	99
-2-Br-C_6H_5	 **157**	68	98
-2-F-C_6H_5	 **158**	77	99
-4-F-C_6H_5	 **159**	85	96
-2,4-F-C_6H_5	 **160**	49	98
-$(CH_2)_{15}CH_3$	 **161**	59	99

Ces différentes modulations ont été imaginées pour les raisons suivantes :

- Pour toutes les molécules, la structure de base de **91** a été conservée car c'est la molécule qui possède la meilleure activité inhibitrice de HK et la fonction alcool permet la substitution de différents sulfonyle en augmentant la taille de la molécule et l'interface de contact avec le site actif.
- Les sulfonates **152**, **153** et **161** possèdent des chaînes aliphatiques de différentes tailles (méthyle, éthyle et hexadécanyle respectivement). Ces chaînes aliphatiques augmentent l'hydrophobie des molécules. Cela permettait d'évaluer des relations structure-activité en comparant l'influence de la taille de la chaîne aliphatique sur l'activité biologique. De même pour la molécule **161** une longue chaîne aliphatique augmente la flexibilité de la molécule pouvant atteindre des interactions avec d'autres cavités du site actif et augmenter l'activité inhibitrice.
- Les molécules **154** et **155** possèdent un cyclohexyle et un phényle permettant d'interagir *via* des interactions de type π-stacking ou pas avec un résidu du site actif. Ces molécules nous permettront de déduire, si le phényle est nécessaire à l'activité inhitrice.
- La substitution de ce deuxième phényle par différents halogènes (fluor, chlore et brome) en différentes positions permettrait de déduire s'ils jouent un rôle sur l'activité inhibitrice.

c) Synthèse des sulfonamides

La deuxième série à être synthétisée est celle des sulfonamides. Cette série a été préparée à partir du couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura du 2-bromo-5-nitrothiophene **98** et de l'acide 4-aminophénylboronique **139** en présence de $Pd(PPh_3)_4$ et de Na_2CO_3 pour obtenir le composé **90** avec un rendement de 62% après purification sur gel de silice. Ensuite le composé **90** est mis en présence d'un large excès de pyridine et de chlorure d'alcane sulfonyle afin d'aboutir aux sulfonamides **162-171** correspondants avec des rendements 41-87% après purification sur gel de silice. (Schéma 36) Les différents chlorures d'alcane sulfonyle ainsi que leurs rendements respectifs sont résumés dans le Tableau 12.

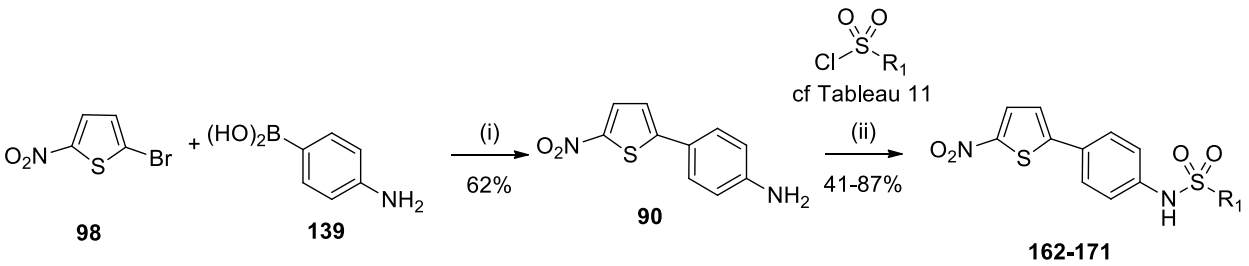
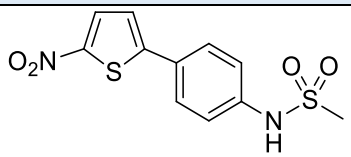
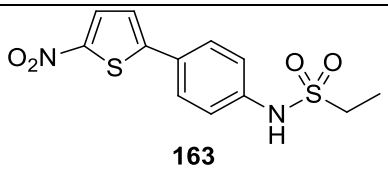
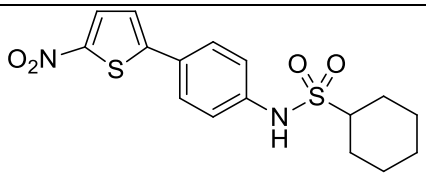
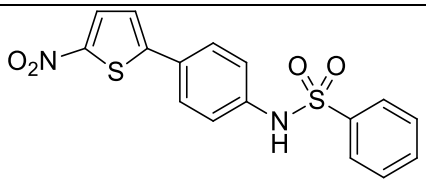
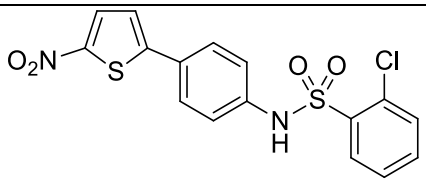
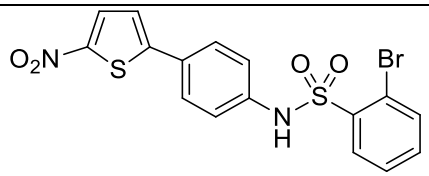
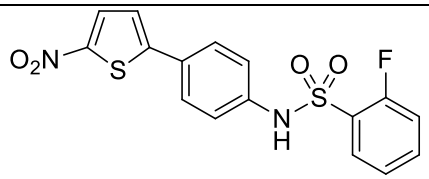
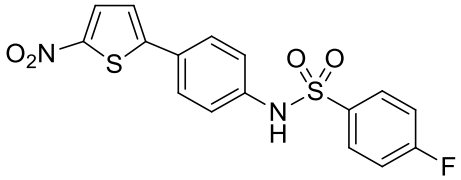
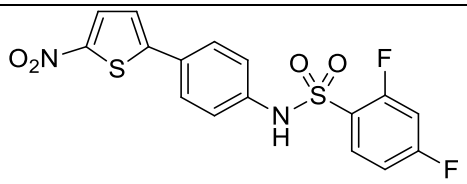
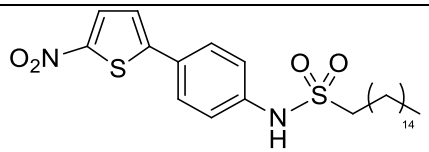


Schéma 36 : Synthèse des sulfonamides **162** à **171**
(i) $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), Na_2CO_3 [2 M], Toluène/EtOH, 70 °C ; (ii) Pyridine, CH_2Cl_2, 0 °C.

Tableau 12 : Sulfonates **162-171** synthétisés et leurs rendements respectifs

R_1	Structure du produit	Rendement (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
$-CH_3$	 **162**	81	97
$-CH_2CH_3$	 **163**	71	98
$-C_6H_{11}$	 **164**	57	98
$-C_6H_5$	 **165**	87	99
$-2\text{-}Cl\text{-}C_6H_5$	 **166**	84	99

-2-Br-C_6H_5	 **167**	41	100
-2-F-C_6H_5	 **168**	65	99
-4-F-C_6H_5	 **169**	84	99
-2,4-F-C_6H_5	 **170**	78	98
-$(CH_2)_{15}CH_3$	 **171**	42	92

Les mêmes modulations que celles évoquées précédemment pour la série des sulfonates ont été utilisées pour la série des sulfonamides. Par la suite, ces 20 nouveaux inhibiteurs potentiels d'histidine kinase ont été évalués par nos collaborateurs respectifs.

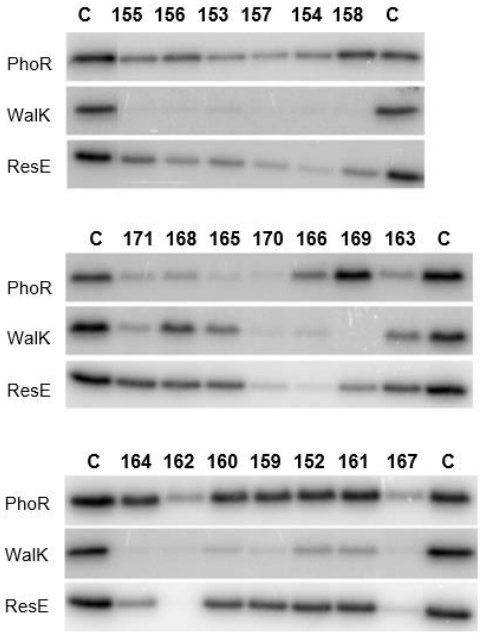
3. Résultats biologiques

a) Evaluation comme inhibiteurs d'histidine kinase

(1) Kinases bactériennes

Ces évaluations biologiques ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. (Section Chapitre 1, II.D.3.a)(1), p.104) Les résultats de ces analyses sont évoqués dans la figure 45.

Dans un premier temps, il a été constaté que les inhibiteurs **153-158**, **159**, **162**, **164**, **166**, **167**, **169**, **170** montrent une forte inhibition de l'autophosphorylation sur le système de WalK. A la différence de WalK, le système PhoR semble être moins perturbé par la présence de ces inhibiteurs. En effet, les molécules **153**, **154**, **157**, **168**, **170**, **166**, **163**, **162** et **167** présentent une inhibition partielle par la présence de bandes plus ou moins claires. Seule la molécule **170** semble inhiber clairement l'activité d'autophosphorylation de PhoR. Finalement les molécules, **153-158**, **166-168**, **170** et **162** inhibent plus ou moins ResE. Dans l'ensemble, ces nouvelles séries des sulfonates et des sulfonamides sont des inhibiteurs d'histidine kinase. Parmi eux, quatre molécules **154**, **162**, **167** et **170** semblent inhiber plus ou moins l'activité d'autophosphorylation des trois systèmes à deux composants WalK, ResE et PhoR ce qui suggèrerait que ces inhibiteurs pourraient être des inhibiteurs à large spectre. (Figure 46)



	C	155	156	153	157	154	158	C
PhoR	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
WalK	+	-	-	-	-	-	-	+
ResE	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+

	C	171	168	165	170	166	169	163	C
PhoR	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+/-	+
WalK	+	+/-	-	-	+/-	-	-	+	+
ResE	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+

	C	164	162	160	159	152	161	167	C
PhoR	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+
WalK	+	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+
ResE	+	+/-	-	+	+	+	+	+/-	+

Figure 46 : Evaluation des composés sur l'inhibition de l'autophosphorylation de multiples HK. + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; - : L'autophosphorylation n'a pas lieu ; +/- : inhibition partielle observée ; C : Contrôle (HK + ATP en absence d'inhibiteur).

Par la suite et pour la même raison que celle décrite pour la série des hétérocycles, nous avons choisi quelques inhibiteurs présentant une inhibition nette pour calculer les CI_{50} et les valeurs sont résumées dans le Tableau 13.

Ces résultats montrent clairement que quatre inhibiteurs possèdent des valeurs de CI_{50} égales ou inférieures à 50 µM pour cette cible : **158**, **159**, **167** et **169**. Pour le composé **170**, même si sur la Figure 46, il a été remarqué que cette molécule inhibe l'autophosphorylation des trois kinases, la détermination de la valeur de CI_{50} sur WalK et ResE a été très problématique. Il s'avère que cette molécule est très peu soluble dans le milieu bilogique et cela empêchait la réalisation correcte de l'analyse.

Ces résultats sont du même ordre d'inhibition que les molécules **119** et **149** de la série des hétérocycles. Les CI_{50} de la série des sulfonates et des sulfonamides sont largement améliorés comparés à ceux obtenus par **90-97**.

Tableau 13 : Valeurs des CI_{50} pour les inhibiteurs potentiels d'histidine kinase issus de la série des sulfonates et des sulfonamides

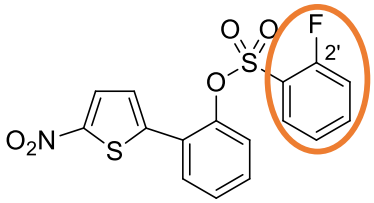
	CI_{50} WalK		CI_{50} WalK	CI_{50} PhoR
155	183,0	**170**	-	46,06
156	192,7	**169**	29,0	-
153	302,0	**164**	>800	-
157	77,16	**162**	77,06	-
154	91,35	**159**	17,14	-
158	35,93	**160**	115,9	-
		167	53,47	-

Les résultats obtenus pour cette série sont très prometteurs et cela ouvre de nouvelles pistes pour la conception d'inhibiteurs de HK. (Figure 47)

Si nous nous intéressons aux structures de ces nouveaux inhibiteurs, ils possèdent des points communs structurellement. Ils possèdent un noyau aromatique supplémentaire et celui-ci est substitué soit en position 2' (**158** et **167**) soit en position 4' (**160** et **169**) ou les deux (**170**) par un halogène. Cela suggèrerait que l'activité inhibitrice de ces inhibiteurs sont associés à ce troisième noyau qui peut interagir avec un résidu du site actif par des interactions de π-stacking. (Figure 47) De même, la présence d'un halogène augmente l'activité inhibitrice ce qui laisse imaginer qu'il

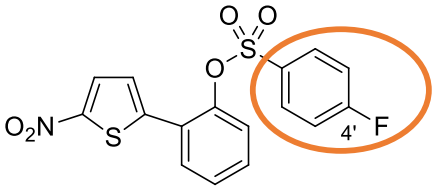
existe un résidu ou une poche hydrophobe au sein du site catalytique permettant une meilleure affinité entre l'inhibiteur et le site actif.

Ces résultats nous confirment que l'augmentation de la taille et l'hydrophobie de l'inhibiteur augmente l'activité inhibitrice.



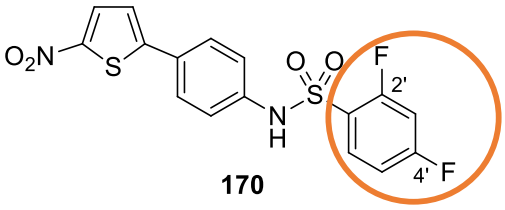
158

CI_{50} = 35,93 µM (WalK)



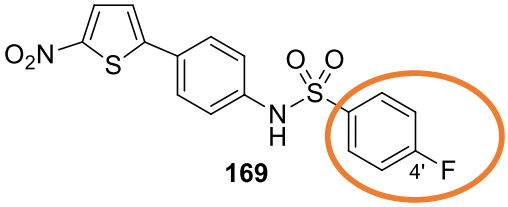
159

CI_{50} = 17,14 µM (WalK)



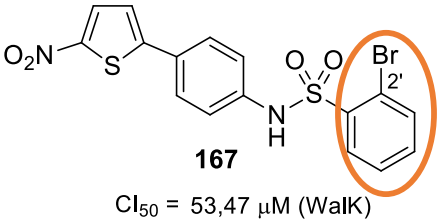
170

CI_{50} = 46,06 µM (PhoR)



169

CI_{50} = 29,0 µM (WalK)



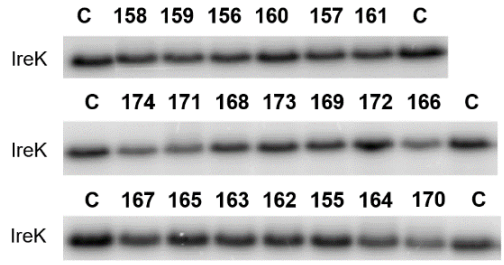
167

CI_{50} = 53,47 µM (WalK)

Figure 47 : Structures des sulfonates et des sulfonamides présentant des activités inhibitrices

(2) Kinases eucaryotes

De même les nouveaux inhibiteurs ont été évalués chez des kinases eucaryotes afin de connaître leur sélectivité. (Figure 48)



	C	**155**	**156**	**153**	**157**	**154**	**158**	**C**	
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	
	C	**171**	**168**	**165**	**170**	**166**	**169**	**163**	**C**
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	**164**	**162**	**160**	**159**	**152**	**161**	**167**	**C**
IreK	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 48 : Résultats d'inhibition des molécules sur la capacité d'inhibition sur les kinases eucaryotes **152-161** et **162-171** ; + : L'autophosphorylation par le substrat naturel a lieu ; C : Contrôle (IreK + ATP en absence d'inhibiteur).

Ces résultats montrent que les nouveaux inhibiteurs sont aussi sélectifs des TCS procaryotes.

b) Evaluation comme antibactériens ou adjuvants d'antibiotiques

(1) Evaluation comme antibactérien

Les 20 nouveaux composés de la série des sulfonamides et sulfonates ont été évalués comme agents antibactérien comme décrits précédemment. Cependant, par rapport à la série des hétérocycles (furane et thiophène), cette série ne présente pas des résultats concluants comme agents antibactériens. Seuls deux molécules, **153** et **170** semblent avoir une faible activité antibactérienne mais leurs CMI n'ont pas été déterminées étant donné que leur halo d'inhibition de la croissance bactérienne ne sont pas significatifs comparés au contrôle. (Figure 49 et Figure 50)

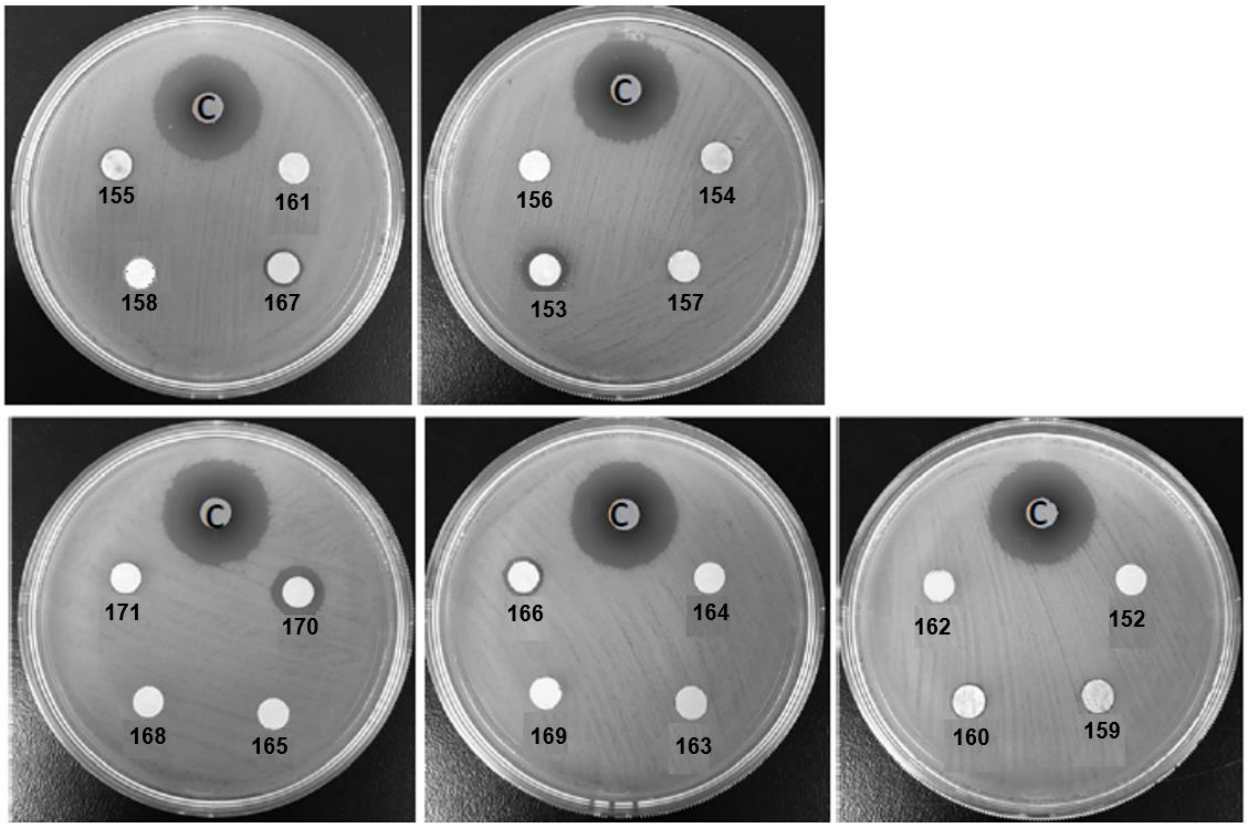
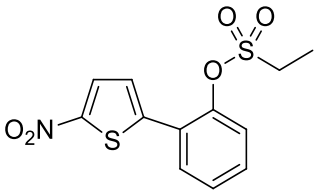
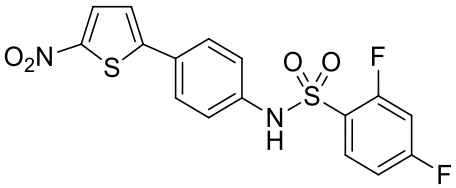


Figure 49 : Méthode de diffusion de Kirby-Bauer sur les séries des sulfonates et des sulfonamides



153



170

Figure 50 : Structures des molécules ayant un faible halo d'inhibition de la croissance bactérienne.

(2) Evaluation comme adjuvant

Ces nouveaux inhibiteurs ont été évalués comme qu'adjuvant d'antibiotiques. Malgré les efforts pour synthétiser des inhibiteurs de HK et des adjuvants d'antibiotiques, les inhibiteurs de la série des sulfonates et des sulfonamides ne présentent pas non plus des propriétés d'adjuvants à des concentrations de 100 µM.

4. Conclusion sur la série des sulfonates et des sulfonamides

Dans la littérature, plusieurs molécules qui possèdent des sulfonamides ont des activités antibactériennes remarquables d'où le choix d'utiliser ces groupements pour concevoir des nouveaux inhibiteurs de HK. Par conséquent 20 nouveaux inhibiteurs potentiels appartenant à la série des sulfonamides et des sulfonates ont été synthétisés. Seulement 5 molécules, **158**, **159**, **167**, **169** et **170** ont montré une activité inhibitrice et spécifique sur les systèmes de WalK et PhoR allant jusqu'à une CI_{50} de 17 µM, valeurs améliorées par rapport aux résultats précédents (série des thiophènes **119** et **149**). Ces molécules suggèrent qu'il y existe une poche hydrophobe dans le site catalytique ou un résidu avec lequel une interaction de type π-stacking a lieu ce qui augmenterait l'affinité entre le site catalytique et l'inhibiteur. Néanmoins, malgré ces résultats prometteurs, ces molécules ne possèdent ni d'activité antibactérienne propre ni d'activité comme adjuvant d'antibiotique. Les molécules ayant une activité inhibitrice prometteuse sont en cours d'évaluation pour leur capacité à inhiber les biofilms chez nos collaborateurs du CHU de Nîmes. Une publication est en cours de rédaction concernant l'activité inhibitrice de HK des sulfonates et des sulfonamides.

F. Analogues d'histidine

1. Conception de nouveaux analogues de HK

Dans le but de concevoir un nouvel inhibiteur original de HK, il est essentiel de trouver une nouvelle cible de ce système. Il a été envisagé par la suite de mimer le substrat naturel de la phosphorylation. En effet, si cela est analysé d'un point de vue mécanistique, suite à un signal détecté par la partie extracellulaire de l'histidine kinase, un résidu histidine va s'autophosphoryler en présence de l'ATP. Ce groupement phosphate va être transféré sur l'aspartate du régulateur de réponse. (Schéma 37)

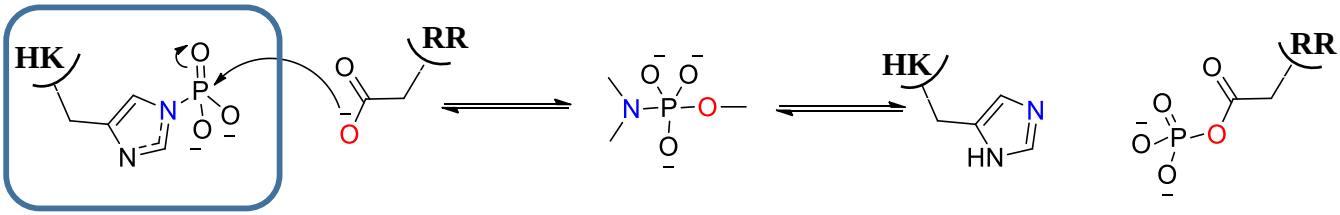


Schéma 37 : Représentation du transfert du groupement phosphate de l'histidine sur l'aspartate

Nous avons envisagé donc de concevoir un nouvel analogue d'histidine qui soit stable (non hydrolysable) afin d'éviter le transfert du groupement phosphate sur le régulateur de réponse. Dans la littérature, d'autres équipes de recherche se sont déjà intéressées à la conception et à la synthèse d'analogues de phosphohistidine. Dans les paragraphes suivants, nous allons évoquer les analogues d'histidine décrits dans la littérature.

En 1999, Schenkels et ses collaborateurs ont reporté la conception et la synthèse d'un analogue de phosphohistidine **172** en remplaçant le noyau d'imidazole par un furane **173**. De même ils ont proposé une structure à base de pyrrole **174** comme analogue de phosphohistidine mais sa synthèse n'a pas été décrite.[99] (Figure 51)

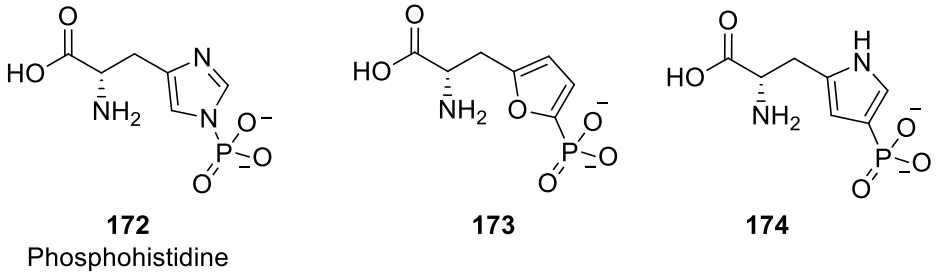


Figure 51 : Analogue de phosphohistidine **172** de type furane **173** ou pyrrole **174** de la littérature

Quelques années plus tard, Mukai et Kee ont travaillé sur une série de triazoles protégés. Cette série a été conçue dans l'objectif d'augmenter la possibilité de créer des liaisons d'hydrogènes avec le milieu. En effet, Murai a conçu des triazoles *N*-méthylamide **175-176** et des acetamides **177-178** car cela mimerait le peptide dans lequel pourrait se situer la phosphohistidine.[100] Par ailleurs, Kee et ces collaborateurs ont travaillé sur une série de triazole *N*-Boc protégé **179-180**.[101,102] (Figure 52)

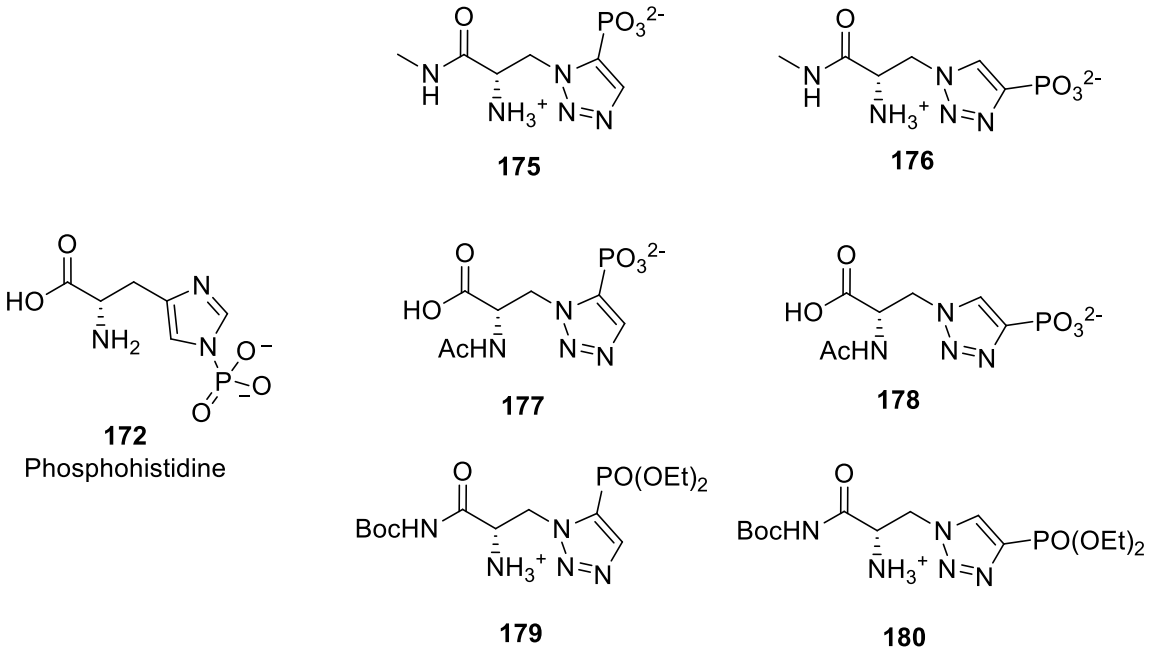


Figure 52 : Analogue de phosphohistidine **172** de type triazole **175-180** de la littérature

Il existe de même la possibilité de remplacer le groupement phosphate afin de concevoir des analogues de phosphohistidine **172**. En 2000, Pirrung et ses collaborateurs ont conçu un analogue d'histidine en remplaçant cette fois-ci le phosphate par un thiophosphate **181**.[103] (Figure 53)

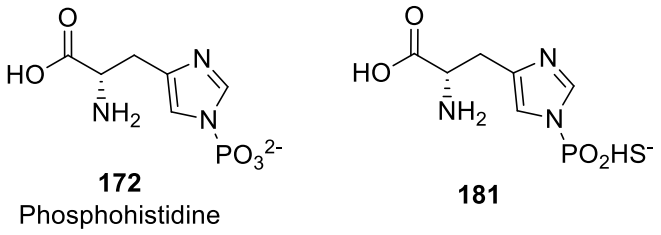


Figure 53 : Analogue de phosphohistidine **172** de type thiophosphate **181**

En 2012 et 2013, Mc Allister et ses collaborateurs ont travaillé sur des analogues de phosphohistidine protégés. Dans un premier temps, ils ont remplacé l'imidazole par un triazole **182-183** puis ensuite, ils ont remplacé le groupement phosphate par un sulfonamide **184**.[104–106] (Figure 54)

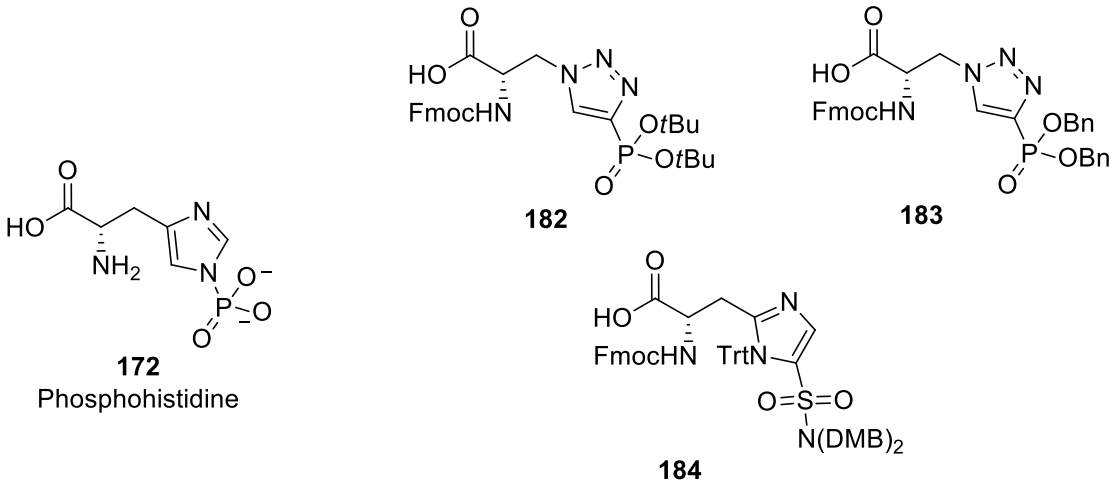


Figure 54 : Analogue de phosphohistidine de type sulfonamide **184** et triazole **182-183** de la littérature

En 2015, Kee et Lilley ont conçu une nouvelle classe d'analogue d'histidine en remplaçant le noyau d'imidazole par un pyrazole **185-186**.[107–110] (Figure 55)

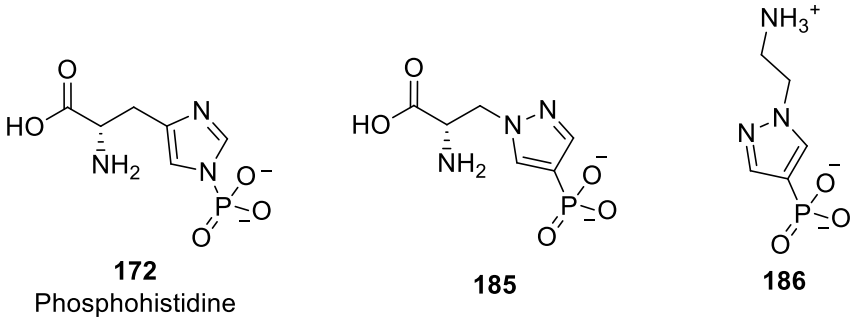


Figure 55 : Analogue de phosphohistidine de type pyrazole **185-186** de la littérature

C'est pour cette raison qu'il a été envisagé de concevoir une nouvelle structure d'un analogue **187** d'histidine phosphorylé. De ce fait, le phosphate sera conservé ainsi que les fonctions acides carboxyliques et amine. Le noyau d'imidazole sera remplacé par un noyau thiophène en prenant en compte les résultats qui ont été obtenus dans les résultats précédents comme inhibiteurs de HK. (Figure 56)

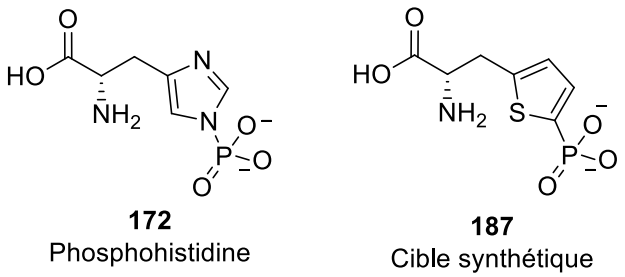


Figure 56 : Analogue de phosphohistidine de type thiophène

2. Synthèse de nouveaux analogues de HK

La stratégie de synthèse de ces nouveaux analogues d'histidine a été inspirée de la voie de synthèse décrite par Lilley et ses collaborateurs avec des légères modifications.[109–111] En effet, un isomère **188** de la molécule souhaitée a été auparavant décrit dans la littérature et sa synthèse a servi d'inspiration pour synthétiser la molécule cible.[109–111] (Figure 57)

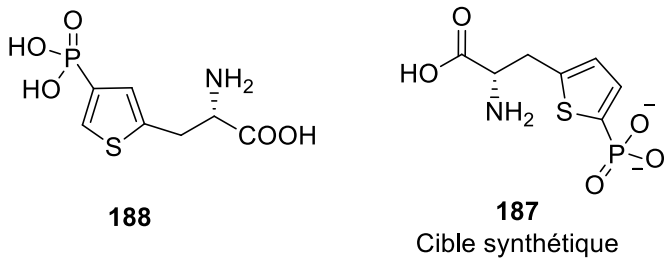


Figure 57 : Isomère de notre analogue **187** de phosphohistidine de type thiophène

Le composé **190** est synthétisé à partir d'un couplage croisé de Hirao à partir du 2-bromothiophène **189** avec un rendement de 91%. Ce composé **190** est iodé en présence d'un acide périodique et de diiode pour aboutir au composé mono iodé **191** en 62%. Il a été constaté que lors de cette étape le composé diiodé **192** est de même isolé avec un rendement de 6%. Par la suite le composé monoiodé **175** est mis en réaction avec un L-organozincique **193** (composé synthétisé à partir *N*-boc methyl-L- alanine) et seront engagés dans un couplage croisé de Negishi. Le composé protégé **194** est obtenu avec un rendement de 52%. Seul le composé de configuration L a été synthétisé. (Schéma 38)

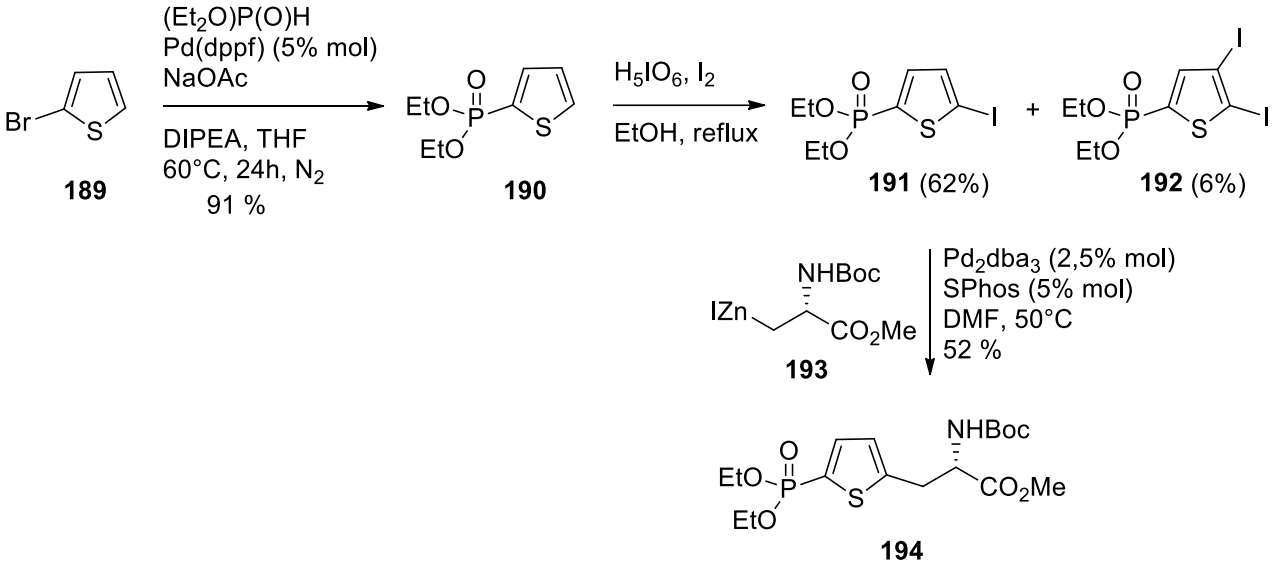


Schéma 38 : Synthèse du composé **194**

En revanche, lors d'une tentative de déprotection des groupements protecteurs en milieu acide, la réaction n'aboutit pas à la molécule souhaitée **187**. En effet, après hydrolyse et purification de la molécule par colonne échangeuse d'ions, la molécule **195** a été isolée avec un rendement de 41% et une pureté de 96% confirmée par UPLC. Cette molécule connue sous le nom de thiénylalanine a déjà été décrite dans la littérature. (Schéma 39)

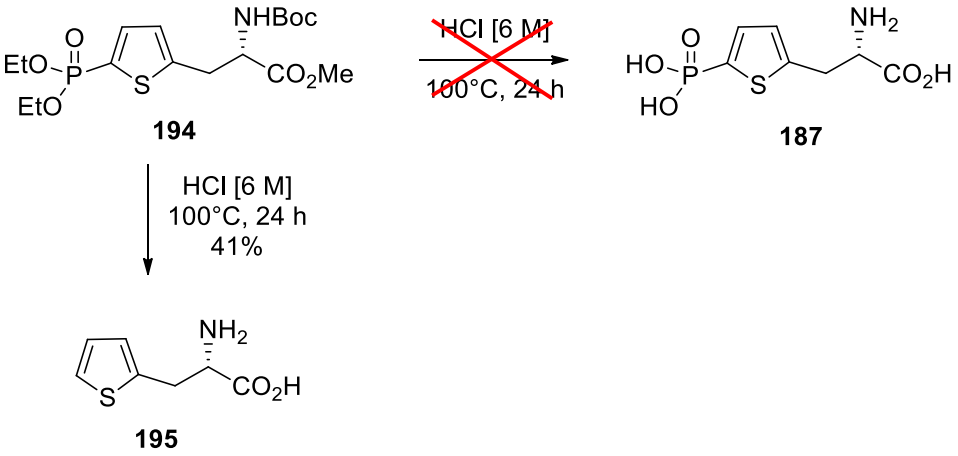


Schéma 39 : Synthèse du composé **195**

La structure de la molécule **195** a été identifiée et confirmée par RMN du proton ^{1}H, par RMN du carbone ^{13}C, par RMN du phosphore ^{31}P, par UPLC et par HRMS.

3. Conclusion sur les analogues d'histidine

Cette nouvelle molécule ouvre la possibilité de concevoir de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase. Cependant, il reste encore à optimiser le protocole envisagé pour la dernière étape de déprotection. Une fois ceci effectué l'analogue d'histidine sera envoyé en test biologique afin d'évaluer sa capacité à inhiber les systèmes à deux composants ou évaluer ses propriétés antibactériennes.

III. Chapitre 1 : Conclusion

La résistance bactérienne est un problème de santé publique. Les bactéries sont capables de s'adapter suite à un changement d'environnement mettant en place des mécanismes de résistance aux composés ayant pour but de les détruire. La découverte de nouveaux agents antibactériens efficaces est au point mort. Des solutions et donc de nouvelles cibles doivent être envisagées pour lutter contre cette résistance. Plusieurs équipes au cours de ces dernières années se sont intéressées à la recherche de nouvelles molécules capables d'inhiber l'action des systèmes à deux composants. Ces systèmes sont capables d'alerter la bactérie de la présence d'antibiotiques et empêcher cette signalisation serait un moyen de bloquer la résistance bactérienne.
Dans cet objectif, les travaux de thèse transcrits dans ce premier chapitre résument la démarche entreprise pour pouvoir inhiber ces systèmes à deux composants.
Trois stratégies ont été entreprises pour inhiber les TCS.

Dans un premier temps, nous avons identifié deux molécules appartenant à la série des nitro thiophène, **119** et **149**, capables d'inhiber le système WalK et PhoR. Ces deux inhibiteurs sont des inhibiteurs sélectifs des kinases procaryotes. De plus, ces molécules ne présentent pas d'activité antibactérienne ni d'activité d'adjuvant. Cependant, une seule molécule **151**, analogue de **149** présente une activité adjuvant d'antibiotique. Son activité inhibitrice de HK est en cours de détermination. Ces molécules nous donnent des pistes pour la conception d'une nouvelle série des amino thiophènes et des aldéhydes aromatiques afin d'étudier des relations structures-activité dans le but de créer de nouveaux inhibiteurs de HK présentant des activités antibactériennes et d'adjuvants d'antibiotiques. (Figure 58)

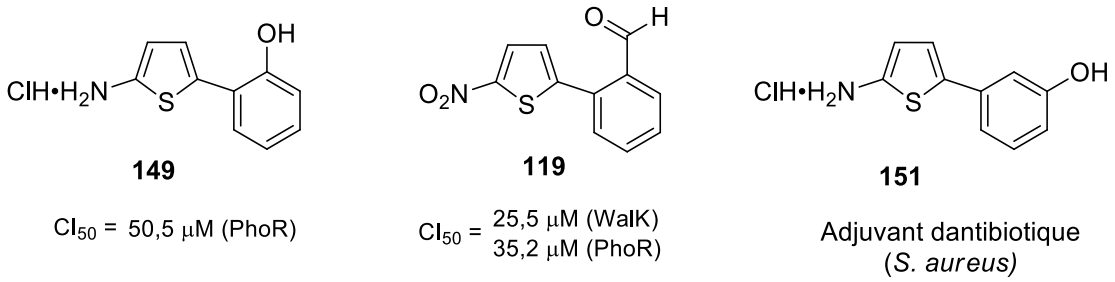


Figure 58 : Inhibiteurs hétérocycliques de HK (**119** et **149**) et adjuvant d'antibiotique (**151**)

Par ailleurs, trois molécules appartenant à la série des furanes **129**, **130** et **132** présentes de fortes activités antibactériennes inattendues comparées à celle obtenues avec la série des thiophènes par **91** et **92** ce qui suggèrerait que cette activité est due au noyau furane. Etant donné que cette activité antibactérienne n'est pas corrélée à l'activité inhibitrice de HK, des études supplémentaires

doivent être envisagés afin de comprendre quels sont les mécanismes entrepris par la molécule pour inhiber la croissance bactérienne.

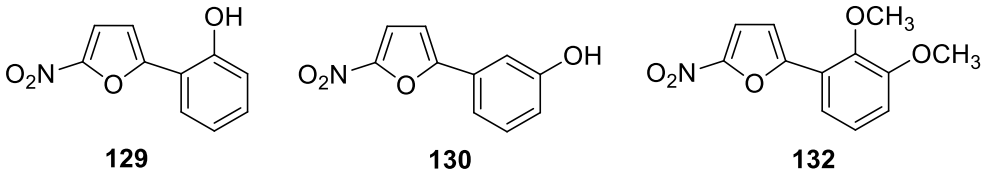


Figure 59 : Dérivés furanes ayant une activité antibactérienne

Dans un deuxième temps, ces résultats nous ont permis de concevoir une nouvelle série de molécules appartenant à la famille des sulfonates et des sulfonamides. Les molécules **158**, **159**, **167**, **169** et **170** sont des inhibiteurs d'histidine kinase de WalK avec des CI_{50} de l'ordre de 50 µM. En revanche, les molécules ne présentent pas d'activité antibactérienne ni d'activité d'adjuvant d'antibiotiques. (Figure 47)

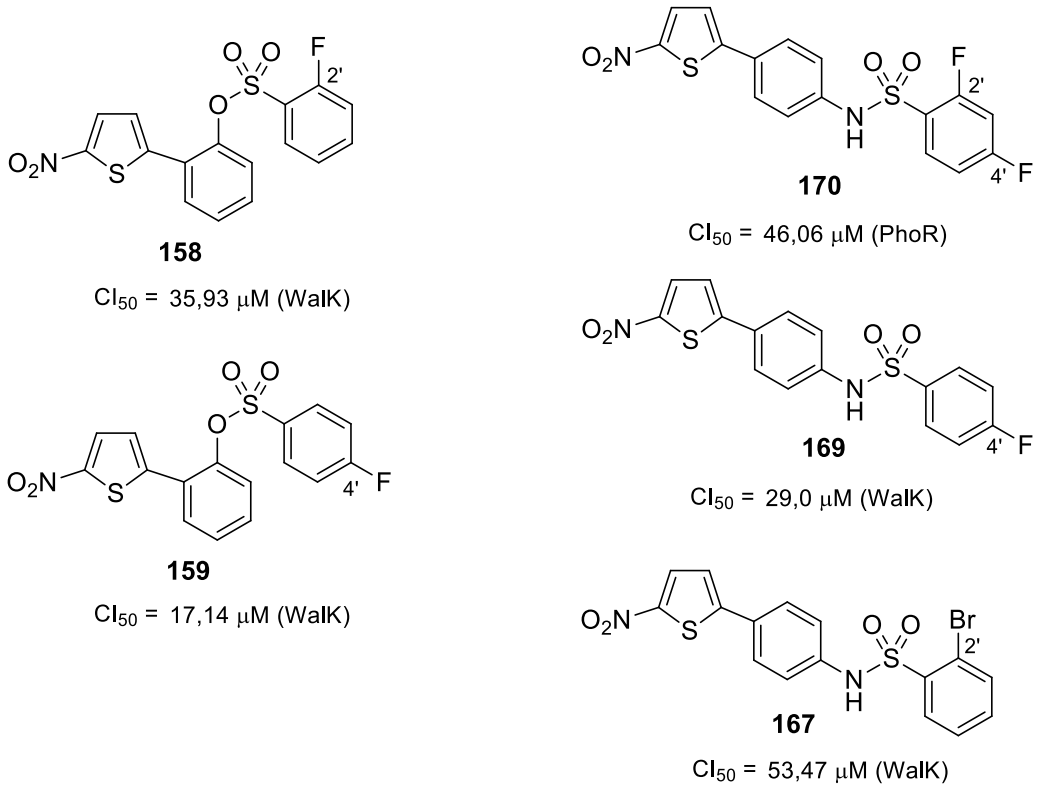


Figure 47: Structures des sulfonates et des sulfonamides présentant des activités inhibitrices

Finalement, un analogue d'histidine phosphorylé **187** (Figure 56) a été conçu cependant la dernière étape de deprotection reste à être optimisée pour aboutir à la molécule cible. Cette nouvelle famille

d'inhibiteurs de HK ouvre la possibilité de créer de nouvelle série d'inhibiteurs potentiels d'histidine kinase.

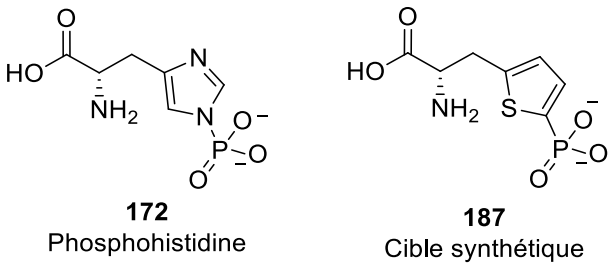


Figure 56 : Analogue de phosphohistidine de type thiophène

Notre objectif principal était de concevoir des inhibiteurs de TCS et pendant la thèse cet objectif a été atteint. Malgré ces activités inhibitrices de HK prometteuses, des modulations chimiques restent à explorer pour corréler les activités à une activité antibactérienne et à une activité d'adjuvant d'antibiotiques.

IV. Partie expérimentale

A. General

- ***Chemical products and solvents***

All reagents were purchased from commercial suppliers (Acros, Sigma Aldrich, Alpha Aeser, TCI and ABC) and were used without further purification.

Toluene was dried over CaH_2 prior to use. Anhydrous THF and DCM was purchased from Sigma Aldrich. All solvents were conserved under nitrogen or argon atmosphere and stored on 4Å molecular sieves.

The petroleum ether used has a boiling point between 40-60°C.

- ***Microwaves synthesis***

The reaction was done in the monomode microwave Discover system from CEM (CEM MWaves SAS, Orsay, France) that has one magnetron (2450 MHz) with a maximum delivered power of 300 W in 1 W increments. The monomode microwave features an electromagnetic stirring with adjustable speeds (Teflon® coated stir bars are suitable), direct control of temperature with the aid of a fiber optic (FO).

- ***Chromatography***

Reactions were monitored with Merck Kieselgel $60F_{254}$ precoated aluminium silica gel plates (0.2 mm thickness).
Reactions were monitored with Macherey-nagel RP-18W/UV_{254} precoated Alugram® plates (0.15 mm thickness).
Product visualization on TLC plates was achieved using UV light or with ninhydrin solution (0.3 g of ninhydrin in butanol/acetic acid: 97/3, v/v).

Manual gel chromatography was performed with Macherey-nagel Silica 60 M (40-63 µm).
Flash chromatography experiments were carried out on a Grace Reveleris X2 using 40 µm packed silica or C18 cartridge.

Cation exchange resin was performed by DOWEX® 50W-X4, H^+, 100-200 mesh, eluted by [0.1 M] or [0.05 M] NH_4OH.

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analyses were done at the University of Montpellier: Laboratoire de Mesures Physiques. UPLC analyses were obtained on the Waters Acquity H-Class using the following conditions: Waters Acquity, Kinetex EVO C18 column (1.7 µm, 50 mm x 2.1 mm), 25 °C column temperature, 0.5 mL/min flow rate, photodiodearray detection (TUV – 214 nm), mobile phase consistent of a gradient of water and acetonitrile (each containing 0.1% of formic acid). Column used deprotected amino acids: Luna Omega Polar C18 column (1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm).

- ***Characterization of molecules***

Melting points were determined on a Stuart scientific SMP10 apparatus and are uncorrected.

