HAL
open science

Synthèse d'acyclonucléotides et hétérocycles visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante

Nicolas Gwenaël Biteau

▶ **To cite this version:**

Nicolas Gwenaël Biteau. Synthèse d'acyclonucléotides et hétérocycles visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante. Autre. Université d'Orléans, 2019. Français. NNT : 2019ORLE3027 . tel-03123939

HAL Id: tel-03123939

https://theses.hal.science/tel-03123939

Submitted on 28 Jan 2021

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

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

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant - SSBCV

Institut de Chimie Organique et Analytique – ICOA

THÈSE présentée par :

Nicolas Gwenaël BITEAU

Soutenue publiquement le : **Vendredi 13 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Synthèse d'acyclonucléotides et hétérocycles visant l'inhibition de la *Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante*

THÈSE dirigée par :

Luigi A. Agrofoglio	Professeur, Université d'Orléans
Vincent Roy	Maître de Conférences, HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Nadège Lubin-Germain	Professeure, Université de Cergy Pontoise
Sylvie Pochet	DR. CNRS, Institut Pasteur

PRESIDENT DU JURY :

Thierry Lequeux	Professeur, Université de Caen

JURY :

Luigi A. Agrofoglio	Professeur, Université d'Orléans
Hubert Becker	Maitre de Conférences, HDR, Ecole Polytechnique
Thierry Lequeux	Professeur, Université de Caen
Nadège Lubin-Germain	Professeure, Université de Cergy Pontoise
Sylvie Pochet	DR. CNRS, Institut Pasteur
Vincent Roy	Maître de Conférences, HDR, Université d'Orléans

ARTICLES ET COMMUNICATIONS DE L'AUTEUR

Chapitre d'ouvrage

Biteau, N. G.; Hervin, V.; Roy, V. ; Agrofoglio, L. A.
Suzuki-Imamura cross-coupling as a synthetic tool for nucleoside and nucleotide modifications
Chap. 3, in "Palladium-Catalyzed Modification of Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides" Eds Kapdi, A.R.; Maiti, D.; Sanghvi, Y. S., *Elsevier* 2018, 37-75.

Publications

Tber, Z.; Biteau, N. G.; Agrofoglio, L.; Cros, J.; Goffinont, S.; Castaing, B.; Nicolas, C.; Roy, V., Microwave-Assisted Suzuki–Miyaura and Sonogashira Coupling of 4-Chloro-2-(trifluoromethyl)pyrido[1,2-*e*]purine Derivatives., *Eur. J. Org. Chem*., **2019**.

Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Agrofoglio, L. A.; Roy, V.,* Microwave-Assisted Regioselective N1-Alkylation of Aromatic Fused Pyrimidine-2,4-(1*H*,3*H*)-diones, *Tetrahedron*. (soumis).

Biteau, N. G.; Becker, H.; Lambry, J. C.; Myllykallio, H.; Agrofoglio, L. A.; Roy, V., Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies ofPyrido[2,1-f]purine-2,4(1H,3H)-dione Analogues as Inhibitors of *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* from *ThyX Mtb. (in progress).*

Biteau, N. G.; Becker, H.; Lambry, J. C.; Myllykallio, H.; Agrofoglio, L. A.; Roy, V., Synthesis and Study of New Acyclic Nucleoside Phosphonate that Inhibits *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* from *Mycobacterium tuberculosis* Based on FAD and dUMP Mimetic. *(in progress).*

Communications

Posters

- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Towards the synthesis of Flavin Dependent Thymidylate Synthase (FDTS) inhibitors, *Fédération de Recherche en infectiologie*, **Juil. 2017** – Tours.
- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., Synthesis of Flavin Dependent Thymidylate Synthase (FDTS) inhibitors targeting antibacterial activity, *Biotechnocentre*, **Oct. 2017** – Seillac.
- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A., Forwards the synthesis of FDTS inhibitors against biowarfare agents, *Journées de la Section Régionale Centre Ouest de la SCF*, **Févr. 2018** - La Rochelle.
- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A., Synthèse de petites molécules ciblant la FDTS : Antimicrobiens à larges spectres, *Fédération de Recherche en infectiologie*, **Juil. 2018** – Tours.
- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Hannu, M.; Hubert, B.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of small molecules targeting FDTS enzyme against biowarfare Agents, Prix du meilleur poster, *XXIII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **Août 2018** - La Jolla (USA).
- Biteau, N. G.; Yoon, J.; Tunyazi, A.; Nicolas, C.; Becker, H.; Myllykallio, H.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., New Heterocycles and Nucleoside analogues targeting FDTS enzyme. *47th IUPAC World Chemistry Congress*, **Juillet 2019** - Paris.

- Biteau, N. G.; Nicolas, C.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A., Design and synthesis of small molecules against FDTS enzyme: A new way to target drug resistance bacteria., ISySyCat, **Sept 2019** – Evora, Portugal.
- Biteau, N. G.; Nicolas, C.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A., Conception et synthèse d'inhibiteurs de la *FDTS* : Nouvelle cible antibactérienne., *Fédération de Recherche en infectiologie*, **Oct. 2019** – Tours.

Communications orales

- Biteau, N. G.; Chevrier, F.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A. Conception d'inhibiteurs de la Flavine-Dépendante Thymidylate Synthase (FDTS) pour des antimicrobiens à large spectre, *Journées de la Section Régionale Centre Ouest de la SCF*, **févr. 2018 -** La Rochelle.
- Biteau, N. G.; Nicolas, C.; Roy, V.; Hubert, B.; Hannu, M.; Agrofoglio, L. A. Design and synthesis of small molecules against FDTS enzyme: A new way to target drug resistance bacteria, *ISySyCat***, Sept 2019** – Evora, Portugal.

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi Agrofoglio et du Dr. HDR Vincent Roy, financé par la Direction Générale de l'Armement (DGA) et la région Centre Val de Loire.

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr. Luigi. A. Agrofoglio pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse dans son laboratoire, et pour la confiance qu'il a pu me porter. Je le remercie également pour m'avoir laissé la liberté de conduire les projets qu'il m'a confié (même celui sur Rautenstrauch). J'aimerais aussi le remercier pour les discussions et les conseils sur la suite de ma vie professionnelle, ainsi que les opportunités durant ces 3 années enrichissantes.

Je souhaiterais remercier par la suite le Dr. HDR Vincent Roy, pour son encadrement et son investissement au quotidien, ainsi que pour ses conseils avisés. Je le remercie aussi pour m'avoir fait confiance dans l'encadrement des TP à l'IUT durant 2 ans. Sa très grande disponibilité, nos nombreuses discussions, ainsi que sa bonne humeur ont permis de rendre plus simple ces 3 années au laboratoire.

J'aimerais sincèrement remercier la Pr. Nadège Lubin-Germain et la DR. Sylvie Pochet d'avoir pris de leur temps pour accepter de juger mon travail de thèse.

Je remercie aussi le Pr. Thierry Lequeux et le Dr. Hubert Becker pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

Je souhaiterais remercier le Pr. Hannu Myllykallio et à nouveau le Dr. HDR Hubert Becker pour leurs accueils au sein de leur laboratoire (LOB) à Palaiseau. Pour m'avoir formé à la réalisation des tests biologiques, mais aussi d'avoir enrichi ma culture sur l'enzyme et le domaine biologique à travers nos nombreux échanges.

Je tiens aussi à remercier les gens sans qui le travail au quotidien serait bien difficile, et notamment Nathalie Percina, Sophie Nicourt, Marie Madeleine Le Floch, Christophe Dubois, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif.

Je remercie le Dr. Patrick Favetta pour sa bonne humeur et sa gentillesse au quotidien, mais aussi pour l'aide qu'il m'a apporté dans la réalisation de certains de mes projets.