Optical rotations were measured at the sodium D-line (589 nm) with Jasco P-2000 polarimeter using 1 dm path length cell, thermostated at 20 °C or 25 °C.

IR spectra were obtained using a Jasco FT-IR 410 instrument as a thin film on NaCl disc as stated; only structurally important peaks ($\bar{\upsilon}$) are presented in cm^{-1}.

Enantiomeric excess was determined by Chirosciences' team at Institut des Sciences Moléculaires de Marseille. The chiral HPLC analyses were performed Agilent 1260 Infinity unit. The analytical columns (250x4.6 mm) used are Lux-Cellulose-2 from Phenomenex (Le Pecq, France), and Chiralpak AZ-H from Chiral Technologies Europe (Illkirch, France).

High resolution mass spectra (HRMS) were performed at the University of Montpellier: Laboratoire de Mesures Physiques. HRMS were obtained by electrospray using a TOF analyzer Platform.

- ***NMR Spectroscopy***

NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 300 spectrometer (300 MHz and 75 MHz for ^{1}H and ^{13}C NMR, respectively), Bruker Avance 400 spectrometer (161.97 MHz for ^{31}P and 376.5 MHz for ^{19}F), Bruker Avance 600 spectrometer (600 MHz and 150 MHz for ^{1}H and ^{13}C NMR, respectively).

Chemical shifts (δ) and coupling constants (*J*) are given in ppm and Hz, respectively, using residual solvent signals as reference for the ^{1}H and ^{13}C.

The following abbreviations are used: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, br s = broad signal, dd = double doublet, dt = double of triplet, m = multiplet.

In the experimental part, the numbering of the molecules is related to the attribution of the atoms.

B. General Procedure

Method A: Suzuki Miyaura cross coupling reaction for bromo thiophene and bromo thiazole

To the commercial bromide (1 eq) with corresponding boronic acid (1.5 eq) and $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 eq) in 1,4-dioxane (2.5 mL/mmol) was added [2 M] aqueous potassium carbonate (1.6 mL/mmol). The reactor was placed into the synthesis monomode microwave oven cavity and carried out under microwave irradiation (300 W) at 120 °C for 17 min and then at 130 °C for 3 min. The reaction mixture was stirred continuously during the reaction. The progress of the reaction was monitored by TLC. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under *vacuo* and 50 mL of acidic solution is added until pH 3-4 is reached and extracted with 5x50 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to give the desire compound. Finally, the obtained powder was dissolved in a small amount of ethyl acetate and precipitated in cold pentane (-20 °C).

Method B: Suzuki Miyaura cross coupling reaction for bromo furan

To the commercial bromide (1 eq) with corresponding boronic acid (1,5 eq) and $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 eq) in DME (2.5 mL/mmol) was added [2 M] aqueous sodium carbonate (1.6 mL/mmol). The reactor was placed into the synthesis monomode microwave oven cavity and carried out under microwave irradiation (300 W) at 120 °C for 17 min and then at 130 °C for 3 min. The reaction mixture was stirred continuously during the reaction. The progress of the reaction was monitored by TLC. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under *vacuo* and 50 mL of acidic solution is added until pH 3-4 is reached and extracted with 5x50 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to give the desire compound. Finally, the obtained powder was dissolved in a small amount of ethyl acetate and precipitated in cold pentane (-20 °C).

Method C: Reduction of a nitro group

The synthesis was prepared according to a procedure described by Millet et *al.*[1] or with minor modifications thereof. To a suspension of nitro compound (1 eq) and 10% Pd/C (10 wt%) in MeOH under 0 °C, was added carefully by portions $NaBH_4$ (5 eq). Once the reaction is finished, 20 mL of water is added and extracted with 3x20 mL of diethyl ether. The combined organic layers were washed, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound.

Method D: Amino salt

To a cold solution of amino compound (1 eq) in THF (5 mL) was added dropwise 10 mL of concd HCl solution (37%, [12 M]). The solution was stirred at 0 °C during 20 min. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the desired compound.

Method E: Buchwald Hartwig cross coupling reaction

To a solution of morpholine (1.2 eq) in toluene (40 mL) was added thiophene (1 eq), $Pd_2(dba)_3$ (0.05 eq), *rac*-BINAP (1.4 eq) and $CsCO_3$ (0.15 eq). The reaction was stirred for 32 hours at 80 °C. The progress of the reaction was monitored by TLC. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under *vacuo* and 50 mL of water was added and extracted with 5x50 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude compound was purified to give the desire compound.

Method F: Synthesis of sulfonates

To a cold solution of **91** (1 eq) in anhydrous dichloromethane (5 mL) under nitrogen atmosphere was added 70 µL of triethylamine. The solution was stirred for 10 minutes at 0°C. Then the corresponding sulfonyl chloride (1.5-2 eq) was added and the reaction mixture is stirred for 30 minutes. The progress of the reaction was monitored by TLC. Once the reaction is finished, 50 mL of an acidic solution is added and extracted with 5x50 mL of ethyl acetate. The combined organic

layers were washed with brine, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude compound was purified to give the desire compound.

Method G: Synthesis of sulfonamides

To a cold solution of **90** (1 eq) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added an excess of pyridine. The solution was stirred for 10 minutes at 0 °C. Then the corresponding sulfonyl chloride (2 eq) was added and the reaction is left overnight. The progress of the reaction was monitored by TLC. Once the reaction is finished, 50 mL of an acidic solution of HCl [1 M] is added and extracted with 5x50 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude compound was purified to give the desire compound.

Method H: Hirao cross coupling reaction

The synthesis was prepared according to a procedure described by Lilley et *al.*[2–4] or with minor modifications thereof. $Pd(dppf)Cl_2$ (0.03 eq) and sodium acetate (0.12 eq.) were being purged with nitrogen in a round bottom flask. Dry THF (60 mL) was then added by syringe followed by DIPEA (1.2 eq). The reaction mixture was then stirred at 60 °C for 30 minutes, before addition of 3-bromothiophene (1 eq) and diethyl phosphite (1 eq). The reaction mixture was then heated at 80 °C overnight. The crude reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified to afford the desired compound.

Method I: Iodination

A solution of compound **190** (1 eq) in abs EtOH (20 mL) was added to a round bottom flask containing H_5IO_6 (0.5 eq) and I_2 (0.43 eq). The reaction mixture was then brought to reflux overnight under stirring. The crude reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography to afford to the desired compound.

Method K: Negishi Cross coupling reaction

Zinc dust (6 eq) was added to a round bottom flask under argon atmosphere. Dry DMF (3 mL) was added with syringe followed by iodine (0.15 eq). Once the reaction mixture had turned

colourless, *N*-(tert-butoxycarbonyl)-3-iodo-alanine methyl ester (1.5 eq) was added. The reaction mixture was then monitored *via* TLC to check for complete zinc insertion. Once the spot for *N*-(tert-butoxycarbonyl)-3-iodo-alanine methyl ester had disappeared, the reaction mixture was transferred to another round bottom flask under argon atmosphere. $Pd_2(dba)_3$ (0.025 eq), SPhos (0.05 eq) and compound **191** (1 eq) were then added to the flask. The reaction was heated to 50 °C overnight. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to afford the desired compound.

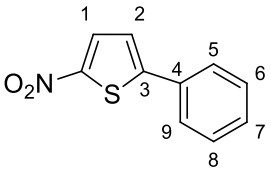
Method L: Cleavage of phosphonate, Boc and ester protection

The synthesis was prepared according to a procedure described by Selvam et *al.* or with minor modifications thereof. Protected amino acid was dissolved in [5 M] HCl solution and heated at 100 °C for 24 hours. The reaction mixture was then cooled and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by cation exchange DOWEX resin and triturated in acetone to give the desired compound.

C. Chemistry

2-nitro-5-phenylthiophene,

(111)



MW = 205.23 g.mol^{-1}

$C_{10}H_7NO_2S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (2.4 mmol; 500 mg), phenylboronic acid **103** (3.6 mmol; 440 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 375 mg (73% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) ***δ***: 7.50 (m, 3H, H-6, H-7 and H-8); 7.69 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.84 (m, 2H, H-5 and H-9); 8.17 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) ***δ***: 124.0 (CH, C-2); 126.2 (2-CH, C-5 and C-9); 129.5 (2-CH, C-6 and C-8); 130.3 (CH, C-7); 131.3 (CH, C-1); 131.4 (C, C-4); 149.3 (C, C-3); 151.5 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1496 ($\nu_{C=C}$); 3110 ($\nu_{=CH}$).

M.p: 127-129 °C.

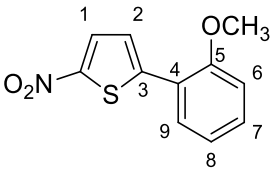
R$_f$: 0.48 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 3.15 min; purity: 97%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_8NO_2S$, 206.0276, found 206.0276.

2-(2-methoxyphenyl)-5-nitrothiophene,

(112)



MW = 235.26 g.mol^{-1}

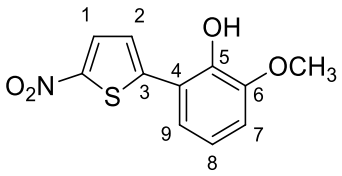
$C_{11}H_9NO_3S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (1.4 mmol; 300 mg), 2-methoxyphenylboronic acid **101** (2.1 mmol; 330 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.072 mmol; 83 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 290 mg (85% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 4.02 (s, 3H, OCH_3); 7.11 (td, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 0.9Hz, H-8); 7.24 (dd, 1H, J_1 = 8.4Hz, J_2 = 0.6Hz, H-6); 7.47 (td, 1H, J_1 = 7.2Hz, J_2 = 1.5Hz, H-7); 7.80 (d, 1H, J = 4.5Hz, H-2); 8.02 (dd, 1H, J_1 =7.8 Hz, J_2 = 1.5Hz, H-9); 8.12 (d, 1H, J = 4.5Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 56.0 (O**C**H_3); 112.4 (CH, C-6); 119.8 (C, C-4); 121.2 (CH, C-8); 124.1 (CH, C-2); 127.7 (CH, C-9); 129.4 (CH, C-1); 131.5 (CH, C-7); 146.0 (C, C-3); 149.7 (C, **C**-NO_2); 155.6 (C, **C**-O, C-5).

IR (cm^{-1}): 1322 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 121-123 °C.
***R*$_f$**: 0.37 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).
UPLC: t_R: 3.20 min; purity: 97%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_3S$, 236.0381, found 236.0384.

2-methoxy-6-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol,
(113)



MW = 251.26 g.mol^{-1}
$C_{11}H_9NO_4S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (1 mmol; 210 mg), 3-methoxy-2-hydroxyphenylboronic acid **102** (1.5 mmol; 250 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.05 mmol; 57 mg). The crude product was purified by flash chromatography C18 (eluent: 0-50% H_2O/ACN) and 82 mg (32% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.87 (s, 3H, OCH_3); 6.91 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8); 7.06 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-7); 7.53 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-9); 7.75 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 8.10 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 10.62 (br s, 1H, O**H**).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 56.1 (O**C**H_3); 112.6 (CH, C-7); 118.7 (C and CH, C-4 and C-9 respectively); 119.7 (CH, C-8); 123.6 (CH, C-2); 129.3 (CH, C-1); 144.0 (C, C-3); 147.1 (C, **C**-NO_2); 148.3 (C, **C**-OH, C-5); 149.5 (C, **C**-OCH_3, C-6).

IR (cm^{-1}): 1317 ($\nu_{=COC}$); 3566 (ν_{OH}).

M.p: 185-187 °C.

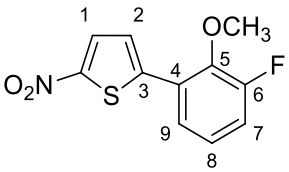
***R*$_f$**: 0.28 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).

UPLC: t_R: 2.53 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_4S$, 252.0331, found 252.0333.

2-(3-fluoro-2-methoxyphenyl)-5-nitrothiophene,

(114)



MW = 253.25 g.mol^{-1}

$C_{11}H_8FNO_3S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (1 mmol; 210 mg), 3-fluoro-2-methoxyphenyl boronic acid **103** (1.5 mmol; 275 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.05 mmol; 57 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 204 mg (80% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 4.02 (d, 3H, J_1 = 1.8Hz, OCH_3); 7.24 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, $^4J_{2,HF}$ = 5.1Hz, H-8); 7.40 (ddd, 1H, $^3J_{1,HF}$ = 11.4 Hz, J_2 = 8.1 Hz, J_3 = 1.2 Hz, H-7); 7.85 (m, 2H, H-9 and H-2); 8.16 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 61.1 (d, OCH_3, $^4J_{CF}$ = 6.4 Hz); 118.1 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 18.8 Hz, C-7); 123.2 (d, CH, $^4J_{CF}$ = 2.8 Hz, C-9); 124.7 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 8.25 Hz, C-8); 125.6 (CH, C-2); 125.8 (d, C, $^3J_{CF}$ = 2.9 Hz, C-4); 129.5 (CH, C-1); 143.8 (d, C, $^2J_{CF}$ = 12.3 Hz, C-5); 144.0 (C, C-3); 150.8 (C, **C**-NO_2); 155.2 (d, CF, $^1J_{CF}$ = 244.2 Hz, C-6).

^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -130.4.

IR (cm^{-1}): 1258 (ν_{C-F}); 1327 ($\nu_{=COC}$).

M.p: 138-140 °C.

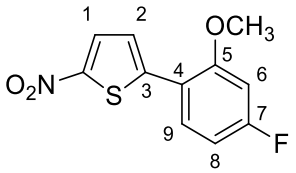
R_f: 0.4 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 2.75 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9NO_3FS$, 254.0287, found 254.0274.

2-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)-5-nitrothiophene,

(115)



MW = 253.25 $g.mol^{-1}$

$C_{11}H_8FNO_3S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (2.4 mmol; 500 mg), 4-fluoro-2-methoxyphenyl boronic acid **104** (3.6 mmol; 655 mg) tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 455 mg (75% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 4.03 (s, 3H, OCH_3); 6.95 (td, 1H, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 2.4 Hz, H-8); 7.19 (dd, 1H, $^3J_{1,HF}$ = 10.8 Hz, J_2 = 2.4 Hz, H-6); 7.76 (d, 1H, J = 4.8 Hz, H-2); 8.07 (dd, 1H, J_1 = 8.7 Hz, $^4J_{2,HF}$ = 6.6 Hz, H-9); 8.13 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 56.6 (OCH_3); 100.7 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 26.1 Hz, C-6); 108.2 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 21.9 Hz, C-8); 116.6 (C, C-4); 124.1 (CH, C-2); 129.4 (CH, C-1); 129.6 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 10.6 Hz, C-9); 145.4 (C, C-3); 149.4 (C, **C**-NO_2); 157.1 (d, C, $^3J_{CF}$ = 10.5 Hz, C-5); 163.8 (d, **C**-F, $^1J_{CF}$ = 247.4 Hz, C-7).

^{19}F NMR (DMSO - d_6, 376.5 MHz) δ: -108.2.

IR (cm^{-1}): 1274 (ν_{C-F}); 1321 ($\nu_{=COC}$).

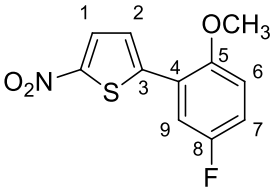
M.p: 167-169 °C.

R_f: 0.4 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 2.71 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9NO_3FS$, 254.0287, found 254.0292.

2-(5-fluoro-2-methoxyphenyl)-5-nitrothiophene,
(116)



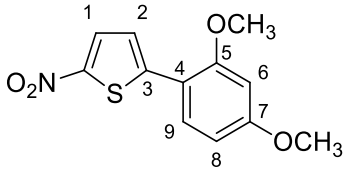
MW = 253.25 g.mol^{-1}
$C_{11}H_8FNO_3S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (2.4 mmol; 500 mg), 5-fluoro-2-methoxyphenyl boronic acid **105** (3.6 mmol; 655 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (1.2 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 545 mg (90% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.99 (s, 3H, OCH_3); 7.27 (m, 2H, H-6 and H-7); 7.85 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 7.93 (dd, 1H, $^3J_{1,\,HF}$ = 9.9 Hz, J_2 = 3 Hz, H-9); 8.11 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 56.5 (OCH_3); 113.8 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 36.1 Hz, C-9); 113.9 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 1.2 Hz, C-6); 117.6 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 23.3 Hz, C-7); 121.0 (d, C, $^3J_{CF}$ = 8.25 Hz, C-4); 125.0 (CH, C-2); 129.1 (CH, C-1); 144.3 (d, C, $^4J_{CF}$ = 1.8 Hz, C-3); 150.4 (C, **C**-NO_2); 151.9 (C, C-5); 156.5 (d, CF, $^1J_{CF}$ = 235.4 Hz, C-8).
^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -123.4.

IR (cm^{-1}): 1265 ($\nu_{C\text{-}F}$); 1325 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 148-150 °C.
***R*$_f$**: 0.3 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).
UPLC: t_R: 2.71 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9NO_3FS$, 254.0287, found 254.0285.

2-(2,4-dimethoxyphenyl)-5-nitrothiophene, **(117)**



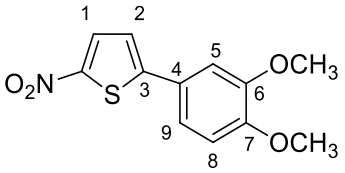
MW = 265.28 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{11}NO_4S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (2.4 mmol; 500 mg), 2,4-dimethoxyphenyl boronic acid **106** (3.6 mmol; 610 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 565 mg (89% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.85 (s, 3H, OCH_3); 4.01 (s, 3H, OCH_3); 6.68 (dd, 1H, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 2.4 Hz, H-8); 6.75 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H-6); 7.64 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 7.93 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H-9); 8.06 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 55.6 (O**C**H_3); 56.1 (O**C**H_3); 98.6 (CH, C-6); 107.0 (CH, C-8); 112.9 (C, C-4); 122.5 (CH, C-2); 128.9 (CH, C-9); 129.6 (CH, C-1); 147.1 (C, C-3); 148.2 (C, **C**-NO_2); 157.1 (C, **C**-O); 162.2 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1320 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 147-149 °C.
***R*$_f$**: 0.35 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV)
UPLC: t_R: 2.69 min; purity: 100%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{12}NO_4S$, 266.0487, found 266.0488.

2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-nitrothiophene, **(118)**



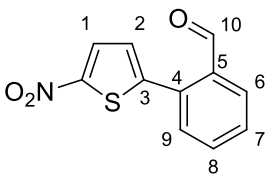
MW = 265.28 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{11}NO_4S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (1 mmol; 210 mg), 3,4-dimethoxyphenyl boronic acid **107** (1.5 mmol; 253 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.05 mmol; 60 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 180 mg (68% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 3.82 (s, 3H, OCH_3); 3.85 (s, 3H, OCH_3); 7.05 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-8); 7.34 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-5); 7.38 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 2.1 Hz, H-9); 7,62 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-2); 8.14 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 55.6 (OCH_3); 55.8 (OCH_3); 109.5 (CH, C-5); 112.1 (CH, C-8); 119.4 (CH, C-9); 123.0 (CH, C-2); 124.1 (C, C-4); 131.4 (CH, C-1); 148.1 (C, C-3); 149.2 (C, **C**-NO_2); 150.8 (C, **C**-O); 152.3 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1316 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 131-133 °C.
R$_f$: 0.26 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).
UPLC: t_R: 2.57 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{12}NO_4S$, 266.0487, found 266.0490.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)benzaldehyde,
(119)



MW = 233.24 g.mol^{-1}
$C_{11}H_7NO_3S$

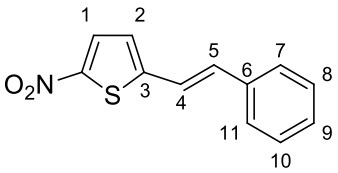
Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (2.4 mmol; 500 mg), 2-formylphenylboronic acid **108** (3.6 mmol; 540 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 297 mg (53% yield) of pure product were obtained as yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 7.44 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-2); 7.71 (m, 2H, H-7 and H-9); 7.82 (td, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-8); 8.00 (dd, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-6); 8.20 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-1); 10.10 (s, 1H, C**H**O).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 128.8 (CH, C-6); 130.0 (CH, C-2); 130.1 (CH); 130.3 (CH, C-1); 131.5 (CH, C-9); 133.9 (C, C-4); 134.2 (CH, C-8); 146.7 (C, C-3); 151.4 (C, **C**-NO_2); 191.0 (C, **C**HO, C-5).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$); 2919 (ν_{CHO}).
M.p: 136-138 °C.
R$_f$: 0.6 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.42 min; purity: 95%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_8NO_3S$, 234.0225, found 234.0231.

(E)-2-nitro-5-styrylthiophene,
(120)



MW = 231.27 g.mol^{-1}
$C_{12}H_9NO_2S$

Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (1 mmol; 210 mg), *trans* 2-phenylvinylboronic acid **109** (1.5 mmol; 150 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.05 mmol; 57 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-5% PE/EtOAc) and 145 mg (62% yield) of pure product were obtained as orange powder.

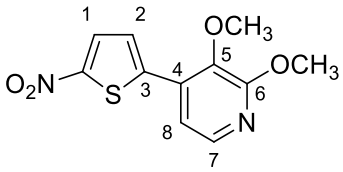
^{1}H NMR (DMSO - d_6, 600 MHz) δ: 7.35 (tt, 1H, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-9); 7.36 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-2); 7.41 (d, 1H, J = 16.3 Hz, H-5); 7.42 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H-8 and H-10); 7.53 (d, 1H, J = 16.3 Hz, H-4); 7.65 (td, 2H, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-7 and H-11); 8.09 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 150 MHz) δ: 120.5 (CH, C-4); 126.0 (CH, C-2); 127.2 (2-CH, C-7 and C-11); 128.9 (2-CH, C-8 and C-10); 129.1 (CH, C-9); 131.1 (CH, C-1); 133.8 (CH, C-5); 135.6 (C, C-6); 148.3 (C, **C**-NO_2); 150.8 (C, C-3).

IR (cm^{-1}): 954 ($\delta_{=CH}$); 1316 ($\nu_{C=C}$); 3090 ($\nu_{=CH}$).
M.p: 145-147 °C.
R$_f$: 0.44 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).
UPLC: t_R: 2.79 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{10}NO_2S$, 232.0432, found 232.0430.

2,3-dimethoxy-4-(5-nitrothiophen-2-yl)pyridine,

(121)



MW = 266.27 g.mol^{-1}

$C_{11}H_{10}N_2O_4S$

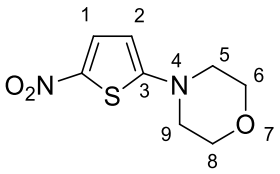
Method A: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (0.45 mmol; 95 mg), 2,3-dimethoxypyridine-4-boronic acid **110** (0.68 mmol; 125 mg) and bis(triphenylphosphine) palladium(II) dichloride (0.022 mmol; 16 mg). The crude product was purified by manual chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 63 mg (53% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.94 (s, 3H, OCH_3); 3.97 (s, 3H, OCH_3); 7.62 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-8); 7.98 (m, 2H, H-7 and H-2); 8.19 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 53.7 (OCH_3); 59.7 (OCH_3); 113.9 (CH, C-8); 127.1 (CH, C-2); 129.3 (CH, C-1); 131.1 (C, C-4); 139.0 (C, **C**-O); 140.9 (CH, C-7); 141.8 (C, **C**-O); 152.3 (C, C-3); 157.6 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1047 ($\nu_{=C-N}$); 1394 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 158-160°C.
***R*$_f$**: 0.28 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).
UPLC: t_R: 2.60 min; purity: 100%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{11}N_2O_4S$, 267.0440, found 267.0440.

4-(5-nitrothiophen-2-yl)morpholine,

(122)



MW = 214.24 g.mol^{-1}

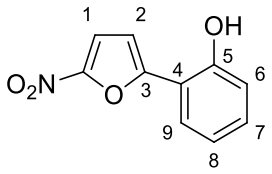
$C_8H_{10}N_2O_3S$

Method E: Starting from 2-bromo-5-nitrothiophene **98** (4.8 mmol; 1 g) and morpholine **123** (5.74 mmol; 500 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 740 mg (72% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 3.43 (t, 4H, CH_2, J = 5.1 Hz, H-5 and H-9); 3.74 (t, 4H, CH_2, J = 4.8 Hz, H-6 and H-8); 6.36 (d, 1H, J_1 = 5.1 Hz, H-2); 7.93 (d, 1H, J_1 = 5.1 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 48.9 (2-CH_2, C-5 and C9); 65.0 (2-CH_2, C-6 and C-8); 104.5 (CH, C-2); 132.6 (C, C-3); 134.3 (CH, C-1); 166.7 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 890 ($\nu_{C\text{-}O\text{-}C}$), 1109 ($\nu_{C\text{-}N}$).
M.p: 171-173 °C.
R$_f$: 0.26 (SiO_2; PE/EtOAc: 2/8; UV).
UPLC: t_R: 1.94 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_8H_{11}N_2O_3S$, 215.0490, found 215.0490.

2-(5-nitrofuran-2-yl)phenol,
(129)



MW = 205.17 g.mol^{-1}
$C_{10}H_7NO_4$

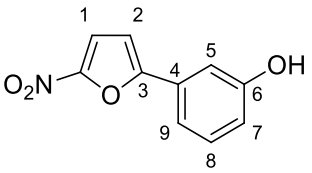
Method B: Starting from 2-bromo-5-nitrofurane **124** (0.62 mmol; 120 mg), 2-hydroxyphenylboronic acid **99** (0.93 mmol; 130 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.03 mmol; 40 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 50 mg (39% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 6.98 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-8); 7.02 (dd, 1H, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 0.9 Hz, H-6); 7.23 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-2); 7.32 (ddd, 1H, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 1.5 Hz, H-7); 7.75 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-9); 7.78 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-1); 10.79 (br s, 1H, O**H**).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 112.7 (CH, C-2); 114.4 (C, C-4); 115.7 (CH, C-1); 116.6 (CH, C-6); 119.7 (CH, C-8); 126.2 (CH, C-9); 131.5 (CH, C-7); 150.4 (C, C-3); 154.0 (C, **C**-NO_2); 155.8 (C, **C**-OH).

IR (cm^{-1}): 3446 (ν_{OH}).
M.p: 218-220 °C.
***R*$_f$**: 0.28 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).
UPLC: t_R: 2.29 min; purity: 100%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_8NO_4$, 206.0453, found 206.0451.

3-(5-nitrofuran-2-yl)phenol,
(130)



MW = 205.17 g.mol^{-1}
$C_{10}H_7NO_4$

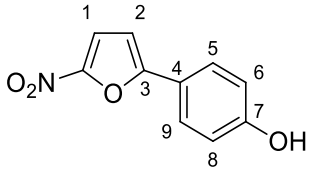
Method B: Starting from 2-bromo-5-nitrofurane **124** (0.62 mmol; 120 mg), 3-hydroxyphenylboronic acid **126** (0.93 mmol; 130 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.03 mmol; 40 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 53 mg (40% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.89 (m, 1H, H-7); 7.28 (m, 1H, H-5); 7.34 (m, 3H, H-9, H-8 and H-2); 7.81 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-1); 9.87 (br s, 1H, O**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 109.6 (CH, C-2); 111.3 (CH, C-5); 115.6 (CH, C-1); 116.1 (CH, C-9); 117.6 (CH, C-7); 128.7 (C, C-4); 130.5 (CH, C-8); 151.1 (C, C-3); 156.1 (C, **C**-NO_2); 158.0 (C, **C**-OH).

IR (cm^{-1}): 3400 (ν_{OH}).
M.p: 205-207 °C.
***R*$_f$**: 0.31 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).
UPLC: t_R: 2.15 min; purity: 100%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_8NO_4$, 206.0453, found 206.0457.

4-(5-nitrofuran-2-yl)phenol,

(131)



MW = 205.17 g.mol^{-1}

$C_{10}H_7NO_4$

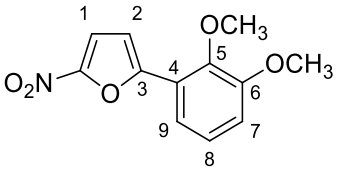
Method B: Starting from 2-bromo-5-nitrofurane **124** (1.56 mmol; 300 mg), 4-hydroxyphenylboronic acid **127** (2.34 mmol; 320 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.07 mmol; 90 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 63 mg (20% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.91 (d, 2H, *J* = 8.7Hz, H-6 and H-8); 7.19 (d, 1H, *J* = 3.9Hz, H-2); 7.74 (d, 2H, *J* = 8.7Hz, H-5 and H-9); 7.81 (d, 1H, *J* = 3.9Hz, H-1); 10.21 (br s, 1H, O**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 107.4 (CH, C-2); 116.1 (2-CH, C-6 and C-8); 116.3 (CH, C-1); 118.6 (C, C-4); 127.1 (2-CH, C-5 and c-9); 150.6 (C, C-3); 157.2 (C, **C**-NO_2); 159.7 (C, **C**-OH).

IR (cm^{-1}): 3384 (ν_{OH}).
M.p: 245-247 °C.
***R*$_f$**: 0.42 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.21 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_8NO_4$, 206.0453, found 206.0453.

2-(2,3-dimethoxyphenyl)-5-nitrofuran,

(132)



MW = 249.22 g.mol^{-1}

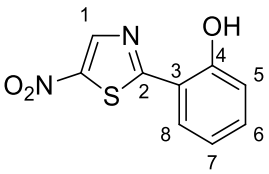
$C_{12}H_{11}NO_5$

Method B: Starting from 2-bromo-5-nitrofurane **124** (0.62 mmol; 120 mg), 2,3-dimethoxyphenylboronic acid **128** (0.93 mmol; 170 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.03 mmol; 40 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 101 mg (65% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 3.84 (s, 3H, OCH_3); 3.87 (s, 3H, OCH_3); 7.23 (m, 3H, H-7, H-8 and H-2); 7.40 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 2.4 Hz, H-9); 7.82 (d, 1H, J = 3.9Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 56.0 (OCH_3); 59.9 (OCH_3); 113.1 (CH, C-2); 114.9 (CH, C-8); 115.4 (CH, C-1); 118.0 (CH, C-9); 121.3 (C, C-4); 124.9 (CH, C-7); 146.6 (C, C-3); 150.8 (C, **C**-NO_2); 152.8 (C, **C**-O); 153.1 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1355 ($\nu_{=COC}$).
M.p: 104-106 °C.
R$_f$: 0.4 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; UV).
UPLC: t_R: 2.53 min; purity: 100%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{11}NO_5$, 250.0715, found 250.0712.

2-(5-nitrothiazol-2-yl)phenol,
(133)



MW = 222.22 g.mol^{-1}
$C_9H_6N_2O_3S$

Method B: Starting from 2-bromo-5-nitrothiazole **125** (2.4 mmol; 500 mg), 2-hydroxyphenylboronic acid **99** (3.6 mmol; 500 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-20% PE/EtOAc) and 45 mg (7% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 7.03 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.5Hz, H-7); 7.11 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-5); 7.46 (ddd, 1H, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 7.5 Hz, J_3 = 1.8 Hz, H-6); 8.26 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-8); 8.87 (s, 1H, H-1); 12.03 (br s, 1H, O**H**).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 116.4 (CH, C-5); 118.6 (C, C-3); 119.8 (CH, C-7); 127.6 (CH, C-8); 133.4 (CH, C-6); 143.9 (CH, C-1); 148.1 (**C**-NO_2); 156.2 (C, **C**-OH); 166.8 (C, C-2).

IR (cm^{-1}): 3503 (ν_{OH}).

M.p: 199-201 °C.

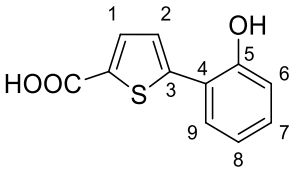
R_f: 0.3 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 2.37 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_9H_7N_2O_3S$, 223.0177, found 223.0178.

5-(2-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylic acid,

(140)



MW = 220.24 g.mol^{-1}

$C_{11}H_8O_3S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 2-hydroxyphenylboronic acid **99** (3.6 mmol; 500 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 347 mg (65% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 6.89 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-8); 7.00 (dd, 1H, J_1 = 8.1Hz, J_2 = 0.9 Hz; H-6); 7.20 (ddd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 1.5 Hz, H-7); 7.66 (m, 2H, H-1 and H-2); 7.75 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-9); 10.59 (br s, 1H, O**H**); 12.83 (br s, 1H, COO**H**).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 116.3 (CH, C-6); 119.5 (CH, C-8); 119.6 (C, C-4); 124.8 (CH, C-2); 127.6 (CH, C-9); 129.5 (CH, C-7); 132.6 (CH, C-1); 132.8 (C, **C**-COOH); 145.8 (C, C-3); 153.8 (C, **C**-OH); 163.2 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}):1663 ($\nu_{C=O}$); 3546 (ν_{OH}).

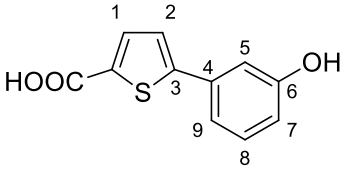
M.p: 226-228 °C.

R_f: 0.24 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; $KMnO_4$).

UPLC: t_R: 2.15 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9O_3S$, 221.0272, found 221.0275.

5-(3-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylic acid,
(141)



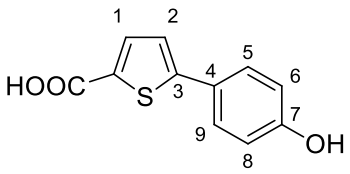
MW = 220.24 g.mol^{-1}
$C_{11}H_8O_3S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 3-hydroxyphenylboronic acid **126** (3.6 mmol; 500 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 155 mg (29% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.80 (ddd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 2.4 Hz, J_3 = 0.9 Hz, H-7); 7.08 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz, H-5); 7.15 (m, 1H, H-9); 7.25 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8); 7.48 (d, *J* = 3.9 Hz, H-1); 7.69 (*J* = 3.9 Hz, H-2); 9.72 (br s, 1H, O**H**); 13.13 (br s, 1H, COO**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 112.4 (CH, C-5); 116.0 (CH, C-7); 116.7 (CH, C-9); 124.4 (CH, C-2); 130.4 (CH, C-8); 133.0 (C, C-4); 134.0 (C, **C**-COOH); 134.3 (CH, C-1); 149.9 (C, C-3); 157.9 (**C**-OH, C-6); 162.8 (C, **C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1663 ($\nu_{C=O}$); 3586 (ν_{OH}).
M.p: 235-237 °C.
***R*$_f$**: 0.55 (SiO_2; DCM/MeOH: 5/5; $KMnO_4$).
UPLC: t_R: 2.18 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9O_3S$, 221.0272, found 221.0273.

5-(4-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylic acid, **(142)**



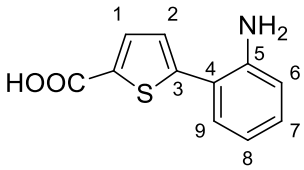
MW = 220.24 g.mol^{-1}
$C_{11}H_8O_3S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 4-hydroxyphenylboronic acid **127** (3.6 mmol; 500 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 210 mg (39% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.83 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.37 (d, 2H, *J* = 3.9 Hz, H-2); 7.55 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 7.66 (d, 2H, *J* = 3.9 Hz, H-1); 9.89 (br s, 1H, O**H**); 12.93 (br s, 1H, COO**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 116.0 (2-CH, C-6 and C-8); 122.7 (CH, C-2); 123.9 (C, C-4); 127.4 (2-CH, C-5 and C-9); 131.4 (C, **C**-COOH); 150.6 (C, C-3); 158.3 (C, **C**-OH); 162.9 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1661 ($\nu_{C=O}$); 3113 (ν_{OH}).
M.p: 258-260 °C.
***R*$_f$**: 0.55 (SiO_2; DCM/MeOH: 5/5; $KMnO_4$).
UPLC: t_R: 2.14 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9O_3S$, 221.0272, found 221.0268.

5-(2-aminophenyl)thiophene-2-carboxylic acid, **(143)**



MW = 219.26 g.mol^{-1}
$C_{11}H_9NO_2S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 2-aminophenylboronic acid hydrochloride **137** (3.6 mmol; 624 mg) and tetrakis (triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 130 mg (25% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 5.09 (br s, 2H, N**H**$_2$); 6.60 (td, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.9 Hz, H-8); 6.78 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 0.9 Hz, H-6); 7.04 (m, 1H, H-7); 7.15 (m, 2H, H-2 and H-9); 7.44 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 115.8 (CH, C-6); 116.7 (CH, C-8); 118.5 (C, C-4); 125.2 (CH, C-2); 128.7 (CH, C-7); 129.7 (CH, C-9); 129.8 (CH, C-1); 143.7 (C, **C**-COOH); 145.3 (2-C, C-3 and **C**-NH); 166.7 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1544 ($\nu_{C=O}$); 2988 (ν_{NH2}

M.p: > 300 °C.

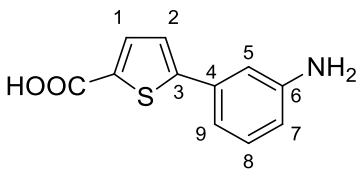
R$_f$: 0.68 (SiO_2; BuOH/ AcOH/H_2O: 8/1/1; $KMnO_4$).

UPLC: t_R: 2.05 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_2S$, 220.0432, found 220.0377.

5-(3-aminophenyl)thiophene-2-carboxylic acid,

(144)



MW = 219.26 g.mol^{-1}

$C_{11}H_9NO_2S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 3-aminophenylboronic acid hydrochloride **138** (3.6 mmol; 624 mg) and tetrakis (triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 230 mg (44% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 5.21 (br s, 2H, N**H**$_2$); 6.51 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-7); 6.80 (m, 2H, H-5 and H-9); 7.03 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-8); 7.21 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-2); 7.41 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 110.5 (CH, C-5); 113.0 (CH, C-9); 113.6 (CH, C-7); 122.6 (CH, C-2); 129.5 (CH, C-8); 130.1 (CH, C-1); 134.5 (C, C-4); 143.2 (C, **C**-COOH); 146.6 (C, C-3); 149.2 (C, **C**-N); 166.8 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1549 ($\nu_{C=O}$); 2988 (ν_{NH2}).

M.p: > 300 °C.

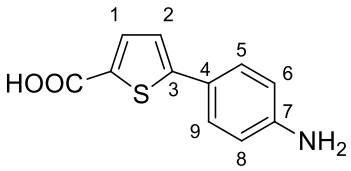
R$_f$: 0.68 (SiO_2; BuOH/ AcOH/H_2O: 8/1/1; $KMnO_4$).

UPLC: t_R: 1.65 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_2S$, 220.0432, found 220.0438.

5-(4-aminophenyl)thiophene-2-carboxylic acid,

(145)



MW = 219.26 g.mol^{-1}

$C_{11}H_9NO_2S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiophenecarboxylic acid **134** (2.4 mmol; 500 mg), 4-aminophenylboronic acid hydrochloride **139** (3.6 mmol; 624 mg) and tetrakis (triphenylphosphine)palladium(0) (0.12 mmol; 140 mg). The crude product was purified by flash chromatography C18 (eluent: 0-40% H_2O/ACN) and 140 mg (27% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 5.35 (br s, 2H, N**H**$_2$); 6.58 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-6 and H-8); 7.10 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-2); 7.32 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 7.39 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 114.0 (2-CH, C-6 and C-8); 120.2 (CH, C-2); 121.7 (C, C-4); 126.3 (2-CH, C-5 and C-9); 130.5 (CH, C-1); 147.6 (C, C, **C**-COOH); 148.8 (2-C, C-3 and **C**-NH); 167.3 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1539 ($\nu_{C=O}$); 2989 (ν_{NH2}).

M.p: > 300 °C.

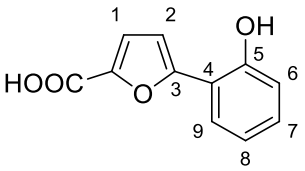
R_f: 0.68 (SiO_2; BuOH/ AcOH/H_2O: 8/1/1; $KMnO_4$).

UPLC: t_R: 1.69 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_2S$, 220.0432, found 220.0441.

5-(2-hydroxyphenyl)furan-2-carboxylic acid,

(146)



MW = 204.18 g.mol^{-1}

$C_{11}H_8O_4$

Method B: Starting from 5-Bromo-2-furancarboxylic acid **135** (2.6 mmol; 500 mg), 2-hydroxyphenylboronic acid **99** (3.9 mmol; 540 mg) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.13 mmol; 150 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 250 mg (45% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 6.92 (td, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-8); 6.98 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 =0.9 Hz, H-6); 7.07 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-2); 7.21 (ddd, 1H J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 1.5 Hz, H-7); 7.28 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-1); 7.73 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-9); 10.41 (br s, 1H, OH); 13.04 (br s, 1H, COOH).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 111.1 (CH, C-2); 116.2 (C, C-4); 116.3 (CH, C-6); 119.3 (CH, C-8); 119.7 (CH, C-1); 125.7 (CH, C-9); 129.7 (CH, C-7); 142.8 (C, C-3); 153.6 (C, **C**-COOH); 154.4 (C, **C**-OH); 159.4 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1653 ($\nu_{C=O}$); 3396 (ν_{OH}).

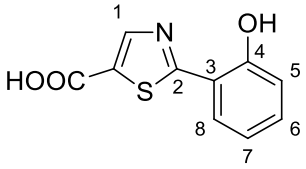
M.p: 211-213 °C.

R_f: 0.26 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; $KMnO_4$).

UPLC: t_R: 1.96 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_9O_4$, 205.0501, found 205.0505.

2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-5-carboxylic acid,
(147)



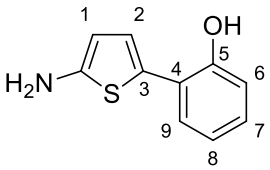
MW = 221.23 g.mol^{-1}
$C_{10}H_7NO_3S$

Method A: Starting from 5-Bromo-2-thiazolecarboxylic acid **136** (1.4 mmol; 300 mg), 2-hydroxyphenylboronic acid **99** (2.16 mmol; 300 mg) and tetrakis (triphenylphosphine) palladium(0) (0.07 mmol; 80 mg). The crude product was purified by flash chromatography C18 (eluent: 0-10% H_2O/ACN) and 281 mg (53% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.9 (t, 1H, *J* = 7.8Hz, H-7); 7.05 (d, 1H, *J* = 8.1Hz, H-5); 7.29 (t, 1H, *J* = 8.4Hz, H-6); 7.98 (d, 1H, *J* = 5.7Hz, H-8); 8.06 (s, 1H, NH); 12.09 (br s, 1H, OH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 116.8 (CH, C-5); 118.7 (CH, C-7); 119.1 (C, C-3); 127.2 (CH, C-8); 131.1 (CH, C-6); 139.3 (C, **C**-COOH); 142.5 (CH, C-1); 155.9 (C, **C**-OH); 164.4 (C, C-2); 166.1 (**C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1520 ($\nu_{C=O}$); 3285 (ν_{OH}).
M.p: > 300 °C.
***R*$_f$**: 0.2 (SiO_2; DCM/MeOH: 7/3; $KMnO_4$).
UPLC: t_R: 2.26 min; purity 82%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_8NO_3S$, 222.0225, found 222.0223.

2-(5-aminothiophen-2-yl)phenol,
(148)



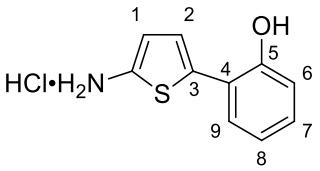
MW = 191.25 g.mol^{-1}
$C_{10}H_9NOS$

Method C: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and sodium borohydride (2.26 mmol; 85 mg). The crude product was obtained 76 mg (88% yield) as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 5.54, (s, 2H, NH_2); 5.84 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-1); 6.74 (td, 1H, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-8); 6.82 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-6); 6.92 (td, 1H, J_1 = 6.9 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-7); 7.11 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-2); 7.33 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-9); 9.76 (br s, 1H, O**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 103.9 (CH, C-1), 115.9 (CH, C-6); 119.3 (CH, C-8); 122.0 (C, C-4); 122.1 (C, C-3); 124.5 (CH, C-2); 125.7 (CH, C-9); 125.9 (CH, C-7); 152.3 (C, **C**-NH); 154.1 (C, **C**-OH).

R$_f$: 0.14 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; Ninhydrin).
UPLC: t_R: 1.76 min; purity: 76%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_{10}NOS$, 192.0483, found 192.0477.

2-(5-aminothiophen-2-yl)phenol hydrochloride,
(149)



MW = 227.71 g.mol^{-1}
$C_{10}H_{10}ClNOS$

Method D: Starting from 2-(5-aminothiophen-2-yl)phenol **148** (0.39 mmol; 76 mg) and HCl ([12 M]; 5 mL). The crude product was obtained 80 mg (75% yield) as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.84 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 0.9 Hz, H-8); 6.91 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-1); 7.00 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 0.6 Hz, H-6); 7.11 (td, 1H, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-7); 7.40 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-2); 7.62 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-9); 10.5 (br s, 1H, O**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 116.2 (CH, C-6), 119.2 (CH, C-8); 119.5 (CH, C-1); 119.9 (C, C-4); 122.5 (CH, C-2); 126.7 (CH, C-9); 128.3 (CH, C-7); 134.2 (C, C-3); 134.8 (C, **C**-NH); 153.0 (C, **C**-OH).

IR (cm^{-1}): 3173 (ν_{NH3+})

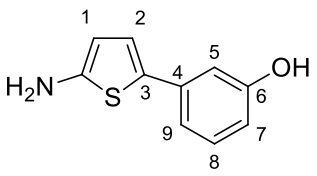
M.p: 168-170 °C

UPLC: t_R: 1.75 min; purity: 98%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_{10}NOS$, 192.0483, found 192.0492.

3-(5-aminothiophen-2-yl)phenol,

(150)



MW = 191.25 $g.mol^{-1}$

$C_{10}H_9NOS$

Method C: Starting from 3-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **92** (0.45 mmol; 100 mg) and sodium borohydride (2.26 mmol; 85 mg). The reaction mixture was filtered with celite pad. 20 mL of a solution of HCl [1 M] were added and the aqueous layer was extracted with 3x20 mL of EtOAc. A solution of Na_2CO_3 [1 M] was added to aqueous layer until pH 7-8 was reached. The aqueous layer was concentrated under reduced pressure and the crude product was obtained 30 mg (35% yield) as purple powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6) δ: 5.73 (br s, 2H, N**H**$_2$); 5.84 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-1); 6.50 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 2.1 Hz, H-7); 6.76 (t, 1H, J = 1.8 Hz, H-5); 6.83 (d, 1H, J_1 = 7.8 Hz, H-9), 6.91 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-2); 7.06 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-8); 9.34 (br s, 1H, O**H**).

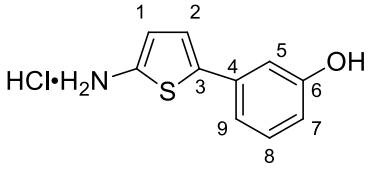
^{13}C NMR (DMSO - d_6) δ: 104.6 (CH, C-1); 110.1 (CH, C-5); 112.3 (CH, C-7); 114.4 (CH, C-9); 122.7 (CH, C-2); 125.2 (C, C-4); 129.7 (CH, C-8); 136.1 (C, C-3); 154.1 (C, **C**-NH); 157.5 (C, **C**-OH).

R$_f$: 0.25 (SiO_2; PE/EtOAc: 6/4; Ninhydrin).

UPLC: t_R: 1.84 min; purity: 97%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_{10}NOS$, 192.0483, found 192.0477.

3-(5-aminothiophen-2-yl)phenol hydrochloride,
(151)



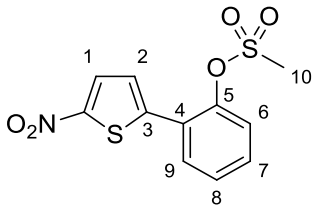
MW = 227.71 g.mol^{-1}
$C_{10}H_{10}ClNOS$

Method D: Starting from 3-(5-aminothiophen-2-yl)phenol **150** (0.015 mmol; 30 mg) and HCl ([12 M]; 5 mL). The crude product was obtained 20 mg (71% yield) as black powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 6.84 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-7); 6.76 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H-1); 6.94 (br s, H-5); 6.98 (d, 1H, J_1 = 7.8 Hz, H-9); 7.17 (m, 2H, H-8 and H-2).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 111.5 (CH, C-5), 114.5 (CH, C-7); 115.6 (CH, C-9); 118.5 (CH, C-1); 122.2 (CH, C-2); 130.1 (CH, C-8); 134.5 (2-C, C-3 and C-NH); 136.9 (C, C-4); 153.0 (C, **C**-OH).

IR (cm^{-1}): 3184 (ν_{NH3+})
M.p: 176-178 °C.
UPLC: t_R: 1.78 min; purity: 72%.
HRMS: [M + H]$^+$ calcd for $C_{10}H_{10}NOS$, 192.0483, found 192.0492.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl methanesulfonate,
(152)



MW = 299.32 g.mol^{-1}
$C_{11}H_9NO_5S$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.67 mmol; 150 mg) and methanesulfonyl chloride (2 eq; 1.3 mmol; 100 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 132 mg (66% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.47 (s, 3H, CH_3); 7.51 (m, 1H, H-8); 7.62 (m, 2H, H-6 and H-7); 7.68 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.97 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-9); 8.19 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 38.3 (CH_3, C-10); 123.1 (CH, C-6); 125.2 (C, C-4); 127.3 (CH, C-2); 128.0 (CH, C-8); 130.1 (CH, C-1); 130.4 (CH, C-9); 131.5 (CH, C-7); 144.5 (C, C-3); 145.4 (C, **C**-NO_2); 151.0 (C, **C**-O, C-5).

IR (cm^{-1}): 1361 ($\nu_{S=O}$).

M.p: 147-149 °C.

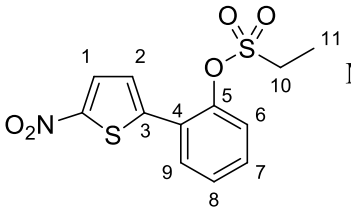
***R*$_f$**: 0.32 (SiO_2; DCM; UV).

UPLC: t_R: 2.53 min; purity: 98%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}NO_5S_2$, 300.0000, found 300.0009.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl ethanesulfonate,

(153)



MW = 313.34 g.mol^{-1}

$C_{12}H_{11}NO_5S$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and ethanesulfonyl chloride (2 eq; 0.9 mmol; 80 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 130 mg (93% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.34 (t, 3H, CH_3, *J* = 7.2 Hz, H-11); 3.62 (q, 2H, CH_2, *J* = 7.5 Hz, H-10); 7.50 (m, 1H, H-8); 7.59 (m, 2H, H-6 and H-7); 7.66 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.97 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 0.9 Hz, H-9); 8.19 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 7.8 (CH_3, C-11); 46.0 (CH_2, C-10); 122.9 (CH, C-6); 125.2 (C, C-4); 127.4 (CH, C-2); 127.8 (CH, C-8); 130.0 (CH, C-1); 130.4 (CH, C-9); 131.4 (CH, C-7); 144.5 (C, C-3); 145.3 (C, **C**-NO_2); 150.9 (C, **C**-O, C-5).

IR (cm^{-1}): 1322 ($\nu_{S=O}$).