Je tiens aussi à remercier le CR Cyril Nicolas pour l'année passée au laboratoire. Nos discussions, mais aussi ces idées scientifiques m'ont beaucoup apporté dans mes derniers projets de thèse. Sa bonne humeur et son investissement m'ont beaucoup aidé.

La suite de mes remerciements va bien évidement à mon laboratoire, au futur Dr. Vincent Hervin (V2) avec qui j'ai partagé ces 3 années au laboratoire, au Dr. Zahira Tber pour ses conseils, son aide et sa bonne humeur avant son départ pour Atlanta, à Réni et sa folie des congrès, au Dr. Ghazi Ayari pour sa présence durant me deux premières années, ainsi qu'aux petits nouveaux Ji-Seong et Jérémy. Je tiens aussi à remercier le duo d'en face (ma co-pilote du matin Agnieszka, ainsi que Clémentine) pour tous ces moments au laboratoire et en dehors et Mazarine.

J'aimerais remercier tout mon club et mon équipe de water-polo, ils ont été ma soupape de décompression, j'ai vécu mes plus belles années sportives et extra sportives avec eux.

Ma famille a été présente à chaque instant, ma mère, mes grands-parents, ma sœur, Charles, Victor, Léo. Merci de m'avoir rappelé d'où je venais et ou j'allais dans les moments de doutes. Merci d'avoir fait ce que je suis aujourd'hui et d'avoir soutenu chacune de mes décisions depuis de nombreuses années.

Pour finir j'aimerais remercier celle qui a eu la folie de croiser mon chemin il y a 3 ans maintenant, elle a partagé les moments de doutes, les larmes, mais aussi les moments de joies et de réussites, je ne sais pas de quoi l'avenir sera fait, mais je sais qu'il sera avec toi, merci pour tout ce que tu as été, est et sera.

A ma grand-mère…

SIGLES ET ABREVIATIONS

A

AAC : *N-acetyltransferase*.
ACN : Acétonitrile.
ADN : Acide déoxyribonucléique
AICART : *Phosphoribosylamino imidazolecarboxamide formyltransferase*
AMP : Adénosine-5'-monophosphate.
AMPs : Peptides antimicrobiens.
AMR : Résistance Antimicrobienne.
ANPs : Acyclonucléosides phosphonates.
APH : *O-phosphotransferase*.
APTS : Acide *p*-toluène sulfonique.
Arg : Arginine.
ARN : Acide ribonucléique.
AT : Acide ribonucléique.
AZT : 3'-Azido-3'-déoxythymidine.

B

BLSE : Entérobactéries productrices de B-lactamase à large spectre.
BMRs : Bactéries Multi-Résistantes.
Bn : Benzyle.
Boc : *Tert*-butoxycarbonyle.
BSA : *Bis*(triméthylsilyl)acétamide.
BSH : β-Mercaptoéthanol.
Bz : Benzoyle.

C

CDV : (*S*)-1-(3-Hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine.
CM : Métathèse croisée.

D

DCM : Dichlorométhane.
DIPEA : Diisopropylethylamine.
DHF : Dihydrofolate.
DHFR : *Dihydrofolate reductase*.
DHPA : (*S*)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)
DHPS : *Dihydroptéroate synthase*.
DMPU : *N,N'*-Diméthylpropylène urée.
Dmpe : 1,2-Bis(dimethylphosphino)éthane.
DPD : Dihydropyrimidine dehydrogenase.
dTDP : Thymidine-5'-diphosphate.
dTMP : Thymidine-5'-monophosphate.
dUMP : 2'-Déoxyuridine-5'monophosphate

E

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmase.
ERG : Entérocoques résistants aux glycopeptides.
ERV : Entérocoques résistants à la Vancomycine.
ET_3N : Triéthylamine.

F

FAD : Flavine Adénosine Dinucléotide.
FDTS : *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase.*
FMN : Flavine mononucléotide.
FPGS : *Folylpolyglutamate synthase*.

G

GART : *Phosphoribosyl glycinamide formyltransferase.*

H

His : Histidine

I

INCAs : Antifolates non classiques ionisés.
IC_{50} : Concentration à 50% d'inhibition.

M

MIC : Concentration minimale inhibitrice.

N

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
NHC : Carbène *N*-hétérocyclique.
NHT : Nicotine Hydrogène Tartrate.
NMI : *N*-méthylimidazole.

O

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

P

pH : Potentiel hydrogène.
PMB : *Para*-méthoxybenzoyle.
POC : Carbonyloxyméthyle.

R

RCM : Métathèse cyclisante.
ROM : Ouverture de cycle par métathèse.
ROMP : Métathèse polymérisante.

S

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.
SHMT : *Sérine hydroxyméthyle transferase*.
Ser : Sérine.

T

TBAI : Iodure de tétrabuthylamonium.
TBTU : 2-(1*H*-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium tétrafluoroborate.
TEMPO : (2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy.
TFA : Acide trifluoroacétique.

THF : Tétrahydrofolate.
TK: *Thymidylate kinase*.
TPPTS : Trisodium 3,3',3-phosphinetriyltribenzènsulfonate.
TS : *Thymidylate Synthase*.

V

VISA : *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée à la vancomycine.

SOMMAIRE

Introduction générale

Chapitre 1 : Introduction

1. Bactéries 21
   1.1. Généralités 21
   1.2. Pathogénicités 22
   1.3. La réplication bactérienne 24
2. Les antibiotiques : Historiques, Familles, et modes d'Actions. 26
   2.1. Historique 26
   2.2. Familles et mécanismes d'actions 27
3. Les antibiotiques : Résistances et Transmissions 32
   3.1. Situation actuelle 32
   3.2. Les résistances bactériennes 34
   3.3. Transmissions des résistances 35
4. Les *Thymidylates Synthases* (*TSases*) 38
   4.1. Du cycle folate vers les *Thymidylates synthases* 38
   4.2. *ThyA* / *ThyX* : 2 enzymes orthologues 39
      4.2.1. Thymidylate Synthase humaine et bactérienne (ThyA) 40
      4.2.2. Flavine-Dependente Thymidyltates Synthases (ThyX) 44
   4.3. Inhibiteurs de la *FDTS* 49

Objectifs et plan de travail de la Thèse

Chapitre 2 : Acyclo-nucléoside phosphonates comme mime du FAD/dUMP

1. Synthèse d'ANPs mimes mixtes dUMP/FAD 63
   1.1. Rappels sur les ANPs et motifs insaturés à intérêts biologiques 63
   1.2. Rappels sur la métathèse d'oléfines 65
   1.3. Rappel sur l'activation par ultrasons 69
   1.4. Rappel sur l'activation par micro-ondes 70
   1.5. Rétrosynthèse 70
   1.6. Résultats et discussion 73
      1.6.1. Synthèse des dérivés N^1 alkényl phosphate 73
      1.6.2. Données biologiques 94
   1.7. Diversification moléculaire via couplage organopalladé 96

1.7.1. Choix des chaînes aliphatiques 96
1.7.2. Rétrosynthèse envisagée 98
1.7.3. Résultats et discussions 99
1.8. Données biologiques 105
1.9. Conclusion 1 et perspectives 107
2. Synthèse d'ANPs mimant le dUMP 109
2.1. Rétrosynthèse 110
2.2. Résultats et discussion 99
2.2.1. Uracile substitués en C^5 111
2.2.2. Série uraciles C^5-subsituées : chaîne bis(OMe) phosphonate 112
2.2.3. Série uracile apliphatique-C^5-subsitué : chaîne bis(POC) phosphonate 116
2.3. Données biologiques 118
2.4. Conclusion 2 et perspectives 119
3. Conclusion générale et perspective 120

Chapitre 3 : Dérives polycycliques azotés

Partie expérimentale Chapitre 2

1. Criblage biologique d'une chimiothèque 188
2. Description et généralités sur les pyridopurindione 190
1.1. Les pyrido[2,1-*f*]purine-2,4(*1H,3H)*-dione 190
1.2. Les pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione 192
3. Synthèse de dérivés polycycliques azotés 195
3.1. Rétrosynthèse envisagée 195
3.2. Préparation des dérivés N^3 196
3.2.1. Synthèse 196
3.2.2. Résultats biologiques 199
3.2.3. Relation structure activité 202
3.3. Synthèse des structures N^1-alkylées 204
3.3.1. Synthèse 204
3.3.2. Résultats biologiques 211
3.4. Synthèses de dérivés substitués en C^9 201
3.4.1. Rappels activation CH 213
3.4.2. Synthèse 216
3.5. Synthèses des structures C^7 et C^8 substituées 220
3.5.1. Synthèses des dérivés méthylés et bromés 220
3.5.2. Résultats biologiques 223

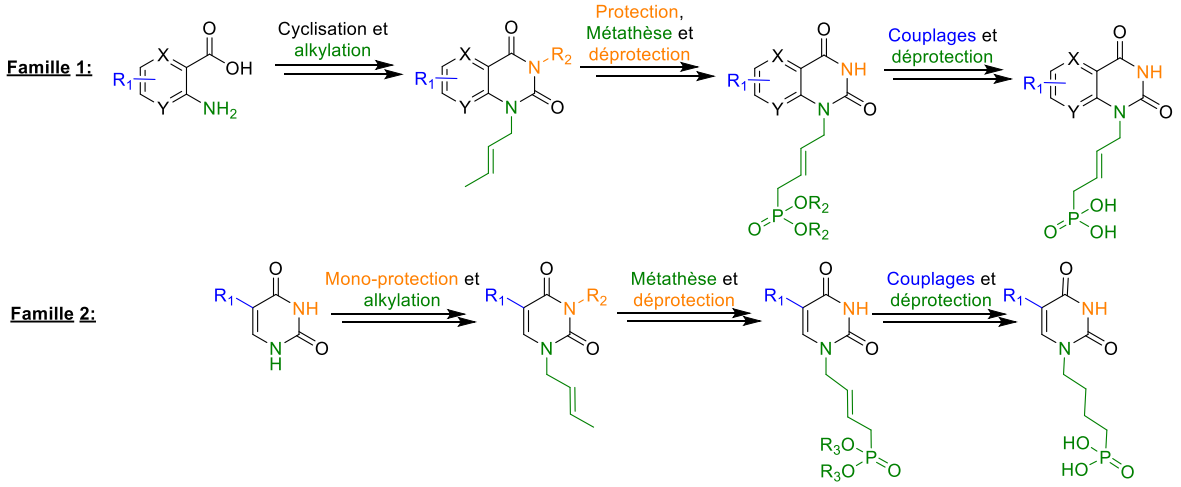
3.5.3. Couplage de Sonogashira 213
3.5.4. Résultats biologiques 228
3.6. Réaction de Suzuki-Miyaura 224
3.6.1. Couplage de Suzuki-Miyaura 231
3.6.2. Résultats biologiques 234
4. Conclusions et perspectives 236
Partie expérimentale Chapitre 3
Conclusions et Perspectives générales

INTRODUCTION GENERALE

L'intense utilisation de chimiothérapies bactériennes (santé humaine ou animale), le recours à des antibiotiques à larges spectres et de dernier recours ont conduit à l'apparition de Bactéries Multi-Résistantes (BMRs). En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)[1] a alerté d'un risque de pénuries d'antibiotiques d'ici 2050 si rien n'était entrepris. Aujourd'hui, *E. coli*, *K. pneumoniaae* et *S. aureus* résistent à plus de 50% des principaux antibactériens. D'une simple évolution génétique naturelle, la situation est devenue un problème de santé publique mondiale, incitant à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux antibactériens. C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de thèse sur l'enzyme de la *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* (*FDTS*) présente dans de nombreux pathogènes résistants.

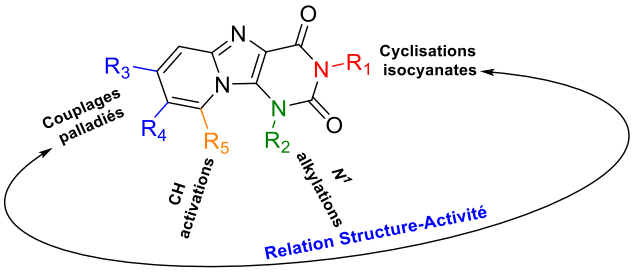
Dans un premier chapitre, nous présenterons à travers une courte introduction des généralités sur les bactéries ainsi que leurs modes d'infections. Puis nous détaillerons de manière concise les différentes familles d'antibiotiques existantes et leurs modes d'actions. Nous décrirons par la suite les différents mécanismes connus permettant l'acquisition de résistances contre les agents thérapeutiques. Pour finir nous présenterons la synthèse *de novo* de la thymidine-5'-monophosphate (dTMP), à partir de la 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) dans le cycle folate, et plus particulièrement l'étape catalysée par une *Thymidylate Synthase* (TS) qui a été largement utilisée comme cible antibactérienne. En 2002, une nouvelle enzyme spécifique des procaryotes catalysant cette même biosynthèse a été découverte en l'absence de *TS* classique. Nous décrirons alors dans un second temps cette cible enzymatique : la *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, du point de vue structural et mécanistique. Enfin nous ferons l'Etat de l'Art des différents inhibiteurs connus à ce jour.

Après avoir décrit les objectifs de la thèse, nous développerons dans un deuxième chapitre, la synthèse de mimes mixtes du FAD ou du dUMP en série acyclonucléosides phosphonates (ANPs). Sur la base de l'Etat de l'Art et de la structure de la *FDTS*, la première famille sera composée de bicycles dérivés de quinazolinedione. Une seconde famille concernera des analogues d'uraciles en série ANP. Ces deux familles seront substituées sur l'azote N^1 par une chaîne *trans*-but-2'-énylphosphonate ou *trans*-pent-2'-énylphosphonate et seront porteuses de groupements fonctionnels en position 6, 7 (dérivés bicycliques) et 5 (dérivés uraciles). Ces synthèses mettront en œuvre deux voies convergentes faisant intervenir des réactions de protections et d'alkylations régiosélectives, ainsi qu'une étape de couplage par une réaction de métathèse croisée.



[1] WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Antimicrobial resistance: global report on surveillance. https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/. (April 2014).

Le dernier chapitre portera sur la synthèse de composés hétéroaromatiques tricycliques, sur la base d'une pyrido[1,2-*e*]purines. Afin d'augmenter les interactions avec le site actif de l'enzyme, nous avons substitué le noyau pyrimidine par un noyau pyrimidine-1,4-dione. Une pharmaco-fonctionnalisation raisonnée sera dirigée par les résultats biologiques et les modélisations (SAR). Dans un premier temps nous déterminerons le meilleur substituant R_1 *via* une réaction de Ugi-Strecker suivi d'une cyclisation. R_2 sera introduit *via* une N^1 alkylation R_3 *via* une activation CH à partir d'un dérivé picolinamide. Enfin R_4 et R_5 à partir de couplages organopalladés (Suzuki-Miyaura, Sonogashira, Heck…).



Une conclusion générale reprendra les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse, et des perspectives à ce travail seront présentées.