M.p: 97-99 °C.

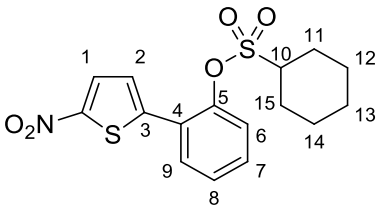
R_f: 0.38 (SiO_2; DCM).

UPLC: t_R: 2.63 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{12}NO_5S_2$, 314.0157, found 314.0145.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl cyclohexanesulfonate,

(154)



MW = 367.43 $g.mol^{-1}$

$C_{16}H_{17}NO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and cyclohexanesulfonyl chloride (1.5 eq; 0.67 mmol; 100 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 130 mg (79% yield) of pure product were obtained as green crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 1.19 (m, 1H, H-13a); 1.33 (m, 2H, H-12a and H-14b); 1.57 (m, 3H, H-13b, H-11a and H-15b); 1.8 (m, 2H, H-12b and H-14a); 2.14 (m, 2H, H-11b and H-15a); 3.63 (m, 1H, H-10); 7.50 (m, 1H, H-8); 7.60 (m, 2H, H-6 and H-7); 7.64 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-2); 7.89 (dd, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-9); 7.20 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 24.0 (2-CH_2, C-12 and C-14); 24.4 (CH_2, C-13); 26.0 (2-CH_2, C11 and C-15); 60.5 (CH, C-10); 123.1 (CH, C-6); 125.1 (C, C-4); 127.6 (2-CH, C-8 and C-2); 130.0 (CH, C-1); 130.6 (CH, C-9); 131.5 (CH, C-7); 144.6 (C, C-3); 145.3 (C, **C**-NO_2); 150.9 (C, **C**-O, C-5).

IR (cm^{-1}): 1322 ($\nu_{S=O}$).

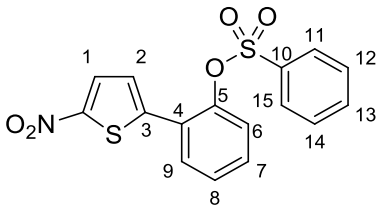
M.p: 113-115 °C.

R_f: 0.46 (SiO_2; DCM; UV).

UPLC: t_R: 2.93 min; purity: 98%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{18}NO_5S_2$, 368.0626, found 368.0633.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl benzenesulfonate,
(155)



MW = 361.39 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{11}NO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and benzenesulfonyl chloride (1.5 eq; 0.67 mmol; 60 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 130 mg (80% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 600 MHz) *δ*: 7.33 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz); 7.40 (dd, 1H, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-6); 7.48 (dt, 1H, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-8); 7.52 (dd, 2H, J_1 = 8.3 Hz, J_2 = 7.4 Hz, H-12 and H-14); 7.57 (ddd, 1H, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 7.6 Hz, J_3 = 1.7 Hz, H-7); 7.64 (dd, 2H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-11 and H-15); 7.74 (tt, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-13); 7.75 (m, 1H, H-9); 8.04 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 150 MHz) *δ*: 123.5 (CH, C-6); 125.3 (C, C-4); 127.4 (CH, C-2); 128.1 (2-CH, C-11 and C-15), 128.4 (CH, C-8); 129.6 (2-CH, C-12 and C-14), 129.8 (CH, C-1); 130.4 (CH, C-9); 131.4 (CH, C-7); 133.7 (C, C-10); 135.2 (CH, C-13); 144.1 (C, C-3), 145.4 (C, **C**-O); 150.9 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1324 ($\nu_{S=O}$).

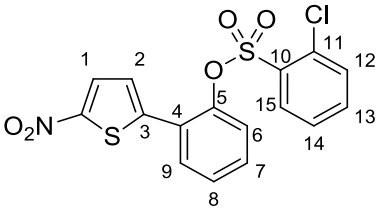
M.p:168-170 °C.

***R*$_f$**: 0.5 (SiO_2; DCM; UV)

UPLC: t_R: 3.12 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}NO_5S_2$, 362.0157, found 362.0154.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl 2-chlorobenzenesulfonate, **(156)**



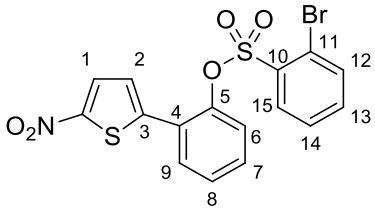
MW = 394.97 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{10}ClNO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and 2-chlorobenzenesulfonyl chloride (1.5 eq; 0.67 mmol; 143 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 150 mg (84% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.15 (m, 1H, H-6); 7.53 (m, 4H, H-2, H-7, H-8 and H-12); 7.83 (m, 4H, H-9, H-13, H-14 and H-15); 8.09 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 122.8 (CH, C-6); 125.4 (C, C-4); 127.5 (CH, C-2); 128.2 (CH, C-12); 128.3 (CH, C-8); 129.8 (CH, C-1); 130.7 (CH, C-9); 131.5 (CH, C-7); 131.8 (C, **C**-Cl and CH, C-14); 132.6 (CH, C-15); 132.7 (C, C-10); 136.6 (CH, C-13); 144.1 (C, C-3); 145.5 (C, **C**-NO_2); 150.9 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1378 ($\nu_{S=O}$).
M.p: 133-135 °C.
R$_f$: 0.51 (SiO_2; DCM; UV).
UPLC: t_R: 3.19 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{11}ClNO_5S_2$, 395.9767, found 395.9758.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl 2-bromobenzenesulfonate, **(157)**



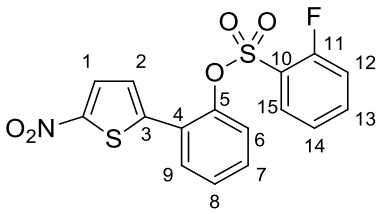
MW = 438.92 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{10}BrNO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and 2-bromobenzenesulfonyl chloride (0.67 mmol; 173 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 135 mg (68% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 7.11 (m, 1H, H-6); 7.50 (m, 3H, H-2, H-8 and H-15); 7.60 (td, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-14); 7.70 (td, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-13); 7.88 (m, 2H, H-7 and H-9); 7.98 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-12); 8.10 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 120.6 (C, C-Br); 123.1 (CH, C-6); 125.8 (C, C-4); 127.8 (CH, C-2); 128.8 (CH, C-8); 129.0 (CH, C-14); 130.2 (CH, C-1); 131.1 (CH, C-9); 131.9 (CH, C-15); 132.3 (CH, C-7); 135.0 (C, C-10); 136.5 (CH, C-13); 136.8 (CH, C-12); 144.5 (C, C-3); 145.8 (C, **C**-NO_2); 151.3 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1324 ($\nu_{S=O}$).
M.p: 128-131 °C.
R$_f$: 0.52 (SiO_2; DCM; UV).
UPLC: t_R: 3.21 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{11}BrNO_5S_2$, 439.9262, found 439.9249.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl cyclohexanesulfonate,
(158)



MW = 379.00 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{10}FNO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.45 mmol; 100 mg) and 2-fluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 0.9 mmol; 120 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 120 mg (77% yield) of pure product were obtained as pale yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 600 MHz) δ: 7.33 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-2); 7.35 (dd, 1H, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 1.1 Hz, H-6); 7.37 (dt, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.1 Hz, H-14); 7.45 (ddd, 1H, J_1 = 10.5 Hz, J_2 = 8.2 Hz, J_3 = 1.1 Hz, H-12); 7.50 (dt, 1H, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 1.1 Hz, H-8); 7.57 (ddd, 1H, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 7.6 Hz, J_3 = 1.7 Hz, H-7); 7.69 (dt, 1H, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 1.7 Hz, H-15); 7.79 (dd, 1H, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 1.7 Hz, H-9); 7.84 (dddd, 1H, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 7.8 Hz, J_3 = 5.0 Hz, J_4 = 1.7 Hz, H-14); 8.04 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 150 MHz) δ: 117.8 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 20.1 Hz, C-12); 122.2 (d, C, $^2J_{CF}$ = 12.8 Hz, C-10); 123.4 (CH, C-6); 125.3 (C, C-4); 125.5 (d, CH, $^4J_{CF}$ = 3.1 Hz, C-14); 127.6 (CH, C-2); 128.5 (CH, C-8); 129.9 (CH, C-1); 130.7 (CH, C-9), 130.9 (CH, C-15); 131.5 (CH, C-7); 138.5 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 9.0 Hz, C-13); 144.1 (C, C-3); 145.4 (C, **C**-O); 150.9 (C, **C**-NO_2); 158.5 (d, CF, $^1J_{CF}$ = 258.5 Hz).

^{19}F NMR (DMSO - d_6, 376.5 MHz) δ: -108.1

IR (cm^{-1}): 1326 ($\nu_{S=O}$).

M.p: 121-123 °C.

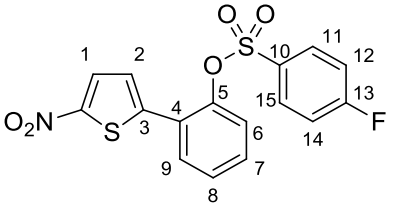
R_f: 0.51 (SiO_2; DCM; UV).

UPLC: t_R: 3.10 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{11}FNO_5S_2$, 380.0063, found 380.0058.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl 4-fluorobenzenesulfonate,

(159)



MW = 379.00 g.mol^{-1}

$C_{16}H_{10}FNO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.67 mmol; 150 mg) and 4-fluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.3 mmol; 252 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 253 mg (85% yield) of pure product were obtained as yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 7.35 (m, 3H, H-2, H-12 and H-14); 7.44 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-6); 7.49 (ddd, 1H, J_1 = 9 Hz, J_2 = 7.8 Hz, J_3 = 1.5 Hz, H-8); 7.59 (ddd, 1H, J_1

= 9.1 Hz, J_2 = 7.5 Hz, J_3 = 1.5 Hz, H-7); 7.72 (m, 3H, H-9, H-11 and H-15); 8.06 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 117.01 (d, 2-CH, $^2J_{CF}$ = 23.1 Hz, C-12 and C-14); 123.6 (CH, C-6); 125.3 (C, C-4); 127.5 (CH, C-2); 128.5 (CH, C-8); 129.8 (CH, C-1 and C, C-10); 130.4 (CH, C-9); 131.5 (d, 2-CH, $^3J_{CF}$ = 10.1 Hz, C-11 and C-15); 131,5 (CH, C-7); 143.9 (C, C-3); 145.3 (C, **C**-NO_2); 151.0 (C, **C**-O); 165.7 (d, CF, $^1J_{CF}$ = 253.9 Hz).

^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -102.7.

IR (cm^{-1}): 1382 ($\nu_{S=O}$).

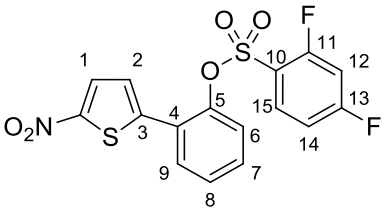
M.p: 119-121 °C.

***R*$_f$**: 0.51 (SiO_2; DCM; UV).

UPLC: t_R: 2.78 min; purity: 96%.

HRMS: $[M - H]^-$ calcd for $C_{16}H_9FNO_5S_2$, 377.9906, found 377.9919.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl 2,4-difluorobenzenesulfonate, (160)



MW = 396.99 g.mol^{-1}

$C_{16}H_9F_2NO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.67 mmol; 150 mg) and 2,4-difluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.3 mmol; 187 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 165 mg (49% yield) of pure product were obtained as yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.26 (tdd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 2.7 Hz, J_3 = 1.2 Hz, H-14); 7.37 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 1.5 Hz, H-6); 7.42 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-2); 7.56 (m, 3H, H-6, H-7 and H-12); 7.76 (m, 2H, H-9 and H-15); 8.10 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 106.8 (t, CH, $^2J_{CF}$ = 26.2 Hz, C-12); 113.1 (dd, CH, $^2J_{CF}$ = 22.6 Hz, $^4J_{CF}$ = 3.2 Hz, C-14); 118.9 (dd, C, $^2J_{CF}$ = 13.3 Hz, $^4J_{CF}$ = 3.5 Hz, C-10); 123.6 (CH, C-6); 125.3 (C, C-4); 127.6 (CH, C-2); 128.7 (CH, C-8); 129.9 (CH, C-9); 130.7 (CH, C-7); 131.6 (CH, C-1); 133.3 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 11.5 Hz, C-15); 144.0 (C, C-3); 145.2 (C, **C**-NO_2); 151.0 (C, **C**-

O); 159,6 (dd, CF, $^{1}J_{1,\,CF}$ = 259.2 Hz, $^{3}J_{2,\,CF}$ = 14.0 Hz); 166.8 (dd, CF, $^{1}J_{1,\,CF}$ = 256.5 Hz, $^{3}J_{2,\,CF}$ = 12.0 Hz).

^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -102.1 (d, $^{4}J_{FF}$ = 14.68 Hz); -97.5 (d, $^{4}J_{FF}$ = 14.68 Hz).

IR (cm^{-1}): 1324 ($\nu_{S=O}$).

M.p: 126-127 °C.

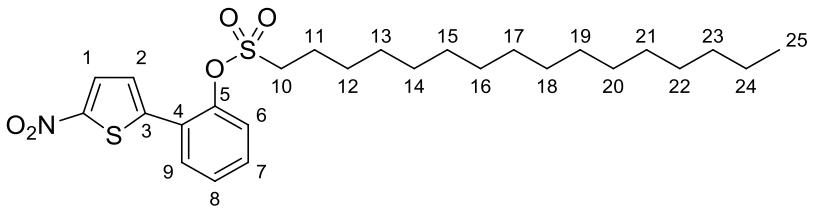
***R*$_f$**: 0.51 (SiO_2; DCM; UV).

UPLC: t_R: 2.77 min; purity: 98%.

HRMS: [M - H]$^-$ calcd for $C_{16}H_8F_2NO_5S_2$, 395.9812 , found 395.9815.

2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl hexadecane-1-sulfonate,

(161)



MW = 509.72 g.mol^{-1}

$C_{26}H_{39}NO_5S_2$

Method F: Starting from 2-(5-nitrothiophen-2-yl)phenol **91** (0.67 mmol; 150 mg) and hexadecanesulfonyl chloride (1.1 eq; 0.74 mmol; 243 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/DCM) and 204 mg (59% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 0.84 (t, 3H, CH_3, *J* = 6.6 Hz, H-25); 1.28 (m, 26H, H-12 to H-24); 1.72 (q, 2H, CH_2, *J* = 7.5 Hz, H-11); 3.59 (t, 3H, CH_3, *J* = 7.5 Hz, H-10); 7.49 (m, 1H, H-8); 7.57 (m, 2H, H-6 and H-7); 7.66 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.92 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-9); 8.18 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H-1).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 13.9 (CH_3, C-25); 23.1 (CH_2, C-11); 22.0, 27.1, 28.3, 28.6, 28.7, 28.8, 29.0, 31.2 (13-CH_2); 51.1 (CH_2, C-10); 122.9 (CH, C-6); 125.0 (C, C-4); 127.5 (CH, C-2); 127.8 (CH, C-8); 130.0 (CH, C-1); 130.5 (CH, C-9); 131.5 (CH, C-7); 144.5 (C, C-3); 145.3 (C, **C**-NO_2); 150.9 (C, **C**-O).

IR (cm^{-1}): 1349 ($\nu_{S=O}$).

M.p: 76-78 °C.

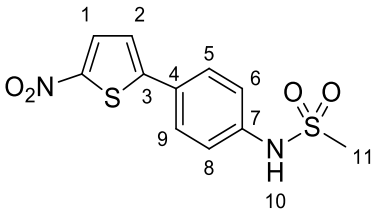
R_f: 0.46 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 3.96 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{26}H_{40}NO_5S_2$, 510.2348, found 510.2325.

N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)methanesulfonamide,

(162)



MW = 298.33 g.mol^{-1}

$C_{11}H_{10}N_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and methanesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 206 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 220 mg (81% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 3.08 (s, 3H, CH_3, H-11); 7.29 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.59 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.82 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 8.15 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 10.17 (br s, 1H, **N**H).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 39.5 (CH_3); 119.2 (2-CH_2, C-6 and C-8); 123.2 (CH, C-2); 126.4 (C, C-4); 127.5 (2-CH_2, C-5 and C-9); 131.5 (CH, C-1); 140.4 (C, C-3); 148.6 (C, **C**-NH, C-7); 151.4 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1320 ($\nu_{S=O}$); 2925 (ν_{NH}).

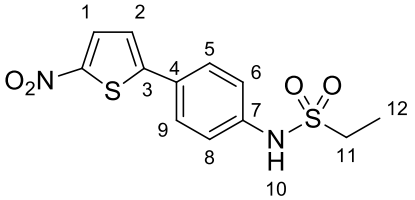
M.p: 206-208 °C.

R_f: 0.48 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; UV).

UPLC: t_R: 2.30 min; purity: 97%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{11}H_{11}N_2O_4S_2$, 299.0160 , 299.0168 found.

N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)ethanesulfonamide, **(163)**



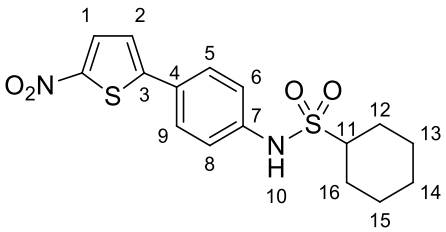
MW = 312.36 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{12}N_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and ethanesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 170 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 203 mg (71% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.20 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, H-12); 3.18 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11); 7.30 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.58 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.81 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H-5 and H-9); 8.15 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H-1); 10.20 (br s, 1H, N**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 8.0 (CH_3, C-12); 45.5 (CH_2, C-11); 118.9 (2-CH, C-6 and C-8); 123.2 (CH, C-2); 126.3 (C, C-4); 127.6 (2-CH, C-5 and C-9); 131.5 (CH, C-1); 140.5 (C, C-3); 148.5 (C, **C**-NH, C-7); 151.4 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1325 ($\nu_{S=O}$); 2970 (ν_{NH}).
M.p: 197-199 °C.
***R*$_f$**: 0.31 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.38 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{13}N_2O_4S_2$, 313.0317, found 313.0321.

N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)cyclohexanesulfonamide, **(164)**



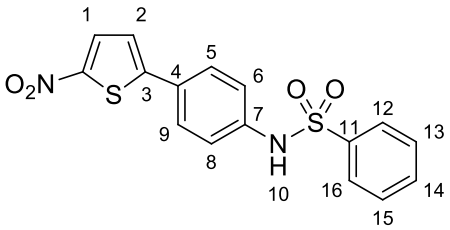
MW = 366.45 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{18}N_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and cyclohexanesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 260 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 198 mg (57% yield) of pure product were obtained as orange crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.17 (m, 3H, H-14a, H-13a and H-15b); 1.41 (m, 2H, H-12a and H-16b); 1.57 (m, 1H, H-14b); 1.75 (m, 2H, H-13b and 15a); 2.02 (m, 2H, H-12b and H-16a); 3.08 (m, 1H, H-11); 7.32 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.58 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.79 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 8.15 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 10.16 (br s, 1H, N**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 24.2 (2-CH_2, C-13 and C-15); 24.6 (CH_2, C-14); 25.9 (2-CH_2, C-12 and C-16); 59.4 (CH, C-11); 118.8 (2-CH, C-6 and C-8); 123.1 (CH, C-2); 126.1 (C, C-4); 127.5 (2-CH, C-5 and C-9); 131.5 (CH, C-1); 140.7 (C, C-3); 148.5 (C, **C**-NH, C-7); 151.5 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1322 ($\nu_{S=O}$); 2929 (ν_{NH}).
M.p: 206-208 °C.
***R*$_f$**: 0.48 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.80 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{19}N_2O_4S_2$, 367.0786, found 367.0792.

N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide,
(165)



MW = 360.40 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{12}N_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and benzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 230 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 287 mg (87% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.20 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.57 (m, 4H, H-2, H-13, H-14 and H-15); 7.72 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 7.82 (dd, 2H, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-12 and H-16); 8.12 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H-1); 10.73 (br s, 1H, N**H**).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 119.6 (2-CH_2, C-6 and C-8); 123.3 (CH, C-2); 126.6 (2-CH_2, C-12 and H-16); 126.7 (C, C-4); 127.4 (2-CH_2, C-5 and C-9); 129.4 (2-CH_2, C-13 and C-15); 131.4 (CH, C-1); 133.1 (CH, C-14); 139.3 (C, C-11); 139.7 (C, C-3); 148.6 (C, **C**-NH, C-7); 151.1 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1321 ($\nu_{S=O}$); 2916 (ν_{NH}).

M.p: 230-232 °C.

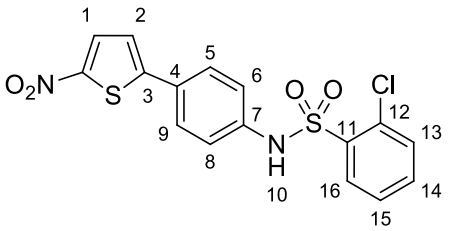
***R*$_f$**: 0.41 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

UPLC: t_R: 2.69 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}N_2O_4S_2$, 361.0317, found 361.0315.

2-chloro-N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide,

(166)



MW = 393.98 g.mol^{-1}

$C_{16}H_{11}ClN_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and 2-chlorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 246 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 303 mg (84% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.18 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.52 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.56 (m, 1H, H-15); 7.65 (m, 2H, H-13 and H-15); 7.71 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 8.11 (m, 2H, H-1 and H-16); 11.07 (br s, 1H, N**H**).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 118.8 (2-CH, C-6 and C-8); 123.3 (CH, C-2); 126.6 (C, C-4); 127.4 (2-CH, C-5 and C-9); 127.9 (CH, C-6); 130.7 (C, **C**-Cl and CH, C-12); 131.4 (CH, C-1); 131.6 (CH, C-15); 132.0 (CH, C-16); 134.9 (CH, C-14); 136.2 (C, C-11); 139.0 (C, C-3); 148.6 (C, **C**-NH, C7); 151.1 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1329 ($\nu_{S=O}$); 2989 (ν_{NH}).

M.p: 183-184 °C.

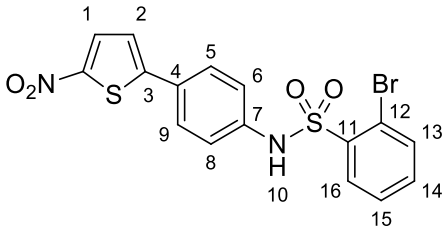
R_f: 0.48 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

UPLC: t_R: 2.76 min; purity: 99%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}ClN_2O_4S_2$, 394.9927, found 394.9926.

2-bromo-N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide,

(167)



MW = 437.93 $g.mol^{-1}$

$C_{16}H_{11}BrN_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.45 mmol; 100 mg) and 2-bromobenzenesulfonyl chloride (1eq; 0.45 mmol; 166 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 83 mg (41% yield) of pure product were obtained as yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 7.18 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.51 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-2); 7.58 (m, 2H, H-14 and H-15); 7.70 (d, 2H, J = 9 Hz, H-5 and H-9); 7.82 (dd, 1H, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-13); 8.11 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H-1); 8.14 (dd, 1H, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-16); 11.08 (br s, 1H, N**H**).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 118.7 (2-CH, C-6 and C-8); 119.1 (C, C-Br, C-12); 123.3 (CH, C-2); 126.5 (C, C-4); 127.4 (2-CH, C-5 and C-9); 128.4 (CH, C-15); 131.4 (CH, C-1); 131.8 (CH, C-16); 134.8 (CH, C-14); 135.5 (CH, C-13); 138.0 (C, C-11); 139.1 (C, C-3); 148.6 (C, **C**-NH, C-7); 151.1 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1327 ($\nu_{S=O}$); 2969 (ν_{NH}).

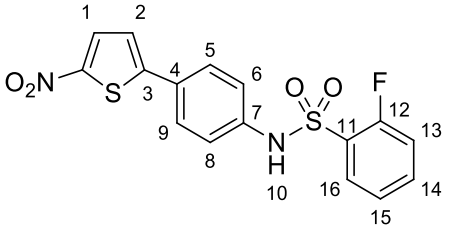
M.p: 201-203 °C.

R_f: 0.57 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

UPLC: t_R: 2.75 min; purity: 100%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}BrN_2O_4S_2$, 438.9422, found 438.9404.

2-fluoro-N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide, **(168)**



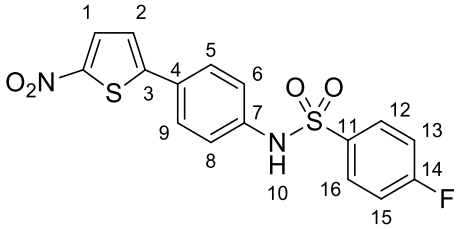
MW = 378.39 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{11}FN_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and 2-fluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 228 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 225 mg (65% yield) of pure product were obtained as pale yellow crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.20 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.41 (m, 2H, H-13 and H-15); 7.53 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.71 (m, 3H, H-5, H-9 and H-14); 7.91 (td, 1H, J_1 = 7.5 Hz, $^4J_{2,\,HF}$ = 1.5 Hz, H-16); 8.11 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 11.06 (br s, 1H, N**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 117.5 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 20.5 Hz, C-13); 119.3 (2-CH, C-6 and C-8); 123.5 (CH, C-2); 125.2 (d, CH, $^4J_{CF}$ = 3.2 Hz, C-15); 126.8 (C, C-4); 126.9 (C, C-11); 127.5 (2-CH, C-5 and C-9); 130.5 (CH, C-16); 131.5 (CH, C-1); 136.3 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 8.4 Hz, C-14); 139.2 (C, C-3); 148.8 (C, **C**-NH, C-7); 151.2 (C, **C**-NO_2); 158.2 (d, **C**F, $^1J_{CF}$ = 253.2 Hz, C-12).
^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -111.0.

IR (cm^{-1}): 1324 ($\nu_{S=O}$); 2916 (ν_{NH}).
M.p: 222-224 °C.
***R*$_f$**: 0.48 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.70 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}FN_2O_4S_2$, 379.0223, found 379.0194.

4-fluoro-N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide, **(169)**



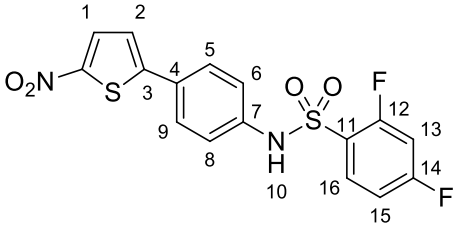
MW = 378.39 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{11}FN_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and 4-fluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 350 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 303 mg (84% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d$_6$*, 300 MHz) *δ*: 7.20 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.42 (t, 2H, *J* = 9 Hz, H-13 and H-15); 7.54 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H-2); 7.72 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 7.87 (m, 2H, H-12 and H-16); 8.12 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 10.74 (br s, 1H, N**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d$_6$*, 75 MHz) *δ*: 116.6 (d, CH, $^2J_{CF}$ = 22.7 Hz, C-13 and C-15); 119.8 (2-CH, C-3 and C-8); 123.4 (CH, C-2); 127.0 (C, C-4); 127.4 (2-CH, C-5 and C-9); 129.7 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 9.6 Hz, C-12 and C-16); 131.4 (CH, C-1); 135.6 (d, C, $^4J_{CF}$ = 2.5 Hz, C-11); 139.5 (C, C-3); 148.7 (C, **C**-NH, C-7); 151.0 (C, **C**-NO_2); 164.4 (d, CF, $^1J_{CF}$ = 250.4 Hz, C-14).
^{19}F NMR (DMSO - *d$_6$*, 376.5 MHz) *δ*: -106.4.

IR (cm^{-1}): 1326 ($\nu_{S=O}$); 2973 (ν_{NH}).
M.p:183-184 °C.
R$_f$: 0.41 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.73 min; purity: 99%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}FN_2O_4S_2$, 379.0223, found 379.0228.

2,4-difluoro-N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)benzenesulfonamide, **(170)**



MW = 396.38 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{10}F_2N_2O_4S_2$

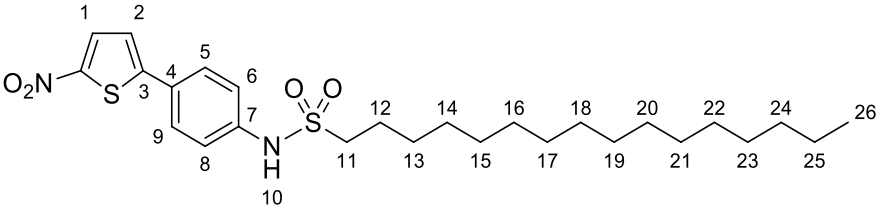
Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and 2,4-difluorobenzenesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 260 µl). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-100% PE/DCM) and 282 mg (78% yield) of pure product were obtained as yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 7.20 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.28 (td, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 2.1 Hz, H-13); 7.54 (m, 2H, H-2 and H-15); 7.73 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 7.97 (m, 1H, H-16); 8.11 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H-1); 11.10 (br s, 1H, N**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 106.2 (t, CH, $^2J_{CF}$ = 25.8 Hz, C-15); 112.5 (dd, CH, $^2J_{1,\,CF}$ = 22.0 Hz, $^4J_{2,\,CF}$ = 3 Hz, H-15); 119.4 (2-CH, C-6 and C-8); 123.4 (CH, C-2); 123.7 (d, C, $^2J_{CF}$ = 3.3 Hz, C-11); 127.0 (C, C-4); 127.5 (2-CH, C-5 and C-9); 131.4 (CH, C-1); 132.5 (d, CH, $^3J_{CF}$ = 10.8 Hz, C-16); 139.0 (C, C-3); 148.7 (C, **C**-NH, C-7); 151.0 (C, **C**-NO_2); 158.9 (dd, CF, $^1J_{1,\,CF}$ = 255.8 Hz, $^3J_{2,\,CF}$ = 13.35 Hz, C-12); 165.3 (dd, CF, $^1J_{1,\,CF}$ = 253.6 Hz, $^3J_{2,\,CF}$ = 11.5 Hz, C-14).
^{19}F NMR (DMSO - *d*$_6$, 376.5 MHz) *δ*: -104.74 (d, $^4J_{FF}$ = 12.4 Hz); -100.38 (d, $^4J_{FF}$ = 12.4 Hz).

IR (cm^{-1}): 1325 ($\nu_{S=O}$); 2921 (ν_{NH}).
M.p:194-196 °C.
***R*$_f$**: 0.52 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).
UPLC: t_R: 2.66 min; purity: 98%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{16}H_{11}F_2N_2O_4S_2$, 397.0128, found 397.0133.

N-(4-(5-nitrothiophen-2-yl)phenyl)hexadecane-1-sulfonamide,

(171)



MW = 508.74 g.mol^{-1}

$C_{26}H_{40}N_2O_4S_2$

Method G: Starting from 4-(5-nitrothiophen-2-yl)aniline **90** (0.91 mmol; 200 mg) and hexadecanesulfonyl chloride (2 eq; 1.8 mmol; 584 mg). The crude product was purified by manual gel chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 195 mg (42% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 0.84 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, H-26); 1.22 (m, 26H, H-13 to H-25); 1.64 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-12); 3.15 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-11); 7.29 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-6 and H-8); 7.58 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.80 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-5 and H-9); 8.14 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 10.19 (br s, 1H, N**H**).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 13.9 (CH_3, C-26); 22.9 (CH_2, C-14); 22.0, 27.0, 28.2, 28.5, 28.7, 28.9, 29.0, 31.2 (13-CH_2); 50.7 (CH_2, C-11); 118.8 (2-CH, C-6 and C-8); 123.1 (CH, C-2); 126.2 (C, C-4); 127.5 (2-CH, C-5 and C-9); 131.5 (CH, C-1);140.6 (C, C-3); 148.5 (C, **C**-NH, C-7); 151.5 (C, **C**-NO_2).

IR (cm^{-1}): 1331 ($\nu_{S=O}$); 2915 (ν_{NH}).

M.p:131-133 °C.

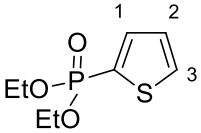
***R*$_f$:** 0.6 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

UPLC: t_R: 3.77 min; purity: 92%.

HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{26}H_{41}N_2O_4S_2$, 509.2508, found 509.2498.

Diethyl thiophen-2-yl phosphonate,

(190)



MW = 220.22 g.mol^{-1}
$C_8H_{13}O_3PS$

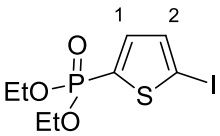
Method H: Starting from Pd(dppf)Cl_2 (1.5 mmol; 1.1 g), sodium acetate (3.6 mmol; 300 mg), DIPEA (3.6 mmol; 4.65 g or 6.3 mL), 2-bromothiophene (0.03 mol; 4.89 g or 2.8 mL) and diethyl phosphite (0.03 mol; 4.1 g or 3.9 mL). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-40% PE/EtOAc) and 6.04 mg (91% yield) of pure product were obtained as pale yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 400 MHz) *δ*: 1.22 (t, 6H, J = 6.9 Hz, CH_3); 4.02 (m, 4H, CH_2); 7.27 (ddd, J_1 = 4.8 Hz, J_2 = 3.6 Hz, $^4J_{3,\,HP}$ = 3.0 Hz, H-2); 7.63 (ddd, $^3J_{1,\,HP}$ = 7.9 Hz, J_2 = 3.6 Hz, J_3 = 1.1 Hz, H-1); 8.05 (ddd, $^4J_{1,\,HP}$ = 5.8 Hz, J_2 = 4.8 Hz, J_3 = 1.1 Hz, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 16.1 (d, 2-CH_3, $^3J_{CP}$ = 6.1 Hz); 62.2 (d, 2-CH_2, $^2J_{CP}$ = 5.4 Hz); 127.6 (d, C, **C**-P, $^1J_{CP}$ = 206.2 Hz); 128.5 (d, CH, $^3J_{CP}$ = 18 Hz, C-2); 134.5 (d, CH, $^3J_{CP}$ = 6.8 Hz, C-3); 136.5 (d, CH, $^2J_{CP}$ = 12.2 Hz, C-1).
^{31}P NMR (DMSO - *d*$_6$, 161.97 MHz) *δ*: 11.1.

IR (cm^{-1}): 1016 (ν_{POEt}); 1250 ($\nu_{P=O}$).
R$_f$: 0.25 (SiO_2; PE/EtOAc: 6/4; UV).

Diethyl (5-iodothiophen-2-yl)phosphonate,

(191)



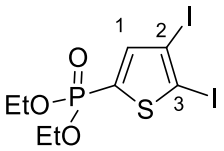
MW = 345.92 g.mol^{-1}
$C_8H_{12}IO_3PS$

Method I: Starting from phosphonate **190** (0.018 mol; 4 g), H_5IO_6 (8.77 mmol; 2 g), I_2 (7.87 mmol; 2 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 1.64 g (52% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 400 MHz) *δ*: 1.22 (td, 6H, J_1 = 6.8 Hz, J_2 = 0.4 Hz, CH_3); 4.02 (m, 4H, CH_2); 7.32 (dd, $^{3}J_{1,\,HP}$ = 8.4 Hz, J_2 = 3.6 Hz, H-1); 7.48 (dd, J_1 = 3.6 Hz, $^{4}J_{2,\,HP}$ = 3.0 Hz, H-2).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 16.1 (d, 2-CH_3, $^{3}J_{CP}$ = 6.2 Hz); 62.4 (d, 2-CH_2, $^{2}J_{CP}$ = 5.3 Hz); 86.4 (d, C, **C**-I, $^{3}J_{CP}$ = 6 Hz); 133.9 (d, C, **C**-P, $^{1}J_{CP}$ = 203.4 Hz); 138.1 (d, CH, $^{3}J_{CP}$ = 3.6 Hz, C-2); 138.2 (d, CH, $^{2}J_{CP}$ = 9.22 Hz, C-1).
^{31}P NMR (DMSO - *d*$_6$, 161.97 MHz) *δ*: 11.1.

IR (cm^{-1}): 1011 (ν_{POEt}); 1236 ($\nu_{P=O}$).
***R*$_f$**: 0.36 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

Diethyl (4,5-diiodothiophen-2-yl)phosphonate,
(192)



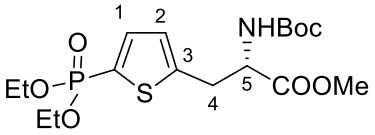
MW = 471.82 g.mol^{-1}
$C_8H_{11}I_2O_3PS$

Method I: Secondary product obtained by iodation of compound **190**. 3-5diiodo derivative was isolated by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 200 mg (6% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 400 MHz) *δ*: 1.22 (td, 6H, J = 7.2 Hz, CH_3); 4.03 (m, 4H, CH_2); 7.45 (d, $^{3}J_{HP}$ = 8.4 Hz, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 16.1 (d, 2-CH_3, $^{3}J_{CP}$ = 6.1 Hz); 62.8 (d, 2-CH_2, $^{2}J_{CP}$ = 21.6 Hz); 97.2 (m, C, 2-**C**-I); 136.3 (d, C, **C**-P, $^{1}J_{CP}$ = 200.1 Hz); 143.4 (d, CH, $^{2}J_{CP}$ = 11.17 Hz, C-1).
^{31}P NMR (DMSO - *d*$_6$, 161.97 MHz) *δ*: 7.01.

IR (cm^{-1}): 1011 (ν_{POEt}); 1240 ($\nu_{P=O}$).
***R*$_f$**: 0.40 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; UV).

(S)methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(5-(diethoxyphosphoryl)thiophen-2-l)propanoate,
(194)



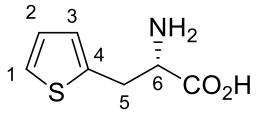
MW = 421.44 g.mol^{-1}
$C_{17}H_{28}NO_7PS$

Method K: Starting from Zn powder (9 mmol; 590 mg); I_2 (0.45 mmol; 120 mg); *N*-(tert-butoxycarbonyl)-3-iodo-L-alanine methyl ester (3 mmol; 990 mg), $Pd_2(dba)_3$ (0.05 mmol; 46 mg), SPhos (0.1 mmol; 46 mg) and diethyl (5-iodothiophen-2-yl)phosphonate **191** (2 mmol; 700 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% Toluene/EtOAc) and 260 mg (30% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 1.21 (t, 6H, $^3J_{HP}$ = 7.2 Hz, 2-CH_3); 1.35 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.13 and 3.36 (m, 2H, CH_2, H-4); 3.64 (s, 3H, OCH_3); 3.99 (m, 4H, 2-CH_2); 4.21 (m, 1H, CH, H-5); 7.06 (t, 1H, CH, $^4J_{HP}$ = 3.6 Hz, H-1); 7.43 (m, 2H, CH and NH, H-2).
^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 16.1 (d, 2-CH_3, $^3J_{CP}$ = 6.07 Hz); 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 30.8 (CH_2, C-4); 52.0 (CO_2**C**H_3); 54.5 (CH, C-5); 62.1 (d, 2-CH_2, $^2J_{CP}$ = 5.25 Hz); 78.4 (**C**$(CH_3)_3$); 126.1 (d, C, **C**-P, $^1J_{CP}$ = 207.2 Hz); 127.8 (d, CH, $^2J_{CP}$ = 16.7 Hz, C-1); 136.2 (d, CH, $^3J_{CP}$ = 11.2 Hz, C-2); 148.5 (d, C, $^3J_{CP}$ = 6.8 Hz, C-3); 155.3 (N**C**OO); 171.6 (**C**$OOCH_3$).
^{31}P NMR (DMSO - d_6, 121.49 MHz) δ: 10.9.

IR (cm^{-1}): 1017 (ν_{POEt}); 1240 ($\nu_{P=O}$).
R_f: 0.12 (SiO_2; Toluene/EtOAc: 5/5; Ninhydrine).
$[\alpha]_D^{25}$ = +43 (CH_2Cl_2; c = 0.98).
UPLC: t_R: 2.92 min; purity: 97%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_{17}H_{28}NO_7PS$, 444.1222, found 444.1230.

(S)-2-amino-3-(5-phosphonothiophen-2-yl)propanoic acid,
(195)



MW = 171.22 g.mol^{-1}
$C_7H_9NO_2S$

Method L: Starting from **194** (0.36 mmol; 153 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 25 mg (41% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.46 (m, 2H, CH_2, H-4); 4.01 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, H-5); 7.04 (m, 2H, H-2 and H-3); 7.39 (dd, 1H, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, H-1).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ*: 30.3 (CH_2, C-4); 55.6 (CH, C-5); 126.0 (CH, C-1); 127.5, 127.8 (2-CH, C-2 and C-3); 136.2 (C, C-3); 173.4 (C, **C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1589 ($\nu_{C=O}$); 3093 (ν_{NH}).
$[\alpha]_D^{25}$ = -14 (H_2O; c = 0.30).
UPLC: t_R: 1.0 min; purity: 96%.
HRMS: $[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{10}NO_2S$, 172.0432, found 172.0442.

V. Références bibliographiques

(1) Casino, P.; Rubio, V.; Marina, A. The Mechanism of Signal Transduction by Two-Component Systems. *Current Opinion in Structural Biology*. **2010**, *20* (6), 763–771.
https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.010.
(2) Wurgler-murphy, S. M. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences.* **2002**, *22* (5), 172-176.
https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01036-0.
(3) Ni, N.; Li, M.; Wang, J.; Wang, B. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. *Medicinal Research Reviews*. **2009**, *29* (1), 65–124.
https://doi.org/10.1002/med.20145.
(4) Ulrich, L. E.; Koonin, E. V; Zhulin, I. B. One-Component Systems Dominate Signal Transduction in Prokaryotes. *Trends in Microbiology*. **2005**, *13* (2), 52–56.
https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006.
(5) Calva, E.; Oropeza, R. Two-Component Signal Transduction Systems, Environmental Signals, and Virulence. *Microbial Ecology*. **2006**, *51* (2), 166–176.
https://doi.org/10.1007/s00248-005-0087-1.
(6) Cashin, P.; Goldsack, L.; Hall, D.; O'Toole, R. Contrasting Signal Transduction Mechanisms in Bacterial and Eukaryotic Gene Transcription. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *261* (2), 155–164.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00295.x.
(7) Kato, M.; Mizuno, T.; Shimizu, T.; Hakoshima, T. Insights into Multistep Phosphorelay from the Crystal Structure of the C-Terminal HPt Domain of ArcB. *Cell Press.* **1997**, *88* (5), 717-723.
https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81914-5.
(8) Thomason, P.; Kay, R. Eukaryotic Signal Transduction *via* Histidine-Aspartate Phosphorelay. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3141–3150.
(9) Gross, R.; Beier, D. *Two-Component Systems in Bacteria*; 2012.
(10) Zschiedrich, C. P.; Keidel, V.; Szurmant, H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*. **2016**, *428* (19), 3752–3775.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003.
(11) Wang, S. Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. In *Protein Phosphorylation in Human Health*; **2012**.
https://doi.org/10.5772/48277.
(12) Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 183–215.
https://doi.org/10.1146/annurev.biochem. 69.1.183.
(13) West, A. H.; Stock, A. M. Histidine Kinases and Response Regulator Proteins in Two-Component Signaling Systems. *Trends in Biochemical Sciences*. **2001**, *26* (6), 369–376.
https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01852-7.
(14) Laub, M. T.; Goulian, M. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* **2007**, *41* (1), 121–145.
https://doi.org/10.1146/annurev.genet. 41.042007.170548.
(15) Stephenson, K.; Hoch, J. A. Virulence- and Antibiotic Resistance-Associated Two-Component Signal Transduction Systems of Gram-Positive Pathogenic Bacteria as Targets for Antimicrobial Therapy. *Pharmacoloy Ther.* **2002**, *93* (2-3), 293–305.
https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00198-5
(16) Szurmant, H. Essential Two-Component Systems of Gram-Positive Bacteria. In *Two-component systems in Bacteria*; **2012**; 127–147.
(17) Gotoh, Y.; Eguchi, Y.; Watanabe, T.; Okamoto, S.; Doi, A.; Utsumi, R. Two-Component Signal Transduction as Potential Drug Targets in Pathogenic Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **2010**, *13* (2), 232–239.

https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.008.
(18) Szurmant, H.; Nelson, K.; Kim, E. J.; Perego, M.; Hoch, J. A. YycH Regulates the Activity of the Essential YycFG Two-Component System in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (15), 5419–5426.
https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5419-5426.2005.
(19) Dubrac, S.; Boneca, I. G.; Poupel, O.; Msadek, T. New Insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) Essential Signal Transduction Pathway Reveal a Major Role in Controlling Cell Wall Metabolism and Biofilm Formation in *Staphylococcus Aureus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (22), 8257–8269.
https://doi.org/10.1128/JB.00645-07.
(20) Bisicchia, P.; Noone, D.; Lioliou, E.; Howell, A.; Quigley, S.; Jensen, T.; Jarmer, H.; Devine, K. M. The Essential YycFG Two-Component System Controls Cell Wall Metabolism in *Bacillus Subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65* (1), 180–200.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05782.x.
(21) Dubrac, S.; Bisicchia, P.; Devine, K. M.; Msadek, T. A Matter of Life and Death: Cell Wall Homeostasis and the WalKR (YycGF) Essential Signal Transduction Pathway. *Mol Microbiol* **2008**, *70* (6), 1307–1322.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x.
(22) Grossman, A. D. Genetic Networks Controlling the Initiation of Sporulation and the Development of Genetic Competence in *Bacillus Subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **1995**, *29* (1), 477–508.
https://doi.org/10.1146/annurev.genet.29.1.477.
(23) Jiang, M.; Shao, W.; Perego, M.; Hoch, J. A. Multiple Histidine Kinases Regulate Entry into Stationary Phase and Sporulation in *Bacillus Subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2000**, *38* (3), 535–542.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02148.x.
(24) Eswaramoorthy, P.; Duan, D.; Dinh, J.; Dravis, A.; Devi, S. N.; Fujita, M. The Threshold Level of the Sensor Histidine Kinase KinA Governs Entry into Sporulation in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (15), 3870–3882.
https://doi.org/10.1128/JB.00466-10.
(25) Winnen, B.; Anderson, E.; Cole, J. L.; King, G. F.; Rowland, S. L. Role of the PAS Sensor Domains in the *Bacillus Subtilis* Sporulation Kinase KinA. *J. Bacteriol.* **2013**, *195* (10), 2349–2358.
https://doi.org/10.1128/JB.00096-13.
(26) Mielich-Süss, B.; Lopez, D. Molecular Mechanisms Involved in *Bacillus Subtilis* Biofilm Formation. *Environmental Microbiology*. **2015**, *17* (3), 555–565.
https://doi.org/10.1111/1462-2920.12527.
(27) Parsek, M. R.; Singh, P. K. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57* (1), 677–701.
https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.
(28) Cai, X.; Zhang, J.; Chen, M.; Wu, Y.; Wang, X.; Chen, J.; Zhang, J.; Shen, X.; Qu, D.; Jiang, H. The Effect of the Potential Phoq Histidine Kinase Inhibitors on Shigella Flexneri Virulence. *PLoS One* **2011**, *6* (8).
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023100.
(29) Crépin, S.; Chekabab, S. M.; Le Bihan, G.; Bertrand, N.; Dozois, C. M.; Harel, J. The Pho Regulon and the Pathogenesis of *Escherichia Coli*. *Vet. Microbiol.* **2011**, *153* (1–2), 82–88.
https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.043.
(30) Härtig, E.; Jahn, D. Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus Subtilis*. *Adv. Microb. Physiol.* **2012**, *61*, 195–216.
https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6.
(31) Foo, Y. H.; Spahn, C.; Zhang, H.; Heilemann, M.; Kenney, L. J. Single Cell Super-

Resolution Imaging of E. Coli OmpR during Environmental Stress. *Integr. Biol. (United Kingdom)* **2015**, *7* (10), 1297–1308.
https://doi.org/10.1039/c5ib00077g.

(32) Whitchurch, C. B.; Erova, T. E.; Emery, J. A.; Sargent, J. L.; Harris, J. M.; Semmler, A. B. T.; Young, M. D.; Mattick, J. S.; Wozniak, D. J. Phosphorylation of the *Pseudomonas Aeruginosa* Response Regulator AlgR Is Essential for Type IV Fimbria-Mediated Twitching Motility. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (16), 4544–4554.
https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4544-4554.2002.

(33) Koteva, K.; Hong, H. J.; Wang, X. D.; Nazi, I.; Hughes, D.; Naldrett, M. J.; Buttner, M. J.; Wright, G. D. A Vancomycin Photoprobe Identifies the Histidine Kinase VanSsc as a Vancomycin Receptor. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (5), 327–329.
https://doi.org/10.1038/nchembio.350.

(34) Sperandio, V.; Mellies, J. L.; Nguyen, W.; Shin, S.; Kaper, J. B. Quorum Sensing Controls Expression of the Type III Secretion Gene Transcription and Protein Secretion in Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (26), 15196–15201.
https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15196.

(35) Clarke, M. B.; Hughes, D. T.; Zhu, C.; Boedeker, E. C.; Sperandio, V. The QseC Sensor Kinase: A Bacterial Adrenergic Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (27), 10420–10425.
https://doi.org/10.1073/pnas.0604343103.

(36) Wang, X.; Vu, A.; Lee, K.; Dahlquist, F. W. CheA-Receptor Interaction Sites in Bacterial Chemotaxis. *J. Mol. Biol.* **2012**, *422* (2), 282–290.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.023.

(37) Weiss, V.; Kramer, G.; Dunnebier, T.; Flotho, A. Mechanism of Regulation of the Bifunctional Further Reading. *J. Mol. Microbrol. Biotechnol.* **2002**, *4* (3), 229–233.

(38) Watanabe, T.; Okada, A.; Gotoh, Y.; Utsumi, R. Inhibitors Targeting Two-Component Signal Transduction. In *Bacterial signal transduction: Network and drug targets*; 2008; 229–236.

(39) Roychoudhury, S.; Zielinski, N. A.; Ninfa, A. J.; Allen, N. E.; Jungheim, L. N.; Nicas, T. I.; Chakrabarty, A. M. Inhibitors of Two-Component Signal Transduction Systems: Inhibition of Alginate Gene Activation in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (3), 965–969.
https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.965.

(40) Matsushita, M. Histidine Kinases as Targets for New Antimicrobial Agents. *Bioorganic {&} Med. Chem.* **2002**, *10* (4), 855–867.
https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00355-8.

(41) Yamamoto, K.; Kitayama, T.; Ishida, N.; Watanabe, T.; Tanabe, H.; Takatani, M.; Okamoto, T.; Utsumi, R. Identification and Characterization of a Potent Antibacterial Agent, NH125 against Drug-Resistant Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (4), 919–923.
https://doi.org/10.1271/bbb.64.919.

(42) Yamamoto, K.; Kitayama, T.; Minagawa, S.; Watanabe, T.; Sawada, S.; Okamoto, T.; Utsumi, R. Antibacterial Agents That Inhibit Histidine Protein Kinase YycG of *Bacillus Subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (10), 2306–2310.
https://doi.org/10.1271/bbb.65.2306.

(43) Demers, J. P.; Johnson, S.; Weidner-Wells, M. A.; Kanojia, R. M.; Fraga-Spano, S. A.; Klaubert, D. H. Triphenylalkyl Antimicrobial Agents. US5643950A1, **1995**.