Chapitre 1 : Introduction

1. Bactéries

1.1. Généralités

Les bactéries sont des entités procaryotes microscopiques unicellulaires se développant par division cellulaire. Découvertes en 1668 par Antoine van Leeuwenhoek,[2] qui les nomma « animalcules », il faudra attendre 1838 pour les voir dénommées « bactéries » par Christian Gottfried Ehrenberg. Elles sont omniprésentes dans notre environnement (eaux, sols, animaux, hommes...). Ces dernières se diversifient *via* plusieurs caractéristiques :[3]

- Leurs tailles : de 0.1-0.2 µm (*Mycoplasma*) à 0.7 mm (*Epulopiscium fishelsoni*), la moyenne se situant entre 0.5-5 µm.
- Leurs formes : divisées en 3 grandes familles, les coques (diplocoque, streptocoque, sarcina…), les bacilles (coccobacille, palissade…) et sous diverses formes (bourgeon, appendice, vibrion, hélicoïdale…).
- La paroi bactérienne (membrane) : séparée en 2 types : avec une paroi épaisse (Gram positif), avec une paroi fine (Gram négatif).
- Sources de matières, d'énergies et milieux de vies : phototrophie, litotrophie, hétérotrophie, thermophile, anaérobique...

Elles ne possèdent pas de noyau, ou d'organites intracellulaires tels que des mitochondries ou d'appareil de Golgi présent dans toutes cellules eucaryotes. Elles possèdent de nombreux points communs (obligatoires ou non) permettant leurs survies dans leurs différents biotopes (Figure 1) :

- Nucléoide et plasmide permettent le stockage du matériel génétique, le bon fonctionnement interne et l'adaptation au milieu extérieur.
- Cytoplasme est une émulsion colloïdale contenant les divers organites.
- Ribosome permet la synthèse des protéines nécessaires à la survie de la bactérie.
- Les granulations de réserves permettent le stockage des éléments nutritifs.
- La membrane plasmique et la paroi cellulaire servent de moyen de défense contre les différents stress et pressions extérieurs. La paroi cellulaire peut être recouverte d'une capside lui conférant une résistance accrue.
- Les pilis sont divisés en 2 catégories, les communs permettant l'adhésion à un support hôte, et les sexuels permettant le transfert de plasmides entre deux entités.
- Les flagelles sont l'unique élément physique permettant le mouvement de la bactérie.

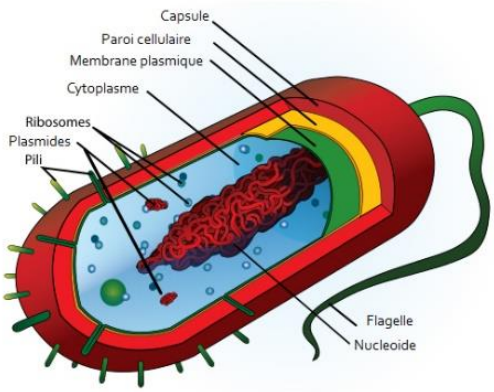


Figure 1 *: Structure générale simplifiée d'une bactérie.*

[2] Porter, J. R., van Leeuwenhoek, A; Tercentenary of his discovery of bacteria, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 260–269.
[3] Medical Microbiology. 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston (TX), **1996**.

Les bactéries sont généralement classées en deux catégories (Gram positif et Gram négatif) en fonction du type de membrane plasmique recouvrant le cytoplasme. La coloration de Gram est un test rapide, empirique et facile de mise en œuvre pour classer les entités procaryotes suivant la coloration de la membrane obtenue permettant ainsi d'adapter les antibiotiques utilisés. Les bactéries sont dans un premiers temps colorées avec du violet de gentiane.

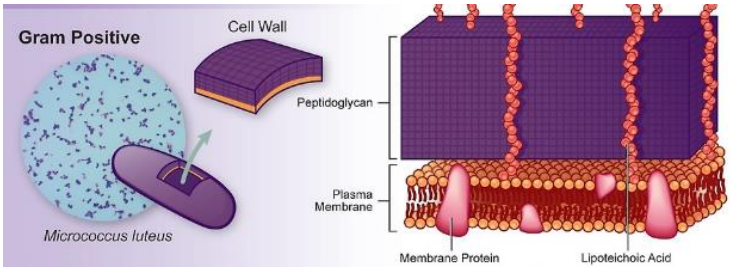


Figure 2 *: Représentation d'une bactérie Gram positif*

Les bactéries possédantes une membrane plasmique épaisse composée d'une superposition de couches de peptidoglycanes sont dites « Gram positif », car elles empêchent la décoloration par l'éthanol/acétone. La présence d'acides teichoïques (AT) connectés aux lipides de la membrane plasmique permet la conservation de cette coloration violette (Figure 2).

Les bactéries possédantes une couche mince de peptidoglycanes recouverte par une couche plus complexe composée de protéines lipidiques, de polysacharides et de phospholipides, vont former une paroi polaire qui permettra la diffusion de l'éthanol/acétone, entrainant ainsi la décoloration. Par la suite, elles sont recolorées en rose par ajout de fuchsine. Elles sont dites « Gram négatif » (Figure 3).

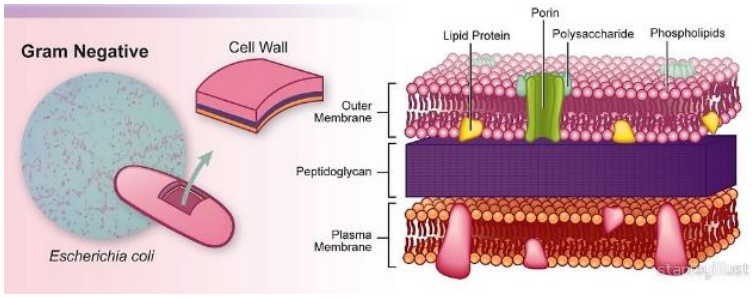


Figure 3*: Représentation d'une bactérie Gram négatif.*

1.2. Pathogénicités

Les bactéries, contrairement à beaucoup d'idées reçues, n'ont pas qu'une fonction pathogène (*Mycobacterium tuberculosis, Bacillus anthracis*…) ; une partie d'entre elles possèdent une double compétence, pouvant être à la fois bénéfique et pathogène à un hôte. Chez l'Homme, elles existent dans les muqueuses comme premières lignes protectrices et métaboliques (la flore cutanée,[4] la flore intestinale[5,6]…). Cette relation bactérie-hôte peut être associée à une symbiose, c'est-à-dire que le microorganisme va se nourrir de ce que son hôte lui donnera sans développer de pathogénicité. En contrepartie l'hôte ne développera pas de réponse immunitaire à la présence du parasite (Figure 4).[7] Le commensalisme est observé quand deux parties hôte-bactérie coexistent sans aucune relation bénéfique ou néfaste. L'équilibre entre ces 3 états (pathogène, commensale et symbiotique) est en mouvement perpétuel, le tout étant dicté par la diversité des bactéries, leurs capacités à se développer et leurs concentrations.

[4] Byrd, A. L.; Belkaid, Y.; Segre, J. A., The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2018**, *16*, 143–155.
[5] Chow, J.; Lee, S. M.; Shen, Y.; Khosravi, A.; Mazmanian, S. K., Host–bacterial symbiosis in health and disease. *Adv. Immunol.*, **2010**, *107*, 243–274.
[6] Xu, J.; Mahowald, M. A.; Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; Hamady M.; *et al*, Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol*, **2007,** 5, 1574-1586.
[7] Hooper, L. V., Commensal Host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **2001**, *292*, 1115–1118.

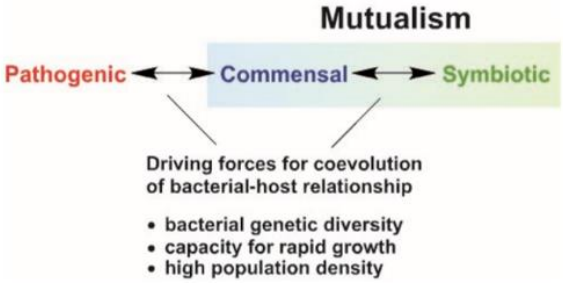


Figure 4 *: Relation Symbiose hôte-bactérie.*[7]

Malheureusement lorsque cette stabilité est rompue, la fonction première de cette barrière protectrice induit un risque prononcé d'infections opportunistes et pathogènes.[8]

Le caractère pathogène d'un microorganisme est sa capacité à déclencher une maladie chez son hôte par des spécificités génétiques, biochimiques ou structurelles. La virulence se mesure en regardant la capacité à se développer dans un organisme (pouvoir invasif) et d'y sécréter des toxines (pouvoir toxique). De nombreux organismes ont été découverts à ce jour :

- Bactéries à Gram positif :
    - *Staphylococcus* (Coque) : septicémie.
    - *Bacillus* (Bacille) : anthrax ou infection alimentaire.
- Bactéries à Gram négatif :
    - *Neisseria* (Coque) : blennorragie.
    - *Legionella* (Bacille) : pneumopathie.
- Particulières :
    - *Mycobacterium* (Bacille) : tuberculose.
    - *Treponema* (Spirochettes) : syphilis.