(44) Demers, J. P. Triphenylalkyl Antimicrobial Agents. WO9748676A1, **1997**.

(45) Barrett, J. F.; Goldschmidt, R. M.; Lawrence, L. E.; Foleno, B.; Chen, R.; Demers, J. P.; Johnson, S.; Kanojia, R.; Fernandez, J.; Bernstein, J.; et al. Antibacterial Agents That Inhibit

Two-Component Signal Transduction Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (9), 5317–5322.
https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5317.

(46) Frechette, R.; Weidner-Wells, M. A. Benzoxazine Antimicrobial Agents. WO97/17333, **1997**.

(47) Macielag, M. J.; Goldschmidt, R. Inhibitors of Bacterial Two-Component Signalling Systems Inhibitors of Bacterial Two-Component Signalling Systems. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9* (10), 2351–2369.
https://doi.org/10.1517/13543784.9.10.2351.

(48) Frechette, R. F.; Beach, & M. J. Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry The Preparation of 2-Hydroxyethyl-2,3- Dihydro-2h-1,4- Benzoxazin-3(4h)-One Derivatives. *Synth. Commun. An Int. J. Rapid Commun. Synth. Org. Chem.* **1998**, *2818*, 3471–3478.
https://doi.org/10.1080/00397919808004455.

(49) Hlasta, D. J.; Demers, J. P.; Foleno, B. D.; Fraga-Spano, S. A.; Guan, J.; Hilliard, J. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K. A.; Sheppard, C. M.; Sui, Z.; et al. Novel Inhibitors of Bacterial Two-Component Systems with Gram-positive Antibacterial Activity: Pharmacophore Identification Based on the Screening Hit Closantel. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1923–1928.
https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00326-6.

(50) Janssen, M. A. C.; Sipido, V. K. Janssen. US4005218A, **1977**.

(51) Macielag, M. J.; Demers, J. P.; Fraga-Spano, S. A.; Hlasta, D. J.; Johnson, S. G.; Kanojia, R. M.; Russell, R. K.; Sui, Z.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H. M.; et al. Substituted Salicylanilides as Inhibitors of Two-Component Regulatory Systems in Bacteria. **1998**, *41* (16), 2939–2945.
https://doi.org/10.1021/jm9803572.

(52) Sui, Z.; Guan, J.; Hlasta, D. J.; Macielag, M. J.; Foleno, B. D.; Goldschmidt, R. M.; Loeloff, M. J.; Webb, G. C.; Barrett, J. F. SAR Studies of diaryltriazoles against bacterial two-component regulatory systems and their antibacterial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1929–1934.
https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jm9803572.

(53) Alvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. 1,2,3-Triazole–[2′,5′-Bis-O-(Tert-Butyldimethylsilyl)-β-D-Ribofuranosyl]-3′-Spiro-5″-(4″-Amino-1″,2″-Oxathiole 2″,2″-Dioxide) (TSAO) Analogs: Synthesis and Anti-HIV-1 Activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (24), 4185–4194.
https://doi.org/10.1021/jm00050a015.

(54) Kharb, R.; Sharma, P. C.; Yar, M. S. Pharmacological Significance of Triazole Scaffold. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (1), 1–21.
https://doi.org/10.3109/14756360903524304.

(55) Kanojia, R. M.; Murray, W.; Bernstein, J.; Fernandez, J.; Foleno, B. D.; Krause, H.; Lawrence, L.; Webb, G.; Barrett, J. F. 6-Oxa Isosteres of Anacardic Acids as Potent Inhibitors of Bacterial Histidine Protein Kinase (HPK)-Mediated Two-Component Regulatory Systems. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (20), 2947–2952.
https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00508-9.

(56) Kitayama, T.; Okamoto, T.; Hill, R. K.; Kawai, Y.; Takahashi, S.; Yonemori, S.; Yamamoto, Y.; Ohe, K.; Uemura, S.; Sawada, S. Chemistry of Zerumbone. 1. Simplified Isolation, Conjugate Addition Reactions, and a Unique Ring Contracting Transannular Reaction of Its Dibromide. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (8), 2667–2672.
https://doi.org/10.1021/jo981593n.

(57) Kitayama, T.; Yamamoto, K.; Utsumi, R.; Takatani, M.; Kawai, Y.; Hill, R. K.; Sawada, S.; Okamoto, T. Chemistry of Zerumbone. 2. Regulation of Ring Bond Cleavage and

Unique Antibacterial Activities of Zerumbone Derivatives Takashi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (10), 2193–2199.
https://doi.org/10.1271/bbb.65.2193.

(58) Kitayama, T.; Iwabuchi, R.; Minagawa, S.; Shiomi, F.; Cappiello, J.; Sawada, S.; Utsumi, R.; Okamoto, T. Unprecedented Olefin-Dependent Histidine-Kinase Inhibitory of Zerumbone Ring-Opening Material. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (23), 5943–5946.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.071.

(59) Kitayama, T.; Iwabuchi, R.; Minagawa, S.; Sawada, S.; Okumura, R.; Hoshino, K.; Cappiello, J.; Utsumi, R. Synthesis of a Novel Inhibitor against MRSA and VRE: Preparation from Zerumbone Ring Opening Material Showing Histidine-Kinase Inhibition. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 1098–1101.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.015.

(60) Weidner-Wells, M. A.; Ohemeng, K. A.; Nguyen, V. N.; Fraga-Spano, S.; Macielag, M. J.; Werblood, H. M.; Foleno, B. D.; Webb, G. C.; Barrett, J. F.; Hlasta, D. J. Amidino Benzimidazole Inhibitors of Bacterial Two-Component Systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (12), 1545–1548.
https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00024-5

(61) Ohemeng, K. A.; Nguyen, V. N. 2-Substituted Phenyl-Benzimidazole Antibacterial Agents. US5942532, **1999**.

(62) Rasko, D. A.; Moreira, C. G.; De, R. L.; Reading, N. C.; Ritchie, J. M.; Waldor, M. K.; Williams, N.; Taussig, R.; Wei, S.; Roth, M.; et al. Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. *Science.* **2008**, *321* (5892), 1078–1080.
https://doi.org/10.1126/science.1160354.

(63) Worthington, R. J.; Blackledge, M. S.; Melander, C. Small-Molecule Inhibition of Bacterial Two-Component Systems to Combat Antibiotic Resistance and Virulence. *Futur. Med Chem* **2013**, *5* (11), 1265–1284.
https://doi.org/10.4155/fmc.13.58.

(64) Sperandio, V.; Falck, J. R.; Stewart, D. Methods of inhibiting bacterial virulence and compounds relating thereto. WO2009088549A2, **2007**.

(65) Qin, Z.; Zhang, J.; Xu, B.; Chen, L.; Wu, Y.; Yang, X.; Shen, X.; Molin, S.; Danchin, A.; Jiang, H.; et al. Structure-Based Discovery of Inhibitors of the YycG Histidine Kinase: New Chemical Leads to Combat *Staphylococcus Epidermidis* Infections. *BMC Microbiol.* **2006**, *6* (96), 1–18.
https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-96.

(66) Pan, B.; Huang, R. Z.; Han, S. Q.; Qu, D.; Zhu, M. L.; Wei, P.; Ying, H. J. Design, Synthesis, and Antibiofilm Activity of 2-Arylimino-3-Aryl-Thiazolidine-4-Ones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (8), 2461–2464.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.03.013.

(67) Pan, B.; Huang, R.; Zheng, L.; Chen, C.; Han, S.; Qu, D.; Zhu, M.; Wei, P. Thiazolidione Derivatives as Novel Antibiofilm Agents: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (3), 819–824.
https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.12.014.

(68) Huang, R. Z.; Zheng, L. K.; Liu, H. Y.; Pan, B.; Hu, J.; Zhu, T.; Wang, W.; Jiang, D. Bin; Wu, Y.; Wu, Y. C.; et al. Thiazolidione Derivatives Targeting the Histidine Kinase YycG Are Effective against Both Planktonic and Biofilm-Associated *Staphylococcus Epidermidis*. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33* (3), 418–425.
https://doi.org/10.1038/aps.2011.166.

(69) Zhao, D.; Chen, C.; Liu, H.; Zheng, L.; Tong, Y.; Qu, D.; Han, S. Biological Evaluation of Halogenated Thiazolo[3,2-a]Pyrimidin-3-One Carboxylic Acid Derivatives Targeting the YycG Histidine Kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 500–507.

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.096.
(70) Wilke, K. E.; Francis, S.; Carlson, E. E. Inactivation of Multiple Bacterial Histidine Kinases by Targeting the ATP-Binding Domain. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 328–335.
https://doi.org/10.1021/cb5008019.
(71) Goswami, M.; Wilke, K. E.; Carlson, E. E. Rational Design of Selective Adenine-Based Sca Ff Olds for Inactivation of Bacterial Histidine Kinases. **2017**, *60* (19), 8170-8182.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01066.
(72) Laufer, S. A.; Domeyer, D. M.; Scior, T. R. F.; Albrecht, W.; Hauser, D. R. J. Synthesis and Biological Testing of Purine Derivatives as Potential ATP-Competitive Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (3), 710–722.
https://doi.org/10.1021/jm0408767.
(73) Carlson, E. E. Antibacterial Agents Including Histidine Kinase Inhibitors. WO2018217884A1, 2018.
(74) Vo, C. D.; Shebert, H. L.; Zikovich, S.; Dryer, R. A.; Huang, T. P.; Moran, L. J.; Cho, J.; Wassarman, D. R.; Falahee, B. E.; Young, P. D.; et al. Repurposing Hsp90 Inhibitors as Antibiotics Targeting Histidine Kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (23), 5235–5244.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.036.
(75) Negishi, E. I.; Baba, S. Novel Stereoselective Alkenyl-Aryl Coupling *via* Nickel-Catalysed Reaction of Alkenylanes with Aryl Halides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, (15).
https://doi.org/10.1039/C3976000596b.
(76) Baba, S.; Negishi, E. I. A Novel Stereospecific Alkenyl-Alkenyl Cross-Coupling by a Palladium- or Nickel-Catalyzed Reaction of Alkenylalanes with Alkenyl Halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**. *98* (21), 6729-6731.
https://doi.org/10.1021/ja00437a067
(77) King, A. O.; Okukado, N.; Negishi, E. I. Highly General Stereo-, Regio-, and Chemo-Selective Synthesis of Terminal and Internal Conjugated Enynes by the Pd-Catalysed Reaction of Alkynylzinc Reagents with Alkenyl Halides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 683–684.
https://doi.org/10.1039/C39770000683.
(78) Negishi, E. ichi; King, A. O.; Okukado, N. Selective Carbon-Carbon Bond Formation *via* Transition Metal Catalysis. 3. A Highly Selective Synthesis of Unsymmetrical Biaryls and Diarylmethanes by the Nickel- or Palladium-Catalyzed Reaction of Aryl- and Benzylzinc Derivatives with Aryl Halides. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (10), 1821–1823.
https://doi.org/10.1021/jo00430a041.
(79) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or l-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440.
https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95429-2.
(80) Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (*E*) -Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, (19) 866–867.
https://doi.org/10.1039/C39790000866.
(81) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. Recent Applications of the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58* (48), 9633–9695.
https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01188-2.
(82) Biajoli, A. F. P.; Schwalm, C. S.; Limberger, J.; Claudino, T. S.; Monteiro, A. L. Recent Progress in the Use of Pd-Catalyzed C-C Cross-Coupling Reactions in the Synthesis of Pharmaceutical Compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (12), 2186–2214.
https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140255.
(83) Martin, R.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling

Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (11), 1461–1473.
https://doi.org/10.1021/ar800036s.
(84) Zhang, H.; Kwong, F. Y.; Tian, Y.; Chan, K. S. Base and Cation Effects on the Suzuki Cross-Coupling of Bulky Arylboronic Acid with Halopyridines: Synthesis of Pyridylphenols. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (20), 6886–6890.
https://doi.org/10.1021/jo980646y.
(85) Liu, C.; Szostak, M. Decarbonylative Phosphorylation of Amides by Palladium and Nickel Catalysis: The Hirao Cross-Coupling of Amide Derivatives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (41), 12718–12722.
https://doi.org/10.1002/anie.201707102.
(86) Hirao, T.; Masunaga, T.; Ohshiro, Y.; Agawa, T. Stereoselective Synthesis of Vinylphosphonate. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (37), 3595–3598.
https://doi.org/10.1016/0040-4039(80)80245-0.
(87) Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34* (12), 1348–1350.
https://doi.org/10.1002/anie.199513481.
(88) Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (13), 5969–5970.
https://doi.org/10.1021/ja00092a058.
(89) Boibessot, T.; Zschiedrich, C. P.; Lebeau, A.; Bénimèlis, D.; Dunyach-Rémy, C.; Lavigne, J. P.; Szurmant, H.; Benfodda, Z.; Meffre, P. The Rational Design, Synthesis, and Antimicrobial Properties of Thiophene Derivatives That Inhibit Bacterial Histidine Kinases. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (19), 8830–8847.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00580.
(90) Method for Synthesizing 5-N-Tert-Butyloxycarbonyl-5-N-Methylamino-2-Thiophenic Acid. CN103833725A, **2014**.
(91) Huang, Z. Substituted 7-Aza-Benzothiophene Compounds as Lipid Kinase Inhibitors. SG184586A1, **2012**.
(92) Qi, T.; Deschrijver, T.; Huc, I. Large-Scale and Chromatography-Free Synthesis of an Octameric Quinoline-Based Aromatic Amide Helical Foldamer. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (4), 693–708.
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.029.
(93) Barker, J. M.; Huddleston, P. R.; Wood, M. L.; Burkitt, S. A. Nitration of Methyl-3-Hydroxy- and 5-Methyl-3-Hydroxy-Thiophene-2-Carboxylate, and Some Chemistry of the Products. *J. Chem. Res. - Part S* **2001**, *445* (10), 401–402.
https://doi.org/10.3184/030823401103168325.
(94) Millet, A.; Plaisant, M.; Ronco, C.; Cerezo, M.; Abbe, P.; Jaune, E.; Cavazza, E.; Rocchi, S.; Benhida, R. Discovery and Optimization of N-(4-(3-Aminophenyl)Thiazol-2-Yl)Acetamide as a Novel Scaffold Active against Sensitive and Resistant Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (18), 8276–8292.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00547.
(95) Yousef, F.; Mansour, O.; Herbali, J. Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). *In-vitro in-vivo in-silico J.* **2018**, *1* (1), 1–15.
(96) Tacic, A.; Nikolic, V.; Nikolic, L.; Savic, I. Antimicrobial Sulfonamide Drugs. *Adv. Technol.* **2017**, *6* (1), 58–71.
https://doi.org/10.5937/savteh1701058t.
(97) Apaydın, S.; Török, M. Sulfonamide Derivatives as Multi-Target Agents for Complex Diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (16), 2042-2050.

https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.041.
(98) Shukla, N. . Sulfonamides : A Novel Approach for Antimicrobial Chemotherapy. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **2003**, *01* (1), 27–62.
(99) Schenkels, C.; Erni, B.; Reymond, J. L. Phosphofurylalanine, a Stable Analog of Phosphohistidine. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (10), 1443–1446.
https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00209-7.
(100) Mukai, S.; Flematti, G. R.; Byrne, L. T.; Besant, P. G.; Attwood, P. V.; Piggott, M. J. Stable Triazolylphosphonate Analogues of Phosphohistidine. *Amino Acids* **2012**, *43* (2), 857–874.
https://doi.org/10.1007/s00726-011-1145-2.
(101) Kee, J.-M.; Villani, B.; Carpenter, L. R.; Muir, T. W. Development of Stable Phosphohistidine Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14327–14329.
https://doi.org/10.1021/ja104393t.
(102) Muir, T. W.; Kee, J.-M. Phosphohistidine Analogs. WO2012020523A2, **2012**.
(103) Pirrung, M. C.; James, K. D.; Rana, V. S. Thiophosphorylation of Histidine. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (25), 8448–8453.
https://doi.org/10.1021/jo000771l.
(104) Mcallister, T. E.; Webb, M. E. Triazole Phosphohistidine Analogues Compatible with the Fmoc-Strategy. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4043–4049.
https://doi.org/10.1039/c2ob25517k.
(105) McAllister, T. E.; Hollins, J. J.; Webb, M. E. Prospects for Stable Analogues of Phosphohistidine. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (4), 1072–1077.
https://doi.org/10.1042/BST20130071.
(106) McAllister, T. E.; Horner, K. A.; Webb, M. E. Evaluation of the Interaction between Phosphohistidine Analogues and Phosphotyrosine Binding Domains. *ChemBioChem* **2014**, *15* (8), 1088–1091.
https://doi.org/10.1002/cbic.201402090.
(107) Kee, J. M.; Oslund, R. C.; Couvillon, A. D.; Muir, T. W. A Second-Generation Phosphohistidine Analog for Production of Phosphohistidine Antibodies. *Org. Lett.* **2015**, *17* (2), 187–189.
https://doi.org/10.1021/ol503320p.
(108) Lilley, M.; Mambwe, B.; Thompson, M. J.; Jackson, R. F. W.; Muimo, R. 4-Phosphopyrazol-2-Yl Alanine: A Non-Hydrolysable Analogue of Phosphohistidine. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (34), 7305–7308.
https://doi.org/10.1039/c5cc01811k.
(109) Jackson, R.; Muimo, R.; Lilley, M. Phosphohistidine and Phosphotyrosine Analogs. GB2517930A, **2013**.
(110) Jackson, R.; Muimo, R.; Lilley, M. Phosphohistidine and Phosphotyrosine Analogues.WO2015/033120A1. **2015**.
(111) Lilley, M.; Mambwe, B.; Jackson, R. F. W.; Muimo, R. 4-Phosphothiophen-2-Yl Alanine: A New 5-Membered Analogue of Phosphotyrosine. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (66), 9343–9345.
https://doi.org/10.1039/C4CC03393K.

Chapitre 2 :
Inhibition de la voie de biosynthèse de la lysine comme stratégie antibactérienne.

I. Etude bibliographique

Face à la problématique de la résistance bactérienne, il est urgent de trouver de nouveaux agents antibactériens, différents des antibiotiques actuels et présentant des structures chimiques nouvelles. Ces nouvelles molécules devront utiliser des mécanismes d'inhibition peu explorés afin de diminuer le risque de développement des résistances bactériennes. Dans cet objectif, notre équipe s'est intéressée à inhiber des enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane par l'action de nouvelles molécules à activité antibactérienne potentielle. Cette démarche sera détaillée dans les prochains paragraphes de ce chapitre.

A. La paroi bactérienne

1. Le peptidoglycane : Généralités

Le peptidoglycane (ou la muréine) est l'un des principaux composants de la paroi cellulaire bactérienne. Il a été identifié pour la première fois en 1960 par Wolfhard et ses collaborateurs. Il s'agit d'une barrière qui protège la bactérie contre des effets néfastes de l'environnement (changements de température et de pH par exemple) et des perturbations dues au choc osmotique. De ce fait cette structure doit être assez rigide pour résister aux changements brusques de pressions. Par ailleurs, il doit être à la fois très flexible, permettant aux bactéries d'ajuster régulièrement leur forme pendant leur croissance et leur division cellulaire.[1,2]

Cette macromolécule est constituée d'un hétéropolymère avec des unités monomériques disaccharidiques composées de *N*-acétylglucosamine (NAG) et d'acide *N*-acétylmuramique (NAM).[3] Ces disaccharides sont reliés par des liaisons osidiques β-1,4 et chaque unité d'acide *N*-acétylmuramique possède une chaîne latérale constituée d'un pentapeptide (L-Ala-D-Glu-(*m*-DAP ou L-Lys)-D-Ala-D-Ala).[1] (Figure 1).

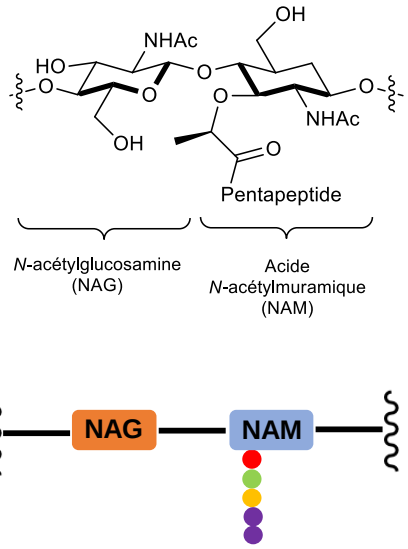


Figure 1 : Structure et schéma du monomère du peptidoglycane

Les bactéries peuvent être classées en deux catégories : Gram positif (Gram +) et Gram négatif (Gram -). Cette classification est rendue possible par la composition de leurs parois bactériennes. Il s'avère que la bactérie Gram + possède une couche de peptidoglycane plus épaisse que les bactéries Gram -. Ainsi la bactérie Gram - contient une membrane externe qui recouvre le peptidoglycane.[1,4] (Figure 2)

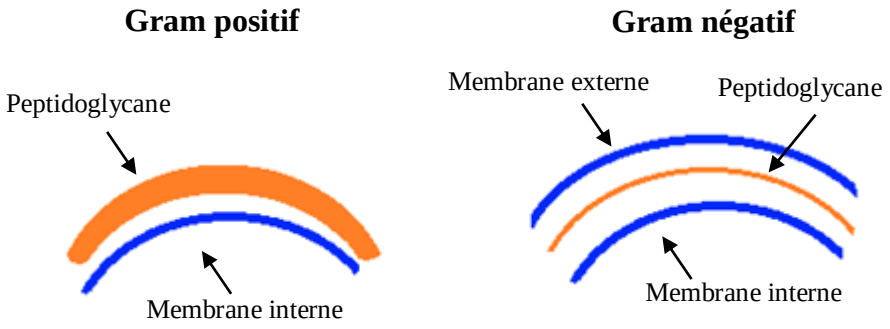


Figure 2 : Schéma d'une bactérie Gram positif et Gram négatif

2. Biosynthèse du peptidoglycane

La biosynthèse du peptidoglycane est un processus assez complexe. En effet, sa synthèse s'effectue principalement au niveau du cytoplasme. Elle est divisée en deux étapes : la synthèse du monomère (NAG-NAM) suivie de l'étape de polymérisation.

Les premières étapes de cette biosynthèse commencent par la synthèse du précurseur Uridine diphosphate-*N*-acétylglucosamine (UDP-NAG) (Figure 3) réalisable en quatre étapes à partir du fructose-6-phosphate.[5]

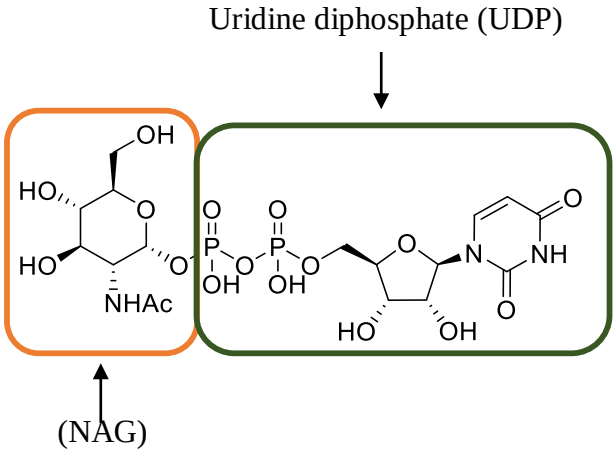


Figure 3 : Structure du bloc UDP-NAG

a) Synthèse du monomère NAG-NAM

Le bloc UDP-NAG va par la suite permettre la synthèse du monomère NAG-NAM. L'insertion du phosphoénolpyruvate (PEP) sur UDP-NAG catalysée par la tranférase MurA est possible par un mécanisme d'addition-élimination.[5–7] Le produit résultant, UDP-NAG-énolpyruvate, est par la suite engagé dans une réduction diastéréosélective de l'alcène réalisée par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH) catalysée par la réductase MurB. Cette étape permet donc de synthétiser le bloc UDP-acide-*N*-acétylmuramique (NAM).[4–6,8] (Figure 4)

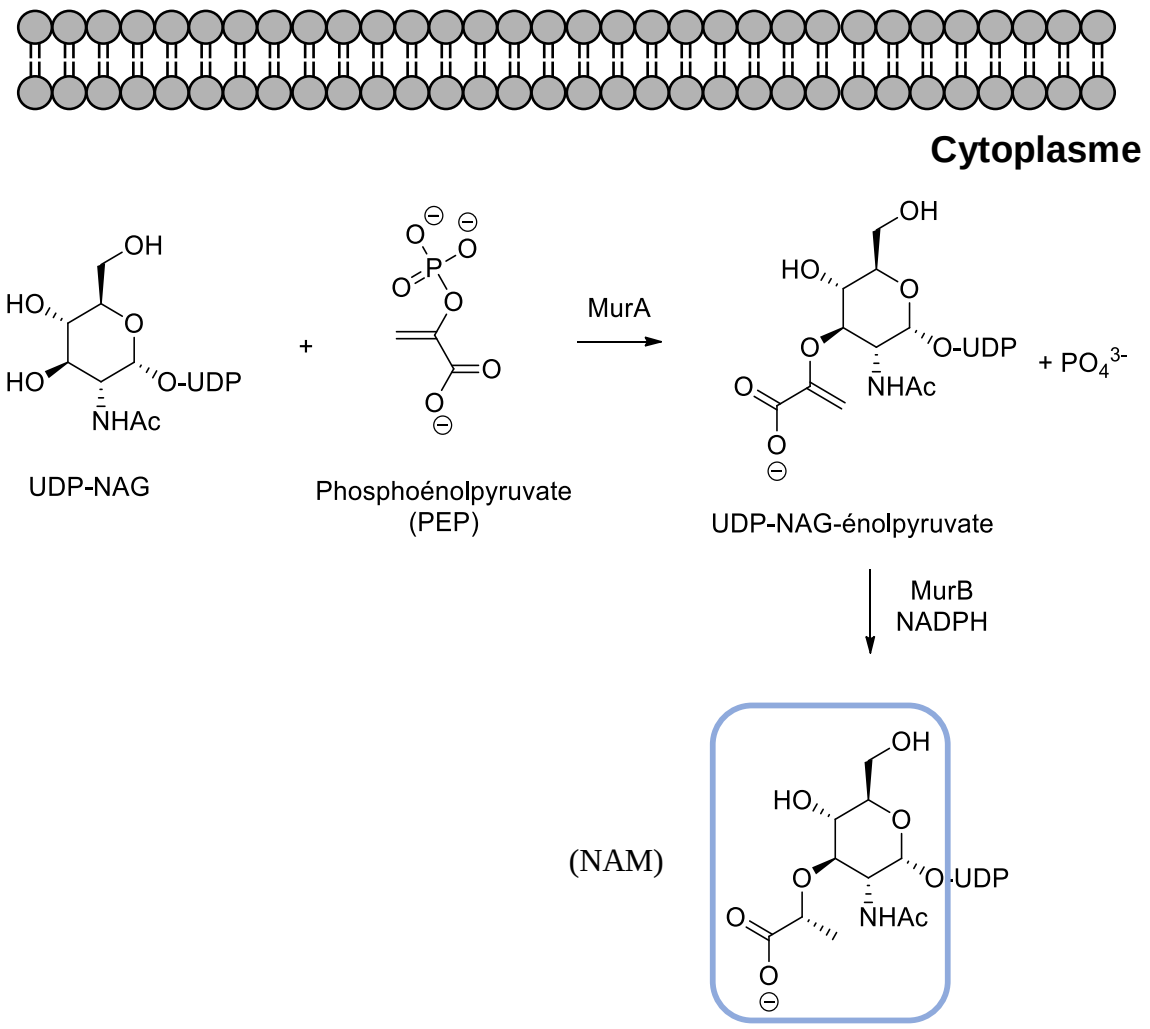


Figure 4 : Actions des enzymes MurA et MurB dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane

L'étape suivante est d'ajouter le pentapeptide sur l'unité NAM au niveau du cytoplasme. Cet ajout est assuré par des ligases ATP-dépendantes qui vont catalyser l'addition du pentapeptide sur UDP-NAM. MurC, MurD, MurE et MurF catalysent l'ajout successif des acides aminés respectifs : L-Ala, D-Glu, *m*éso-acide diaminopimélique (DAP ; Gram -) ou L-Lys (Gram +) et un dipeptide D-Ala-D-Ala.[5,6,9–11] (Figure 5)

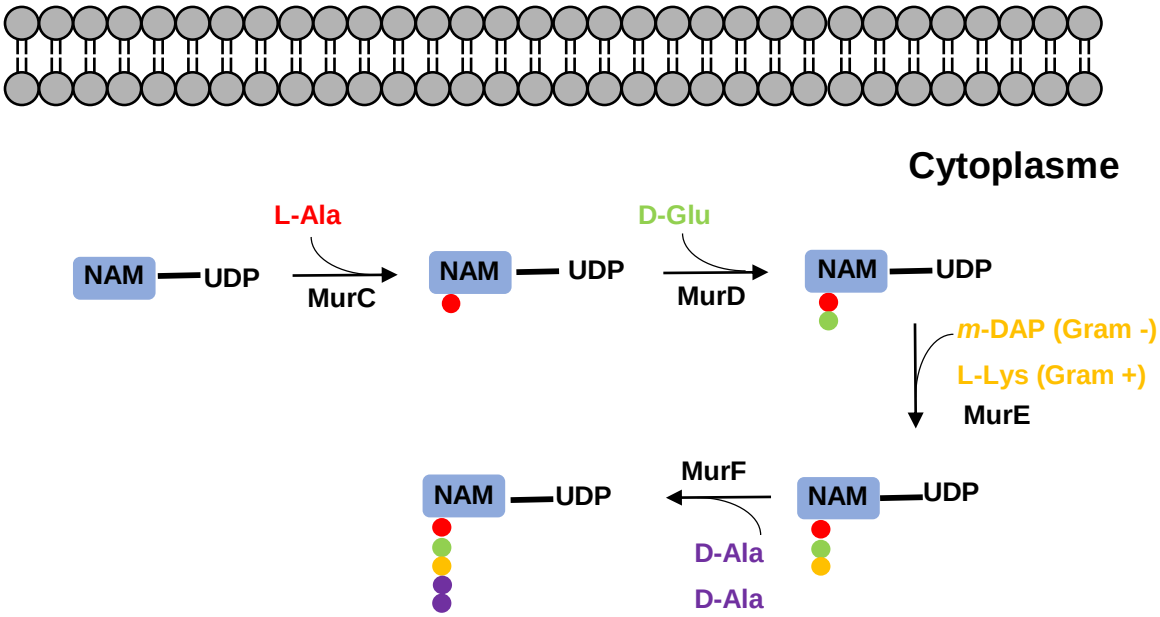


Figure 5 : Synthèse de l'unité UDP-NAM-pentapeptide catalysée par les ligases MurC-F

b) Polymérisation de l'unité NAG-NAM-pentapeptide

Cette unité UDP-NAM-pentapeptide est transférée par la suite sur la membrane cytoplasmique (Figure 6 ; Ⓟ). Cette réaction est catalysée par la transférase MraY et le produit résultant est le Lipide I (Figure 6 ; **1**). Ensuite, la tranférase MurG catalyse le transfert du UDP-NAG sur le Lipide I formant ainsi le Lipide II (Figure 6 ; **2**).[5,12,13] Ce Lipide II est transféré à travers la membrane et libéré à l'extérieur par l'action d'une flippase (Figure 6 ; **3**).[5,9]

Le Lipide II, situé à l'extérieur de la membrane, est polymérisé à l'aide de la glycotransférase pour former les unités du peptidoglycane. (Figure 6 ; **4**) Finalement, la dernière étape consiste à relier les pentapeptides entre eux pour créer un réseau. Ceci est possible par l'action de la transpeptidase qui va relier le *m*-DAP ou la L-Lys au quatrième résidu, D-Ala, d'un autre pentapeptide.[9,12–14] (Figure 6 ; **5**)

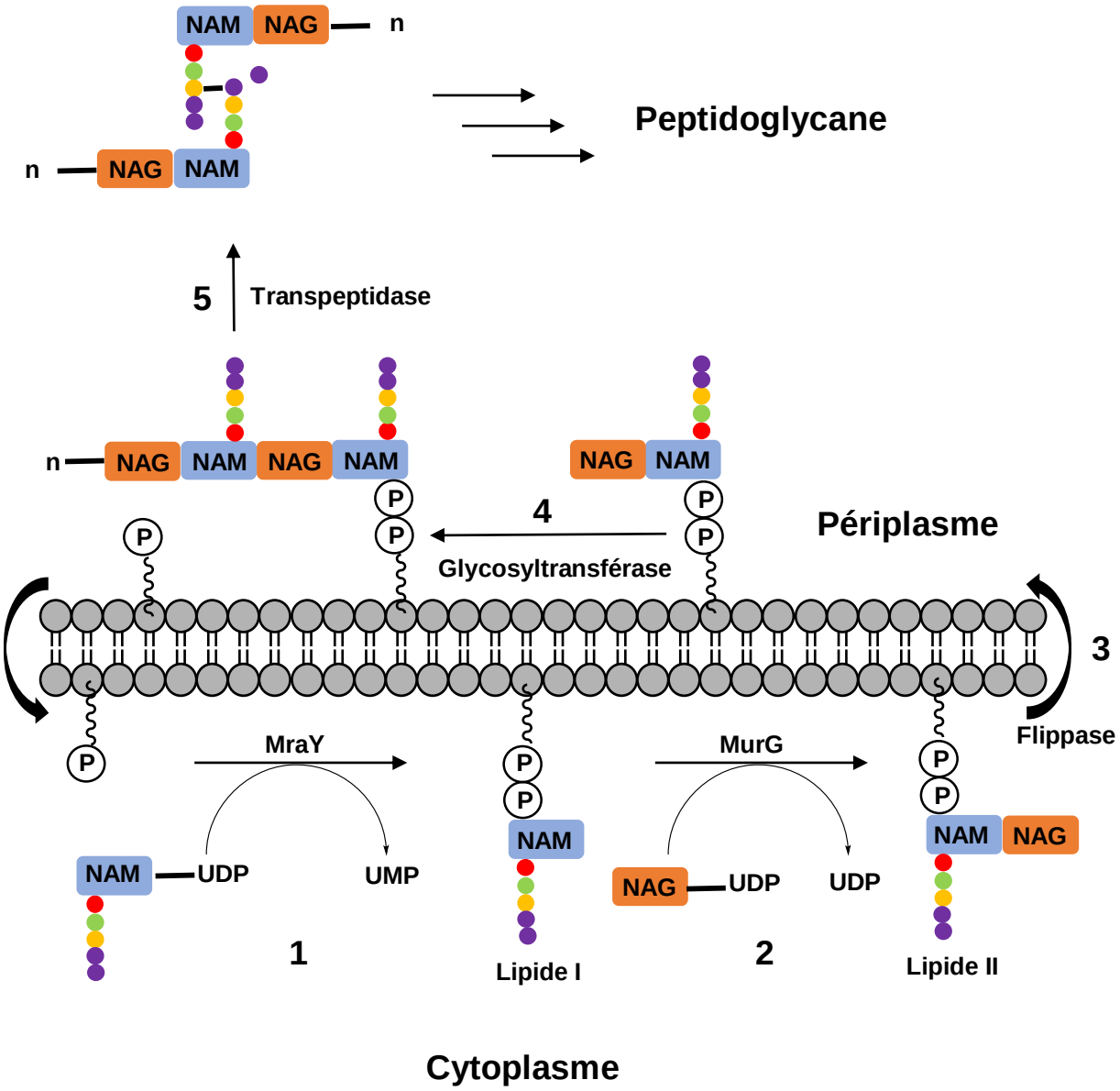


Figure 6 : Biosynthèse du peptidoglycane

L'intégralité du peptidoglycane est essentielle à la survie cellulaire et doit donc être maintenue au cours de la croissance et de la division cellulaire. La dégradation du peptidoglycane conduit alors à la lyse bactérienne.

B. Cible potentielle

Depuis les années 1980, un fort intérêt s'est porté sur la voie de biosynthèse de la lysine pour le développement de nouveaux antibactériens. En effet, les mammifères ne possèdent pas de voie de biosynthèse de la lysine et l'apport essentiel de cet acide aminé se fait par l'alimentation.[15] Seuls les bactéries, les champignons et les plantes sont capables d'en synthétiser par deux voies de synthèse différentes mais aucune voie n'a été reportée jusqu'à présent chez les eucaryotes. Au niveau bactérien plus précisément, la lysine ou son précurseur le *méso*-DAP jouent un rôle crucial sur la voie de biosynthèse de la paroi bactérienne, non seulement sur la synthèse du pentapeptide (troisième résidu) mais aussi sur la dernière étape médiée par la transpeptidase pour former le réseau final. De ce fait, inhiber la voie de biosynthèse de la lysine ou de son précurseur *méso*-DAP est une cible potentielle pour le développement d'antibiotiques effectifs.[16]

1. Voie de biosynthèse de la lysine

La biosynthèse de la lysine commence par la phosphorylation du L-aspartate **1** catalysé par l'aspartokinase pour conduire à l'aspartylphosphate **2**. Par la suite, l'aspartate semialdéhyde **3** (ASA) est synthétisé par une réduction effectuée par l'aspartate semialdéhyde déshydrogénase (ASA-DH). La synthèse de ASA **3** est aussi commune pour la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine.[17] (Schéma 1)

La première étape spécifique de la voie de biosynthèse de la lysine est catalysée par la dihydrodipicolinate synthase (DHDPS ; DapA). C'est l'étape de condensation de ASA **3** avec le pyruvate **4** permettant la formation de **5** (DHDP). Ensuite DHDP **5** est réduit en tetrahydrodipicolinate **6** (THDP) catalysé par la DHDP réductase. Par la suite, la plupart des bactéries synthétisent le *N*-succinyl-2-amino-6-ketopimelate **7a** en partant de THDP catalysée par la *N*-succinyltransférase. Cependant, chez certaines espèces bactériennes de type *Bacillus*, l'enzyme utilisée est la *N*-acétyltransférase pour conduire à **7b**. Puis, **7a** est transformé en **8a** par une amino transférase suivi par une déacylation de la fonction amine par l'action de DapE pour conduire au LL-DAP **9**. Finalement, LL-DAP est transformé en *méso*-DAP par une épimérase DapF. Par ailleurs, certaines bactéries possèdent une enzyme appelée *méso*-DAP déshydrogénase (ddh) capable de transformer le *méso*-DAP **10** en THDP **6** directement. Finalement, la décarboxylase (LysA) permet la formation de la L-Lysine.[15–21] (Schéma 1)

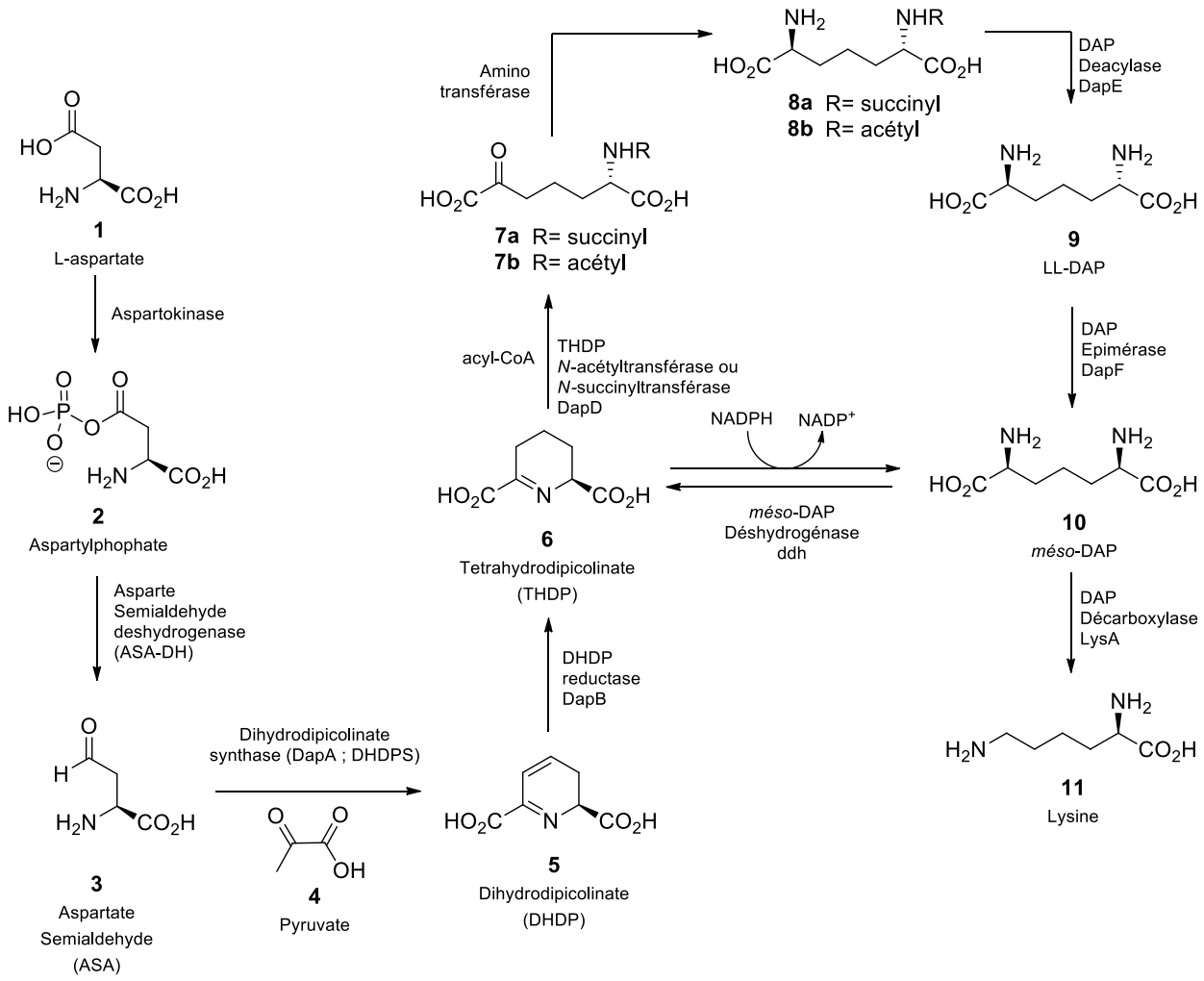
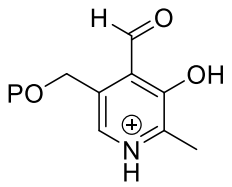


Schéma 1 : Voie de biosynthèse du peptidoglycane

Cette voie de biosynthèse de la lysine est une cible potentielle pour le développement de nouveaux agents antibactériens. De ce fait, plusieurs équipes ont essayé d'inhiber l'action des différentes enzymes afin d'empêcher la synthèse de la lysine et par conséquent celle du peptidoglycane. Etant donné que l'acide diaminopimélique (*méso*-DAP) est commun à la biosynthèse du peptidoglycane des bactéries à Gram + comme Gram –, l'inhibition des enzymes (ddh et/ou DapF) responsables de la synthèse de celui-ci représentent des moyens attractifs pour bloquer la synthèse du peptidoglycane.

2. La décarboxylase LysA

La décarboxylase est une enzyme dite à phosphate de pyridoxal (PLP)-dépendante. Le PLP **12** (Figure 7) est un dérivé de la vitamine B6 et il s'agit d'une molécule biologique utilisée comme cofacteur lors des réactions de transamination, élimination et décarboxylation.[22,23]



12

Figure 7 : Structure du phosphate de pyridoxal

La décarboxylase Lys, en particulier, catalyse une réaction de décarboxylation sur un centre D ce qui laisserait penser que cette enzyme dépend de la structure du substrat. Elle n'accepte pas comme substrat ni le LL-DAP **9** ni le DD-DAP **13**, seul le méso-DAP **10** conduit par décarboxylation à la lysine **11**.[17] (Figure 8)

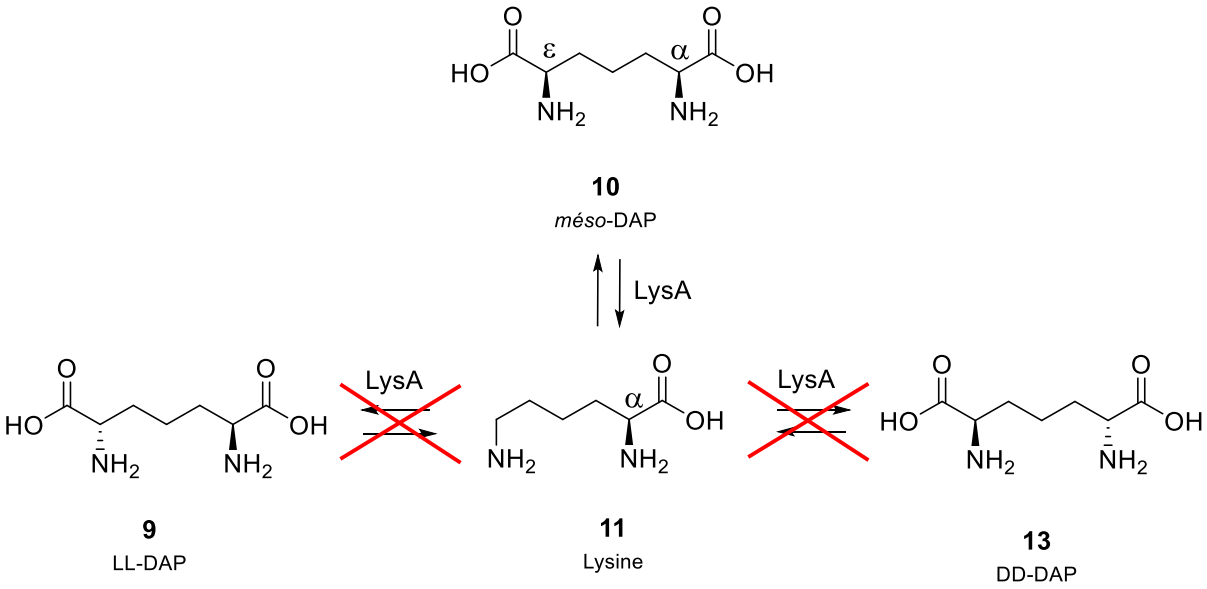


Figure 8 : Action de la décarboxylase sur le méso-DAP **10** pour obtenir la lysine **11**

La décarboxylation se fait par le biais du phosphate de pyridoxal **14** qui se lie dans un premier temps par la fonction amine du résidu en formant une liaison imine **15**. Suite au départ de CO_2,

l'intermédiaire **16** est formé. Le résidu est reprotoné **17** par la présence d'une enzyme et **18** est finalement libéré. (Figure 9)

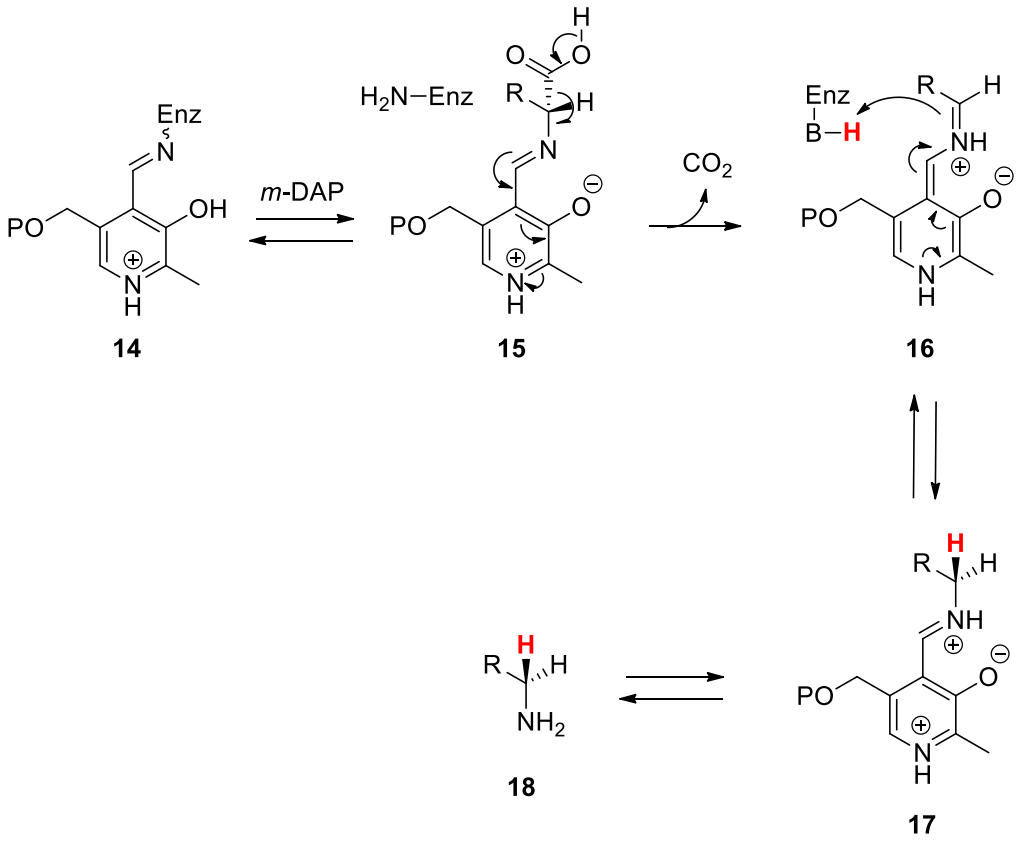


Figure 9 : Réaction de décarboxylation du méso-DAP catalysée par la décarboxylase LysA

3. La déshydrogénase ddh

Comme mentionné précédemment, cette étape n'est pas commune à toutes les bactéries et est principalement observé chez *Bacillus sphaericus*.

La réaction se fait *via* une ouverture de cycle du THDP **6** par l'ammoniac formant une imine plane **19** qui est par la suite réduit stéréospecifiquement à l'aide de NADPH. Cette réduction génère le centre D du méso-DAP **10**. Cette réaction est de même réversible et catalysée par la déshydrogénase ddh et seul le méso-DAP **10** est reconnu pour la conversion en THDP **6**. [17,24] (Figure 10)

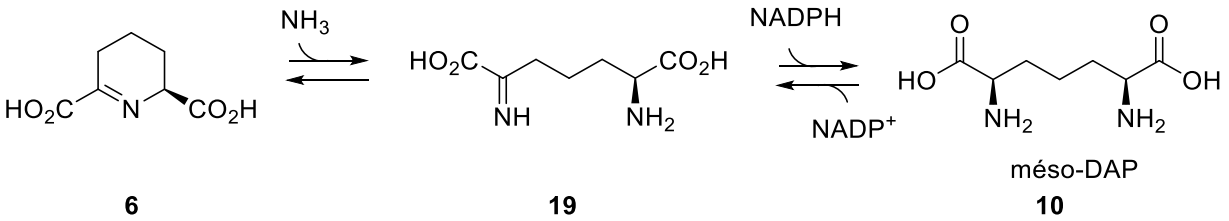


Figure 10 : Réaction catalysée par le méso-DAP déshydrogénase

4. L'épimérase DapF

La racémisation des acides aminés est cruciale pour la synthèse de substrats impliqués dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane possédant en majorité de centres D-acides aminés.

L'épimérase DapF est une enzyme clé dans la synthèse de l'acide diaminopimélique, troisième acide aminé du pentapeptide du peptidoglycane. Il ne s'agit pas d'une enzyme à phosphate de pyridoxal (PLP). Elle ne nécessite pas de cofacteur ni d'ions métalliques pour catalyser cette épimérisation.[24–26] Par ailleurs cette épimérase a été détectée chez la plupart des bactéries Gram + comme chez les bactéries à Gram -.

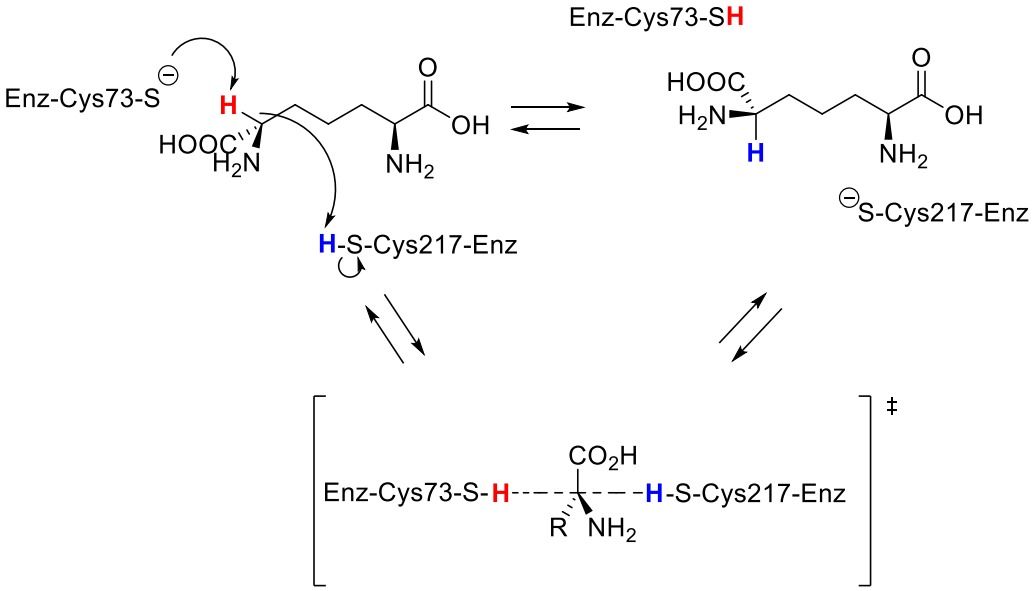


Figure 11 : Epimérisation menée par l'épimérase DapF

En effet, DapF catalyse l'inversion du centre asymétrique en ε du LL-DAP **9** pour conduire au *méso*-DAP **10**. DapF étant une enzyme PLP-indépendante, son mécanisme nécessite deux résidus basiques capables d'arracher le proton en ε du LL-DAP **9**. Cette action est menée par la présence de deux cystéines : la Cys73 sous forme de thiolate qui va se comporter comme une base et la

Cys217, sous forme de thiol, qui va céder son proton pour inverser la configuration du carbone asymétrique.[24,27,28] (Figure 11)

Cependant, il s'avère que le DD-DAP **13** à la différence de LL-DAP **9** n'est pas un substrat de l'épimérase DapF.[24] Il s'agit d'une épimérase assez spécifique ainsi pour discriminer les deux centres asymétriques du *méso*-DAP **10** : c'est celui en α qui confère toute sa reconnaissance et par conséquent son activité.[24,26,27] (Figure 12)

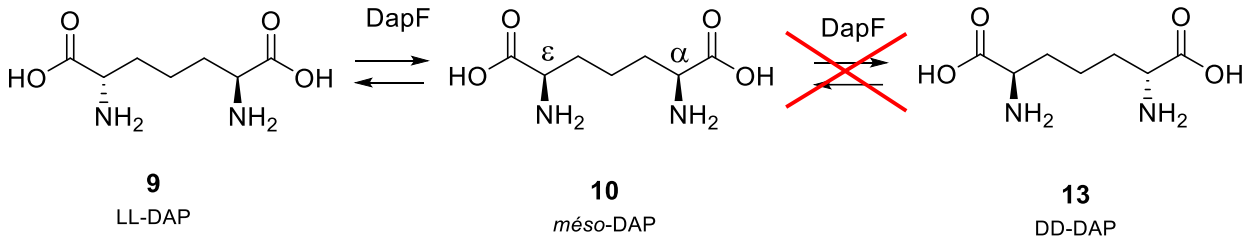


Figure 12 : Epimérisation sélective de LL-DAP **9**

C. Les analogues du *méso*-DAP décrits dans la littérature

Par la suite, de nombreuses équipes se sont intéressées à trouver de nouvelles cibles enzymatiques dans lesquelles l'acide diaminopimélique est impliqué telles que la déshydrogénase (ddh), l'épimérase (DapF) et la décarboxylase (LysA). Cette stratégie conduira au développement d'agents antibactériens potentiels pour répondre à la problématique de l'antibiorésistance.

Les premiers analogues du DAP ont été décrits par Girodeau et ses collaborateurs en 1986. Leur objectif était d'inhiber l'activité de l'épimérase DapF et de la décarboxylase LysA afin de concevoir des inhibiteurs suicides. Pour cela, ils ont synthétisé une série d'inhibiteurs vinyliques répondant à deux critères fondamentaux : d'un côté augmenter la rigidité de la molécule afin d'induire une meilleure affinité envers l'enzyme et d'un autre côté montrer un mécanisme original d'inhibition dû à la présence de cette insaturation. De ce fait, les auteurs ont proposé des mécanismes pour inhiber irréversiblement ces deux enzymes en partant d'un même composé insaturé. Pour la décarboxylase LysA, il s'agit d'un mécanisme d'inhibition de type substrat suicide. Un intermédiaire réactionnel de la réaction enzymatique (Figure 13, **A**) subit une addition 1,4 de type Mickaël d'un nucléophile de site actif de l'enzyme conduisant à l'inactivation de l'enzyme (Figure 13, **B**) par liaison covalente. (Figure 13) L'épimérase DapF, conduit à l'intermédiaire insaturé **C** (Figure 13, **C**) permettant la fixation covalente de l'enzyme.

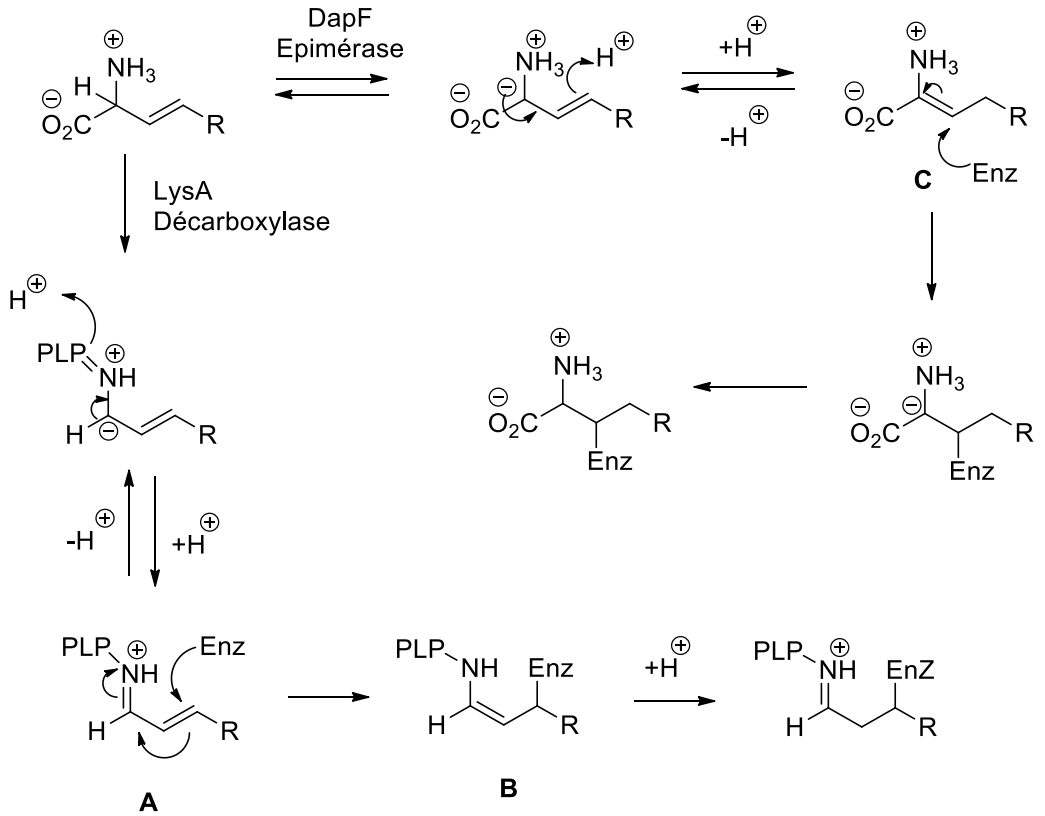
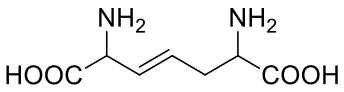


Figure 13 : Mécanisme d'inhibition proposé par les auteurs par LysA et DapF

Au total, ils ont synthétisé 12 analogues de DAP mais un seul, **20**, a montré une bonne affinité pour la décarboxylase LysA avec une constante d'inhibition : *Ki* = 180 µM.[29] (Figure 14)

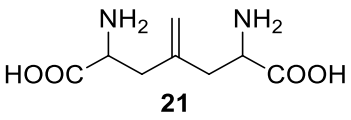


20

K_i = 180 µM (LysA)

Figure 14 : Structure de la molécule **20** et sa constante d'inhibition

Cependant, **20** n'a pas présenté d'activité antibactérienne. De manière surprenante, les auteurs indiquent qu'un autre inhibiteur, **21**, présente une faible activité inhibitrice de la décarboxylase LysA (la valeur de la constante d'inhibition *Ki* n'est pas indiquée) mais possède une activité antibactérienne non négligeable contre les souches Gram négatifs.[29] (Figure 15)

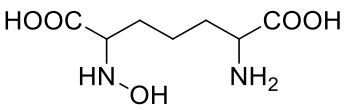


21

CMI = 2 µg/mL (LysA, *E. coli)*
CMI = 4 µg/mL (LysA, *P. aeruginosa)*

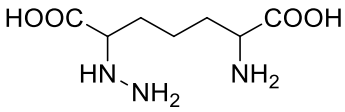
Figure 15 : Structure de la molécule **21** et ses concentrations inhibitrices respectives

La même année, Kelland et ses collaborateurs ont également synthétisé une série de cinq inhibiteurs compétitifs à la fois de la décarboxylase bactérienne LysA de *B. sphaericus*.[30]
Parmi ces composés, il semble que les composés **22** et **23** (Figure 16), sous forme de mélange de stéréoisomères, montrent une activité inhibitrice puissante sur la décarboxylase bactérienne LysA avec des valeurs de constante d'inhibition *Ki* de 0,91 et 0,10 mM respectivement.[30]



22

K_i = 0.91 mM (LysA,*B. sphaericus*)

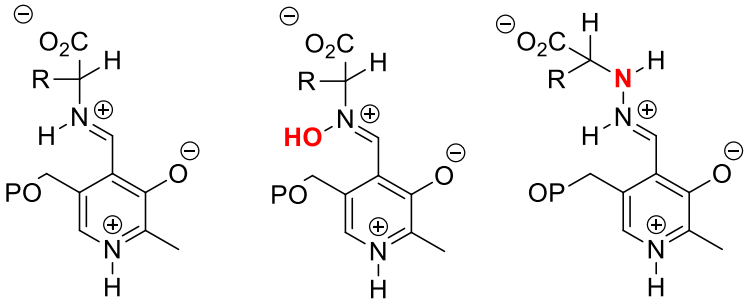


23

K_i = 0.10 mM (LysA, *B. sphaericus*)

Figure 16 : Structures des molécules **22** et **23** avec leurs constantes d'inhibitions respectives

Ils ont de même indiqué une possible liaison avec la décarboxylase LysA par la modification de la fonction amine du substrat (hydroxylamide **22** et hydrazine **23**). (Figure 17)



A **B** **C**

Figure 17 : Intermédiaires proposés par les auteurs responsables de l'inhibition de **22** et **23** sur LysA. **A** : Liaison du substrat naturel ; **B** : Possible intermédiaire pour **22** ; **C** : Possible intermédiaire pour **23**.

Quelques années après, en 1988, Lam et ses collaborateurs ont évalué ces inhibiteurs sur la déshydrogénase ddh et sur l'épimérase DapF. Ils ont démontré que le composé **22** était également

un puissant inhibiteur de l'épimérase DapF avec des valeurs de *Ki* de 5,6 µM.[31] Ils se sont concentrés à démontrer le mécanisme d'inhibition de **22** sur ces deux enzymes. En effet, l'action de la déshydrogénase ddh donnerait lieu à la molécule oxydée **24** analogue de L-THDP **6**. Par ailleurs, **22** se lierait sur l'enzyme responsable de l'épimérisation. (Figure 18)

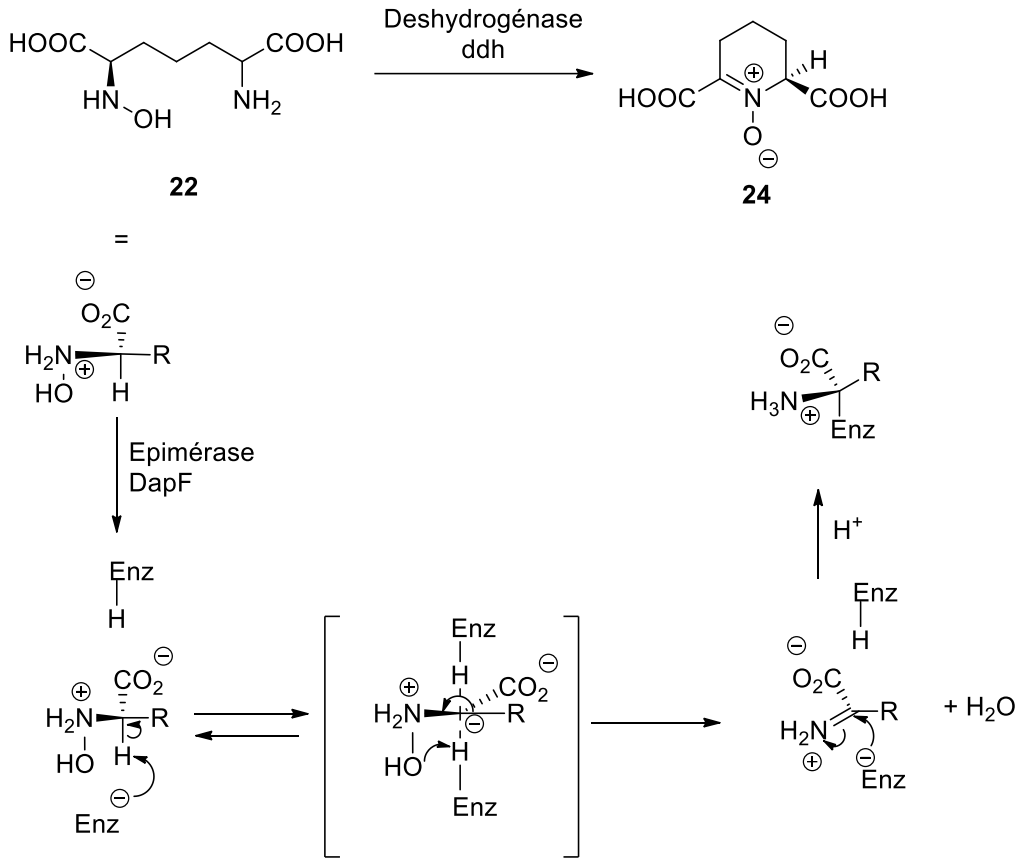
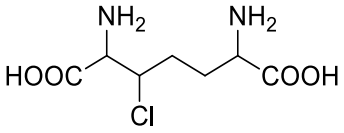


Figure 18 : Mécanisme d'inhibition de **22** proposé par les auteurs

En 1988, Baumann et ses collaborateurs ont décrit l'acide 3-chlorodiaminopimélique **25** (Figure 19) sous forme de mélange racémique comme inhibiteur de l'épimérase DapF provenant de souches de *E. coli* avec une constante d'inhibition *Ki* = 0,2 µM.[32]



25

K_i = 0.2 µM (DapF, *E. coli*)

Figure 19 : Structure de la molécule **25** et sa concentration d'inhibition

Les auteurs proposent un mécanisme d'inhibition de **25** catalysé par l'épimérase DapF. Cette réaction, a lieu dans le site actif de l'enzyme, il s'agit d'un mécanisme d'élimination par dégagement de HCl formant ainsi une structure plane **26** suivie d'une cyclisation conduisant à la molécule **6**. [32] (Figure 20)

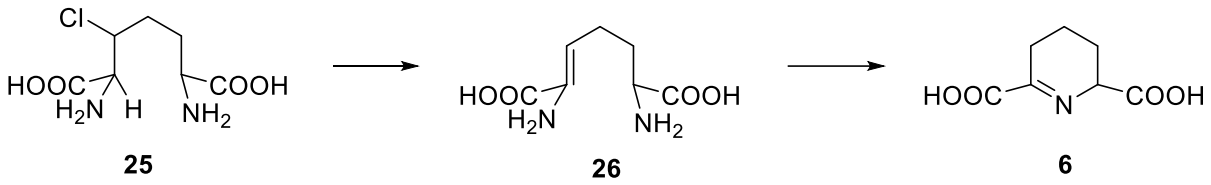


Figure 20 : Mécanisme d'inhibition simplifié de **25** proposé par les auteurs sur DapF

Gelb et ses collaborateurs ont préparé des analogues fluorés du composé chloré **25** (Figure 21 ; **27**, **28**, **29** et **30**), dans le but d'obtenir des inhibiteurs de l'épimérase DapF chez *E. coli*. Cette fois, ils ont réalisé la synthèse de ces analogues pour aboutir à des isomères purs et évaluer indépendamment leurs activités inhibitrices respectives.[33,34]

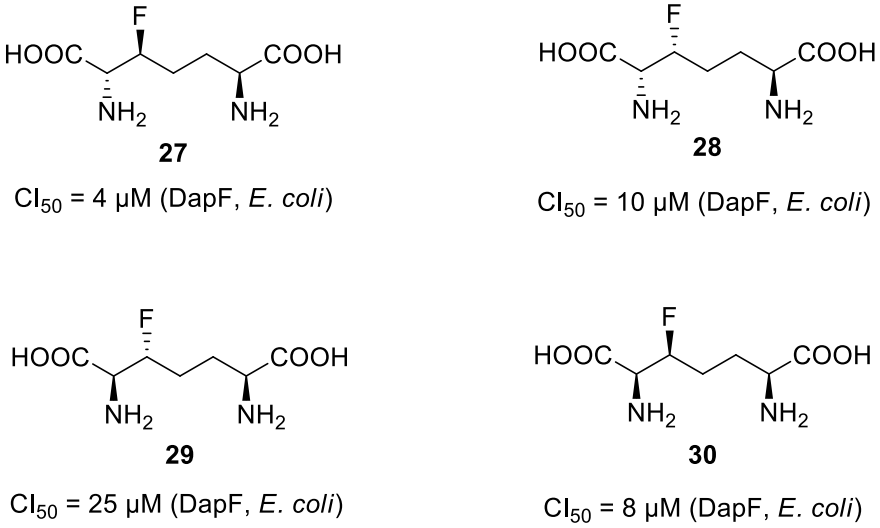


Figure 21 : Structures des molécules **27** à **30** et leurs CI_{50} respectives.

Les quatre composés présentaient une bonne activité inhibitrice sur l'épimérase DapF avec des valeurs de CI_{50} variant de 4 à 25 µM.[33]

La présence du fluor, comme pour le cas du composé **25**, inhibe l'épimérase DapF par un mécanisme d'élimination. (Figure 22)

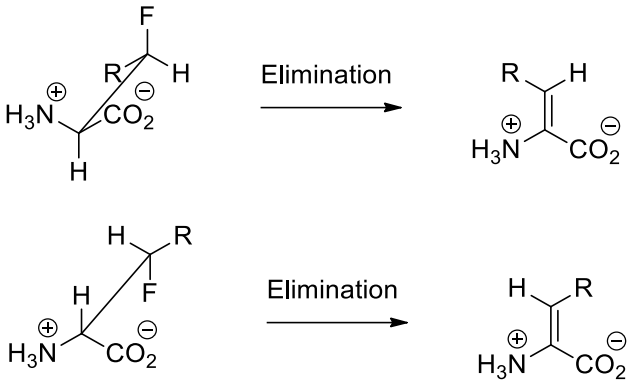
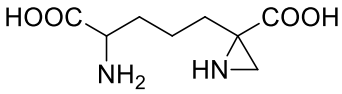


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition simpliqué de DapF des molécules **27-30**

En 1989 et 1990, Gerhart et Higgins ont travaillé sur une série d'inhibiteurs de l'épimérase DapF chez *E. coli* de type aziridine (**31**). (Figure 23) Higgins et ses collaborateurs ont déterminé la séquence exacte de cette épimérase contenant un résidu de cystéine responsable de l'épimérisation de LL-DAP en méso-DAP.[35,36]



31

$K_i \geq 25$ µM (DapF, *E. coli*)
$K_i/k_i = 5.5$ µM

Figure 23 : Structure de l'azi-DAP **31**

Gerhart et ses collaborateurs ont synthétisé l'azi-DAP **31** et ils ont évalué son activité inhibitrice sur l'épimérase DapF chez *E. coli*. Ils ont démontré que l'azi-DAP **31** est un inhibiteur irréversible qui agit suivant le mécanisme de la Figure 24.[24,35,36]

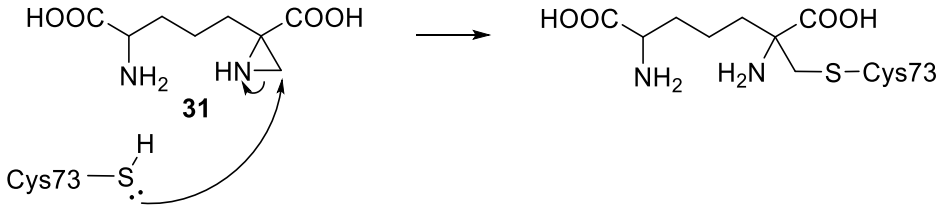
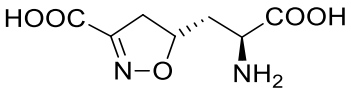


Figure 24 : Mécanisme d'inhibition de l'azi-DAP **31** sur l'épimérase DapF

Cette inactivation de l'épimérase DapF par l'azi-DAP **31** implique le thiol de Cys73 qui se lie de manière covalente à l'azi-DAP **31** par l'ouverture de l'aziridine. La valeur de la constante

d'inhibition *Ki* n'a pas été déterminée de manière précise mais elle serait légèrement supérieure à 25 µM.[35]

En 1994, Abbott et ses collaborateurs ont décrit la synthèse d'une série de composés hétérocycliques en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'épimérase DapF et de la déshydrogénase ddh. Au total, ils ont synthétisé trois inhibiteurs potentiels de cette enzyme. Tout d'abord, ils ont évalué ces composés hétérocycliques sur l'épimérase DapF et ils ont constaté que ces composés avaient une faible activité inhibitrice. Leurs hypothèses étaient que l'hétérocycle central pouvait provoquer une interférence stérique ou qu'il serait peut-être nécessaire que les analogues du DAP aient une conformation spécifique pour être reconnus par l'enzyme. Ils ont donc poursuivi leurs études et ont évalué ces inhibiteurs sur la déhygrogénase ddh de *B. sphaericus*. L'isoxazoline **32** (Figure 25) est un inhibiteur de la déshydrogénase ddh avec une constante d'inhibition *Ki* = 23 µM. Aucun mécanisme d'inhibition n'a été proposé par les auteurs.[37]

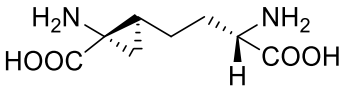


32

K_i = 23 µM (ddh, *B. sphaericus*)

Figure 25 : Structure de l'isoxazoline **32** et sa concentration inhibitrice

En 1996, Williams et ses collaborateurs ont travaillé sur une série d'inhibiteurs inspirés de l'azi-DAP **31** décrits en 1994 par Gerhart. Leur objectif était de créer un inhibiteur suicide et d'inhiber l'action de l'épimérase DapF. Ils ont synthétisé trois molécules avec un cyclopropane central. L'activité antibactérienne a été évaluée mais aucune de ces trois molécules n'a présenté de propriétés antibactériennes. Néanmoins, ils ont poursuivi leurs études sur l'inhibition de l'épimérase DapF. Deux de ces composés, **33** et **34** (Figure 26), ont présenté une faible activité inhibitrice sur l'épimérase DapF avec des valeurs de CI_{50} de 10 mM et 0,2 mM respectivement.[38]



33

CI_{50} = 10 mM (DapF, *E. coli*)

34

CI_{50} = 0.2 mM (DapF, *E. colii*)

Figure 26 : Structures des molécules **33** et **34** avec leurs activités inhibitrices respectives

Le mécanisme inhibition irréversible proposé par les auteurs serait similaire à celui évoqué pour l'azi-DAP **31**. Ainsi, l'épimérase se lierait de façon covalente par l'ouverture du cyclopropane. [38] (Figure 27)

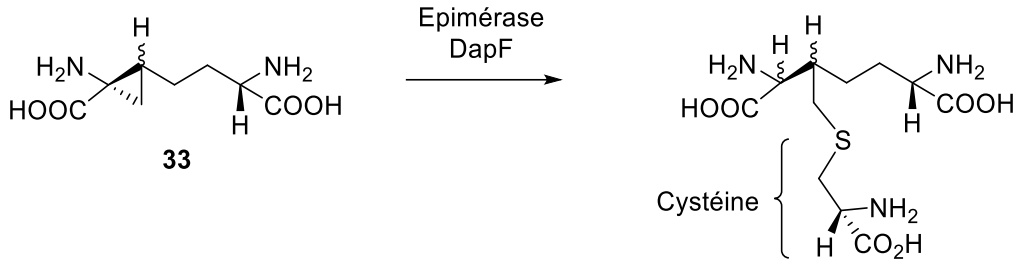


Figure 27 : Mécanisme d'inhibition de **33-34** proposé par les auteurs sur l'épimérase DapF

En 2000, Caplan et ses collaborateurs ont travaillé sur deux dérivés d'énones, **35** et **36** (Figure 28) Ces deux composés ont montré une faible inhibition sur la déshydrogénase ddh mais seul **36** a montré également une inhibition sur l'épimérase DapF. Elle inhibe DapF et ddh avec des valeurs de CI_{50} de 500 µM.[39]

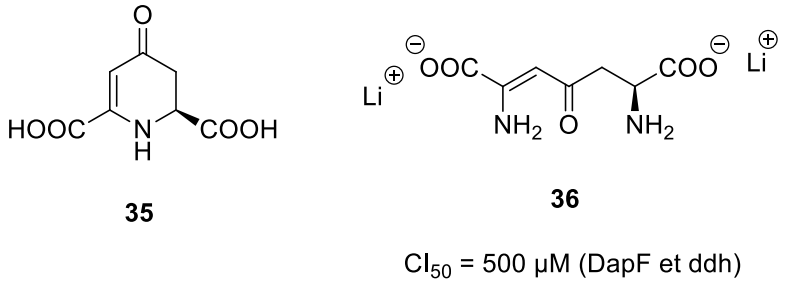


Figure 28 : Structures des molécules **35** et **36** avec la valeur de concentration d'inhibition de DapF et ddh

Le mécanisme d'inhibition proposé par les auteurs repose sur l'action de l'épimérase sur la forme tautomère **36'** de **36** par une attaque nucléophile sur l'imine tautomère **36'**. (Figure 29)

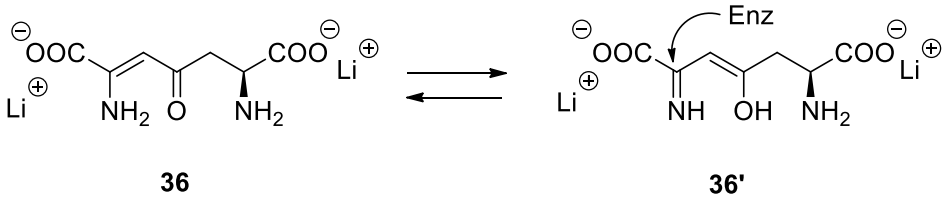
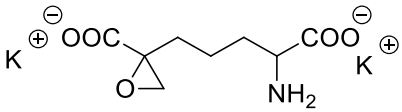


Figure 29 : Mécanisme d'inhibition de **36** sur l'épimérase DapF

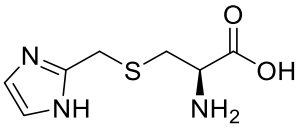
En 2002, Cox et ses collaborateurs se sont inspirés de l'azi-DAP **31** et ont conçu l'époxyde **37**. (Figure 30) L'époxyde **37** a montré une activité inhibitrice de l'épimérase DapF, mais aucune valeur de la constante d'inhibition n'a été précisée. Ils ont également montré que ce composé était instable dans un tampon neutre (pH = 7,3), en s'hydrolysant en diol, contrairement à l'azi-DAP **31**.[40] Les auteurs n'ont pas détaillé le mécanisme d'inhibition de cette molécule. Cependant ils évoquent qu'il s'agirait du même mécanisme irréversible observé par l'azi-DAP **31**.



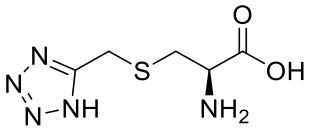
37

Figure 30 : Structure de la molécule **37**

En 2017, Shaikh et ses collaborateurs ont poursuivi leurs recherches sur de nouveaux analogues du DAP. Ils ont conçu une nouvelle série d'analogues en remplaçant le groupe carboxyle par un hétérocycle à cinq chaînons et en introduisant un atome de soufre dans la chaîne principale. (Figure 31) Ils ont démontré, par des évaluations *in silico*, que ces composés pouvaient inhiber de multiples enzymes telles que DapB, DapF, DapA et ddh mais aucune valeur inhibitrice n'est donnée. Les composés **38** et **39** (Figure 31) ont montré une activité antibactérienne à large spectre en inhibant efficacement la croissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Aucun mécanisme d'inhibition n'a été cependant proposé.[41]



38



39

Figure 31 : Structures de molécules **38** et **39**

Même si ces nouveaux inhibiteurs de la voie de biosynthèse de la lysine et par conséquent de la voie de biosynthèse du peptidoglycane sembleraient avoir un avenir prometteur comme agents antibactériens, les recherches se poursuivent afin d'améliorer les valeurs d'inhibition des analogues décrits dans la littérature.

D. Objectifs

Comme mentionné précédemment, combattre des résistances bactériennes est un sujet d'actualité et cela est d'autant plus accentué par la pénurie d'antibiotiques capables de guérir des infections bactériennes. Trouver de nouvelles cibles et surtout des nouveaux agents antibactériens est urgemment nécessaire. De ce fait, la biosynthèse de la lysine et du méso-DAP (Figure 32) semble être une cible potentielle pour la conception de nouveaux agents antibactériens. Ainsi, notre équipe s'est penchée sur la conception de nouveaux inhibiteurs de l'épimérase DapF qui transforme LL-DAP en *meso*-DAP **10**. (Figure 11) En d'autres termes concevoir de nouveaux analogues de l'acide diaminopimélique qui est le précurseur de la lysine **11** obtenue par décarboxylation engendré par l'enzyme LysA.

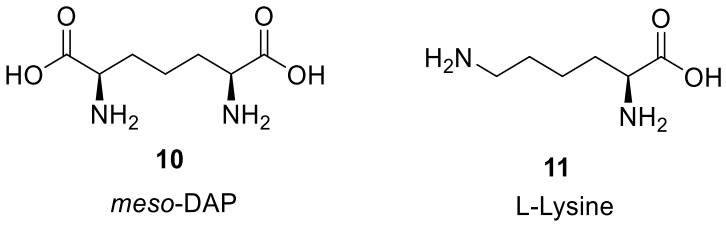


Figure 32 : Structure de *meso*-DAP et L,L-DAP

Pour ce faire, il a été imaginé d'augmenter la rigidité de la molécule par l'introduction d'un hétérocycle comme un triazole ou par l'introduction d'une insaturation comme une triple liaison. Cela permettrait d'introduire une contrainte conformationnelle en vue d'augmenter l'affinité avec l'enzyme ou bien d'introduire un groupe réactif pouvant, à une étape de la catalyse enzymatique, réagir avec un résidu du site actif de l'enzyme. D'autre part, nous avons choisi de garder les fonctions amine et acide carboxylique (cadre rouge, Figure 33) pour mimer la structure de base de la lysine ou du *méso*-DAP. (Figure 33) De plus, le triazole ou la triple liaison sont de même substitués par une chaîne latérale, possédant des groupements polaires et/ou acides tels que OH, NH_2 ou COOH. (Figure 33)

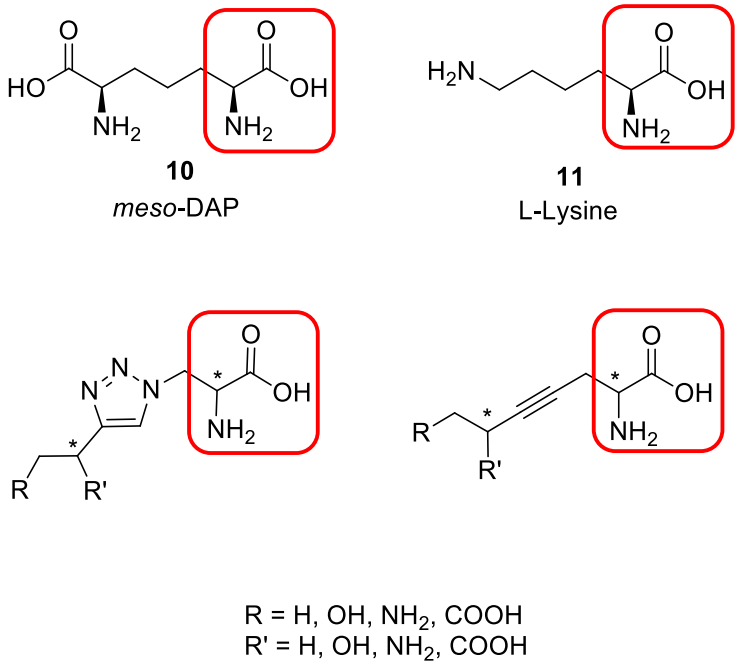


Figure 33 : Conception de nouveaux analogues de *méso*-DAP et Lysine

La plupart des équipes ont travaillé sur les inhibiteurs des différentes enzymes dans lesquelles le méso-DAP est impliqué et ont proposé des mécanismes originaux d'inhibition. Par conséquent, nous avons de même proposé un mécanisme original concernant notre molécule ayant une triple liaison et il est illustré dans la Figure 34.

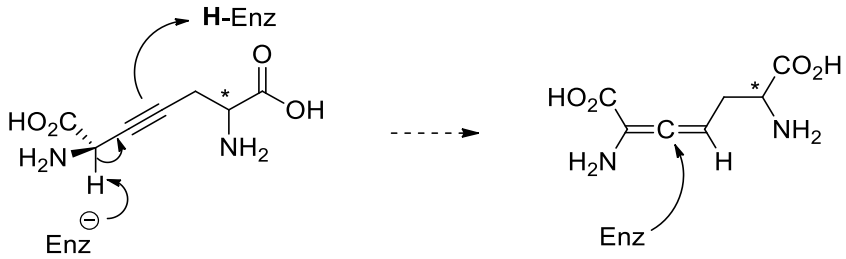


Figure 34 : Proposition de mécanisme d'inhibition pour les dérivés de la série des alcynes

II. Résultats et discussion

A. Série des triazoles

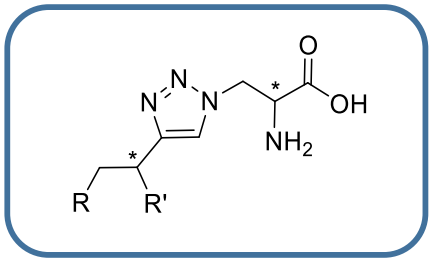


Figure 35 : Structure générale de la série des triazoles

1. Analyse rétrosynthétique

Ces nouvelles molécules ont comme point commun un noyau triazole au sein de leurs structures. Ainsi, celui-ci pourrait être facilement synthétisé par une cycloaddition de Huisgen en partant d'un alcyne commercial et d'un azoture. De plus, ces synthons sont accessibles depuis la L ou D sérine. (Figure 36)

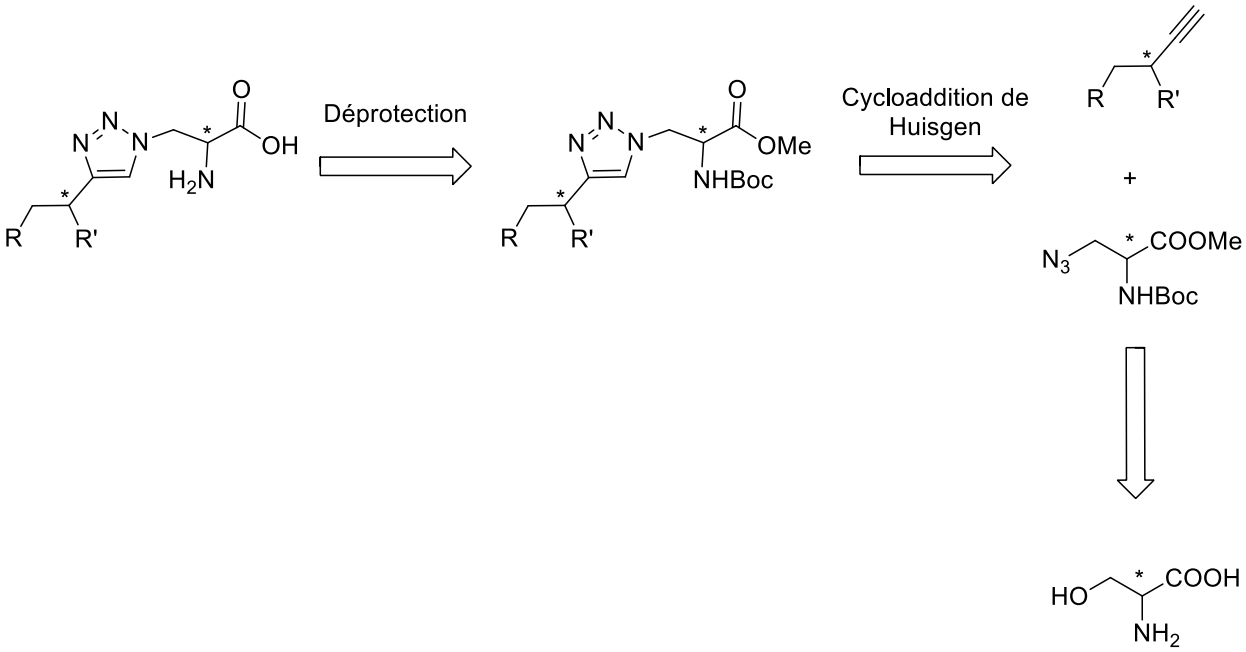


Figure 36 : Analyse rétrosynthétique des nouveaux analogues du DAP.

2. Synthèse d'acides aminés non usuels à base de triazole

La synthèse de l'azoture et des alcynes est décrite par la suite et elle a été inspirée de la méthode de synthèse décrite par Boibessot dans notre laboratoire.[42]

a) Synthèse de l'azoture

La fonction amine de la L- ou de la D- sérine (**40a** et **40b**) est protégée en présence du dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) en milieu basique (solution aqueuse de NaOH [1 M]) pour former les *Boc*-sérine (*S*)-**41a** et (*R*)-**41b** avec des rendements quantitatifs. Les composés sont directement engagés dans l'étape suivante sans aucune purification.

Par la suite, les (*S*)-**41a** et (*R*)-**41b** sont mis en présence d'iodométhane et de carbonate de potassium (K_2CO_3) pour obtenir les esters méthyliques correspondants (*S*)-**42a** et (*R*)-**42b** avec des rendements de 53% et de 74%. Ensuite les fonctions alcools de (*S*)-**42a** et (*R*)-**42b** sont activées en présence de chlorure de tosyle pour obtenir les tosylates (*S*)-**43a** et (*R*)-**43b** avec les rendements respectifs de 79% et 74%. Finalement, les azotures (*S*)-**44a** et (*R*)-**44b** sont synthétisés à partir des tosylates (*S*)-**43a** et (*R*)-**43b** et d'azoture de sodium par substitution nucléophile (S_{N2}). Les composés (*S*)-**44a** et (*R*)-**44b** sont obtenus avec des rendements respectifs de 28% et de 31%. Lors de cette réaction, le produit **45** est obtenu de manière concomitante. Ce composé provient d'une réaction d'élimination du fait de la présence du proton acide en α de (*S*)-**43a** et (*R*)-**43b** et la présence du bon groupement partant tosyle. (Schéma 2)

Les rendements indiqués dans cette partie sont ceux obtenus après purifications par chromatographie flash.

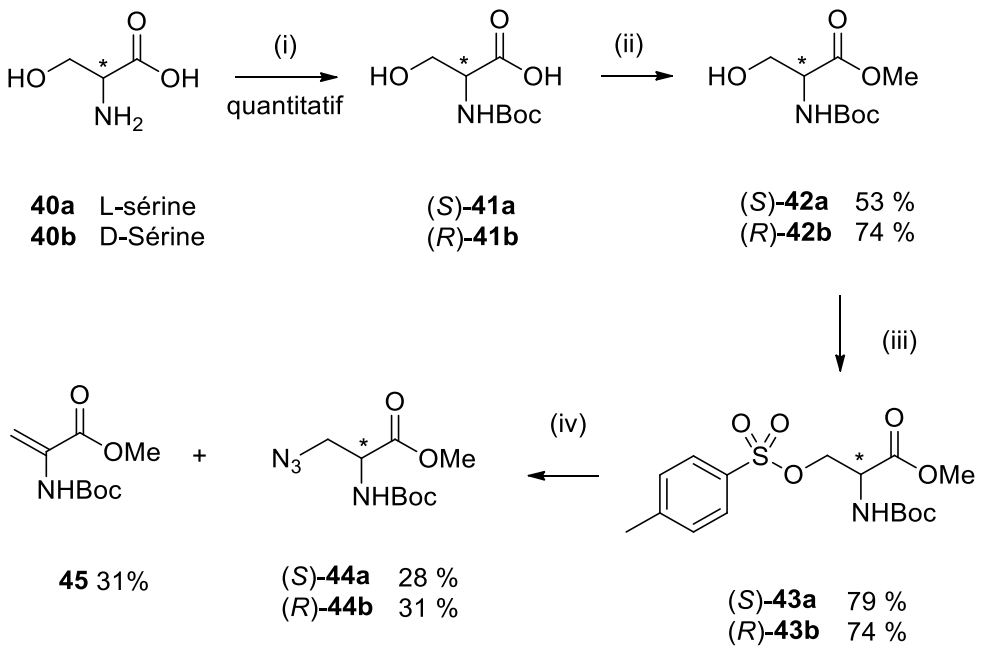


Schéma 2 : Synthèse des azotures (*S*)-**44a** et (*R*)-**44b**
(i) $(Boc)_2O$, NaOH [1M], 1,4-dioxane, 0 °C ; (ii) K_2CO_3, CH_3I, DMF, 0 °C ; (iii) 4-DMAP, Me_3NHCl, NEt_3, TsCl, CH_2Cl_2, 0 °C ; (iv) NaN_3, DMF.

b) Synthèse des alcynes

La cycloaddition 1,3-dipolaire nécessite aussi un alcyne. Dans cette partie sera décrite la synthèse de trois alcynes différents.

(1) Protection des amines propargyliques

Dans un premier temps, une série d'alcynes contenant une fonction amine a été utilisée afin de synthétiser des analogues structuraux de la lysine.

De ce fait, les amines des alcynes commerciaux **46** et **48** ont été protégées de manière classique. Ces synthèses ont été auparavant décrites dans la littérature et ces méthodologies de synthèse ont été utilisées avec de légères modifications.[43,44] Les composés protégés par le groupe Boc **47** et **49** ont été obtenus avec 50% et 70% de rendement respectivement. Les rendements indiqués dans cette partie sont calculés après purifications par chromatographie flash. (Schéma 3)

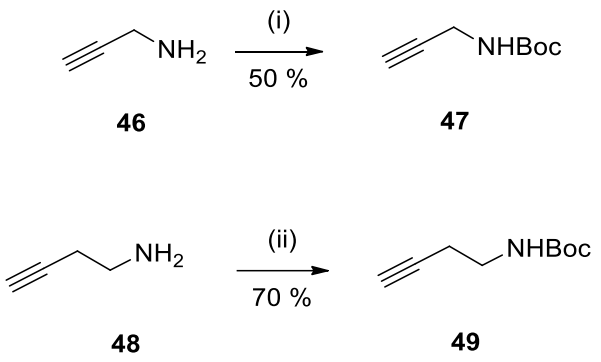


Schéma 3 : Protection des fonctions amines des amines propargyliques **46** et **48**
(i) Boc_2O, CH_2Cl_2, 0 °C ; (ii) Boc_2O, Na_2CO_3, CH_2Cl_2, DMF, 0 °C.

(2) Synthèse du synthon éthynylglycine

Le synthon ethynylglycine est un alcyne vrai dérivé de la sérine et il permet d'envisager la synthèse de triazoles comprenant deux centres asymétriques tout en permettant d'introduire une fonction amino alcool. Ces triazoles permettront d'imaginer des analogues potentiels ou précurseurs du *méso*-DAP nouveaux.

Par ailleurs, le synthon ethylnylglycine est maintenant bien connu dans la synthèse de nombreux composés à activité biologique potentielle et notamment d'acides aminés non usuels.[45]

La synthèse de ce synthon s'effectue en sept étapes consécutives en partant de la L- ou de la D-sérine. Les rendements indiqués dans cette partie sont de rendements bruts.

Les deux premières étapes de cette synthèse sont la protection des fonctions amine et acide carboxylique de la L- ou D- sérine (**40a** et **40b**). La synthèse de (*S*)-**42a** et de (*R*)-**42b** a été décrite en section II.A.2.a). Par la suite, la protection de la fonction alcool de (*S*)-**42a** et (*R*)-**42b** est faite par le biais de la formation du cycle oxazolidine dans (*S*)-**50a** et (*R*)-**50b** en présence d'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté (APTS-H_2O) en quantité catalytique et de dimethoxypropane (DMP). Ce composé est obtenu avec un rendement brut de 85% et 91% pour (*S*)-**50a** et (*R*)-**50b** respectivement. La réduction de la fonction ester de (*S*)-**50a** et (*R*)-**50b** est possible avec du borohydrure de lithium sous atmosphère inerte et les alcools (*R*)-**51a** et (*S*)-**51b** sont obtenus avec un rendement brut de 98% et 94% respectivement. La fonction alcool du cycle oxazolidine (*R*)-**51a** et (*S*)-**51b** est par la suite engagée dans une oxydation de Swern en présence de chlorure d'oxalyle, dimethylsulfoxide (DMSO) et de diisopropyléthylamine (DIPEA) pour obtenir les aldéhydes (*S*)-**52a** et (*R*)-**52b** correspondants, communément appelé l'aldéhyde de Garner. (*S*)-**52a** et (*R*)-**52b** ont été obtenus avec le même rendement brut de 97%. (Schéma 4)

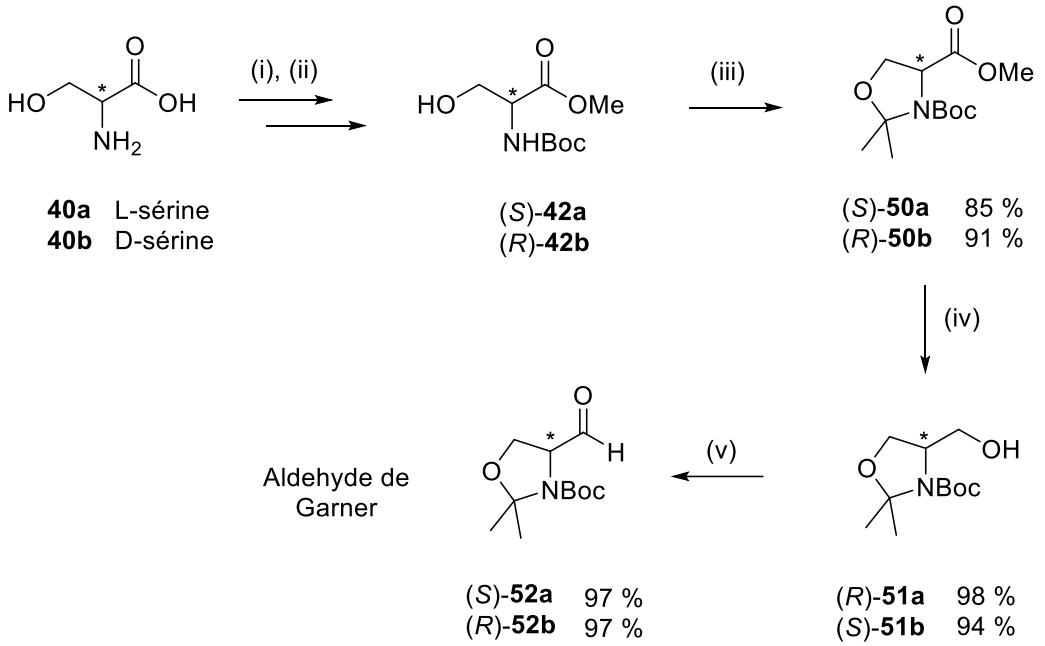


Schéma 4 : Synthèse de l'aldéhyde de Garner (*S*)-**52a** et (*R*)-**52b**
(i) $(Boc)_2O$, NaOH [1 M], 1,4-dioxane, 0 °C ; (ii) K_2CO_3, CH_3I, DMF, 0 °C ; (iii) DMP, APTS-H_2O (cat.), toluène, 110 °C ; (iv) $LiBH_4$, THF/MeOH, -10 °C, N_2 ; (v) $(COCl)_2$, DMSO, DIPEA, CH_2Cl_2, -78 °C, N_2.

Finalement, la réaction d'homologation à partir de l'aldéhyde de Garner a été réalisée suivant le protocole décrit par Boibessot et ses collaborateurs au laboratoire.[42] Pour cela, nous avons utilisé la réaction d'homologation décrite par Seyferth-Gilbert qui met en jeu le 1-diazo-2-oxopropylphosphonate de diéthyle et un aldéhyde. Cette synthèse permet d'obtenir l'alcyne désiré dans des conditions plus douces. En effet, l'aldéhyde de Garner possède un proton en α avec un certain caractère acide. Lors de la réaction d'homologation, en fonction des conditions utilisées, il pourrait être facilement déprotoné et favoriser l'apparition d'un produit d'élimination ou conduire à une racémisation.

Cette réaction de Seyferth-Gilbert débute par la synthèse du 1-diazo-2-oxopropylphosphonate de diméthyle (réactif de Bestmann-Ohira **55**) en partant du 2-oxopropylphosphonate de diméthyle **53** et de l'azoture de 4-acétamidobenzènesulfonyle **54** en milieu basique pour obtenir **55** avec 73% de rendement après purification sur colonne de gel de silice.