Ces dernières sont souvent contractées lors de séjours prolongés dans des instituts de santé et présentent des résistances aux arsenaux thérapeutiques puissants. Il existe aussi des bactéries uniquement pathogènes qui peuvent être utilisées pour le bioterrorisme.

Ces bactéries peuvent être classées suivant 3 familles, suivant leurs modes d'actions et leurs capacités de survies hors de l'hôte :

- Les pathogènes obligatoires : sont des microorganismes incapables de survivre en dehors d'un hôte (ex : pour la tuberculose, diphtérie, typhus).
- Les pathogènes accidentels : sont présents dans notre environnement et profitent d'une voie d'entrée (cutanée, buccale…) pour infecter l'hôte (ex : le tétanos et le choléra).
- Les pathogènes opportunistes : profitent de l'affaiblissement de leurs hôtes pour déclencher des symptômes, ces derniers sont souvent déjà présents sur et en nous. Ils causent les maladies dites nosocomiales.

Chaque bactérie peut posséder un mécanisme de ligation à un hôte qui lui est propre. Mais il existe seulement deux stratégies universelles d'infections, indépendantes de la famille bactérienne, qui ont été développées par les microorganismes pathogènes : à savoir l'invasivité et la toxinogénèse.

[8] Levy, M.; Kolodziejczyk, A. A.; Thaiss, A. A.; Elinav, E., Dysbiosis and the immune system *Nat. Rev. Immunol.*, **2017**, *17*, 219–232.

- **<u>L'invasivité</u>** : les bactéries vont dans un premier temps chercher à adhérer à une cellule hôte (peau, muqueuse, tissu profond).[9] Pour chaque surface, les microorganismes peuvent créer une liaison spécifique. Ce facteur d'adhérence provient de protéines (polypeptides) ou de polysaccharides (carbohydrates). Dans un second temps, elles vont se multiplier par endocytose, en pénétrant les cellules pour utiliser la machinerie cellulaire ou en produisant des substances lytiques pour se disséminer dans les tissus, afin de créer plusieurs foyers infectieux. Pour se protéger des différentes réponses immunitaires engendrées lors de l'infection, les bactéries peuvent se protéger à l'intérieur d'une capside qui limitera l'action les macrophages et neutrophiles.[10]
- **<u>La toxinogénèse</u>** : c'est l'étape durant laquelle le microorganisme pathogène peut libérer deux types de toxines. Les exotoxines (faibles concentrations et protéiques) sont libérées sur les cellules eucaryotes lors de la multiplication cellulaire dans le milieu physiologique ou par injection direct dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elles ont pour rôle de tuer les cellules hôtes. Les endotoxines (fortes concentrations et non protéiques) sont contenues dans les membranes cellulaires des procaryotes, elles seront libérées lors de la lyse, par l'action d'une réponse immunitaire ou sous l'action d'un antibiotique. Ces dernières n'ont pas de mécanisme direct pour endommager les cellules hôtes, mais sont tout autant toxiques pour l'hôte.

1.3. <u>La réplication bactérienne</u>

L'ADN bactérien est double brin pouvant exister sous trois formes topologiques (double hélice pelotonnée, surenroulée et circulaire). La réplication du plasmide bactérien se déroule en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Schéma 1).[11a,b]

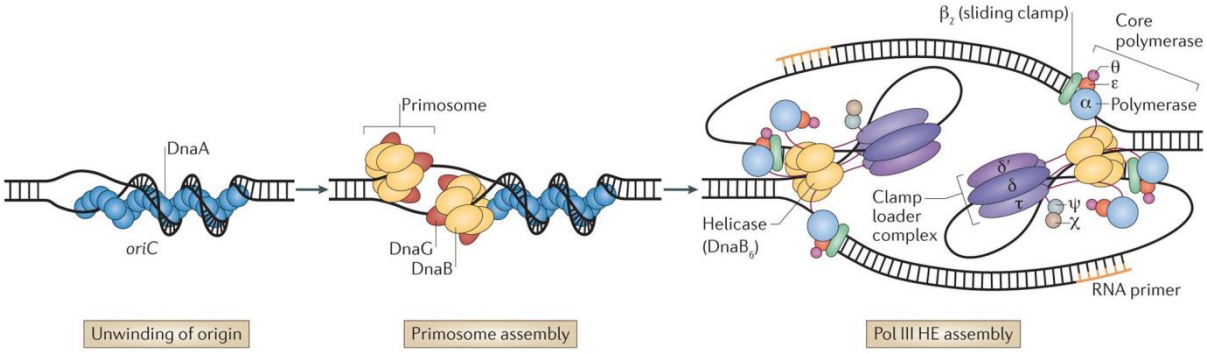


Schéma 1 *: Réplication de l'ADN bactérien.*[11b]

Lors de l'initiation, un enzyme viendra couper un brin (*sso* : single-strand origin) de l'ADN double brin (*dso* : double-strand origin). Par la suite, un *ADN Polymérase III* viendra se lier sur la position *3'-OH* du brin coupé. A partir de ce moment, la réplication unidirectionnelle de l'ADN bactérien

[9] Finlay, B. B.; Falkow, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1997**, *61*, 136–169.
[10] Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; Le Blanc, C. L.; *et al*, Mechanisms of bacterial pathogenicity, *Postgrad. Med. J.* **2002**, *78*, 216-224.
[11] a) Del Solar, G.; Giraldo, R.; Ruiz-Echevarría, M. J.; Espinosa, M.; Díaz-Orejas, R., Replication and control of circular bacterial plasmids, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., **1998**, *62*, 434-464. b) Robinson, A.; Van Oijen, A. M., Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies, *Nat. Rev. Microbiol*., **2013**, *11*, 303-315.

commence en utilisant le brin non entaillé comme template d'origine *via* la synthèse *de novo* tout en déplaçant le brin entaillé. Une fois la réplication complète du brin d'ADN effectué, le brin entaillé et le nouveau brin formé sont cyclisés et séparés *via* un *ADN ligase*. On forme ainsi deux nouveaux ADN circulaires, un double-brin (dsDNA) avec un nouveau brin et un mono-brin (ssDNA). Dans le cas du second, une *ARN primase* va créer une amorce afin d'initier la synthèse du second brin d'ADN sur la position *sso*.

Lors de la réplication de l'ADN, la voie *de novo* représente la principale biosynthèse des nucléotides dérivés de bases pyrimidiques (C, T, U) et puriques (A, G) de l'ADN. Durant nos recherches, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse des « blocs » C, T, U à partir de la glutamine, l'adénosine-5'-triphosphate et du bicarbonate (Schéma 2).[12]

Nous avons pris *Escherichia coli* comme modèle général de la synthèse *de novo* chez les bactéries. La première étape de cette voie est la biosynthèse du dihydroorotate à partir d'une catalyse enzymatique trifonctionnelle. Cette étape est nommée CAD. Elle met en œuvre 3 enzymes : la ***C****arbamoyl Phosphate Synthetase* (*carA/carB*), l'***A****spartate Carbamoyle Trasnferase* (*pyrA/pyrB*) et la ***D****ihydroorotase* (*pyrC*). Le produit dihydroorotate sera ensuite transformé *via* la *dihydroorotate oxidase* (*pyrD*) en orotate puis *via* une *Orotate Phosphoribosyltransferase* (*pyrE*) en orotidine-5'-monophosphate. La dernière étape permettra la conversion de ce produit en dUMP mais aussi le recyclage de l'orotate par l'action d'un enzyme bifonctionnelle en présence *Orotidine-5'-Monophosphate Decarboxylase* (*pyrF*).