Par la suite, le réactif de Bestmann-Ohira **55** est mis en présence de l'aldéhyde de Garner engagé ici sous forme brute (*S*)-**52a** et (*R*)-**52b** en milieu basique et les synthons ethynylglycine (*R*)-**56a** et (*S*)-**56b** sont obtenus avec 20% et 38% de rendement après purification sur colonne de gel de silice. (Schéma 5)

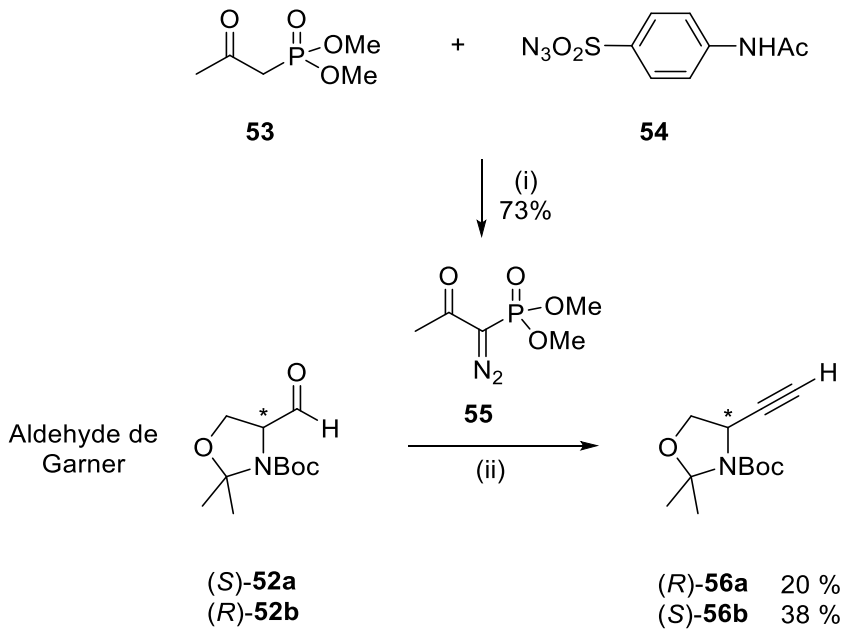


Schéma 5 : Synthèse du réactif de Bestmann-Ohira **55** et réaction d'homologation (i) NaH (60%), Toluène/THF, -10 °C, N_2 ; (ii) K_2CO_3, MeOH, -10 °C.

c) Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

Afin de pouvoir aboutir à la synthèse des nouveaux triazoles, les alcynes **47**, **49** et (*R*)-**56a** et (*S*)-**56b** synthétisés préalablement ainsi que des alcynes commerciaux **57a,b** et **59a,b** (Tableau 1) sont engagés en présence de l'azoture (*S*)-**44a** ou (*R*)-**44b** dans une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Cette réaction est possible par la présence de catalyseur à base de cuivre, dans ce cas le sulfate de cuivre pentahydraté ($CuSO_4$•$5H_2O$) et du L-ascorbate de sodium. (Schéma 6)

Les produits issus de cette réaction, **58a-g**, **60a-d** et **61a-d** (Tableau 1) ont été obtenus après purification par chromatographie flash sur gel de silice avec un rendement compris entre 56% et 84% (Tableau 1). Les produits ont été caractérisés par RMN du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C, IR, UPLC et HRMS.

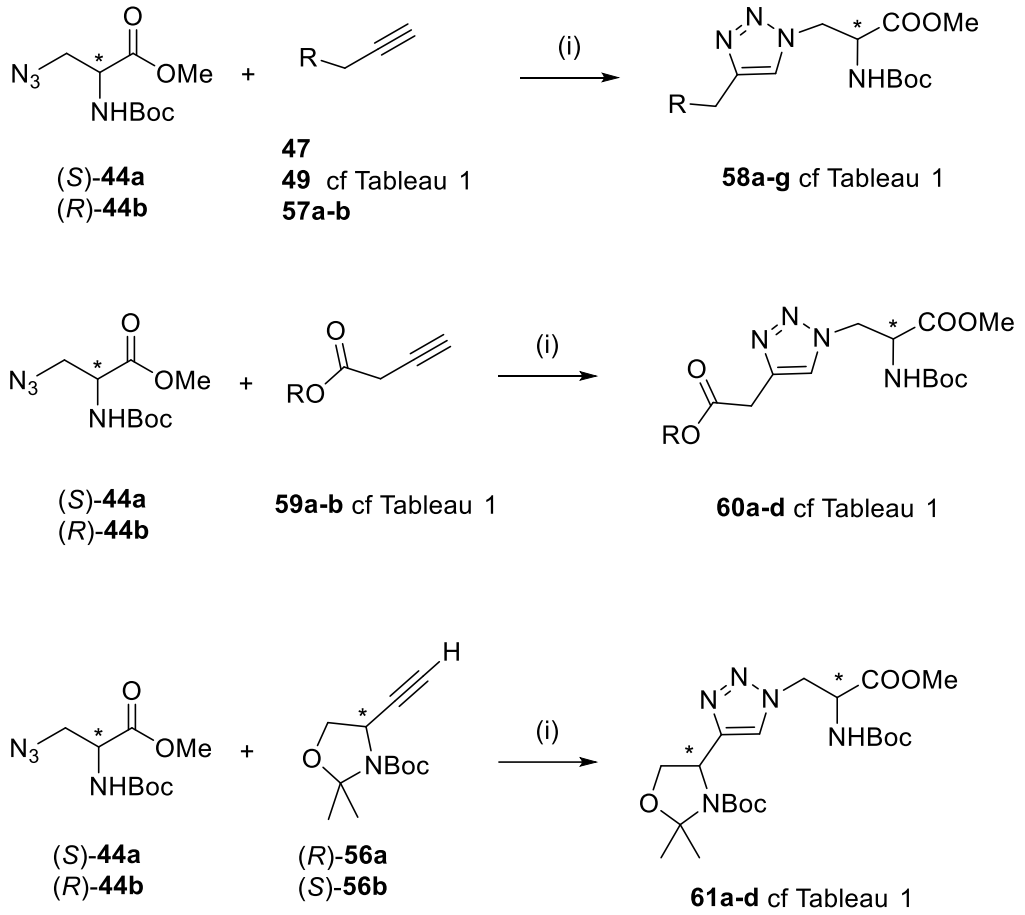
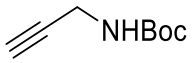
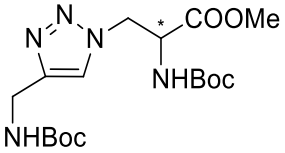
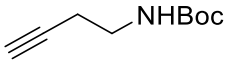
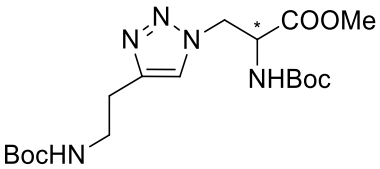
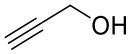
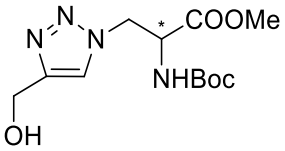
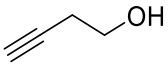
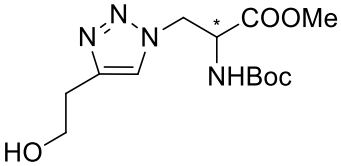
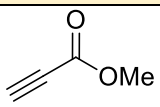
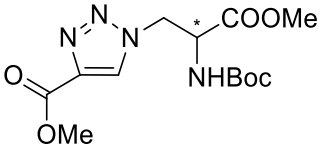
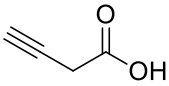
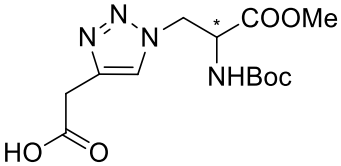
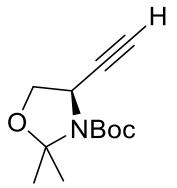
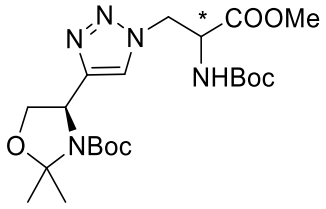
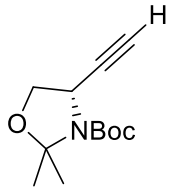
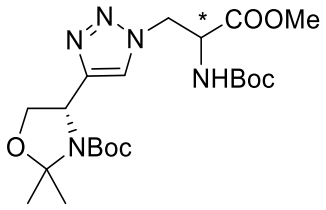


Schéma 6 : Synthèses des triazoles **58a-g**, **60a-d** et **61a-d**
(i) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, L-ascorbate de sodium, *t*BuOH/H_2O, TA ou TA + M/W

Tous les triazoles ont été synthétisés par la même méthodologie. Cependant, il a été constaté que la réaction entre l'alcyne commercial **59b** et l'azoture (*S*)-**44a** n'évoluait pas comme pour les autres. En effet, le produit (*S*)-**60c** a été obtenu avec un rendement de 37% après purification par chromatographie flash. Ce faible rendement peut être expliqué par le fait que l'azoture (*S*)-**44a** n'a pas été totalement consommé. Par conséquent, le protocole a été légèrement modifié sur la méthode de chauffe : 24h à température ambiante puis 1h à 70 °C par chauffage micro-ondes. Le produit final (*S*)-**60c** a été obtenu avec un rendement de 56% de rendement après purification sur chromatographie flash. Ce protocole a été utilisé pour synthétiser l'énantiomère (*R*)-**60d** avec un rendement de 64% après purification. (Schéma 6)

Tableau 1 : Structures et rendements des triazoles protégés **58a-g**, **60a-d** et **61a-d**.

Alcyne	Structure	Nom	Rendements (%)	Pureté déterminée par UPLC (%)
Série des amines et alcools				
 **47**		(*S*)-**58a** (*R*)-**58b**	81 77	96 98
 **49**		(*S*)-**58c** (*R*)-**58d**	83 83	97 100
 **57a**		(*S*)-**58e** (*R*)-**58f**	78 79	98 100
 **57b**		(*S*)-**58g** (*R*)-**58h**	76 74	100 98
Série des acides carboxyliques				
 **59a**		(*S*)-**60a** (*R*)-**60b**	84 84	96 98
 **59b**		(*S*)-**60c** (*R*)-**60d**	64 56	86 97
Série provenant du synthon éthynylglycine				

 (*R*)-**56a**		(*2S*, *6R*)-**61a** (*2R*, *6R*)-**61b**	68 78	97 98
 (*S*)-**56b**		(*2S*, *6S*)-**61c** (*2R*, *6S*)-**61d**	72 77	98 100

d) Deprotection des fonctions acides, amines et alcools

La dernière étape de cette série consiste donc à déprotéger les groupements Boc et l'ester méthylique des triazoles pour obtenir les molécules finales correspondantes analogues du méso-DAP **10**.

Il existe plusieurs conditions pour déprotéger ces groupements qui ont été décrites dans la littérature. Classiquement, ils sont déprotégés en deux étapes. La deprotection de l'ester méthylique conduit par saponification à l'acide carboxylique après acidification. Puis ensuite la déprotection du groupement Boc est possible en présence d'acide trifluoroacétique (TFA). Cependant, la saponification peut conduire à une épimérisation ou une racémisation (si deux carbones asymétriques). Pour éviter cela, il est possible d'envisager la déprotection des deux fonctions en milieu acide en une seule étape.

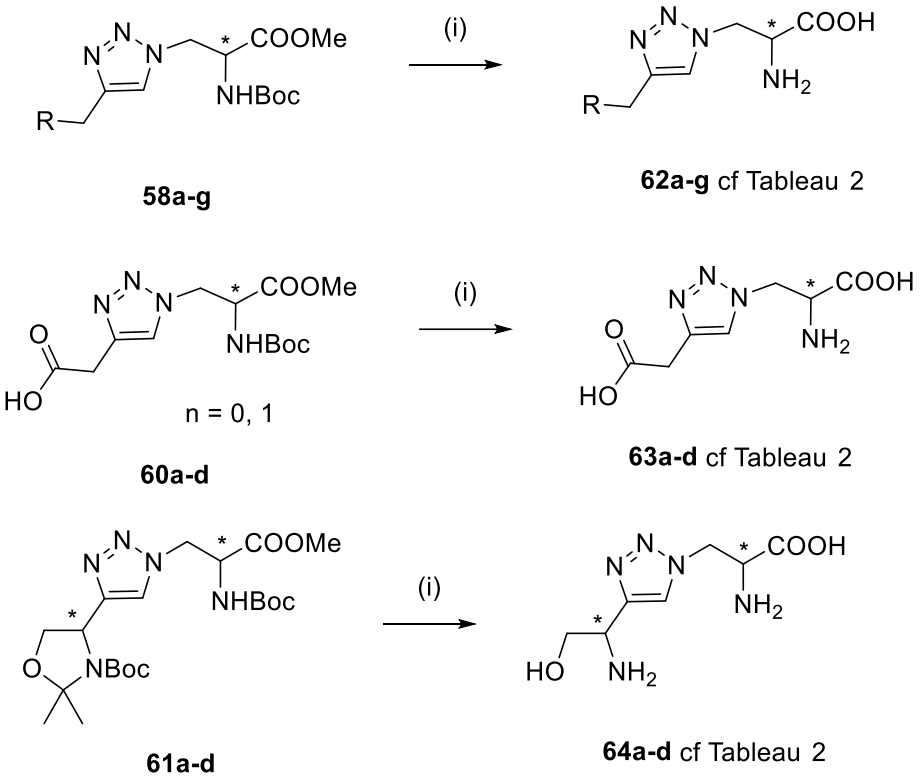
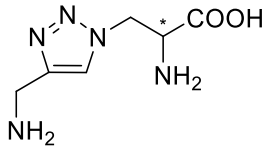
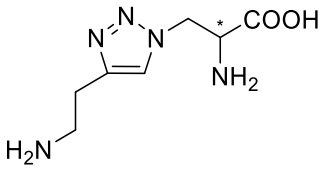
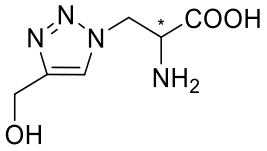
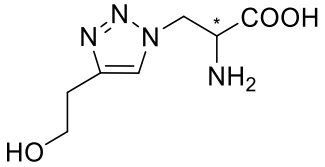
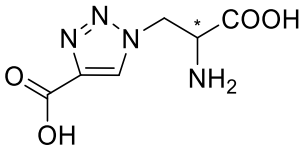
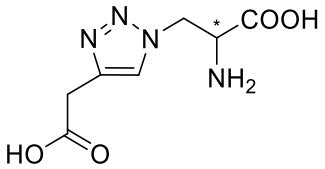
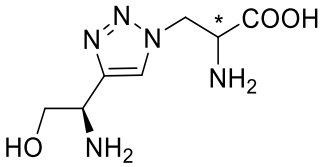
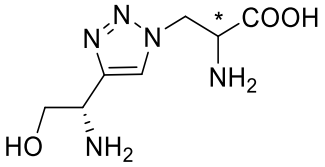


Schéma 7 : Déprotection **58a-g**, **60a-d** et **61a-d** en milieu acide
(i) HCl [5 M], 100 °C, Résine échangeuse d'ions

Les triazoles protégés **58a-g**, **60a-d** et **61a-d** ont été placés en milieu acide (solution aqueuse de HCl [5 M]) et chauffés à 100 °C pendant 5 heures. Les chlorohydrates d'amines obtenus ont été purifiés par résine échangeuse de cations (DOWEX H^+, 100-200 mesh) et élués avec de l'eau puis avec une solution aqueuse de [0,1 M] ou [0,05 M] de NH_4OH. (Schéma 7) Après purification, les triazoles déprotégés **62a-g**, **63a-d** et **64a-d** (Tableau 2) ont été obtenus avec un rendement compris entre 20% et 57%. Les produits **62a-g**, **63a-d** et **64a-d** ont été caractérisés par RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C, IR, UPLC et HRMS.

Tableau 2 : Structures et rendements des triazoles déprotégés **62a-g**, **63a-d** et **64a-d**

Structure	Nom	Rendements	Pureté déterminée par UPLC (%)
Série des amines et alcools			
	(*S*)-**62a** (*R*)-**62b**	57% 43%	100 96

	(*S*)-**62c** (*R*)-**62d**	48% 48%	91 90
	(*S*)-**62e** (*R*)-**62f**	43% 40%	88 100
	(*S*)-**62g** (*R*)-**62h**	40% 40%	96 86
Série des acides carboxyliques			
	(*S*)-**63a** (*R*)-**63b**	21% 25%	90 90
	(*S*)-**63c** (*R*)-**63d**	46% 44%	100 100
Série provenant du synthon éthynylglycine			
	(*2S, 6R*)-**64a** (*2R, 6R*)-**64b**	22% 44%	100 100
	(*2S, 6S*)-**64c** (*2R, 6S*)-**64d**	33% 22%	100 100

3. Conclusion sur la série des triazoles

Dans cette première partie, 16 nouveaux analogues du méso-DAP ont été synthétisés et caractérisés par RMN du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C, IR, UPLC et HRMS.

Par ailleurs, les molécules ont été envoyées à nos collaborateurs biologistes pour tester leurs activités.

Dans un premier, les composés synthétisés ont été envoyés dans l'équipe du Dr. John Stravinides à l'Université de Regina au Canada qui évaluera les composés sur des souches résistantes (Gram

positif, Gram négatifs) afin de connaître leur profil antibactérien. Ensuite, l'équipe du Dr. Sébastien Albrecht de l'Université de Haute-Alsace à Mulhouse évaluera les molécules sur des enzymes aminopeptidases de la voie de biosynthèse du DAP. Finalement, nos collaborateurs de l'équipe du Dr. Pascal Ratet de l'Université de Paris Saclay, évaluera l'activité des molécules **62a-d** comme analogues de l'aminoéthoxyvinylglycine (AVG) pour inhiber la synthèse de l'éthylène. (Figure 37) L'AVG est un inhibiteur de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase impliquée dans le métabolisme de l'éthylène chez les plantes.[46] Ces évaluations sont en cours de réalisation mais à ce jour, nous n'avons pas reçu les résultats.

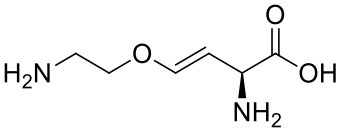


Figure 37 : Structure de l'aminoéthoxyvinylglycine (AVG)

Comme mentionné dans la section Chapitre 2, I.D, une deuxième série d'analogues possédant un alcyne au sein de leurs structures a été de même imaginée.

B. Série des alcynes

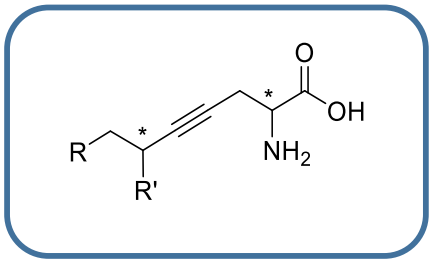


Figure 38 : Structure générale de la série des alcynes

1. Analyse rétrosynthétique

Ces molécules contenant une triple liaison au sein de leurs structures sont obtenues par l'analyse rétrosynthétique suivante. Comme l'analyse rétrosynthétique décrite en section II.A.1 ces molécules peuvent être facilement accessibles à partir de la sérine. Les dérivés halogénés peuvent être synthétisés par réaction d'Appel ou sont commerciaux. L'étape cruciale de cette synthèse et l'alkylation de l'alcyne. (Figure 39)

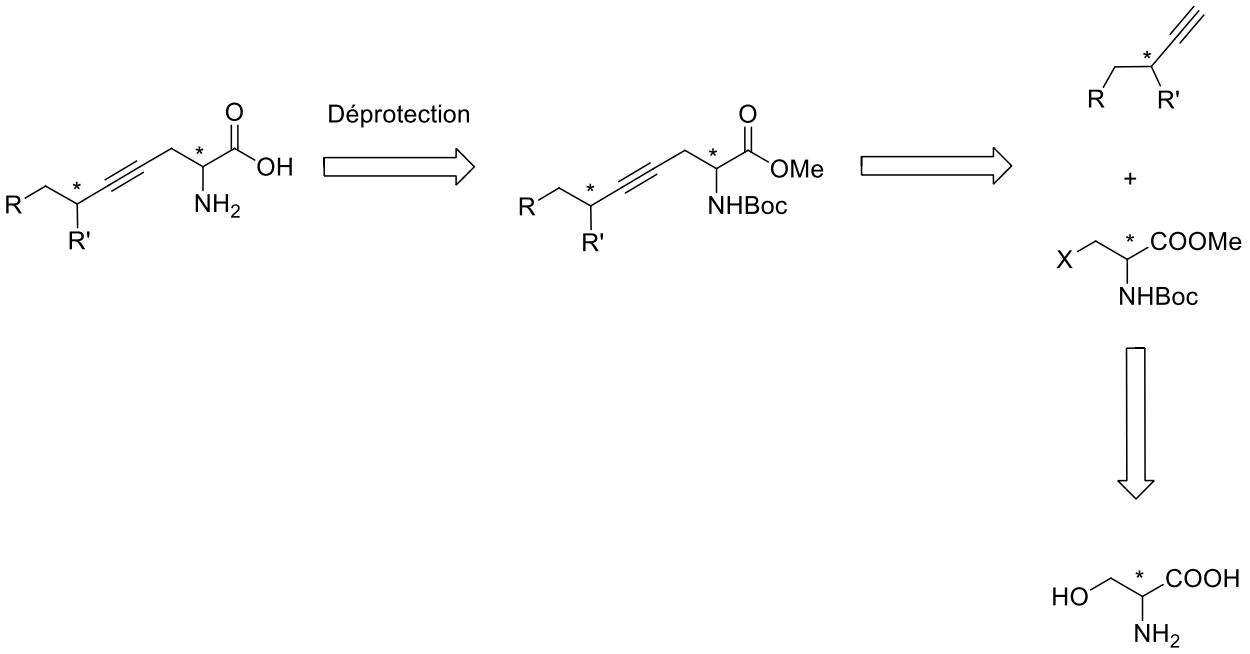


Figure 39 : Analyse rétrosynthétique pour la synthèse de la série des alcynes

2. Démarche entreprise pour l'alkylation

Les tentatives d'alkylation ont été uniquement réalisées sur les composés de la série L afin d'optimiser les protocoles car les matières premières sont moins onéreuses.

a) Alkylation en milieu basique

Afin de réaliser cette alkylation, le choix s'est porté sur l'utilisation du synthon ethynylglycine déjà utilisé auparavant.[45] Sa synthèse est décrite en section II.A.2.b)(2).

En premier lieu, l'alkylation de (*R*)-**56a** a été effectuée dans des conditions basiques pour former l'alcynure *in situ* sur lequel est ajouté un dérivé halogéné. Une substitution nucléophile permettra ainsi la formation de l'alcyne recherché (*2S, 6R*)-**65**. (Schéma 8)

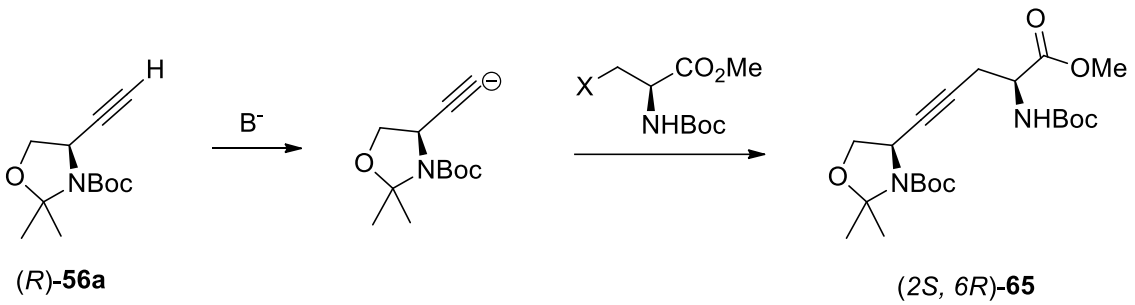


Schéma 8 : Première stratégie de synthèse pour la formation de l'alcyne (*2S, 6R*)-**65**

Pour cette substitution, le dérivé chloré (*R*)-**66** a été utilisé. Celui-ci a été synthétisé par une réaction d'Appel à partir de l'alcool (*S*)-**42a** en présence d'héxachloroéthane et de triphénylphosphine pour obtenir le dérivé chloré (*R*)-**66** avec 50% de rendement après purification sur colonne de gel de silice. (Schéma 9)

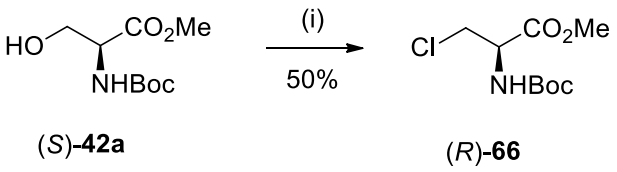


Schéma 9 : Synthèse du dérivé chloré par réaction d'Appel
(i) C_2Cl_6, PPh_3, CH_2Cl_2, N_2, TA

Le choix de la base s'est porté sur le diisopropylamidure de lithium (LDA) car il s'agit d'une base forte encombrée ayant un pKa de 35 et qui pourrait empêcher la réaction secondaire d'élimination à la différence du *n*-butyllithium (*n*-Buli) ou de l'hydrure de sodium (NaH). En effet, les deux réactifs possèdent un proton acide sur le carbone asymétrique qui est susceptible d'être déprotoné par la base forte et conduire à l'élimination. (Schéma 10)

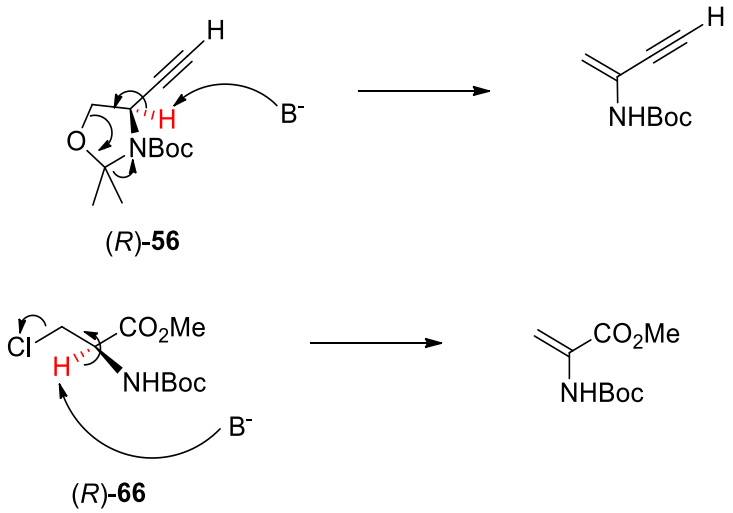


Schéma 10 : Possible réaction secondaire lors de l'alkylation

Deux tentatives ont été réalisées pour former l'alcyne désiré (*2S, 6R*)-**65**.

Premièrement, l'alcyne (*R*)-**56a** a été mis en présence d'une solution commerciale de LDA pour former l'alcynure correspondant à -78 °C sous atmosphère inerte. Le dérivé chloré (*R*)-**66** est ensuite ajouté au goutte à goutte et la réaction est laissée remonter jusqu'à température ambiante. Il a été constaté que l'alcyne (*R*)-**56a** de départ était toujours présent dans le milieu réactionnel

alors que le dérivé chloré (*R*)-**66** a été consommé. L'apparition du produit d'élimination **45** est de même observé. Nous pouvons imaginer deux hypothèses : lors de l'ajout du dérivé halogéné (*R*)-**66** la formation de l'alcynure n'a pas été totale et l'excès de LDA favoriserait la formation du produit d'élimination **45**. Il est aussi possible qu'il soit responsable de l'élimination par son caractère basique (compétition entre la substitution et l'élimination). (Schéma 11)

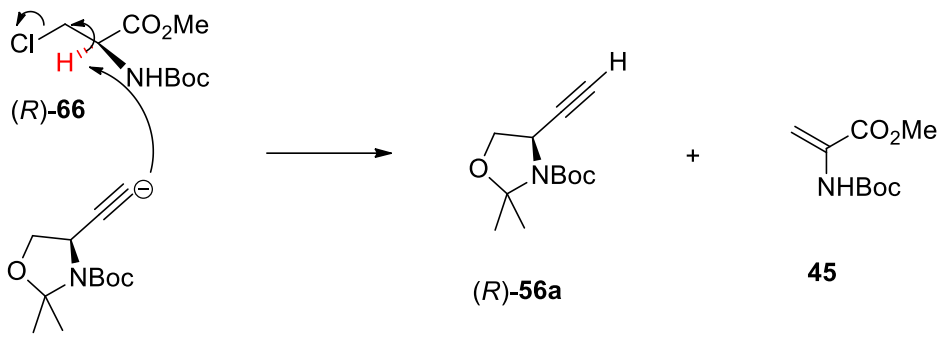


Schéma 11 : Possible protonation de l'alcynure par le dérivé halogéné

Afin de tenter de minimiser la formation de **45**, une addition inversée a été envisagée. En d'autres termes, l'alcynure une fois formé sera ajouté lentement au (*R*)-**66**. Cela permettrait à (*R*)-**66** de se retrouver dans un milieu moins basique et donc favoriser la substitution. (Schéma 12) Cependant, la formation majoritaire de **45** est retrouvée. Il semble donc que l'élimination reste la réaction prépondérante avec (*R*)-**66**.

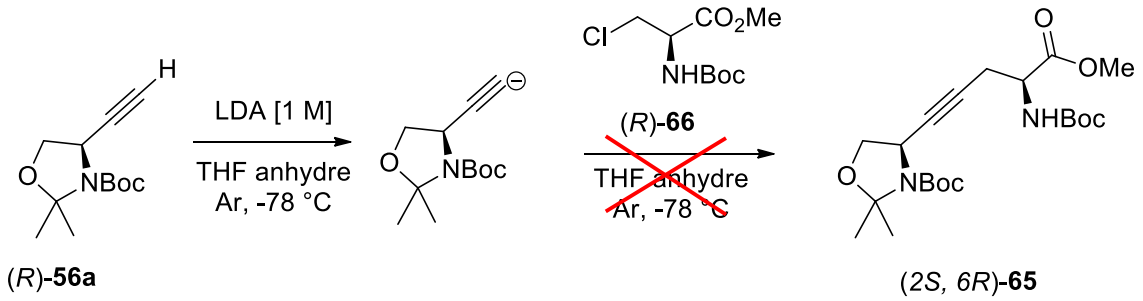


Schéma 12 : Première tentative d'alkylation en milieu basique

Par conséquent, (*R*)-**66** a été remplacé par (*S*)-**67**. Ce dernier est synthétisé par réaction d'Appel en mettant en jeu l'alcool (*R*)-**51a** en présence de tétrachlorure de carbone et de la triphénylphosphine pour obtenir (*S*)-**67** en 46% de rendement. (Schéma 13)

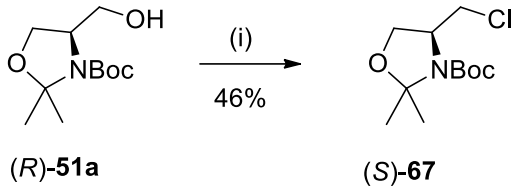


Schéma 13 : Synthèse du (*S*)-**67** par réaction d'Appel
(i) CCl_4, PPh_3, Toluène

Ce dérivé halogéné (*S*)-**67** étant cyclique et très encombré pourrait minimiser la réaction secondaire. De plus, le proton en α de l'azote doit être moins acide puisque la fonction ester est absente. Nous n'observons cependant que la réaction de (*S*)-**67** sur l'alcynure de (*R*)-**56a** ne conduit pas non plus à (*2R, 6R*)-**68**. (Schéma 14) Les produits de départ (*R*)-**56a** et (*S*)-**67** ont été récupérés et nous n'observons pas la formation de produit secondaire d'élimination.

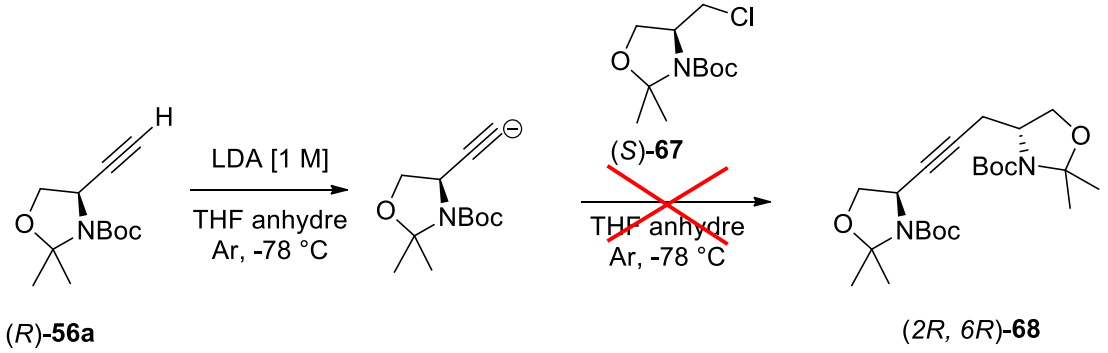


Schéma 14 : Deuxième tentative d'alkylation en milieu basique

L'alkylation en milieu basique semble être problématique. De ce fait, d'autres démarches ont été entreprises pour essayer d'atteindre la molécule cible (*2S, 6R*)-**65**.

b) Alkylation par couplage organométallique

Les réactions palladocatalysées sont devenues des outils essentiels à la formation de liaison C-C. Par conséquent leurs utilisations pour l'alkylation du synthon ethynylglycine (*R*)-**56a**, pourrait être un choix judicieux afin de former le produit désiré (*2S, 6R*)-**65**.

(1) Couplage croisé de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira a été tenté sur notre système dans des conditions classiques.[47] Le couplage a été tenté en partant de (*R*)-**56a** et un dérivé halogéné commercial (*R*)-**68** en présence

de iodure de cuivre(I) et de chlorure de bis(triphenylphosphine)palladium(II). (Schéma 15) Cependant, nous observons la formation du produit d'élimination **45** ainsi que la présence de l'alcyne de départ (*R*)-**56a** et (*2S, 6R*)-**65** n'est pas obtenu.

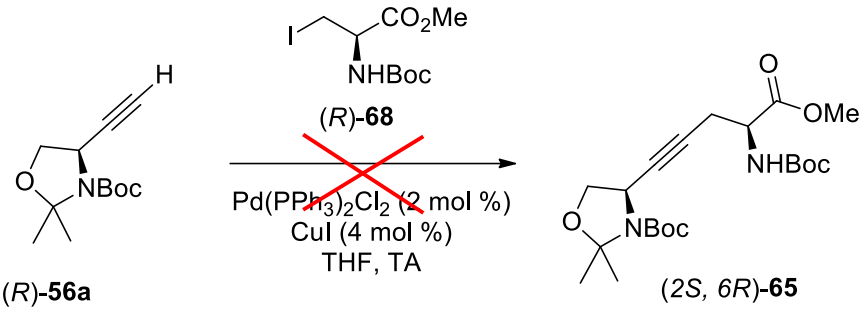


Schéma 15 : Tentative d'alkylation par couplage croisé de Sonogashira

(2) Couplage croisé de Negishi

En vue des résultats précédents, notre choix s'est porté vers le couplage de Negishi. Même si cette réaction a été auparavant décrite avec des composés aryle ou vinyle et non sur les triples liaisons, la méthodologie décrite par Lilley et ses collaborateurs permet d'utiliser un organozincique **70** et un dérivé iodé **69**.[48] L'utilisation de Pd_2dba_3 et de SPhos deux ligands encombrés pourraient minimiser la formation du produit secondaire **45**. (Schéma 16)

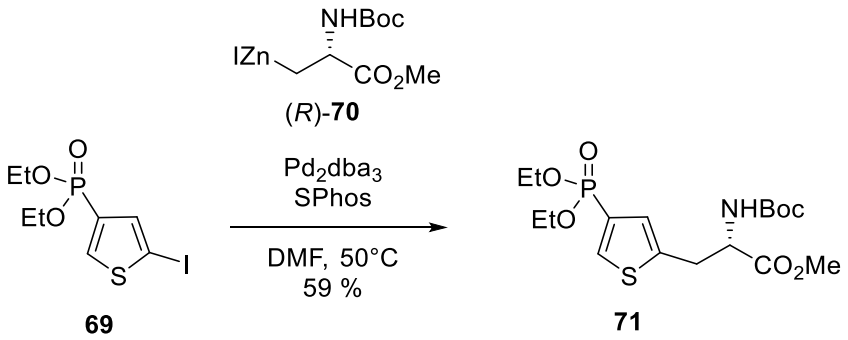


Schéma 16 : Synthèse de la molécule **71** par couplage de Negishi décrite par Lilley et ses collaborateurs[48]

En s'inspirant de cette synthèse, il a été décidé de l'appliquer sur (*R*)-**56a**. Dans un premier temps, un dérivé iodé (*R*)-**72** est préparé pour ensuite réaliser le couplage de Negishi sur (*R*)-**70** afin d'atteindre la molécule cible (*2S, 6R*)-**65**. (Schéma 17)

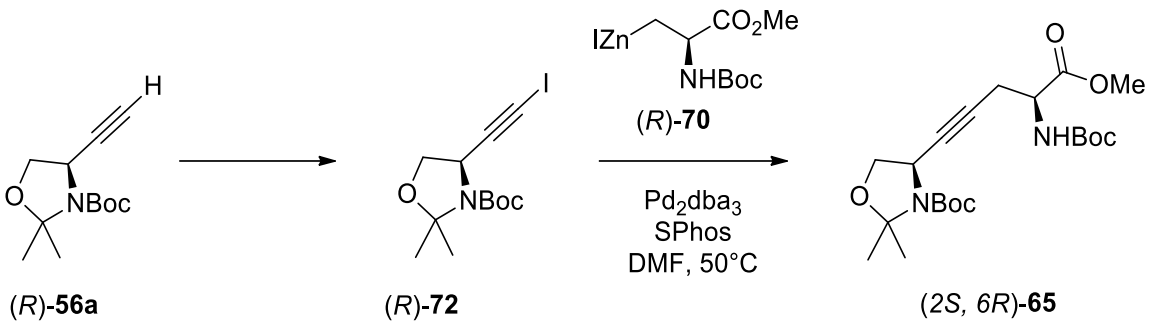


Schéma 17 : Stratégie de synthèse envisagée par couplage de Negishi

Cette première étape d'iodation a été décrite auparavant par Ayed et ses collaborateurs, en utilisant du diiode en présence de morpholine dans du benzène sur l'alcyne (*R*)-**56a**.[49] (Schéma 18)

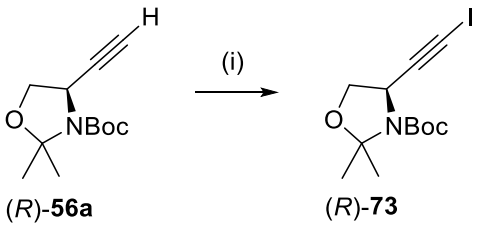


Schéma 18 : Synthèse de (*R*)-**73** décrite par Ayed et ses collaborateurs
(i) I_2, morpholine, benzène

Etant donné que l'utilisation du benzène est très contrôlée actuellement, celui-ci a été remplacé par du toluène qui possède des propriétés physico-chimiques similaires. Or, dans ce solvant, nous avons constaté que la réaction n'a pas eu lieu. (Schéma 19)

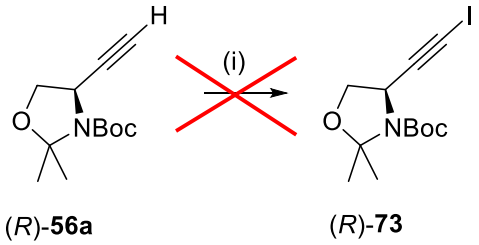


Schéma 19 : Tentative d'iodation du synthon ethynylglycine
(i) I_2, morpholine, toluène

Afin de réaliser cette iodation, les conditions décrites par Crossley et Hein ont été appliquées sur (*R*)-**56a**.[50,51] Dans un premier temps, la formation de l'iodure d'hydrogène *N*-iodomorpholine **75** est réalisée en présence d'iode et de morpholine **74**. Ensuite, l'ajout de l'alcyne (*R*)-**56a** avec de CuI conduit au produit iodé (*R*)-**73** avec un rendement de 45%. (Schéma 20)

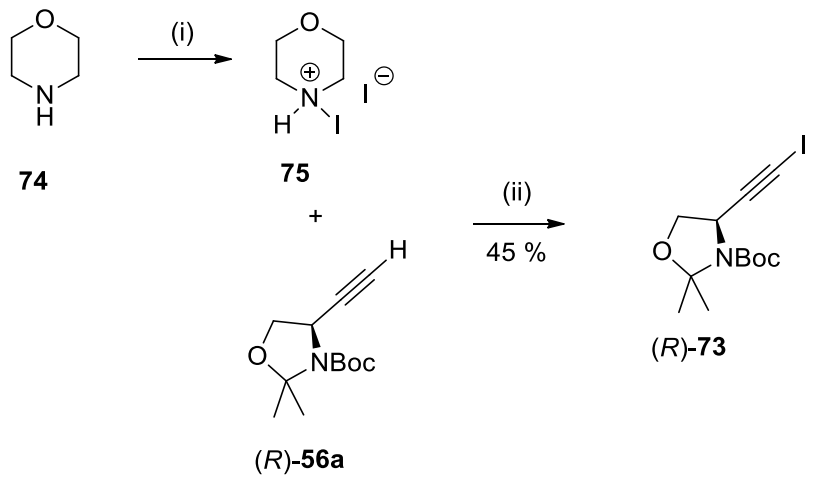


Schéma 20 : Synthèse du composé (*R*)-**73**
(i) I_2, MeOH, 1h, TA ; (ii) CuI, THF, 3h, TA.

Le couplage de Negishi a été entrepris par deux stratégies différentes :

- Premièrement, la formation de l'organozincique (*R*)-**76** à partir de (*R*)-**73** puis (*R*)-**76** est engagé dans le couplage de Negishi avec (*R*)-**68** en présence catalyseur. (Schéma 21)
- Deuxièmement, l'organozincique (*R*)-**70** a été réalisé à partir du composé halogéné (*R*)-**68** puis il est engagé dans le couplage de Negishi avec (*R*)-**73**. (Schéma 21)

En revanche, la formation de l'alcyne recherché (*2S, 6R*)-**65** n'a pas été observée dans aucun des deux cas. Seule la formation du composé secondaire d'élimination **45** est observée.

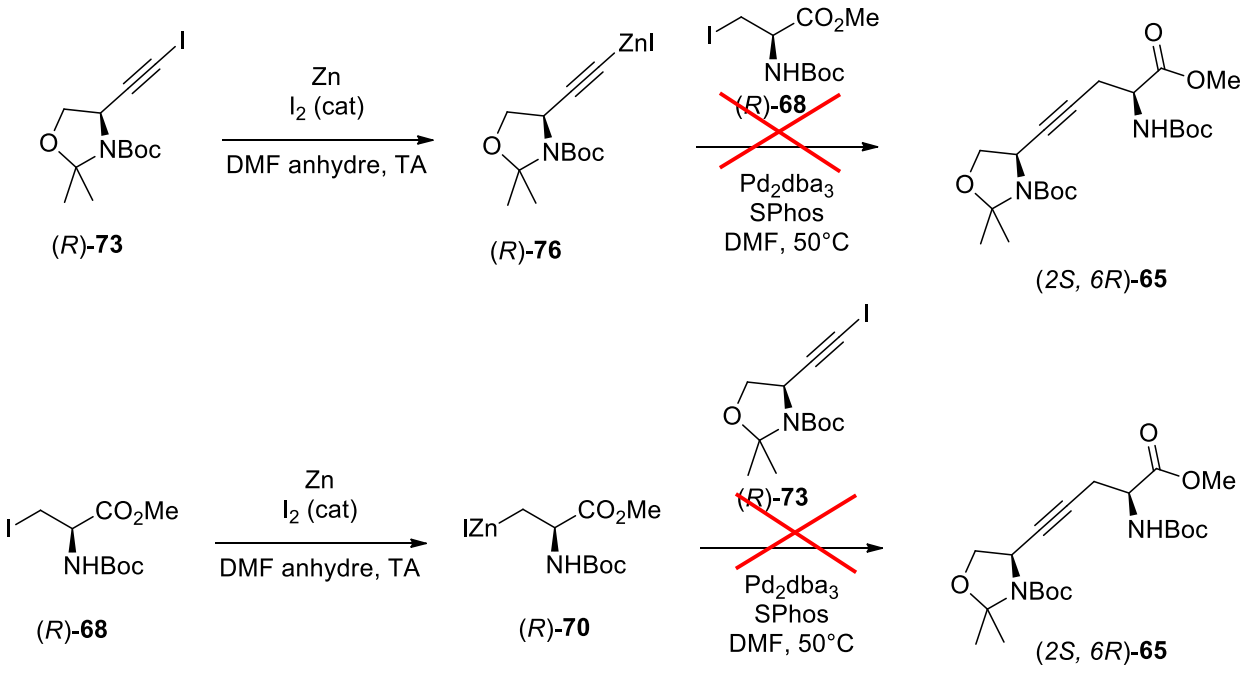


Schéma 21 : Tentative d'alkylation par couplage de Negishi

Ce couplage de Negishi ne permet pas la formation de (*2S, 6R*)-**65** et favorise la réaction d'élimination du produit halogéné (*R*)-**68**.

3. Perspectives sur l'alkylation

Ainsi, dans la littérature d'autres méthodes d'alkylation ont été décrites ce qui pourrait permettre de synthétiser la molécule (*2S, 6R*)-**65**.

a) Alkylation par couplage croisé de Kumada-Corriu

En 2004, Yang et ses collaborateurs ont utilisé un couplage de Kumada-Corriu pour alkyler un alcyne **77** avec une chaine alkyle **78**. (Schéma 22) Ce couplage met en jeu des réactifs de Grignard qui sont très réactifs en présence d'un catalyseur de type palladium et un dérivé halogéné.[52] Cette méthodologie leur a permis de faciliter la formation de liaisons C_{sp}-C_{sp3}.

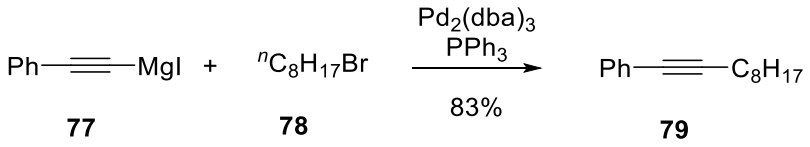


Schéma 22 : Stratégie de synthèse de l'alcyne par couplage de Kumada-Corriu

b) Alkylation inspirée des conditions de Knochel et coll.

En 2002, Ijsselstijn et ses collaborateurs ont synthétisé de nouveaux acides aminés **82** contenant des alcynes au sein de leurs structures. Pour cela ils ont développé une nouvelle méthodologie afin d'introduire des chaînes alkyles en deux étapes. Tout d'abord ils ont mis en jeu la propargylglycine protégée **80** et le *N*-bromosuccinimide ainsi que $AgNO_3$ en quantité catalytique afin de synthétiser le dérivé bromé **81** en 87% de rendement. L'alcyne **82** est ensuite obtenu dans des conditions modifiées de Knochel à partir du composé **81** et de (*R*)-**68** en présence de zinc, I_2, CuCN et LiCl dans des conditions très controlées. Cette molécule **82** est obtenue avec un rendement de 57% dans un mélange de diastéréoisomères.[53] (Schéma 23)

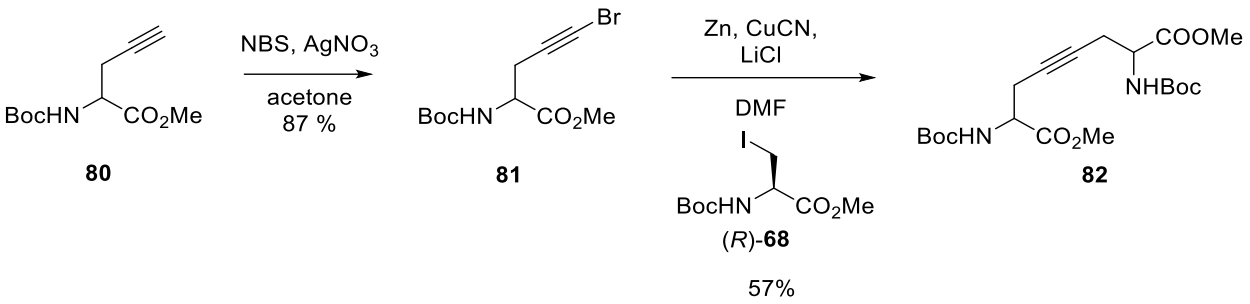


Schéma 23 : Stratégie de synthèse du composé **82**

Ces méthodes d'alkylation pourraient être tentées sur la molécule (*R*)-**56a** afin de synthétiser l'alcyne (*2S, 6R*)-**65**. Une fois la méthode d'alkylation optimisée, celle-ci sera transposée sur les autres énantiomères pour synthétiser les quatre isomères possibles. Par la suite les groupements protecteurs de cet alcyne serraient hydrolysés en présence d'une solution de HCl [5 M] et purifiés par colonne échangeuses d'ions afin d'atteindre la molécule **83**, analogue du *méso*-DAP. (Schéma 24)

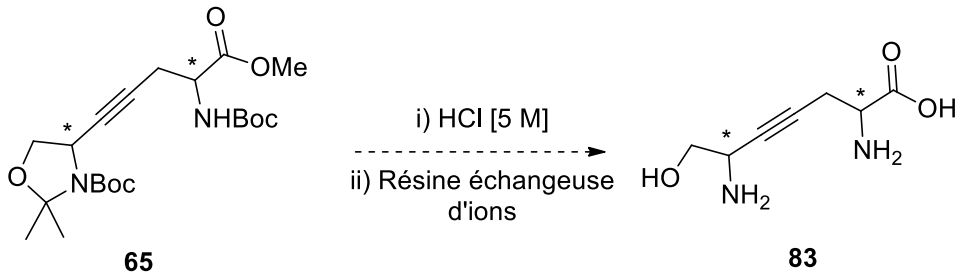


Schéma 24 : Perspective de synthèse afin d'atteindre l'analogue du *méso*-DAP

III. Chapitre 2 : Conclusion

La plupart des bactéries ont besoin de la lysine ou de son précurseur biosynthétique, l'acide diaminopimélique (DAP) afin de construire le réseau du peptidoglycane de la bactérie. Le DAP ou la Lysine n'étant pas présente chez les mammifères, les inhibiteurs de cette voie de biosynthèse pourraient fournir des agents antibactériens potentiels présentant une faible toxicité pour les mammifères.

Dans l'objectif de répondre à la problématique de la résistance bactérienne, nous avons conçu des analogues à base de triazole permettant ainsi d'introduire une contrainte stérique à la différence de la lysine ou le méso-DAP. Au total 16 nouveaux dérivés acides aminés ont été synthétisés et ont été obtenus avec des rendements compris entre 21% et 57% après purification par résine échangeuse d'ions. De même, les analogues de type triazole ont été caractérisés par RMN du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C, IR, UPLC et HRMS.

Les analogues du méso-DAP ont été envoyés en évaluation biologique chez nos collaboteurs biologiste de l'Université de Régina (Canada), de l'Université de Paris-Saclay (Paris) et de l'Université de Haute-Alsace (Mulhouse) et les expériences sont en cours de réalisation.

Le dérivé alcynyle envisagé n'a pas pu être synthétisé pendant ce travail de thèse mais des conditions inspirées de la littérature restent envisageables afin d'aboutir à la molécule cible.