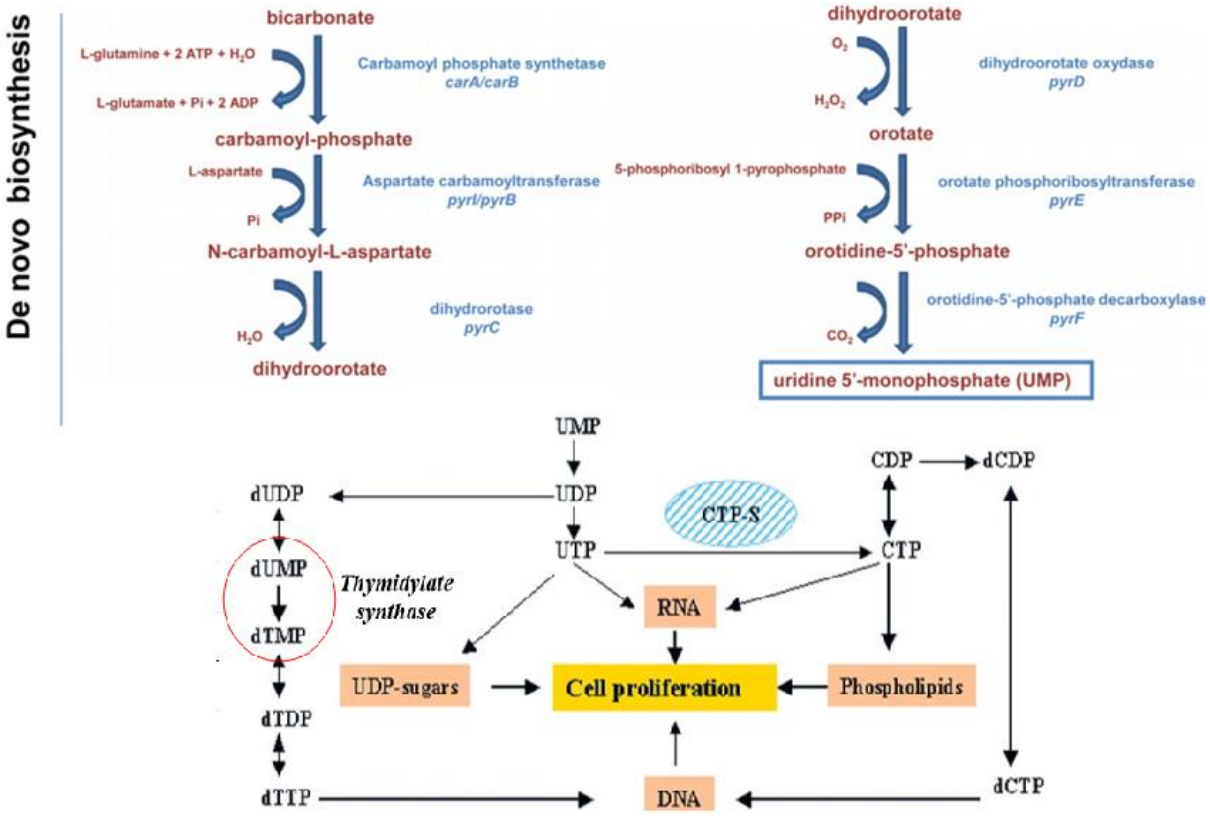


Schéma 2 : Voie de novo pour la synthèse des nucléotides à base pyrimidine de l'ADN chez Escherichia col.[12]

[12] Garavaglia, M.; Rossi, E.; Landini, P., The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in Escherichia coli. *PLoS ONE*, **2002**, 7.

2. Les antibiotiques : Historiques, Familles, et modes d'Actions.

2.1. Historique

Lorsque l'on parle d'antibiotiques, on pense rapidement à la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, qui lui valut le Prix Nobel en 1944. Au regard de l'Histoire, les antibiotiques étaient déjà présents entre 350-500 av. J.-C chez certaines populations Nubiennes (tétracycline contenue dans les os, ingérée *via* l'alimentation).[13] L'ère moderne des antibiotiques reste marquée par deux grands noms, Paul Ehrlich et Alexander Fleming. Le premier (Prix Nobel 1908) pour le concept de la « Magic Bullet » supposait qu'il était possible de toucher spécifiquement la bactérie responsable des symptômes cliniques sans affecter les cellules du patient. Ces travaux ont aussi porté sur le traitement de la syphilis par des dérivés de l'arsenic. Le Salvarsan **1** fut ainsi le premier antibiotique de synthèse développé et optimisé, en augmentant sa solubilité, jusqu'au Néosalvarsan **2**. Paul Ehrlich est considéré aujourd'hui comme le père de la chimiothérapie.[14] Le second pour sa découverte de la pénicilline qui fut industrialisée dans les années 40 et largement utilisée durant la 2nd Grande Guerre par les armées alliées. On peut rajouter à ces deux illustres noms, Domgak et une équipe de plusieurs chercheurs pour la découverte des sulfonamides en 1935 (avec le Protonsil **3**), dérivé de la structure du Salvarsan d'Ehrlich (Figure 5). [15]

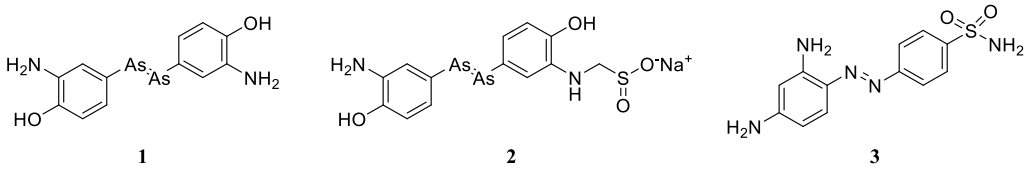
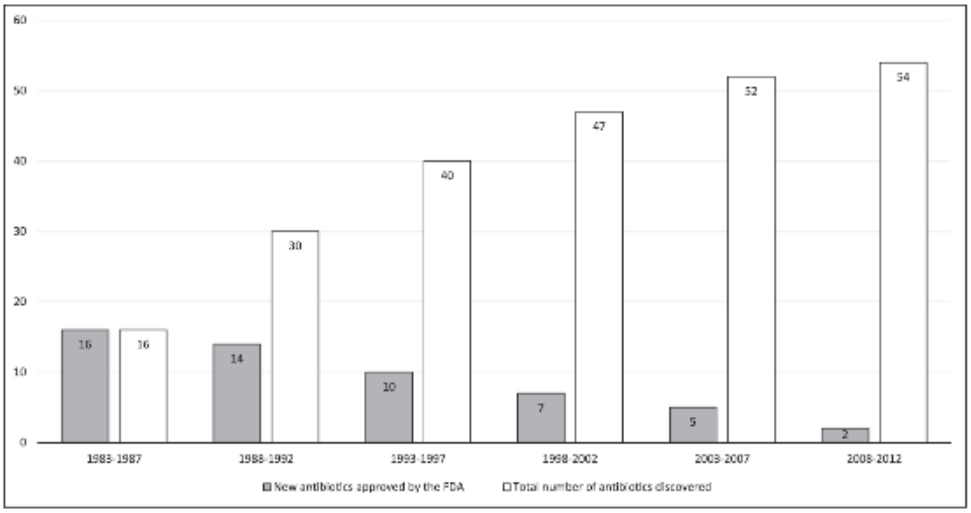


***Figure 5** : Premiers antibactériens synthétisés*



***Graphique 1**: Molécules antibactériennes approuvées par la FDA.[1]*

Suite au développement de ces trois molécules, des criblages de molécules naturelles et synthétiques ont été réalisés, conduisant à l'apogée de la recherche antibactérienne « Golden Age »

[13] Bassett, E. J.; Keith, M. S.; Armelagos, G. J.; Martin, D. L.; Villanueva, A. R., Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350), *Science*, **1980**, 209, 1532–1534.
[14] Aminov, R. I., A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, *Front. Microbiol.*, **2010**, *1*, 134-141.
[15] Saga, T.; Yamaguchi, K., History of antimicrobial agents and resistant bacteria, *JMAJ*, **2009**, *52*, 103-108.

des années 1945 à 1987, durant laquelle pas moins de vingt-six familles d'antibactériens ont été découvertes (naturelles, synthétiques). Depuis les années 90, seulement quatorze nouvelles molécules et deux nouvelles familles ont été approuvées par la « Food and Drug Administration » (FDA). Cette période est communément appelée « Discovery Void » (Graphique 1).[16]

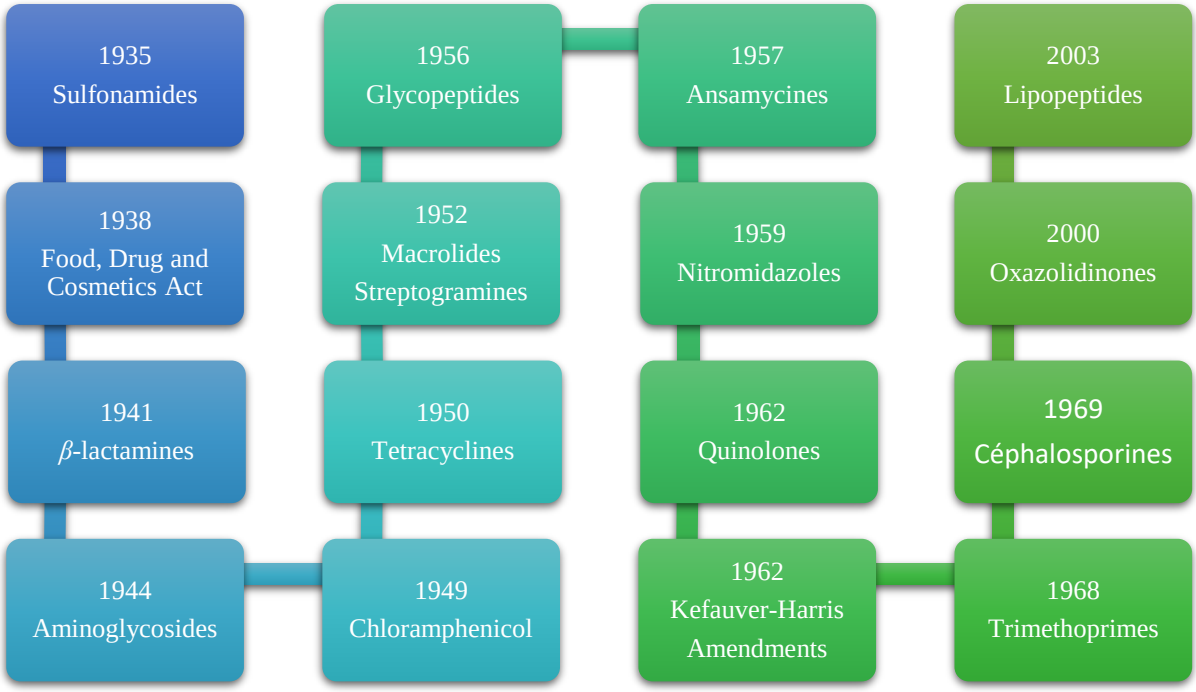


Schéma 3 *: Historique des différentes découvertes et actions.*[17]

Deux lois ont vu le jour suite à ces différentes découvertes afin de renforcer la réglementation autour de ces nouvelles molécules (Schéma 3). La première, le « Food, Drug and Cosmetics Act » en 1938, suite au décès de personnes ayant pris un antibiotique de la famille des sulfanilamides contenant du diéthylène glycol. Cette loi a renforcé les pouvoirs de la FDA en termes de contrôle et d'autorisation de mise sur le marché. La seconde est connue sous le nom de « Kefauver-Harris Amendment ». Elle a introduit une exigence pour les fabricants de médicaments de fournir la preuve de l'efficacité et l'innocuité de leurs médicaments avant l'approbation, de révéler les différents effets secondaires suite à la prise d'un médicament, et l'arrêt de la vente de médicaments génériques sous de nouvelles dénominations. Suite à cela, plusieurs méthodes furent utilisées, comme la pharmaco-fonctionnalisation de composés connus, des criblages à haut débit, ou encore la combinaison et la réaffectation de composés, permettant le développement de nouvelles familles thérapeutiques.

2.2. Familles et mécanismes d'actions

Les différentes familles de molécules antibiotiques peuvent être classées en deux catégories : les bactéricides et les bactériostatiques. La première est utilisée afin de tuer la bactérie en ciblant la membrane ou ses enzymes. La seconde va ralentir la propagation de l'infection en s'attaquant à la

[16] Durand, G. A.; Raoult, D.; Dubourg. G., Antibiotic discovery: history, methods and perspectives, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2019**, *53*, 371-382.
[17] Silver, L. L., Challenges of antibacterial discovery, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2011**, *24*, 71-109.

synthèse des protéines.[18] Chaque molécule ou famille est classée ainsi suivant son mode d'action (Figure 6).

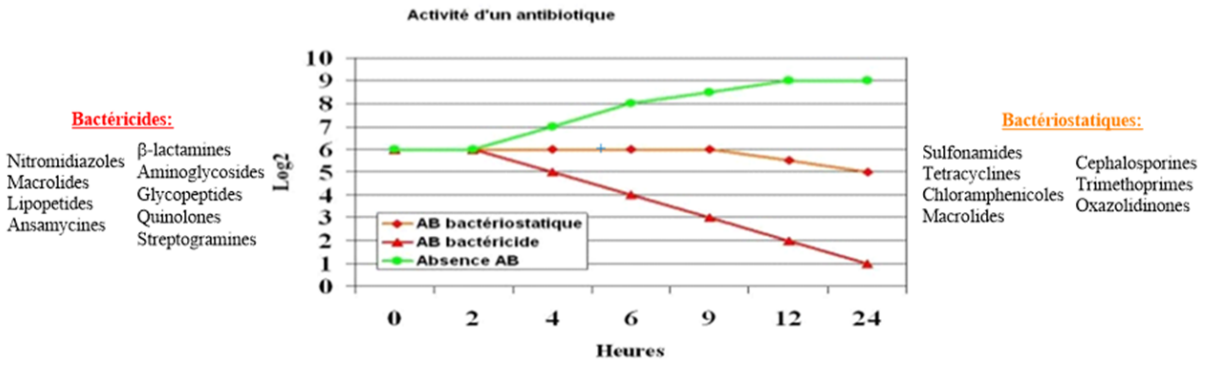


Figure 6 *: Différentiation bactéricides vs bactériostatiques.*

Il faut aussi tenir compte du type de bactéries auquel il s'agit de trouver une réponse thérapeutique :

- Activité sur les bactéries à Gram négatif : aminoglycosides.
- Activité sur les bactéries à Gram positif : β-lactamines, glycopeptides, lipopeptides, macrolides, ansamycines, oxazolidinones.
- Activité à large spectre : quinolones, sulfonamides, tetracyclines, lhloramphenicoles.