IV. Partie expérimentale

Method M: Boc-protection of the amino group of serine

To a solution of L or D serine (1 eq) in a solution of NaOH [1 M] (150 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of Boc_2O (1.5 eq), dissolved in 1,4-dioxane, and left ovenight at room temperature under stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, a solution of [1 M] of aq. $KHSO_4$ was dropwise until pH of 2-3 was reached and 200 mL of ethyl acetate was added. The aqueous layer was extracted 3x200 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Method N: Esterification of carboxylic acid of *N*-Boc-serine

To a solution of *N*-Boc-serine **41** (1 eq) in DMF at 0 °C, was added K_2CO_3 (1.2 eq) and iodomethane (2 eq). The reaction mixture was stirred for one night at room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, 100 mL of ethyl acetate and 200 ml of water were added. Aqueous layer was extracted 3x100 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Method O: Tosylate formation of *N*-Boc-serine methyl ester 42

The synthesis was prepared according to a procedure described by Jackson et *al*.[54] or with minor modifications thereof. *N*-Boc-serine methyl ester **42** (1 eq) was dissolved in dichloromethane (100 mL) and cooled to 0 °C. At this temperature, DMAP (0.05 eq), trimethylamine hydrochloride (0.1 eq), and *p*-toluenesulfonyl chloride (1 eq) were added. NEt_3 (1 eq) was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and was added dropwise to the reaction and left 5 hours stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, 100 mL of a solution of HCl [2 M] was added. The aqueous layer was extracted with dichloromethane and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was precipitated by adding hot Et_2O (100 mL) and cooled to 0 °C. Once the crystallization began, Petroleum ether (30 mL) was added in five portions and cooled to -20 °C overnight. The crystals obtained were dried under vacuum to afford the desired product.

Method P: Synthesis of azide derivatives

To a solution of tosylate derivative **43** (1 eq) in 50 mL of DMF was added sodium azide (3.15 eq) and the reaction was stirred at room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, 100 mL of cold water was added. The aqueous layer was extracted with 200 mL of ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to give the desired compound.

Method Q: Boc-protection of amino group of 3-amino-1-propyne 46

To a solution of 3-amino-1-propyne **46** (1 eq) in dichloromethane (20 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of Boc_2O (dissolved in 10 mL of dichloromethane) and left one hour at room temperature under stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to give the desired compound.

Method R: Boc-protection of amino group of 4-amino-1-butyne 48

To a solution of 4-amino-1-butyne **48** (1 eq) in a mixture of THF/H_2O (80 mL: 1/1: v/v) was added Boc_2O (1.5 eq) and sodium carbonate (3 eq). The reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, 50 mL of ethyl acetate was added and aqueous layer was extracted with 3x50 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified to give the desired compound.

Method S: Cyclisation of *N*-Boc-serine methyl ester 42

To a solution of *N*-Boc-serine methyl ester **42** (1 eq) in toluene was added 2,2-dimethoxypropane (2 eq) and of *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.014 eq) and the reaction was stirred overnight. The reaction mixture was distilled to remove approximately 10 mL of methanol. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, the reaction

mixture was concentrated under reduced pressure and 150 mL of water was added. The aqueous layer was extracted with 4x150 mL of ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Method T: Reduction of methyl ester

To a solution of methyl ester **50** (1 eq) in a mixture of THF/MeOH (95/5, v/v) at -10 ° C (ice-salt bath) under nitrogen atmosphere, was added the lithium borohydride in three portions over 30 min. The solution was left under stirring at - 10 ° C for 1h30. The progress of the reaction was monitored by TLC examination. Once the reaction is finished, 100 mL of water were added. The solution was filtered and the solid was washed with 50 mL diethyl ether. The two phases are separated and the aqueous phase is extracted with 3x100 mL of ethyl acetate. Combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Method U: Swern oxidation of a primary alcohol 51

To a solution of oxalyl chloride (1.4 eq) in CH_2Cl_2 at -78 °C under a nitrogen atmosphere, dimethylsulfoxide (2.6 eq) was dissolved in a small amount of CH_2Cl_2 and added dropwise to the solution. The reaction was stirred for one hour at -78 ° C. Alcohol **51** (1 eq) was dissolved in CH_2Cl_2 and added dropwise to the reaction mixture. The solution was stirred for 40 minutes and *N*,*N*-diisopropylethylamine (5.9 eq) were carefully added dropwise. The solution was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was placed at 0 °C and 50 ml of a solution of HCl [2 M] was added dropwise. The two layers were separated and the aqueous phase was extracted with 3x100 mL of CH_2Cl_2. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Method V: Synthesis of Bestmann-Ohira reagent

The synthesis was prepared according to a procedure described by Pietruszka *et al.*. To a solution of sodium hybride (1.2 eq) in anhydrous toluene at 0 °C was added dropwise a solution of dimethyl 2- oxopropylphosphonate (1 eq) in 40 mL of anhydrous toluene. One hour later at 0 °C, a solution

of 4-acetamidobenzenesulfonyl azide (1 eq) in 40 mL of anhydrous tetrahydrofuran was added dropwise. The solution was stirred overnight at room temperature. The mixture was filtered through Celite pad, washed with of tetrahydrofuran and the solvent was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography to give the desired compound.

Method W: Bestmann-Ohira homologation

The synthesis was prepared according to a procedure described by Meffre *et al*.[55] To a solution of aldehyde **52** (1 eq) in 40 mL of mEtOH at -10 °C was added a solution of Bestmann-Ohira reagent **55** (1.5 eq) in 40 mL of methanol. The reaction mixture was stirred for 30 min at -10 °C, K_2CO_3 (2 eq) was added in three portions over 2 hours. The reaction was stirred at room temperature during 2.5 h and solution of saturated aqueous ammonium chloride solution was added. The aqueous phase was extracted with petroleum ether 3x100 mL and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography, eluting petroleum ether/ ethyl acetate to give the desired compound.

Method X: Huisgen 1,3-Dipolar cycloaddition

To a solution of azide derivative **44** (1 eq) and alkyne (1 eq) in a mixture *t*-BuOH/H_2O (5 mL: 1/1: v/v) was added sodium L-ascorbate (0.2 eq) and copper sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$, 0.1 eq). The reaction was stirred for 24 hours at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and 25 mL of water was added. The aqueous layer was extracted with 25 mL of ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography, eluting petroleum ether/ ethyl acetate to give the desired compound.

Method Y: Cleavage of protecting groups of Boc-protection and methyl ester

The synthesis was prepared according to a procedure described by Selvam et *al*.[56] or with minor modifications thereof. Protected amino acid was dissolved in [5 M] HCl solution and heated at 100 °C for 5 hours. The reaction mixture was then cooled and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in 10 mL of [1 M] of HCl and 10 mL of ethyl acetate. The

aqueous layer was then concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by cation exchange DOWEX resin to afford to desired compound.

Method Z: Halogenation of *N*-boc serine methyl ester

To a solution of alcohol **42** (1 eq) in 20 mL of anhydrous dichloromethane under an inert atmosphere are added triphenylphosphine (1.1 eq) and hexachloroethane (1.1 eq) previously solubilized in 20 mL of anhydrous dichloromethane. The reaction was stirred for 24 hours at room temperature. 40 ml of a saturated solution of sodium hydrogencarbonate were added to the reaction mixture. The aqueous layer was extracted with 50 mL of ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography, eluting petroleum ether/ ethyl acetate to give the desired compound.

Method AA: Halogenation of alcohol 51

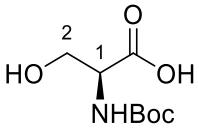
To a solution of alcohol **51** (1 eq) in 30 mL of anhydrous toluène under an inert atmosphere are added dropwise CCl_4 (1.3 eq) and PPh_3 (1.3 eq) previously solubilized in 10 mL of anhydrous toluène. The reaction was stirred for 4 hours at 110 °C. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and 25 mL of a mixture of hexane/ EtOAc (2/8) was added. The solution was vacuum filtered and the filtrate was concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography, eluting petroleum ether/ ethyl acetate to give the desired compound.

Method AB: Iodation of alkyne

To a solution of alkyne **56** (1 eq) in THF (25 mL) was added CuI (0.05 eq) and *N*-iodomorpholine (1.1 eq). The reaction was stirred for 45 minutes at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure 50 mL of water was added. The aqueous layer was extracted with 50 mL of ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography, eluting petroleum ether/ ethyl acetate to give the desired compound.

N-(tert-butoxycarbonyl)-L-serine,

((*S*)-41a)



MW = 205.21 g.mol^{-1}

$C_8H_{15}NO_5$

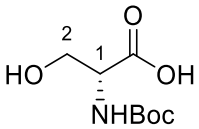
Method M: Starting from L-serine **40a** (0.11 mol; 25 g), NaOH [1 M] (150 mL) and Boc_2O (0.14 mol; 24.8 g) dissolved in 55 mL of 1,4-dioxane. The crude product was used without any further purification and 20.04 g (quantitative) of crude product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.37 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.60 (d, 2H, CH_2, *J* = 4.8 Hz, H-2); 3.94 (m, 1H, H-1); 6.67 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.2 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 56.2 (CH, C-1); 61.5 (CH_2, C-2); 78.1 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.3 (C, N**C**O_2); 172.4 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1683 ($\nu_{C=O}$); 2977 (ν_{NH}); 3375 (ν_{OH}).
***R*$_f$**: 0.65 (SiO_2; BuOH/H_2O/AcOH; 8/1/1, Ninhydrin).

N-(tert-butoxycarbonyl)-D-serine,

((*R*)-41b)



MW = 205.21 g.mol^{-1}

$C_8H_{15}NO_5$

Method M: Starting from D-serine **40b** (0.11 mol; 25 g), NaOH [1 M] (150 mL) and Boc_2O (0.14 mol; 24.8 g) dissolved in 55 mL of 1,4-dioxane. The crude product was used without any further purification and 20.16 g (quantitative) of crude product were obtained as yellow oil.

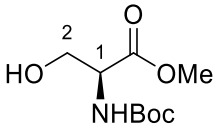
^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.37 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.60 (d, 2H, CH_2, *J* = 4.8 Hz, H-2); 3.94 (m, 1H, H-1); 6.67 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 56.2 (CH, C-1); 61.5 (CH_2, C-2); 78.1 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.3 (C, N**C**O_2); 172.4 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1685 ($\nu_{C=O}$); 2989 (ν_{NH}); 3360 (ν_{OH}).

R_f: 0.65 (SiO_2; BuOH/H_2O/AcOH; 8/1/1, Ninhydrin).

N-(tert-butoxycarbonyl)-L-serine methyl ester,

((*S*)-42a)



MW = 219.23 $g.mol^{-1}$

$C_9H_{17}NO_5$

Method N: Starting from Boc protected-L-serine (*S*)-**41a** (0.097 mol; 20.04 g), K_2CO_3 (0.11 mol; 16.2 g) and iodomethane (0.19 mol; 27.73 g or 12.16 mL). The crude product was used without any further purification and 11.34 g (53% yield) of product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) ***δ***: 1.38 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.62 (s, 5H, CH_2 and CH_3, H-2); 4.06 (m, 1H, H-1); 6.92 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) ***δ***: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 51.6 (CH_3, O**C**H_3); 56.1 (CH, C-1); 61.2 (CH_2, C-2); 78.2 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.2 (C, N**C**O_2); 171.4 (C, **C**O_2CH_3).

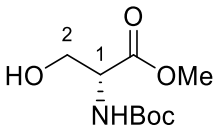
IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$); 1740 ($\nu_{C=O}$); 2977 (ν_{NH}); 3409 (ν_{OH}).

R_f: 0.36 (SiO_2; PE/EtOAc; 5/5, Ninhydrin).

$[\alpha]_D^{20}$ = -19.6 (MeOH; c = 4.00); litt: -19.1 (MeOH; c = 4.07).[57]

N-(tert-butoxycarbonyl)-D-serine methyl ester,

((*R*)-42b)



MW = 219.23 $g.mol^{-1}$

$C_9H_{17}NO_5$

Method N: Starting from Boc protected-D-serine (*R*)-**41b** (0.098 mol; 20.16 g), K_2CO_3 (0.11 mol; 16.3 g) and iodomethane (0.19 mol; 27.9 g or 12.2 mL). The crude product was used without any further purification and 15.95 g (74% yield) of product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.38 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.61 (s, 5H, CH_2 and CH_3, H-2); 4.06 (m, 1H, H-1); 6.92 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH).

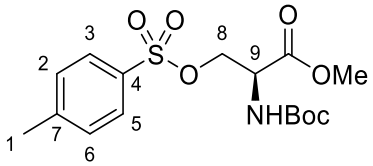
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 51.7 (CH_3, O**C**H_3); 56.2 (CH, C-1); 61.3 (CH_2, C-2); 78.3 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.3 (C, N**C**O_2); 171.5 (C, **C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1687 ($\nu_{C=O}$); 1740 ($\nu_{C=O}$); 2977 (ν_{NH}); 3387 (ν_{OH}).

***R*$_f$**: 0.36 (SiO_2; PE/EtOAc; 5/5, Ninhydrin).

$[\alpha]_D^{20}$ = +19.7 (MeOH; c = 4.00).

(S)-methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(tosyloxy)propanoate, ((*S*)-43a)



MW = 373.42 g.mol^{-1}

$C_{16}H_{23}NO_7S$

Method O: Starting from *N*-Boc-serine methyl ester (*S*)-**42a** (0.11 mol; 25 g), *p*-toluenesulfonyle chloride (0.11 mol; 21.7 g), DMAP (5.7 mmol; 700 mg), trimethylamine hydrochloride (0.01 mol; 1.09 g) and NEt_3 (0.11 mol; 15.9 mL). The crude product was precipitated (Et_2O/PE) and 33.83 g (79% yield) of product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.34 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 2.42 (s, 3H, CH_3, H-1); 3.58 (s, 3H, CH_3, OCH_3); 4.18 (d, 2H, CH_2, *J* = 5.7 Hz, H-8); 4.34 (m, 1H, H-9); 7.49 (d, 2H, 2-CH, *J* = 8.4 Hz, H-2 and H-6); 7.78 (d, 2H, 2-CH, *J* = 8.1 Hz, H-3 and H-5).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 21.1 (CH_3, C-1); 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 52.2 (CH_3, OCH_3); 52.5 (CH, C-9); 68.6 (CH_2, C-8); 78.7 (C, **C**$(CH_3)_3$); 127.7 (CH, C-3 and C-5); 130.2 (CH, C-2 and C-6); 137.7 (C, C-7); 145.5 (C, C-4); 158.4 (C, N**C**O_2); 171.5 (C, **C**O_2CH_3).

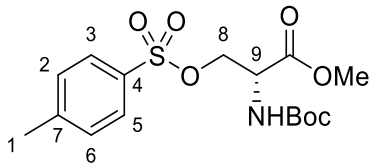
IR (cm^{-1}): 1348 ($\nu_{S=O}$); 1704 ($\nu_{C=O}$); 1739 ($\nu_{C=O}$); 3014 (ν_{NH}).

M.p: 68-70 °C; litt : 74-76 °C.[54]

***R*$_f$**: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc; 7/3, Ninhydrin).

$[\alpha]_D^{20}$ = +2.4 (MeOH; c = 2.00); litt: +3 (MeOH; c = 2.00).[54]

(R)-methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(tosyloxy)propanoate, ((*R*)-43b)



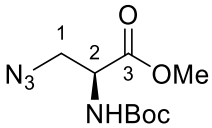
MW = 373.42 g.mol^{-1}
$C_{16}H_{23}NO_7S$

Method O: Starting from *N*-Boc-serine methyl ester (*R*)-**42a** (0.11 mol; 25 g), *p*-toluenesulfonyle chloride (0.11 mol; 21.7 g), DMAP (5.7 mmol; 700 mg), trimethylamine hydrochloride (0.01 mol; 1.09 g) and NEt_3 (0.11 mol; 15.9 mL). The crude product was precipitated (Et_2O/PE) and 31.77 g (74% yield) of product were obtained as pale orange powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.35 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 2.42 (s, 3H, CH_3, H-1); 3.58 (s, 3H, CH_3, OCH_3); 4.18 (d, 2H, CH_2, *J* = 5.7 Hz, H-8); 4.34 (m, 1H, H-9); 7.48 (d, 2H, 2-CH, *J* = 8.1 Hz, H-2 and H-6); 7.77 (d, 2H, 2-CH, *J* = 8.4 Hz, H-3 and H-5).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 21.1 (CH_3, C-1); 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 52.5 (CH, C-9); 68.6 (CH_2, C-8); 78.7 (C, **C**$(CH_3)_3$); 127.7 (CH, C-3 and C-5); 130.2 (CH, C-2 and C-6); 137.7 (C, C-7); 145.5 (C, C-4); 158.4 (C, N**C**O_2); 171.5 (C, **C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1344 ($\nu_{S=O}$); 1702 ($\nu_{C=O}$); 1739 ($\nu_{C=O}$); 2983 (ν_{NH}).
M.p: 70-72 °C. litt : 74-76 °C.[42]
***R*$_f$**: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc; 7/3, Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -3 (MeOH; c = 2.00); litt : -4 (MeOH; c = 2.00).[42]

(S)-methyl 3-azido-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate, ((*S*)-44a)



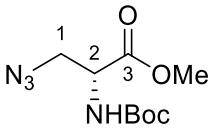
MW = 244.25 g.mol^{-1}
$C_9H_{16}N_4O_4$

Method P: Starting from tosylate (*S*)**-43a** (0.01 mol; 4 g) and sodium azide (0.03 mol; 2.19 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 720 mg (28% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.39 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.54 (m, 2H, CH_2, H-1); 3.64 (s, 3H, OCH_3); 4.23 (m, 1H, CH, H-2); 7.50 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 50.6 (CH_2, C-1); 52.1 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.3 (CH, C-2); 78.6 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.3 (C, N**C**O_2); 170.3 (C, **C**O_2CH_3, C-3).

IR (cm^{-1}): 1711 ($\nu_{C=O}$); 1747 ($\nu_{C=O}$); 2108 (ν_{N3}); 2977 (ν_{NH}).
***R*$_f$**: 0.5 (SiO_2; PE/EtOAc; 7/3, Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = +37.1 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: +37.1 ($CHCl_3$; c = 1.10).[42]

(R)-methyl 3-azido-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate,
((*R*)-44b)



MW = 244.25 g.mol^{-1}
$C_9H_{16}N_4O_4$

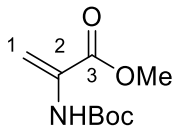
Method P: Starting from tosylate (*R*)**-43b** (0.04 mol; 15 g) and sodium azide (0.12 mol; 8.22 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 3.06 g (31% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.39 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.56 (m, 2H, CH_2, H-1); 3.65 (s, 3H, OCH_3); 4.23 (m, 1H, CH, H-2); 7.50 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 50.5 (CH_2, C-1); 52.1 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.2 (CH, C-2); 78.6 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.2 (C, N**C**O_2); 170.2 (C, **C**O_2CH_3, C-3).

IR (cm^{-1}): 1700 ($\nu_{C=O}$); 1747 ($\nu_{C=O}$); 2102 (ν_{N3}); 2979 (ν_{NH}).
***R*$_f$**: 0.5 (SiO_2; PE/EtOAc; 7/3, Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -41.9 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -36.3 ($CHCl_3$; c = 1.04).[42]

Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acrylate,

(45)



MW = 201.22 g.mol^{-1}

$C_9H_{15}NO_4$

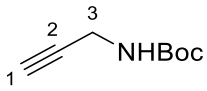
Method P: Secondary product obtained by elimination of compounds **43**. **45** was isolated by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 600 mg (28% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.39 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.56 (m, 2H, CH_2, H-1); 3.65 (s, 3H, OCH_3); 4.23 (m, 1H, CH, H-2); 7.50 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 50.5 (CH_2, C-1); 52.1 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.2 (CH, C-2); 78.6 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.2 (C, N**C**O_2); 170.2 (C, **C**O_2CH_3, C-3).

IR (cm^{-1}): 1697 ($\nu_{C=O}$); 2980 (ν_{NH}).
***R*$_f$**: 0.75 (SiO_2; PE/EtOAc; 7/3, Ninhydrin).

N-Boc-propargylamine,

(47)



MW = 155.2 g.mol^{-1}

$C_8H_{13}NO_2$

Method Q: Starting from 3-amino-1-propyne **46** (0.036 mol; 2 g or 2.32 mL) and Boc_2O (0.04 mol; 8.7 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 3.02 g (50% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.37 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.05 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, C≡CH, H-1); 3.69 (dd, 2H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 2.4 Hz, CH_2, H-3); 7.26 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, NH).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 29.3 (CH_2, C-3); 72.6 (C≡**C**H, C-1); 78.1 (**C**$(CH_3)_3$); 81.7 (**C**≡CH, C-2); 155.2 (C, N**C**O_2).

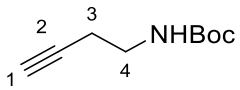
IR (cm^{-1}): 1671 ($\nu_{C=O}$); 3013 (ν_{NH}); 3318 ($\nu_{C\equiv C-H}$).

M.p: 40-42°C; litt : 41-42°C.[43]

R_f: 0.25 (SiO_2; PE/EtOAc; 9/1, Ninhydrin).

N-Boc-butynylamine,

(49)



MW = 169.22 g.mol^{-1}

$C_9H_{15}NO_2$

Method R: Starting from 4-amino-1-butyne **48** (0.014 mol; 1 g), Boc_2O (0.043 mol; 4.6 g) and Na_2CO_3 (0.021 mol; 4.73 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 1.66 g (70% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.37 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 2.24 (td, 2H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 2.7 Hz, CH_2, H-3); 2.77 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz, C≡CH, H-1); (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH_2, H-4); 6.91 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, NH).

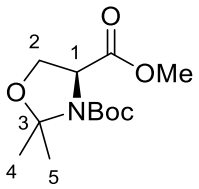
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 19.1 (CH_2, C-2); 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 39.0 (CH_2, C-3); 71.9 (C≡**C**H, C-1); 77.7 (**C**$(CH_3)_3$); 82.1 (**C**≡CH, C-2); 155.4 (C, N**C**O_2).

IR (cm^{-1}): 1690 ($\nu_{C=O}$); 2980 (ν_{NH}); 3312 ($\nu_{C\equiv C-H}$).

R_f: 0.25 (SiO_2; PE/EtOAc; 9/1, Ninhydrin).

(S)-3-tert-butyl 4-methyl 2,2-dimethyloxazolidine-3,4-dicarboxylate,

((*S*)-50a)



MW = 259.3 g.mol^{-1}

$C_{12}H_{21}NO_5$

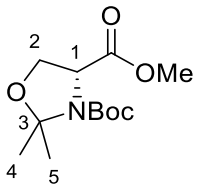
Method S: Starting from *N*-Boc-serine methyl ester (*S*)-**42a** (0.089 mol; 19.57 g) and 2,2-dimethoxypropane (0.17 mol; 21.97 mL) and *p*-toluenesulfonic acid (1.25 mmol; 0.237 g). The

crude product was used without any further purification and 19.78 g (85% yield) of product were obtained as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.34, 1.42, 1.43, 1.54 (4s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-4 and H-5); 3.68 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.94 and 4.15 (2m, 2H, CH_2, H-2); 4.38 (m, 1H, CH, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 24.0, 24.7, 24.8, 26.0, 27.8 and 27.9 (5-CH_3, C(**C**H_3)$_3$, C-4 and C-5); 52.1 (CH_3, CO_2**C**H_3); 58.6 (CH, C-1); 65.3, 65.6 (CH_2, C-2); 79.3, 79.9 (**C**(CH_3)$_3$); 93.6, 93.9 (**C**(CH_3)$_2$, C-3); 150.5, 151.2 (N**C**O_2); 171.0, 171.3 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1699 ($\nu_{C=O}$); 1757 ($\nu_{C=O}$).
***R*$_f$**: 0.66 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -54.0 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -54.4 ($CHCl_3$; c = 1.07).[57]

(R)-3-tert-butyl 4-methyl 2,2-dimethyloxazolidine-3,4-dicarboxylate,
((*R*)-50b)



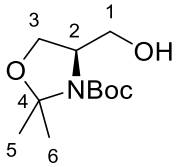
MW = 259.3 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{21}NO_5$

Method S: Starting from *N*-Boc-serine methyl ester (*R*)-**42b** (0.061 mol; 13.44 g) and 2,2-dimethoxypropane (0.12 mol; 15.02 mL) and *p*-toluenesulfonic acid (0.85 mmol; 0.163 g). The crude product was used without any further purification and 14.51 g (91% yield) of product were obtained as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33, 1.42, 1.43, 1.54 (4s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-4 and H-5); 3.67 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.94 and 4.15 (2m, 2H, CH_2, H-2); 4.39 (m, 1H, CH, H-1).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 24.0, 24.7, 24.8, 26.0, 27.8 and 27.9 (5-CH_3, C(**C**H_3)$_3$, C-4 and C-5); 52.1 (CH_3, CO_2**C**H_3); 58.6 (CH, C-1); 65.3, 65.6 (CH_2, C-2); 79.3, 79.9 (**C**(CH_3)$_3$); 93.6, 93.9 (**C**(CH_3)$_2$, C-3); 150.5, 151.2 (N**C**O_2); 171.0, 171.3 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1705 ($\nu_{C=O}$); 1757 ($\nu_{C=O}$).
***R*$_f$**: 0.66 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = +52.8 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: +49.8 ($CHCl_3$; c = 1.04).[58]

(R)-tert-butyl 4-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,
((*R*)-51a)



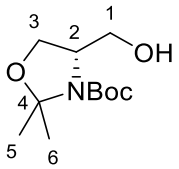
MW = 231.29 g.mol^{-1}
$C_{11}H_{21}NO_4$

Method T: Starting from oxazolidine ester (*S*)-**50a** (0.052 mol; 13.56 g) and $LiBH_4$ (0.10 mol; 2.39 g). The crude product was used without any further purification and 11.96 g (98% yield) of product were obtained as orange oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.40, 1.43 (2s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-5 and H-6); 3.16, 3.50 (2m, 2H, CH_2, H-3); 3.73 (m, 1H, CH, H-2); 3.88 (m, 2H, CH_2, H-1); 4.89 (br s, 1H, O**H**).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 22.8, 24.1, 26.5, 27.4, 28.0 (5-CH_3, C(**C**H_3)$_3$, C-5 and C-6); 58.1, 58.3 (CH, C-2); 59.9, 60.5 (CH_2, C-3); 64.2, 64.4 (CH_2, C-1); 78.7, 79.2 (**C**(CH_3)$_3$); 92.6, 92.7 (**C**(CH_3)$_2$, C-4); 151.1, 151.4 (N**C**O_2).

IR (cm^{-1}): 1668 ($\nu_{C=O}$); 3430 (ν_{OH}).
***R*$_f$**: 0.27 (SiO_2; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -21.3 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -26.7 ($CHCl_3$; c = 1.00).[57]

(S)-tert-butyl 4-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,
((*S*)-51b)



MW = 231.29 g.mol^{-1}
$C_{11}H_{21}NO_4$

Method T: Starting from oxazolidine ester (*R*)-**50b** (0.056 mol; 14.51 g) and $LiBH_4$ (0.11 mol; 2.56 g). The crude product was used without any further purification and 12.17 g (94% yield) of product were obtained as orange oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.40, 1.43 (2s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-5 and H-6); 3.17, 3.51 (2m, 2H, CH$_2$, H-3); 3.73 (m, 1H, CH, H-2); 3.88 (m, 2H, CH$_2$, H-1); 4.88 (br s, 1H, O**H**).

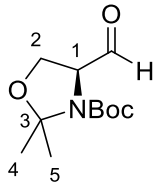
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 22.8, 24.1, 26.5, 27.3, 28.0 (5-CH$_3$, C(**C**H$_3$)$_3$, C-5 and C-6); 58.1, 58.2 (CH, C-2); 59.9, 60.5 (CH$_2$, C-3); 64.2, 64.4 (CH$_2$, C-1); 78.7, 79.2 (**C**(CH$_3$)$_3$); 92.6, 92.8 (**C**(CH$_3$)$_2$, C-4); 151.1 (N**C**O$_2$).

IR (cm^{-1}): 1671 ($\nu_{C=O}$); 3461 (ν_{OH}).

***R*$_f$**: 0.27 (SiO$_2$; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +24.3 (CHCl$_3$; c = 1.00). litt : + 23.6 (CHCl$_3$; c = 1.44).[58]

(S)-tert-butyl 4-formyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate, ((*S*)-52a)



MW = 229.28 g.mol^{-1}
$C_{11}H_{19}NO_4$

Method U: Starting from from oxalyl chloride (0.081 mol; 6.9 mL), DMSO (0.151 mol; 10.76 mL), oxazolidine alcohol (*S*)-**51a** (0.058 mol; 11.96 g) and DIPEA (0.34 mol; 58.29 mL). The crude product was used without any further purification and 12.98 g (97% yield) of product were obtained as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.35, 1.44, 1.51 (3s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-4 and H-5); 4.06 (m, 2H, CH$_2$, H-2); 4.36 (m, 1H, CH, H-1); 9.52 (s, 1H, C**H**O).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.6, 25.3, 26.2, 27.8 (5-CH$_3$, C(**C**H$_3$)$_3$, C-4 and C-5); 62.5, 62.9 (CH$_2$, C-2); 64.4 (CH, C-1); 79.6, 80.1 (**C**(CH$_3$)$_3$); 93.6, 93.9 (**C**(CH$_3$)$_2$, C-3); 150.7, 151.6 (N**C**O$_2$); 199.6, 199.7 (**C**HO).

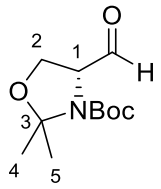
IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{C=O}$); 1732 ($\nu_{C=O}$).

***R*$_f$**: 0.52 (SiO$_2$; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -88.7 (CHCl$_3$; c = 1.00); litt: -89.7 (CHCl$_3$; c = 1.65).[57]

(R)-tert-butyl 4-formyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*R*)-52b)



MW = 229.28 g.mol^{-1}

$C_{11}H_{19}NO_4$

Method U: Starting from from oxalyl chloride (0.036 mol; 3.12 mL), DMSO (0.068 mol; 4.9 mL), oxazolidine alcohol (*R*)-**51b** (0.026 mol; 6.10 g) and DIPEA (0.15 mol; 27.13 mL). The crude product was used without any further purification and 5.89 g (97% yield) of product were obtained as brown oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.35, 1.43, 1.51 (3s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-4 and H-5); 4.06 (m, 2H, CH$_2$, H-2); 4.37 (m, 1H, CH, H-1); 9.52 (s, 1H, C**H**O).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.6, 24.6, 25.3, 26.2, 27.8 (5-CH$_3$, C(**C**H$_3$)$_3$, C-4 and C-5); 62.5, 62.9 (CH$_2$, C-2); 64.4 (CH, C-1); 79.6, 80.1 (**C**(CH$_3$)$_3$); 93.6, 93.9 (**C**(CH$_3$)$_2$, C-3); 150.7, (N**C**O$_2$); 199.6, 199.8 (**C**HO).

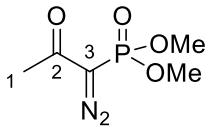
IR (cm^{-1}): 1694 ($\nu_{C=O}$); 1712 ($\nu_{C=O}$)

R$_f$: 0.52 (SiO$_2$; PE/EtOAc: 7/3; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +86.8 (CHCl$_3$; c = 1.00); litt: +83.8 (CHCl$_3$; c = 1.00).[59]

Dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate,

(55)



MW = 192.11 g.mol^{-1}

$C_5H_9N_2O_4P$

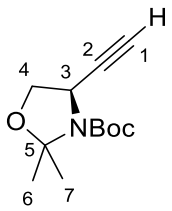
Method V: Starting from sodium hybride (0.056 mol; 2.25 g; 60% dispersed in mineral oil), dimethyl 2- oxopropylphosphonate **53** (0.047 mol; 7.8 g or 6.5 mL) and 4-acetamidobenzenesulfonyl azide **54** (0.047 mol; 11.3 g). The crude product was purified by flash

chromatography (eluent: 0-100% PE/EtOAc) and 6.64 g (73% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR ((DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 2.21 (s, 3H, CH_3, H-1); 3.74 (d, 6H, 2-OMe, J_{HP} = 12 Hz).
^{13}C NMR ((DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 26.9 (CH_3, C-1); 53.5 (d, 2-O**C**H_3, J_{CP} = 5.1 Hz); 127.2 (d, C, CN_2, $^{1}J_{CP}$ = 87.0 Hz, C-3); 127.2 (d, C, CO, $^{2}J_{CP}$ = 11.1 Hz, C-2).
^{31}P NMR (DMSO - *d*$_6$, 121.49 MHz) *δ*: 14.3.

IR (cm^{-1}): 1019 (ν_{POCH3}); 1267 ($\nu_{P=O}$); 1656 ($\nu_{C=O}$); 2116 ($\nu_{C=N2}$).
***R*$_f$**: 0.34 (SiO_2; PE/EtOAc: 0/10; Ninhydrin).

(R)-tert-butyl 4-ethynyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,
((*R*)-56a)



MW = 225.29 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{19}NO_3$

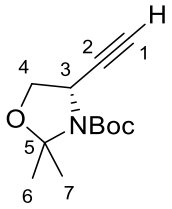
Method W: Starting from oxazolidine aldehyde (*S*)-**52a** (0.023 mol; 5.28 g), K_2CO_3 (0.046 mol; 6.36 g) and Bestmann Ohira reagent (0.034 mol; 6.64 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-80% PE/EtOAc) and 1.04 g (20% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.40, 1.42, 1.50 (3s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-6 and H-7); 3.22 (br s, 1H, C≡CH, H-1); 3.87, 3.99 (2m, 2H, H-4); 4.53 (m, 1H, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.4, 23.8, 24.7, 25.8, 26.9, 28.0 (6-CH_3, C(**C**H_3)$_3$, C-6 and C-7); 47.8 (CH, C-1); 68.2 (CH_2, C-4); 72.4 (C≡**C**H, C-1); 79.4, 79.8 (**C**(CH_3)$_3$); 83.3 (**C**≡CH, C-2); 93.3 (**C**(CH_3)$_2$, C-5); 150.7 (C, N**C**O_2).

IR (cm^{-1}): 1697 ($\nu_{C=O}$); 3201 ($\nu_{C\equiv CH}$).
***R*$_f$**: 0.72 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -97.4 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -96.5 ($CHCl_3$; c = 1.23).[55]

(S)-tert-butyl 4-ethynyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*S*)-56b)



MW = 225.29 g.mol^{-1}

$C_{12}H_{19}NO_3$

Method W: Starting from oxazolidine aldehyde (*R*)-**52b** (0.019 mol; 4.42 g), K_2CO_3 (0.038 mol; 5.335 g) and Bestmann-Ohira reagent (0.029 mol; 5.55 g). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-80% PE/EtOAc) and 1.65 g (38% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.40, 1.42, 1.50 (3s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-6 and H-7); 3.22 (br s, 1H, C≡CH, H-1); 3.87, 3.99 (2m, 2H, H-4); 4.52 (m, 1H, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.8, 24.7, 25.8, 26.9, 27.9 (5-CH$_3$, C(**C**H$_3$)$_3$, C-6 and C-7); 47.8 (CH, C-1); 68.2 (CH$_2$, C-4); 72.4 (C≡**C**H, C-1); 79.4, 79.7 (**C**(CH$_3$)$_3$); 83.3 (**C**≡CH, C-2); 93.3 (**C**(CH$_3$)$_2$, C-5); 150.7 (C, N**C**O$_2$).

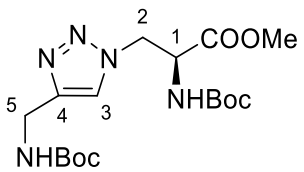
IR (cm^{-1}): 1698 ($\nu_{C=O}$); 3279 ($\nu_{C\equiv CH}$).

***R*$_f$**: 0.72 (SiO_2; PE/EtOAc: 8/2; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +99.4 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: +96.1 ($CHCl_3$; c = 1.22).[42]

(S)-methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*S*)-58a)



MW = 399.45 g.mol^{-1}

$C_{17}H_{29}N_5O_6$

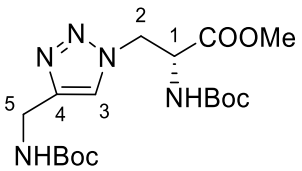
Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (3.0 mmol; 730 mg), *N*-Boc-propargylamine **47** (3.0 mmol; 465 mg), sodium L-ascorbate (0.6 mmol; 120 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.3 mmol; 75 mg).

The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 970 mg (81% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1.38 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.14 (d, 2H, CH_2, *J* = 5.7Hz, H-5); 4.58 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.28 (t, 1H, NH, *J* = 5.1 Hz); 7.39 (d, 1H, NH, *J* = 8.1 Hz); 7.81 (s, 1H, CH, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 28.3 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 35.6 (CH_2, C-5); 49.3 (CH_2, C-2); 52.3 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.8 (CH, C-1); 78.0 (**C**$(CH_3)_3$); 78.9 (**C**$(CH_3)_3$); 123.4 (CH, C-3); 145.6 (C, C-4); 155.2 (N**C**O_2); 155.7 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{C=O}$); 2977 (ν_{NH}).
M.p: 48-50 °C.
***R*$_f$**: 0.35 (SiO_2; EtOAc/PE: 7/3; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = +32.8 ($CHCl_3$; c = 1.00).
UPLC: t_R: 3.52 min; purity: 96%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_{17}H_{30}N_5O_6$, 400.2196, found 400.2195.

(R) methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,
((*R*)-58b)



MW = 399.45 g.mol^{-1}
$C_{17}H_{29}N_5O_6$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.4 mmol; 600 mg), *N*-Boc-propargylamine **47** (2.4 mmol; 380 mg), sodium L-ascorbate (0.48 mmol; 95 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.24 mmol; 60 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 758 mg (77% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1.38 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.14 (d, 2H, CH_2, *J* = 5.7Hz, H-5); 4.58 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.28 (t, 1H, NH, *J* = 5.1 Hz); 7.39 (d, 1H, NH, *J* = 8.1 Hz); 7.81 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 28.1 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 28.3 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 35.6 (CH_2, C-5); 49.3 (CH_2, C-2); 52.3 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.8 (CH, C-1); 78.0 (**C**(CH_3)$_3$); 78.9 (**C**(CH_3)$_3$); 123.4 (CH, C-3); 145.6 (C, C-4); 155.2 (N**C**O_2); 155.7 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1696 ($\nu_{C=O}$); 2977 (ν_{NH}).

M.p: 48-50 °C.

R$_f$: 0.35 (SiO_2; EtOAc/PE: 7/3; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -32.1 ($CHCl_3$; c = 1.00).

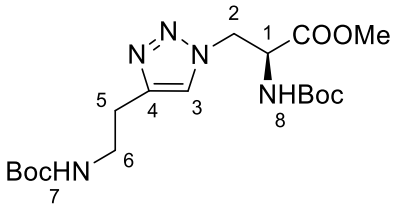
e.e.: >99.5%.

UPLC: t_R: 3.43 min; purity: 98%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{17}H_{30}N_5O_6$, 400.2196, found 400.2196.

(S) methyl -2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*S*)-58c)



MW = 413.48 g.mol^{-1}

$C_{18}H_{31}N_5O_6$

Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (1.84 mmol; 450 mg), *N*-Boc butynylamine **49** (1.84 mmol; 310 mg), sodium L-ascorbate (0.36 mmol; 70 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.18 mmol; 45 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 634 mg (83% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - d_6, 300 MHz) δ: 1.33, 1.37 (2s, 18H, C(CH_3)$_3$); 2.71 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-5); 3.15 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-6); 3.64 (s, 1H, CO_2CH_3); 4.54 (m, 3H, H-1, H-2); 6.86 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-7); 7.39 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8); 7.80 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - d_6, 75 MHz) δ: 25.8 (CH_2, C-5); 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 28.2 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 39.5 (CH_2, C-6); 49.3 (CH_2,C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.6 (CH,C-1); 77.6 (**C**(CH_3)$_3$); 78.7 (**C**(CH_3)$_3$); 122.9 (CH,C-3); 144.1 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 155.5 (N**C**O_2); 170.0 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$).

M.p: 143-145 °C.

R_f: 0.47 (SiO_2; EtOAc/PE: 8/2; Ninhydrin).

$[\alpha]_D^{20}$ = +28.6 ($CHCl_3$; c = 1.00).

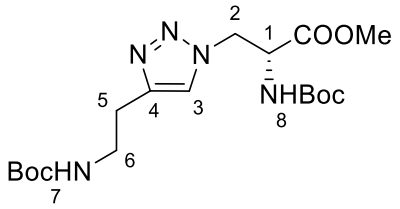
e.e.: 98.9%.

UPLC: t_R: 3.46 min; purity: 97%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_{18}H_{32}N_5O_6$, 414.2353, found 414.2351.

(R) methyl -2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*R*)-58d)



MW = 413.48 g.mol^{-1}

$C_{18}H_{31}N_5O_6$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), *N*-Boc butynylamine **49** (2.0 mmol; 340 mg), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 634 mg (83% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33, 1.37 (2s, 18H, $C(CH_3)_3$); 2.71 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-5); 3.15 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-6); 3.64 (s, 1H, CO_2CH_3); 4.54 (m, 3H, H-1, H-2); 6.86 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-7); 7.39 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-8); 7.80 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 25.8 (CH_2, C-5); 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 28.2 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 39.5 (CH_2,C-6); 49.3 (CH_2,C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.6 (CH,C-1); 77.6 (**C**$(CH_3)_3$); 78.7 (**C**$(CH_3)_3$); 122.9 (CH,C-3); 144.1 (C,C-4); 155.1 (N**C**O_2); 155.5 (N**C**O_2); 170.0 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1683 ($\nu_{C=O}$); 2978 (ν_{NH}).

M.p: 143-145 °C.

R_f: 0.47 (SiO_2; EtOAc/PE: 8/2; Ninhydrin).

$[\alpha]_D^{20}$ = -29.5 ($CHCl_3$; c = 1.00).

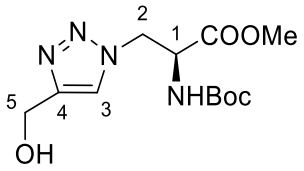
e.e.: >99.5%.

UPLC: t_R: 3.48 min; purity: 100%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{18}H_{32}N_5O_6$, 414.2353, found 414.2352.

(S) methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*S*)-58e)



MW = 300.32 g.mol^{-1}

$C_{12}H_{20}N_4O_5$

Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (1.86 mmol; 455 mg), prop-2-yn-1-ol **57a** (1.86 mmol; 110 µl), sodium L-ascorbate (0.36 mmol; 70 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.18 mmol; 45 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-5% EtOAc/MeOH) and 436 mg (78% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.34 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.65 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.57 (m, 5H, H-2, H-5 and H-1); 5.18 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, OH); 7.43 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH); 7.90 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 49.1 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.7 (CH, C-1); 55.0 (CH_2, C-5); 78.8 (**C**$(CH_3)_3$); 123.3 (CH, C-3); 147.8 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1699 ($\nu_{C=O}$); 2981 (ν_{NH}); 3308 (ν_{OH}).

***R*$_f$**: 0.36 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +40.5 ($CHCl_3$; c = 1.00).

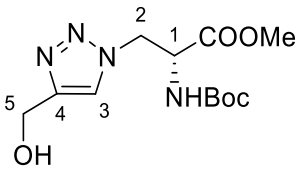
e.e.: 99.1%.

UPLC: t_R: 2.49 min; purity: 98%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{12}H_{21}N_4O_5$, 301.1512, found 301.1511.

(R) methyl -2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*R*)-58f)



MW = 300.32 g.mol^{-1}

$C_{12}H_{20}N_4O_5$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), prop-2-yn-1-ol **57a** (2.0 mmol; 115 µl), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-5% EtOAc/MeOH) and 485 mg (79% yield) of pure product were obtained as yellow oil.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.60 (m, 5H, H-2, H-5 and H-1); 5.18 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, OH); 7.43 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH); 7.89 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 49.1 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.7 (CH, C-1); 55.0 (CH_2, C-5); 78.8 (**C**$(CH_3)_3$); 123.3 (CH, C-3); 147.8 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$); 2975 (ν_{NH}); 3343 (ν_{OH}).

***R*$_f$**: 0.36 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -41.1 ($CHCl_3$; c = 1.00).

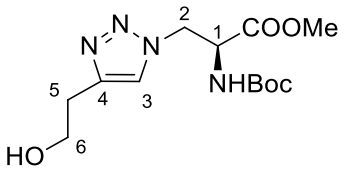
e.e.: 98.5%.

UPLC: t_R: 2.46 min; purity: 100%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_{12}H_{21}N_4O_5$, 301.1512, found 301.1512.

(S) methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*S*)-58g)



MW = 314.16 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{22}N_4O_5$

Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (2.0 mmol; 500 mg), but-3-yn-1-ol **57b** (2.0 mmol; 155 µl), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-5% EtOAc/MeOH) and 488 mg (76% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) ***δ***: 1.33 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 2.74 (t, 2H, CH_2, *J* = 6.9 Hz, H-5); 3.59 (m, 2H, CH_2, H-6); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.59 (m, 4H, H-2, H-1 and O**H**); 7.39 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH); 7.79 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) ***δ***: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 29.1 (CH_2, C-5); 49.2 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.7 (CH, C-1); 60.3 (CH_2, C-6); 78.7 (**C**$(CH_3)_3$); 123.1 (CH, C-3); 144.1 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1685 ($\nu_{C=O}$); 1794 ($\nu_{C=O}$); 3353 (ν_{OH}).

M.p: 80-82 °C.

***R*$_f$**: 0.30 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +37.6 ($CHCl_3$; c = 1.00).

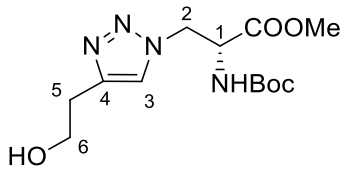
e.e.: 98.6%.

UPLC: t_R: 2.54 min; purity: 100%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_{13}H_{23}N_4O_5$, 315.1668, found 315.1670.

(R) methyl -2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate,

((*R*)-58h)



MW = 314.16 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{22}N_4O_5$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), but-3-yn-1-ol **57b** (2.0 mmol; 155 µl), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-5% EtOAc/MeOH) and 475 mg (74% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 2.74 (t, 2H, CH_2, *J* = 6.9 Hz, H-5); 3.60 (m, 2H, CH_2, H-6); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.60 (m, 4H, H-2, H-1 and O**H**); 7.39 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH); 7.79 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 29.1 (CH_2, C-5); 49.2 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.6 (CH, C-1); 60.3 (CH_2, C-6); 78.7 (**C**$(CH_3)_3$); 123.1 (CH, C-3); 144.1 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$); 1734 ($\nu_{C=O}$); 3355 (ν_{OH}).

M.p: 80-82 °C.

***R*$_f$**: 0.30 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -37.9 ($CHCl_3$; c = 1.00).

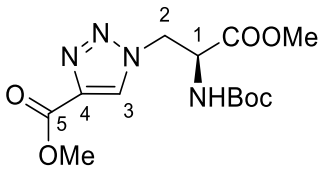
e.e.: 99.5%.

UPLC: t_R: 2.52 min; purity: 98%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_{13}H_{23}N_4O_5$, 315.1668, found 315.1669.

(S) methyl-1-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate,

((*S*)-60a)



MW = 328.32 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{20}N_4O_6$

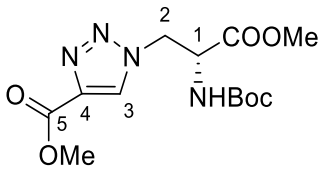
Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (1.84 mmol; 450 mg), methyl propiolate **59a** (1.84 mmol; 165 µl), sodium L-ascorbate (0.36 mmol; 70 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.18 mmol; 45 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 510 mg (84% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) ***δ***: 1.30 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.66 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.83 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.70 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.44 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH); 8.69 (s, 1H, CH, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) ***δ***: 27.9 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 49.7 (CH_2, C-2); 51.7 (CH_3, CO_2**C**H_3); 52.3 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.2 (CH, C-1); 78.8 (**C**$(CH_3)_3$); 129.8 (CH, C-3); 138.4 (C, C-4); 155.1 (N**C**O_2); 160.6 (**C**O_2CH_3, C-5); 169.7 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1697 ($\nu_{C=O}$); 1717 ($\nu_{C=O}$); 2953 (ν_{NH}).
M.p: 136-138 °C.
R$_f$: 0.23 (SiO_2; EtOAc/PE: 7/3; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = +38.4 (MeOH; c = 1.00).
e.e.: 98.6%.
UPLC: t_R: 3.01 min; purity: 96%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{21}N_4O_6$, 329.1461, found 329.1459.

(R) methyl-1-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate,

((*R*)-60b)



MW = 328.32 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{20}N_4O_6$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), methyl propiolate **59a** (2.0 mmol; 182 µl), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-70% PE/EtOAc) and 566 mg (84% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.30 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.66 (s, 3H, CH_3); 3.83 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.70 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.44 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH); 8.69 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 27.9 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 49.2 (CH_2, C-2); 51.7 (CH_3, CO_2**C**H_3); 52.3 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.2 (CH, C-1); 78.8 (**C**$(CH_3)_3$); 129.8 (CH, C-3); 138.4 (C, C-4); 155.0 (N**C**O_2); 160.6 (**C**O_2CH_3, C-5); 169.7 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1697 ($\nu_{C=O}$); 1719 ($\nu_{C=O}$); 2988 (ν_{NH}).

M.p: 136-138 °C.

R$_f$: 0.23 (SiO_2; EtOAc/PE: 7/3; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -40.9 (MeOH; c = 1.00).

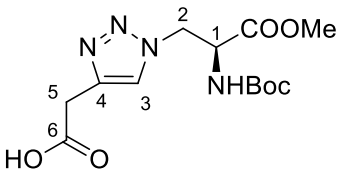
e.e.: 97.9%.

UPLC: *t$_R$*: 3.02 min; purity: 98%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{21}N_4O_6$, 329.1461, found 329.1453.

(S)-2-(1-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)acetic acid,

((*S*)-60c)



MW = 328.14 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{20}N_4O_6$

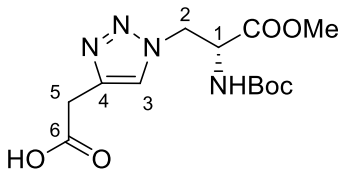
Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (4.0 mmol; 1.00 g), but-3-ynoic acid **59b** (4.0 mmol; 340 mg), sodium L-ascorbate (0.8 mmol; 160 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.4 mmol; 100 mg). The crude product was purified by C18 flash chromatography (eluent: 0-20% H_2O/ACN) and 863 mg (64% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.39 (s, 2H, CH_2, H-5); 3.63 (s, 3H, CO_2CH_3); 4.55 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.49 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH); 7.89 (s, 1H, CH, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.9 (3-CH_3, (**C**$H_3)_3$); 35.6 (CH_2, C-5); 49.1 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.9 (CH, C-1); 78.7 (**C**$(CH_3)_3$); 123.9 (CH, C-3); 143.4 (C, C-4); 155.2 (N**C**O_2); 170.2 (**C**O_2H, C-6); 175.6 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1704 ($\nu_{C=O}$).
M.p: 148-150 °C.
***R*$_f$**: 0.15 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).
[α]$_D^{25}$ = -19 (EtOH; c = 1.04).
e.e.: 97.2%.
UPLC: t_R: 2.45 min; purity: 86%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{21}N_4O_6$, 329.1461, found 329.1469.

(R)-2-(1-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)acetic acid,

((*R*)-60d)



MW = 328.14 g.mol^{-1}

$C_{13}H_{20}N_4O_6$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (4.0 mmol; 1.00 g), but-3-ynoic acid **59b** (4.0 mmol; 340 mg), sodium L-ascorbate (0.8 mmol; 160 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.4 mmol; 100 mg). The crude product was purified by C18 flash chromatography (eluent: 0-20% H_2O/ACN) and 760 mg (56% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.33 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.37 (s, 2H, CH_2, H-5); 3.63 (s, 3H, CH_3); 4.55 (m, 3H, H-2 and H-1); 7.49 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH); 7.87 (s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**H_3)$_3$); 34.9 (CH_2, C-5); 49.0 (CH_2, C-2); 52.2 (CO_2**C**H_3); 53.9 (CH, C-1); 78.8 (**C**$(CH_3)_3$); 123.8 (CH, C-3); 143.5 (C, C-4); 155.2 (N**C**O_2); 170.2 (**C**O_2H, C-6); 175.4 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1704 ($\nu_{C=O}$).

M.p: 148-150 °C.

R$_f$: 0.15 (SiO_2; EtOAc/MeOH: 95/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{25}$ = +19 (EtOH; c = 0.88).

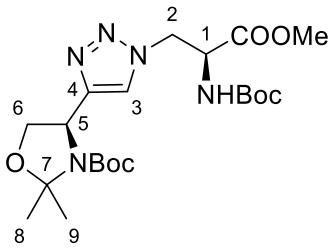
e.e.: 98.2%.

UPLC: *t$_R$*: 2.62 min; purity: 97%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{21}N_4O_6$, 329.1461, found 329.1465.

(R)-tert-butyl 6-(1-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*2S*, *6R*)-61a)



MW = 469.54 g.mol^{-1}

$C_{21}H_{35}N_5O_7$

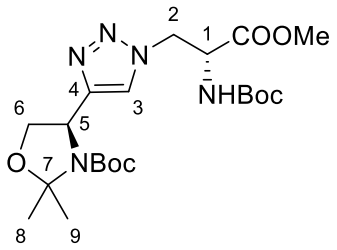
Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (2.0 mmol; 500 mg), alkyne (*R*)-**56a** (2.0 mmol; 460 mg), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•5H_2O (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 655 mg (68% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.27, 1.33, 1.42, 1.48 and 1.55 (5s, 24H, 2-C(C**H**$_3$)$_3$, H-8 and H-9); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.96 and 4.19 (2m, 2H, CH_2, H-6); 4.45-4.73 (2m, 3H, CH_2, H-2 and H-5); 4.98 (m, 1H, H-1); 7.42 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH); 7.82, 7.88 (2s, 1H, CH, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.3, 24.4, 25.9, 26.9, 27.9 (8-CH_3, C(**C**H_3)$_3$, C-8 and C-9); 49.2 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H_3); 53.2 (CH, C-1); 53.7, 53.9 (CH, C-5); 67.7, 68.3 (CH_2, C-6); 78.7, 79.0, 79.5 (2-**C**(CH_3)$_3$); 93.3 (**C**(CH_3)$_2$); 122.9, 123.1 (CH, C-3); 147.8, 148.2 (C, C-4); 150.9, 151.1 (N**C**O_2); 155.2 (N**C**O_2); 170.1 (**C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}): 1698 ($\nu_{C=O}$); 2982 (ν_{NH}).
M.p: 49-51 °C; litt : 47-49 °C.[42]
***R*$_f$**: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -22.1 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -20.9 ($CHCl_3$; c = 0.94).[42]
e.e.: >99.5%.
d.r.: 91.67/8.33 (R*S*/R*R*).
UPLC: t_R: 3.93 min; purity: 97%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{21}H_{36}N_5O_7$, 470.2615, found 470.2621.

(R)tert-butyl-6-(1-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate

((*2R, 6R*)-61b)



MW = 469.54 g.mol^{-1}

$C_{21}H_{35}N_5O_7$

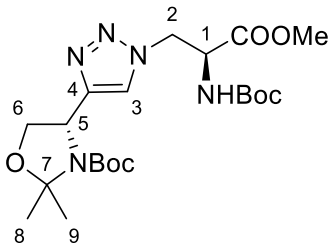
Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), alkyne (*R*)-**56a** (2.0 mmol; 460 mg), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 754 mg (78% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.27, 1.33, 1.42, 1.48 and 1.56 (5s, 24H, 2-C(C**H**$_3$)$_3$, H-8 and H-9); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.96 and 4.19 (2m, 2H, CH_2, H-6); 4.52-4.70 (2m, 3H, CH_2, H-2 and H-5); 4.99 (m, 1H, H-1); 7.43 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, NH); 7.80, 7.88 (2s, 1H, CH, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.4, 24.4, 25.9, 26.9, 27.9 (8-CH_3, C(**C**H$_3$)$_3$, C-8 and C-9); 49.1 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H$_3$); 53.2 (CH, C-1); 53.8 (CH, C-5); 67.7, 68.3 (CH_2, C-6); 78.7, 79.0, 79.5 (2-**C**(CH$_3$)$_3$); 93.3 (**C**(CH$_3$)$_2$); 123.0, 123.3 (CH, C-3); 147.7, 148.1 (C, C-4); 150.9, 151.2 (N**C**O$_2$); 155.1 (N**C**O$_2$); 170.1 (**C**O$_2$CH$_3$).

IR (cm^{-1}): 1697 ($\nu_{C=O}$); 2982 (ν_{NH}).
M.p: 49-51 °C; litt : 47-49 °C.[42]
R$_f$: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; Ninhydrin).
[α]$_D^{20}$ = -78.9 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: -79.0 ($CHCl_3$; c = 0.93).[42]
e.**e**.: >99.5%.
d.**r**.: 92.04/7.96 (R*R*/R*S*).
UPLC: *t$_R$*: 3.93 min; purity: 98%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{21}H_{36}N_5O_7$, 470.2615, found 470.2613.

(S)tert-butyl-6-(1-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*2S, 6S*)-61c)



MW = 469.54 g.mol^{-1}

$C_{21}H_{35}N_5O_7$

Method X: Starting from azide (*S*)-**44a** (2.0 mmol; 500 mg), alkyne (*S*)-**56b** (2.0 mmol; 460 mg), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 790 mg (72% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.27, 1.33, 1.42, 1.48 and 1.56 (5s, 24H, 2-C(C**H**$_3$)$_3$, H-8 and H-9); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.95 and 4.19 (2m, 2H, CH_2, H-6); 4.48-4.75 (2m, 3H, CH_2, H-2 and H-5); 4.99 (m, 1H, H-1); 7.42 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, NH); 7.80, 7.88 (2s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.4, 24.4, 25.9, 26.9, 27.9 (8-CH_3, C(**C**H$_3$)$_3$, C-8 and C-9); 49.1 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H$_3$); 53.2 (CH, C-1); 53.8 (CH, C-5); 67.7, 68.3 (CH_2, C-6); 78.7, 79.0, 79.5 (2-**C**(CH$_3$)$_3$); 93.3 (**C**(CH$_3$)$_2$); 123.0, 123.3 (CH, C-3); 147.8, 148.1 (C, C-4); 150.9, 151.2 (N**C**O$_2$); 155.1 (N**C**O$_2$); 170.0 (**C**O$_2$CH$_3$).

IR (cm^{-1}): 1695 ($\nu_{C=O}$); 2982 (ν_{NH}).

M.p: 49-51 °C; litt : 47-49 °C.[42]

***R*$_f$**: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +77.3 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: +80.7 ($CHCl_3$; c = 0.86).[42]

e.e.: >99.5%.

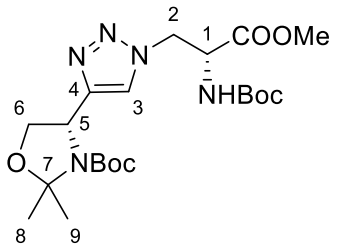
d.r.: 91.31/8.69 (R*R*/R*S*).

UPLC: t_R: 3.90 min; purity: 98%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{21}H_{36}N_5O_7$, 470.2615, found 470.2618.

(S)tert-butyl-6-(1-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*2R, 6S*)-61d)



MW = 469.54 g.mol^{-1}

$C_{21}H_{35}N_5O_7$

Method X: Starting from azide (*R*)-**44b** (2.0 mmol; 500 mg), alkyne (*S*)-**56b** (2.0 mmol; 460 mg), sodium L-ascorbate (0.4 mmol; 80 mg) and $CuSO_4$•$5H_2O$ (0.2 mmol; 50 mg). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-50% PE/EtOAc) and 727 mg (77% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.27, 1.33, 1.42, 1.48 and 1.55 (5s, 24H, 2-C(C**H**$_3$)$_3$, H-8 and H-9); 3.64 (s, 3H, CO_2CH_3); 3.95 and 4.19 (2m, 2H, CH_2, H-6); 4.48-4.75 (2m, 3H, CH_2, H-2 and H-5); 4.99 (m, 1H, H-1); 7.42 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH); 7.82, 7.88 (2s, 1H, CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 23.3, 24.4, 25.9, 26.9, 28.0 (8-CH_3, C(**C**H$_3$)$_3$, C-8 and C-9); 49.2 (CH_2, C-2); 52.2 (CH_3, CO_2**C**H$_3$); 53.2 (CH, C-1); 54.0 (CH, C-5); 67.7, 68.3 (CH_2, C-6); 78.7, 79.0, 79.5 (2-**C**(CH$_3$)$_3$); 93.3 (**C**(CH$_3$)$_2$); 122.9, 123.1 (CH, C-3); 147.8, 148.2 (C, C-4); 150.9, 151.2 (N**C**O$_2$); 155.2 (N**C**O$_2$); 170.1 (**C**O$_2$CH$_3$).

IR (cm^{-1}): 1694 ($\nu_{C=O}$); 2982 (ν_{NH}).

M.p: 49-51 °C; litt : 47-49 °C.[42]

R$_f$: 0.32 (SiO_2; PE/EtOAc: 5/5; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +22.3 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt: +22.1 ($CHCl_3$; c = 0.93).[42]

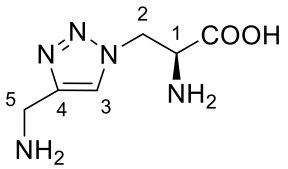
e.**e**.: >99.5%.

d.**r**.: 92.5/7.5 (R*S*/R*R*).

UPLC: t_R: 3.91 min; purity: 100%.

HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_{21}H_{36}N_5O_7$, 470.2615, found 470.2622.

(S)-2-amino-3-(4-(aminomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*S*)-62a)



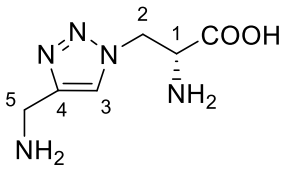
MW = 185.19 g.mol^{-1}
$C_6H_{11}N_5O_2$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**58a** (0.75 mmol; 300 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.1 M NH_4OH elution) and 80 mg (57% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.84 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1); 4.23 (s, 2H, H-5); 4.70 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, H-2); 7.99 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 34.1 (CH_2, C-5); 53.4 (CH_2, C-2); 55.7 (CH, C-1); 125.3 (CH, C-3); 141.2 (C, C-4); 177.0 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1587 ($\nu_{C=O}$); 3012 (ν_{NH2}).
M.p: 209-211 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = -12 (H_2O; c = 1.30).
UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 100%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_6H_{12}N_5O_2$, 186.0991, found 186.0991.

(R)-2-amino-3-(4-(aminomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*R*)-62b)



MW = 185.19 g.mol^{-1}
$C_6H_{11}N_5O_2$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**58b** (0.75 mmol; 300 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.1 M NH_4OH elution) and 60 mg (43% yield) of pure product were obtained as white crystals.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.85 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1); 4.23 (s, 2H, H-5); 4.70 (d, 2H, *J* = 4.5 Hz, H-2); 7.99 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 34.1 (CH_2, C-5); 53.2 (CH_2, C-2); 55.5 (CH, C-1); 125.4 (CH, C-3); 140.9 (C, C-4); 176.6 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1587 ($\nu_{C=O}$); 2917 (ν_{NH2}).

M.p: 209-211 °C.

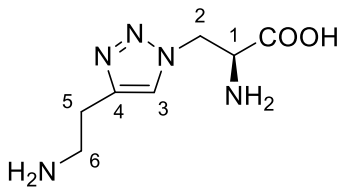
$[\alpha]_D^{25}$ = +12 (H_2O; c = 0.96).

UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 96%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_6H_{12}N_5O_2$, 186.0991, found 186.0994.

(S)-2-amino-3-(4-(2-aminoethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,

((*S*)-62c)



MW = 199.21 g.mol^{-1}

$C_7H_{13}N_5O_2$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**58c** (0.72 mmol; 300 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.1 M NH_4OH elution) and 70 mg (48% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.08 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-5); 3.30 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-6); 3.76 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1); 4.62 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 7.82 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 22.9 (CH_2, C-5); 38.8 (CH_2, C-6); 53.7 (CH_2, C-2); 56.0 (CH, C-1); 124.5 (CH, C-3); 143.1 (C, C-4); 178.0 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1601 ($\nu_{C=O}$).

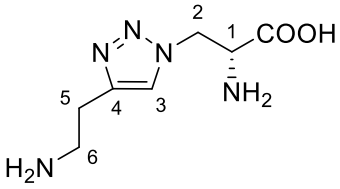
M.p: 202-204 °C.

$[\alpha]_D^{25}$ = -10 (H_2O; c = 0.90).

UPLC: t_R: 0.53 min; purity: 91%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_2$, 200.1147, found 200.1126.

(R)-2-amino-3-(4-(2-aminoethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid ,
((*R*)-62d)



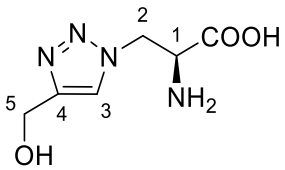
MW = 199.21 g.mol^{-1}
$C_7H_{13}N_5O_2$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**58d** (0.72 mmol; 300 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.1 M NH_4OH elution) and 70 mg (48% yield) of pure product were obtained as pale yellow powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.08 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-5); 3.30 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-6); 3.76 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, H-1); 4.62 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, H-2); 7.82 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 22.9 (CH_2, C-5); 38.8 (CH_2, C-6); 53.7 (CH_2, C-2); 56.0 (CH, C-1); 124.5 (CH, C-3); 143.1 (C, C-4); 178.1 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1599 ($\nu_{C=O}$).
M.p: 202-204 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = +10 (H_2O; c = 1.02).
UPLC: t_R: 0.53 min; purity: 90%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_2$, 200.1147, found 200.1151.

(S)-2-amino-3-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*S*)-62e)



MW = 186.17 g.mol^{-1}
$C_6H_{10}N_4O_3$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**58e** (0.99 mmol; 300 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 80 mg (43% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 4.30 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-1); 4.72 (s, 2H, H-5); 4.97 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 7.97 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 49.7 (CH_2, C-5); 54.3 (CH, C-1); 54.4 (CH_2, C-2); 124.8 (CH, C-3); 147.1 (C, C-4); 170.3 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1591 ($\nu_{C=O}$); 3207 (ν_{OH}).

M.p: 221-223 °C.

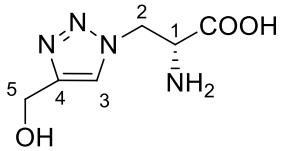
$[\alpha]_D^{25}$ = -22 (H_2O; c = 1.23); litt: -6 (H_2O; c = 0.05).[60]

UPLC: t_R: 0.58 min; purity: 88%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_6H_{11}N_4O_3$, 187.0831, found 187.0832.

(R)-2-amino-3-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,

((*R*)-62f)



MW = 186.17 g.mol^{-1}

$C_6H_{10}N_4O_3$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**58f** (1.6 mmol; 485 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 120 mg (40% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 4.29 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-1); 4.71 (s, 2H, H-5); 4.95 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 7.96 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 49.7 (CH_2, C-5); 54.3 (CH, C-1); 54.4 (CH_2, C-2); 124.7 (CH, C-3); 147.0 (C, C-4); 170.3 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1608 ($\nu_{C=O}$); 3207 (ν_{OH}).

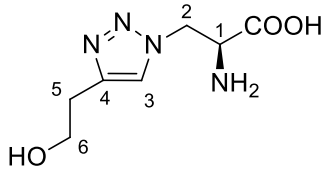
M.p: 221-223 °C.

$[\alpha]_D^{25}$ = +22 (H_2O; c = 1.23).

UPLC: t_R: 0.58 min; purity: 100%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_6H_{11}N_4O_3$, 187.0831, found 187.0835.

(S)-2-amino-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*S*)-62g)



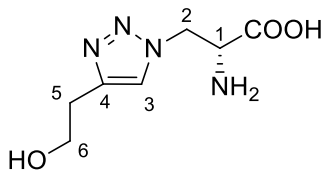
MW = 200.20 g.mol^{-1}
$C_7H_{12}N_4O_3$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**58g** (0.63 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 50 mg (40% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 2.93 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-5); 3.85 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-6); 4.27 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1); 4.93 (d, 2H, *J* = 6 Hz, H-2); 7.82 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ*: 27.6 (CH_2, C-5); 49.6 (CH_2, C-2); 54.3 (CH, C-1); 60.4 (CH_2, C-6); 124.5 (CH, C-3); 145.6 (C, C-4); 170.4 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1576 ($\nu_{C=O}$); 3011 (ν_{NH2}).
M.p: 242-244 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = 0 (H_2O; c = 0.61).
UPLC: t_R: 0.66 min; purity: 96%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{13}N_4O_3$, 201.0989, found 201.0988.

(R)-2-amino-3-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*R*)-62h)



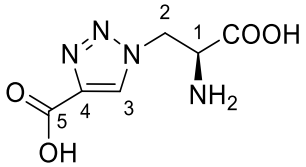
MW = 200.20 g.mol^{-1}
$C_7H_{12}N_4O_3$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**58h** (0.63 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 50 mg (40% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 2.93 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-5); 3.85 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-6); 4.27 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1); 4.93 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-2); 7.82 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 27.6 (CH_2, C-5); 49.6 (CH_2, C-2); 54.3 (CH, C-1); 60.4 (CH_2, C-6); 124.5 (CH, C-3); 145.6 (C, C-4); 170.4 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1580 ($\nu_{C=O}$); 3052 (ν_{NH2}).
M.p: 242-244 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = 0 (H_2O; c = 0.80).
UPLC: t_R: 0.68 min; purity: 86%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{13}N_4O_3$, 201.0988, found 201.0990.

(S)-1-(2-amino-2-carboxyethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid,
((*S*)-63a)



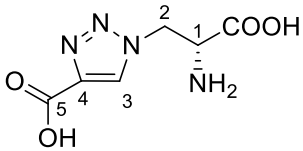
MW = 200.15 g.mol^{-1}
$C_6H_8N_4O_4$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**60a** (0.60 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 25 mg (21% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR ((DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 4.51 (t, 1H, *J* = 6 Hz, H-1); 4.92 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, H-2); 8.66 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 48.9 (CH_2, C-2); 52.0 (CH, C-1); 130.3 (CH, C-3); 139.8 (C, C-4); 161.6 (C, **C**O_2H), 168.0 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1607 ($\nu_{C=O}$); 1684 ($\nu_{C=O}$); 3111 (ν_{OH}).
M.p: 229-231 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = -1 (HCl [1 M]; c = 0.38); litt: 10 (H_2O; c = 0.1).[60]
UPLC: t_R: 0.57 min; purity: 90%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_6H_9N_4O_4$, 201.0624, found 201.0621.

(R)-1-(2-amino-2-carboxyethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid,
((*R*)-63b)



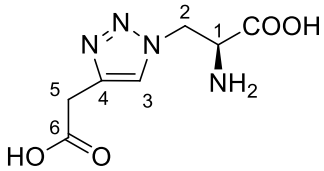
MW = 200.15 g.mol^{-1}
$C_6H_8N_4O_4$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**60b** (0.60 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 30 mg (25% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR ((DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 4.54 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-1); 4.95 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, H-2); 8.65 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 48.9 (CH_2, C-2); 51.9 (CH, C-1); 130.5 (CH, C-3); 139.9 (C, C-4); 161.7 (C, **C**O_2H), 168.1 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1621 ($\nu_{C=O}$); 1683 ($\nu_{C=O}$); 3106 (ν_{OH}).
M.p: 229-231 °C.
[α]$_D^{25}$ = +1 (HCl [1 M]; c = 0.29).
UPLC: t_R: 0.57 min; purity: 90%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_6H_9N_4O_4$, 201.0624, found 201.0624.

(S)-2-amino-3-(4-(carboxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*S*)-63c)



MW = 214.18 g.mol^{-1}
$C_7H_{10}N_4O_4$

Method Y: Starting from triazole (*S*)-**60c** (0.60 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 60 mg (46% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.81 (s, 2H, H-5); 4.31 (m, 1H, H-1); 4.95 (m, 2H, H-2); 7.91 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 31.5 (CH_2, C-5); 49.7 (CH_2, C-2); 54.3 (CH, C-1); 124.3 (CH, C-3); 141.9 (C, C-4); 170.3 (C, **C**O_2H); 175.6 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1580 ($\nu_{C=O}$).

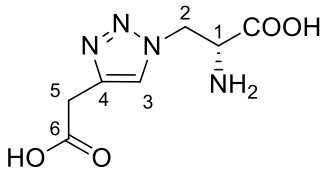
M.p: 240-242 °C.

$[\alpha]_D^{25}$ = -10 (H_2O; c = 0.65).

UPLC: t_R: 0.63 min; purity: 100%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{11}N_4O_4$, 215.0780, found 215.0782.

(R)-2-amino-3-(4-(carboxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*R*)-63d)



MW = 214.18 g.mol^{-1}
$C_7H_{10}N_4O_4$

Method Y: Starting from triazole (*R*)-**60d** (0.60 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 57 mg (44% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.79 (s, 2H, H-5); 4.30 (m, 1H, H-1); 4.96 (m, 2H, H-2); 7.90 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 33.1 (CH_2, C-5); 49.7 (CH_2, C-2); 54.4 (CH, C-1); 125.0 (CH, C-3); 143.4 (C, C-4); 170.3 (C, **C**O_2H); 177.4 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1575 ($\nu_{C=O}$).

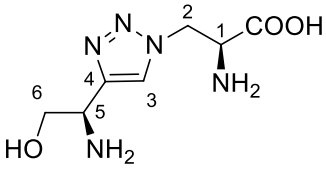
M.p: 240-242 °C.

$[\alpha]_D^{25}$ = +12 (H_2O; c = 0.52).

UPLC: t_R: 0.63 min; purity: 100%.

HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{11}N_4O_4$, 215.0780, found 215.0784.

(S)-2-amino-3-(6-((R)-1-amino-2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*2S, 6R*)-64a)



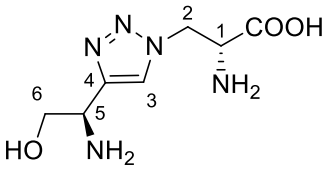
MW = 215.21 g.mol^{-1}
$C_7H_{13}N_5O_3$

Method Y: Starting from triazole (*2S, 6R*)-**61a** (0.42 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 20 mg (22% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.94 (m, 2H, CH_2, H-6); 4.07 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz, H-1); 4.55 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-5); 4.84 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, H-2); 8.02 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 48.6 (CH_2, C-5); 51.7 (CH_2, C-2); 55.0 (CH, C-1); 62.3 (CH_2, C-6); 124.6 (CH, C-3); 143.7 (C, C-4); 173.7 (C, **C**O_2H).

IR (cm^{-1}): 1577 ($\nu_{C=O}$); 3008 (ν_{NH2}).
M.p: 219-221 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = -23 (H_2O; c = 0.28).
UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 100%.
HRMS:[M + H]$^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_3$, 216.1097, found 216.1095.

(R)-2-amino-3-(6-((R)-1-amino-2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*2R, 6R*)-64b)



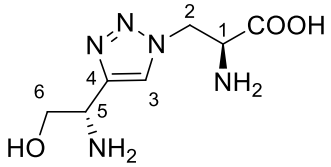
MW = 215.21 g.mol^{-1}
$C_7H_{13}N_5O_3$

Method Y: Starting from triazole (*2R, 6R*)-**61b** (0.42 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 40 mg (44% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 4.04 (m, 2H, CH_2, H-6); 4.33 (t, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 4.75 (m, 1H,H-5); 5.01 (dd, 2H, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 1.8 Hz, H-2); 8.13 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 48.5 (CH_2, C-5); 49.9 (CH_2, C-2); 54.2 (CH, C-1); 60.9 (CH_2, C-6); 125.4 (CH, C-3); 141.3 (C, C-4); 170.2 (C, **C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1559 ($\nu_{C=O}$); 3008 (ν_{NH2}).
M.p: 212-214 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = +23 (H_2O; c = 0.39).
UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 100%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_3$, 216.1097, found 216.1099.

(S)-2-amino-3-(6-((S)-1-amino-2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid,
((*2S, 6S*)-64c)



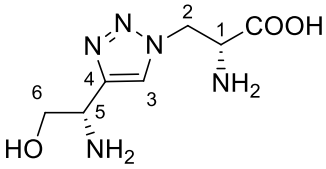
MW = 215.21 g.mol^{-1}
$C_7H_{13}N_5O_3$

Method Y: Starting from triazole (*2S, 6S*)-**61c** (0.42 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 33 mg (33% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.95 (m, 2H, CH_2, H-6); 4.09 (t, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 4.57 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, H-5); 4.85 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 8.03 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 48.5 (CH_2, C-5); 51.5 (CH_2, C-2); 54.9 (CH, C-1); 62.1 (CH_2, C-6); 124.8 (CH, C-3); 143.0 (C, C-4); 173.3 (C, **C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1590 ($\nu_{C=O}$); 3008 (ν_{NH2}).
M.p: 212-214 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = -3 (H_2O; c = 0.37).
UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 100%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_3$, 216.1097, found 216.1096.

(R)-2-amino-3-(6-((S)-1-amino-2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoic acid ((*2R, 6S*)-64d)



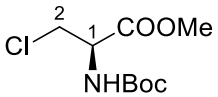
MW = 215.21 g.mol^{-1}
$C_7H_{13}N_5O_3$

Method Y: Starting from triazole (*2R, 6S*)-**61d** (0.42 mmol; 200 mg). The crude product was purified using a cation exchange resin column (0.05 M NH_4OH elution) and 20 mg (22% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (D_2O, 300 MHz) *δ*: 3.91 (m, 2H, CH_2, H-6); 4.00 (t, 1H, *J* = 4.5 Hz, H-1); 4.48 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, H-5); 4.85 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, H-2); 8.00 (s, 1H, H-3).
^{13}C NMR (D_2O, 75 MHz) *δ:* 48.6 (CH_2, C-5); 52.2 (CH_2, C-2); 55.2 (CH, C-1); 62.8 (CH_2, C-6); 124.4 (CH, C-3); 144.5 (C, C-4); 174.7 (C, **C**OOH).

IR (cm^{-1}): 1577 ($\nu_{C=O}$); 3008 (ν_{NH2}).
M.p: 219-221 °C.
$[\alpha]_D^{25}$ = +3 (H_2O; c = 0.39).
UPLC: t_R: 0.52 min; purity: 100%.
HRMS:$[M + H]^+$ calcd for $C_7H_{14}N_5O_3$, 216.1097, found 216.1105.

(R)-methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-chloropropanoate, ((*R*)-66)



MW = 237.68 g.mol^{-1}
$C_9H_{16}ClNO_4$

Method Z: Starting from *N*-Boc-serine methyl ester (*S*)-**42a** (2 g, 9.12 mmol), PPh_3 (2.63 g, 10 mmol) and hexachloroethane (2.37 g, 10 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 1.08 g (50% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.39 (s, 9H, $(CH_3)_3$); 3.66 (s, 3H, OCH_3); 3.81 (m, CH_2, H-2); 4.37 (m, 1H, H-1); 7.44 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 28.0 (3-CH_3, (**C**$H_3)_3$); 43.8 (CH_2, C-2); 52.3 (CH_3, O**C**H_3); 55.0 (CH, C-1); 78.7 (C, **C**$(CH_3)_3$); 155.2 (C, N**C**O_2); 169.8 (C, **C**O_2CH_3).

IR (cm^{-1}):

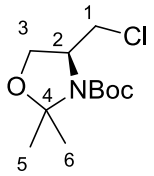
M.p: 60-62 °C; litt : 62-64 °C.[61]

***R*$_f$**: 0.5 (SiO_2; PE/EtOAc: 9/1; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = +38.9 ($CHCl_3$; c = 1.00); litt : +37.8 ($CHCl_3$; c = 1.5).[61]

(S)-tert-butyl 4-(chloromethyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate,

((*S*)-67)



MW = 249.11 g.mol^{-1}

$C_{11}H_{20}ClNO_3$

Method AA: Starting from alcohol oxazolidine alcohol (*S*)-**51a** (2 g, 8.64 mmol), PPh_3 (2.95 g, 11 mmol) and CCl_4 (1.1 mL, 11 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 990 mg (46% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.42, 1.48 (2s, 15H, C(C**H**$_3)_3$, H-5 and H-6); 3.55, 3.68 (2m, 2H, CH_2, H-3); 3.88, 4.02 (2m, 2H, CH_2, H-1); 4.02 (m, 1H, CH, H-2).

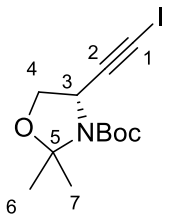
^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 22.8, 24.1, 26.3, 27.0, 27.9 (5-CH_3, C(**C**$H_3)_3$, C-5 and C-6); 43.1, 43.8 (CH_2, C-3); 57.5, 57.7 (CH, C-2); 64.6, 65.0 (CH_2, C-1); 79.5, 79.9 (**C**$(CH_3)_3$); 93.3, 93.5 (**C**$(CH_3)_2$, C-4); 150.7, 151.3 (N**C**O_2).

IR (cm^{-1}): 1694 ($\nu_{C=O}$); 3124 (ν_{NH2}).

***R*$_f$**: 0.67 (SiO_2; PE/EtOAc: 9/1; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -16.9 ($CHCl_3$; c = 1.00).

(S)-tert-butyl 4-(iodoethynyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate, ((*R*)-73)



MW = 351.18 g.mol^{-1}
$C_{12}H_{18}INO_3$

Method AB: Starting from alkyne (*R*)-**56a** (1 g, 4.43 mmol), CuI (42 mg, 0.22 mmol), *N*-iodomorpholine (1.66 g, 4.88 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (eluent: 0-10% PE/EtOAc) and 1 g (45% yield) of pure product were obtained as white powder.

^{1}H NMR (DMSO - *d*$_6$, 300 MHz) *δ*: 1.39, 1.41, 1.69 (3s, 15H, C(C**H**$_3$)$_3$, H-6 and H-7); 3.54, 4.09 (2m, 2H, H-4); 4.30 (m, 1H, C≡CH, H-3).

^{13}C NMR (DMSO - *d*$_6$, 75 MHz) *δ*: 24.5, 25.9, 28.0 (5-CH$_3$, C(**C**H$_3$)$_3$, C-6 and C-7); 29.8 (C≡**C**I, C-1); 66.1 (CH$_2$, C-4); 68.3 (CH, C-1); 79.4 (**C**(CH$_3$)$_3$); 94.6 (**C**(CH$_3$)$_2$, C-5); 123.4 (**C**≡CH, C-2); 150.7 (C, N**C**O$_2$).

IR (cm^{-1}): 1684 ($\nu_{C=O}$); 2949 (ν_{NH}).

M.p: 63-55 °C; litt : 61 °C. [49,62]

***R*$_f$**: 0.43 (SiO$_2$; PE/EtOAc: 9/1; Ninhydrin).

[α]$_D^{20}$ = -100 (CDCl$_3$; c = 3.00); litt: -104 (CHCl$_3$; c = 3.4). [49,62]

V. Références bibliographiques

(1) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
(2) Mayer, C.; Kluj, R. M.; Mühleck, M.; Walter, A.; Unsleber, S.; Hottmann, I.; Borisova, M. Bacteria's Different Ways to Recycle Their Own Cell Wall. *Int. J. Med. Microbiol.* **2019**, No. April, 151326.
https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.006.
(3) Matteï, P.-J.; Neves, D.; Dessen, A. Bridging Cell Wall Biosynthesis and Bacterial Morphogenesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20* (6), 749–755.
https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.014.
(4) Rausch, S.; Hänchen, A.; Denisiuk, A.; Löhken, M.; Schneider, T.; Süssmuth, R. D. Feglymycin Is an Inhibitor of the Enzymes MurA and MurC of the Peptidoglycan Biosynthesis Pathway. *ChemBioChem* **2011**, *12* (8), 1171–1173.
https://doi.org/10.1002/cbic.201100120.
(5) Van Heijenoort, J. Recent Advances in the Formation of the Bacterial Peptidoglycan Monomer Unit. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (5), 503–519.
https://doi.org/10.1039/a804532a.
(6) Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 168–207.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
(7) Eschenburg, S.; Kabsch, W.; Healy, M. L.; Schonbrunn, E. A New View of the Mechanisms of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) and 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (AroA) Derived from X-Ray Structures of Their Tetrahedral Reaction Intermediate States. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (49), 49215–49222.
https://doi.org/10.1074/jbc.M309741200.
(8) Hrast, M.; Sosič, I.; Šink, R.; Gobec, S. Inhibitors of the Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes MurA-F. *Bioorg. Chem.* **2014**, *55*, 2–15.
https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.03.008.
(9) Lovering, A. L.; Safadi, S. S.; Strynadka, N. C. J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81* (1), 451–478.
https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-112742.
(10) Miyachiro, M. M.; Granato, D.; Trindade, D. M.; Ebel, C.; Paes Leme, A. F.; Dessen, A. Complex Formation between Mur Enzymes from *Streptococcus Pneumoniae*. *Biochemistry* **2019**, *58* (30), 3314–3324.
https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00277.
(11) Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I.; Mayer, C.; Kluj, R. M.; Mühleck, M.; Walter, A.; Unsleber, S.; Hottmann, I.; et al. Inhibitors of the Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes MurA-F. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *55* (3), 167–173.
https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.03.008.
(12) Bouhss, A.; Trunkfield, A. E.; Bugg, T. D. H.; Mengin-Lecreulx, D. The Biosynthesis of Peptidoglycan Lipid-Linked Intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 208–233.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00089.x.
(13) Hao, H.; Cheng, G.; Dai, M.; Wu, Q.; Yuan, Z. Inhibitors Targeting on Cell Wall Biosynthesis Pathway of MRSA. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8* (11), 2828–2838.
https://doi.org/10.1039/c2mb25188d.
(14) Mohammadi, T.; Van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-De Bruin, M.; Nguyen-Distéche, M.; De Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a Transporter of Lipid-Linked Cell Wall Precursors across the Membrane. *EMBO J.* **2011**, *30* (8), 1425–1432.
https://doi.org/10.1038/emboj.2011.61.

(15) Hutton, C. A.; Perugini, M. A.; Gerrard, J. A. Inhibition of Lysine Biosynthesis: An Evolving Antibiotic Strategy. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3* (7), 458–465.
https://doi.org/10.1039/b705624a.
(16) Kale, M.; Shaikh, M. S. Exploration of Lysine Pathway for Developing Newer Anti-Microbial Analogs through Enzyme Inhibition Approach. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *25* (2), 221–230.
(17) Cox, R. J. The DAP Pathway to Lysine as a Target for Antimicrobial Agents. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13* (1), 29–43.
https://doi.org/10.1039/np9961300029.
(18) Liu, Y.; Xie, S.; Yu, J. Genome-Wide Analysis of the Lysine Biosynthesis Pathway Network during Maize Seed Development. *PLoS One* **2016**, *11* (2), 1–21.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148287.
(19) Born, T. L.; Blanchard, J. S. Structure/Function Studies on Enzymes in the Diaminopimelate Pathway of Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3* (5), 607–613.
https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00016-2.
(20) Fazius, F.; Zaehle, C.; Brock, M. Lysine Biosynthesis in Microbes: Relevance as Drug Target and Prospects for β-Lactam Antibiotics Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (9), 3763–3772.
https://doi.org/10.1007/s00253-013-4805-1.
(21) Pavelka, M. S.; Jacobs, W. R. Biosynthesis of Diaminopimelate, the Precursor of Lysine and a Component of Peptidoglycan, Is an Essential Function of Mycobacterium Smegmatis. *J. Bacteriol.* **1996**, *178* (22), 6496–6507.
https://doi.org/10.1128/jb.178.22.6496-6507.1996.
(22) Momany, C.; Ghosh, R.; Hackert, M. L. Structural Motifs for Pyridoxal-5′-phosphate Binding in Decarboxylases: An Analysis Based on the Crystal Structure of the Lactobacillus 30a Ornithine Decarboxylase. *Protein Sci.* **1995**, *4* (5), 849–854.
https://doi.org/10.1002/pro.5560040504.
(23) Sandmeier, E.; Hale, T. I.; Christen, P. Multiple Evolutionary Origin of Pyridoxal-5′-phosphate-dependent Amino Acid Decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221* (3), 997–1002.
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18816.x.
(24) Cox, R. J.; Sutherland, A.; Vederas, J. C. Bacterial Diaminopimelate Metabolism as a Target for Antibiotic Design. *Bioorganic Med. Chem.* **2000**, *8* (5), 843–871.
https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00044-4.
(25) Ahn, Y. C.; Fischer, C.; Van Belkum, M. J.; Vederas, J. C. PLP-Independent Racemization: Mechanistic and Mutational Studies of: O -Ureidoserine Racemase (DcsC). *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (7), 1126–1133.
https://doi.org/10.1039/c7ob03013d.
(26) Carolyn W, K.; Blanchard, J. S. Chemical Mechanism of *Haemophilus Influenzae* Diaminopimelate Epimerase. *Biochemistry* **1999**, *38* (14), 4416–4422.
https://doi.org/10.1021/bi982911f.
(27) Cox, R. J. The DAP Pathway to Lysine as a Target for Antimicrobial Agents. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13* (1), 29–43.
https://doi.org/10.1039/np9961300029.
(28) Hartmann, M.; Tauch, A.; Eggeling, L.; Bathe, B.; Möckel, B.; Pühler, A.; Kalinowski, J. Identification and Characterization of the Last Two Unknown Genes, DapC and DapF, in the Succinylase Branch of the L-Lysine Biosynthesis of *Corynebacterium Glutamicum*. *J. Biotechnol.* **2003**, *104* (1–3), 199–211.
https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00156-1.
(29) Girodeau, J.-M.; Agouridas, C.; Masson, M.; Pineau, R.; Le Goffic, F. The Lysine Pathway

as a Target for a New Genera of Synthetic Antibacterial Antibiotics? *J. Med. Chem.* **1986**, *29* (6), 1023–1030.
https://doi.org/10.1021/jm00156a021.

(30) Kelland, J. G.; Arnold, L. D.; Palcic, M. M.; Pickard, M. A.; Vederas, J. C. Analogs of Diaminopimelic Acid as Inhibitors of Meso-Diaminopimelate Decarboxylase from *Bacillus Sphaericus* and Wheat Germ. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (28), 13216–13223.

(31) Lam, L. K. P.; Arnold, L. D.; Kalantar, T. H.; Kelland, J. G.; Lane-Bell, P. M.; Palcic, M. M.; Pickard, M. A.; Vederas, J. C. Analogs of Diaminopimelic Acid as Inhibitors of Meso-Diaminopimelate Dehydrogenase and LL-Diaminopimelate Epimerase. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (24), 11814–11819.

(32) Baumann, R. J.; Bohme, E. H.; Wiseman, J. S.; Vaal, M.; Merrell, J. S. N. Inhibition of Escherichia Coli Growth and Diaminopimelic Acid Epimerase by 3-Chlorodiaminopimelic Acid Downloaded From; **1988**; Vol. 32.

(33) Gelb, M. H.; Lin, Y.; Pickard, M. A.; Song, Y.; Vederas, J. C. Synthesis of 3-Fluorodiaminopimelic Acid Isomers as Inhibitors of Diaminopimelate Epimerase: Stereocontrolled Enzymatic Elimination of Hydrogen Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (12), 4932–4942.
https://doi.org/10.1021/ja00168a045.

(34) Sutherland, A.; Vederas, J. C. The First Isolation of an Alkoxy-N,N-Dialkylaminodifluorosulfane from the Reaction of an Alcohol and DAST: An Efficient Synthesis of (2S,3R,6S)-3-Fluoro-2,6-Diaminopimelic Acid. *Chem. Comm.* **1999**, 1739-1740.
https://doi.org/10.1039/A904821I.

(35) Gerhart, F.; Higgins, W.; Tardif, C.; Ducep, J. B. 2-(4-Amino-4-Carboxybutyl)Aziridine-2-Carboxylic Acid. A Potent Irreversible Inhibitor of Diaminopimelic Acid Epimerase. Spontaneous Formation from α-(Halomethy 1) Diaminopimelic Acids. *J. Med. Chem.* **1990**, *33* (8), 2157–2162.
https://doi.org/10.1021/jm00170a018.

(36) Higgins, W.; Tardif, C.; Richaud, C.; Krivanek, M. A.; Cardin, A. Expression of Recombinant Diaminopimelate Epimerase in Escherichia Coli Isolation and Inhibition with an Irreversible Inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186* (1–2), 137–143.
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15187.x.

(37) Abbott, S.; Lane-Bell, P.; Sidhu, K. P. S.; Vederas, J. C. Synthesis and Testing of Heterocyclic Analogues of Diaminopimelic Acid (DAP) as Inhibitors of DAP Dehydrogenase and DAP Epimerase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (15), 6513-6520.
https://doi.org/10.1021/ja00094a004.

(38) Williams, R. M.; Fegley, G. J.; Gallegos, R.; Schaefer, F.; Pruess, D. L. Asymmetric Syntheses of (2S,3S,6S)-, (2S,3S,6R)-, and (2R,3R,6S)-2,3-Methano-2,6-Diaminopimelic Acids. Studies Directed to the Design of Novel Substrate-Based Inhibitors of L,L-Diaminopimelate Epimerase. *Tetrahedron.* **1996**, *52* (4), 1149–1164.
https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00976-0.

(39) Caplan, J. F.; Zheng, R.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C. Vinylogous Amide Analogues of Diaminopimelic Acid (DAP) as Inhibitors of Enzymes Involved in Bacterial Lysine Biosynthesis. *Org. Lett.* **2000**, *2* (24), 3857–3860.
https://doi.org/10.1021/ol000271e.

(40) Cox, R. J.; Durston, J.; Roper, D. I. Synthesis and in Vitro Enzyme Activity of an Oxa Analogue of Azi-DAP. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2002**, *8*, 1029–1035.
https://doi.org/10.1039/b201727j.

(41) Shaikh, M. S.; Kale, M. A.; Sharuk, K. Discovery of Heterocyclic Analogs of Diaminopimelic Acid as Promising Antibacterial Agents Through Enzyme Targeted Inhibition of Lysine Biosynthesis. *Curr. Enzym. Inhib.* **2017**, *14* (2), 120–130.

https://doi.org/10.2174/1573408014666171218150219.
(42) Boibessot, T.; Bénimèlis, D.; Jean, M.; Benfodda, Z.; Meffre, P. Synthesis of a Novel Rhizobitoxine-Like Triazole-Containing Amino Acid. *Synlett* **2016**, *27* (19), 2685–2688.
https://doi.org/10.1055/s-0036-1588300.
(43) Denton, T. T.; Zhang, X.; Cashman, J. R. 5-Substituted, 6-Substituted, and Unsubstituted 3-Heteroaromatic Pyridine Analogues of Nicotine as Selective Inhibitors of Cytochrome P-450 2A6. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (1), 224–239.
https://doi.org/10.1021/jm049696n.
(44) Ranyuk, E.; Lebel, R.; Bérubé-Lauzière, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; Van Lier, J. E.; Guérin, B. 68Ga/DOTA- and 64Cu/NOTA-Phthalocyanine Conjugates as Fluorescent/PET Bimodal Imaging Probes. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (9), 1624–1633.
https://doi.org/10.1021/bc400257u.
(45) Benfodda, Z.; Benimélis, D.; Reginato, G.; Meffre, P. Ethynylglycine Synthon, a Useful Precursor for the Synthesis of Biologically Active Compounds: An Update. Part II: Synthetic Uses of Ethynylglycine Synthon. *Amino Acids* **2018**, *50* (10), 1307–1328.
https://doi.org/10.1007/s00726-018-2628-1.
(46) Berrabah, F.; Balliau, T.; Aït-Salem, E. H.; George, J.; Zivy, M.; Ratet, P.; Gourion, B. Control of the Ethylene Signaling Pathway Prevents Plant Defenses during Intracellular Accommodation of the Rhizobia. *New Phytol.* **2018**, *219* (1), 310–323.
https://doi.org/10.1111/nph.15142.
(47) Karpov, A. S.; Müller, T. J. J. Straightforward Novel One-Pot Enaminone and Pyrimidine Syntheses by Coupling-Addition-Cyclocondensation Sequences. *Synthesis (Stuttg).* **2003**, No. 18, 2815–2826.
https://doi.org/10.1055/s-2003-42480.
(48) Lilley, M.; Mambwe, B.; Jackson, R. F. W.; Muimo, R. 4-Phosphothiophen-2-Yl Alanine: A New 5-Membered Analogue of Phosphotyrosine. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (66), 9343–9345.
https://doi.org/10.1039/C4CC03393K.
(49) Ayed, C.; Palmier, S.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Augé, J. Indium-Mediated Alkynylation of Sugars: Synthesis of C-Glycosyl Compounds Bearing a Protected Amino Alcohol Moiety. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345* (17), 2566–2570.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.033.
(50) Crossley, J. A.; Browne, D. L. An Alkynyliodide Cycloaddition Strategy for the Construction of Iodoisoxazoles. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (15), 5414–5416.
https://doi.org/10.1021/jo1011174.
(51) Hein, J. E.; Tripp, J. C.; Krasnova, L. B.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Cycloaddition of Organic Azides and 1-Iodoalkynes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48* (43), 8018–8021.
https://doi.org/10.1002/anie.200903558.
(52) Yang, L. M.; Huang, L. F.; Luh, T. Y. Kumada-Corriu Reactions of Alkyl Halides with Alkynyl Nucleophiles. *Org. Lett.* **2004**, *6* (9), 1461–1463.
https://doi.org/10.1021/ol049686g.
(53) IJsselstijn, M.; Kaiser, J.; Van Delft, F. L.; Schoemaker, H. E.; Rutjes, F. P. J. T. Synthesis of Novel Acetylene-Containing Amino Acids. *Amino Acids* **2003**, *24* (3), 263–266.
https://doi.org/10.1007/s00726-002-0408-3.
(54) Jackson, R. F. W.; Perez-Gonzalez, M. Synthesis of N-(Tert -Butoxycarbonyl)-β-Iodoalanine Methyl Ester: A Useful Building Block in the Synthesis of Nonnatural α-Amino Acids *via* Palladium Catalyzed Cross Coupling Reactions. In *Organic Syntheses*; 2005; Vol. 81, pp 77–88.
https://doi.org/10.1002/0471264229.os081.08.
(55) Meffre, P.; Gauzy, L.; Branquet, E.; Durand, P.; Le Goffic, F. Synthesis of Optically Active

β,γ-Alkynylglycine Derivatives. *Tetrahedron*. **1996**, *52* (34), 11215-11238.

(56) Selvam, C.; Lemasson, I. A.; Brabet, I.; Oueslati, N.; Karaman, B.; Cabaye, A.; Tora, A. S.; Commare, B.; Courtiol, T.; Cesarini, S.; et al. Increased Potency and Selectivity for Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists Binding at Dual Sites. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (5), 1969–1989.
https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01438.

(57) Dondoni, A.; Perrone, D. Synthesis of 1,1-Dimethylethyl (S)-4-Formyl-2,2-Dimethyl-3-Oxazolidinecarboxylate by Oxidation of the Alcohol. In *Organic Syntheses*; 2003; Vol. 77, 64–64.
https://doi.org/10.1002/0471264180.os077.07.

(58) Ollivier, A.; Goubert, M.; Tursun, A.; Canet, I.; Sinibaldi, M.-E. *Orthogonally Protected Glycerols and 2-Aminodiols: Useful Building Blocks in Heterocyclic Chemistry*; Vol. 2010.

(59) Williams, L.; Zhang, Z.; Shao, F.; Carroll, P. J.; Joullié, M. M. Grignard Reactions to Chiral Oxazolidine Aldehydes. *Tetrahedron* **1996**, *52* (36), 11673–11694.
https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00672-2.

(60) Gajewski, M.; Seaver, B.; Esslinger, C. S. Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Triazole Amino Acids Used to Probe Binding Interactions between Ligand and Neutral Amino Acid Transport Protein SN1. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (15), 4163–4166.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.061.

(61) Kenworthy, M. N.; Paul Kilburn, J.; K Taylor, R. J. Highly Functionalized Organolithium Reagents for Enantiomerically Pure R-Amino Acid Synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, *9* (2), 17.
https://doi.org/10.1021/ol0360039.

(62) Ayed, C.; Picard, J.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Auge, J. Synthesis of Alkynes and Alkynyl Iodides Bearing a Protected Amino Alcohol Moiety as Functionalized Amino Acids Precursors. In *Science China Chemistry*; 2010; Vol. 53, 1921–1926.
https://doi.org/10.1007/s11426-010-4072-2.

Résumé de la thèse

L'émergence récente et continuelle de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, classiquement utilisés en clinique, est de nos jours un grave problème de santé publique. Cela est d'autant plus accentué par la mauvaise utilisation des antibiotiques combinée au manque d'intérêt de l'industrie pharmaceutique. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles antibactériennes et de nouveaux agents antibactériens pour lutter contre les bactéries multirésistantes. Afin de répondre à cette problématique, deux stratégies ont été envisagées.

La première stratégie vise à concevoir et à synthétiser de nouveaux inhibiteurs d'histidine kinase (HK, protéine impliquée dans le mécanisme de résistance) à caractère d'adjuvant d'antibiotiques. Parmi les 47 composés synthétisés, deux dérivés thiophènes, deux dérivés sulfonates et trois dérivés sulfonamides présentent des valeurs inhibitrices de HK inférieures à 50 µM. Ces valeurs ont été améliorées par rapport aux précédents inhibiteurs synthétisés au laboratoire. Par ailleurs, trois dérivés furanes ont inhibé la croissance bactérienne de bactéries à Gram-positif comme à Gram-négatif. Finalement, un chlorhydrate d'amine présente une activité adjuvante d'antibiotique.

La deuxième stratégie menée, vise à inhiber la voie de biosynthèse de la lysine qui est un des principaux résidus impliqués dans la biosynthèse du peptidoglycane. Ceci est possible par la synthèse d'acides aminés non usuels à base de triazole ou d'alcyne, analogues de l'acide diaminopimélique (précurseur de la lysine). Au total 16 acides aminés de type triazole ont été synthétisés et leurs activités biologiques sont en cours de réalisation.