Il existe un cas particulier pour la famille des céphalosporines qui suivant la génération, vont agir sur un type de bactérie bien précis. La 1ère est largement active sur les bactéries à Gram positif, alors que les 2nd et 3èmes générations affectent plus les bactéries à Gram négatif. La 4ème génération permet un traitement à large spectre des bactéries, tandis que la 5ème génération permet de cibler des pathogènes méthicilline résistants.

Il existe divers modes d'actions sur les bactéries (Figure 7). En s'attaquant directement ou non (v*ia* l'inhibition de sa synthèse) à la paroi bactérienne (Tableau 1). En inhibant la synthèse protéique du ribosome et ses unités 30S (petites) et 50S (grandes) avec des inhibiteurs allostériques (Tableau 2). La petite sous-unité 30 S est responsable de la liaison et de la lecture de l'ARN_m durant la traduction. La grande sous-unité 50S possède de nombreux rôles : catalyseur de la formation de liaison entres peptides, *via* l'hydrolyse prématurée de ces derniers, possède un site de fixation pour les cofacteurs des protéines G et aide au repliement des protéines après leurs synthèses. Ces deux sous-unités forment l'unité 70S responsable de la traduction de l'ARN_m en protéines. En inhibant la transcription et la réplication de l'ARN et de l'ADN. (Tableau 3) ou encore en inhibant les différents métabolismes clés comme celui de l'acide folique et de la synthèse *de novo* (Tableau 4).[19a,b]

[18] Adzitey F., Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry: A mini review. *World's Vet. J.*, **2015**, *5*, 36-41.

[19] a) Ebimieowei, E.; Ibemologi, A., Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*., **2016**, *4*, 90-101. b) Peach, K. C.; Bray, W. M.; Winslow, D.; Linington, P. F.; Linington, R. G., Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis, *Mol. Biosyst.*, **2013**, *9*, 1837–1848.

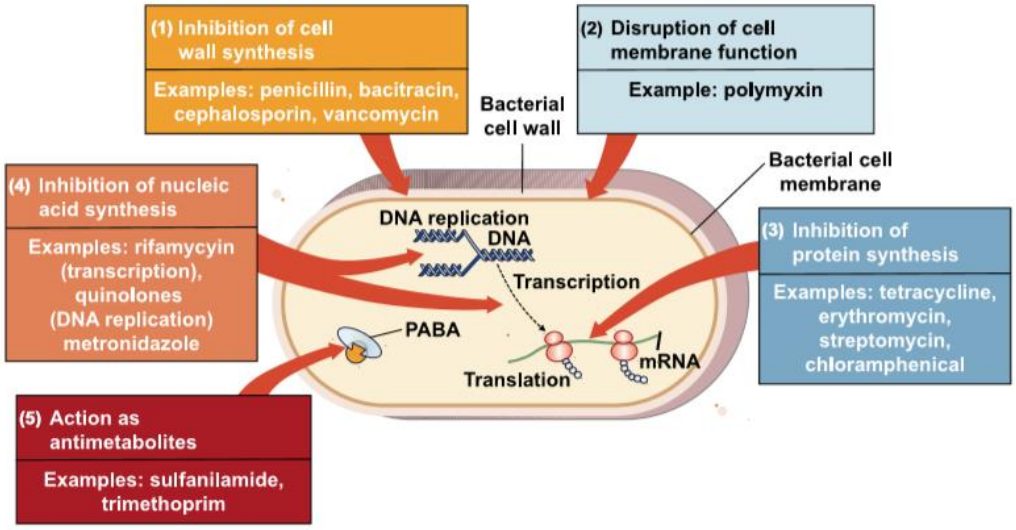


Figure 7: *Résumé des différentes cibles pour un antibiotique.*[20]

- **Inhibition/destruction de la paroi cellulaire ou plasmique :**[20]

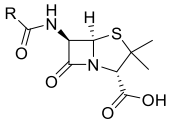
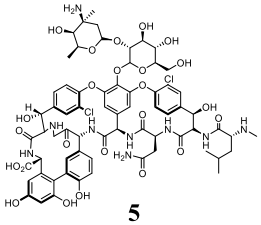
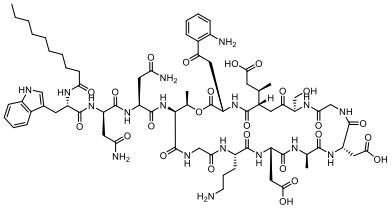
***β*-Lactamines**	**Glycopeptides**	**Lipopeptides**
Les plus utilisées	**Dernier recours**	**Peu de résistances**
 **4**	 **5**	 **6**
Contient un cycle β-lactame	**Carbohydrate connecté à un peptide**	**Lipide connecté avec un peptide**
Pénicilline, amoxicilline…	**Vancomycine, teicoplanin…**	**Daptomycine, surfactin**
Inhibe la biosynthèse des peptidoglycanes et donc de la paroi bactérienne	**Conduit à la lyse en empêchant la formation de liaison intra-membranaire**	**Détruit les fonctions membranaires, conduisant à la lyse**
1ère résistances dès 1942	**1ère résistances dès 1960**	**1ère résistances dès1987**
Large spectre	**Large spectre**	**Bactéries Gram positif**
Ex : *S. aureus, M. leprae*	Ex : *C. trachomatis, Rickettsia*	Ex : *M. luteus, C. albicans*

Tableau 1 *: Familles inhibant ou détruisant la paroi cellulaire.*

[20] Bbosa, G. S.; Mwebaza, N.; Odda, J.; Kyegombe, D. B.; Ntale, M., Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, *Health*, **2014**, 6, 410-425.

- **Inhibition de la synthèse protéique :**[20]

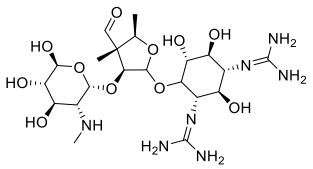
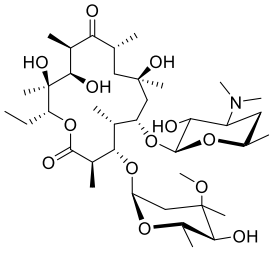
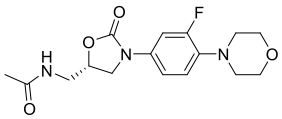
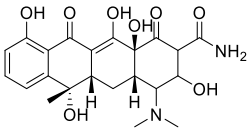
Aminoglycosides	Macrolides	Oxazolidinones	Tétracyclines
Seulement une vingtaine de molécules	**Les deuxièmes plus utilisés**	**Derniers recours**	**Beaucoup de résistances**
 **7**	 **8**	 **9**	 **10**
Sous-structures aminosucre	**Cycle à 14-16 carbones macrolides**	**2-oxazolidinone dans la structure**	**4 Cycles adjacents**
Streptomycine, neomycine…	**Erythromycine, azithromycine…**	**Linezoid, posizoid…**	**Tetracycline, doxycycline…**
Inhibe la synthèse de la sous-unité 30S de la protéine et limite la propagation	**Inhibe la synthèse de la sous-unité 30S de la protéine, et tue la bactérie**	**Inhibe la synthèse de la sous-unité 50S de la protéine et limite la propagation**	**Inhibe la synthèse de la sous-unité 30S de la protéine et limite la propagation**
1ère résistances dès 1946	**1ère résistances dès 1951**	**1ère résistances dès 2001**	**1ère résistances dès 1950**
Large spectre	**Large spectre**	**Bactéries Gram positif**	**Large spectre**
Ex : *M. tuberculosis, S. aureus*	Ex : *B. pertussis, C.psitacci*	Ex : *S. aureus* méti-S	Ex : *B. anthracis, T. pallidum*

Tableau 2 *: Familles inhibant la synthèse protéique.*

- **Inhibition de métabolismes clés :**[20]

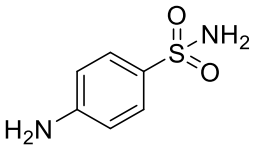
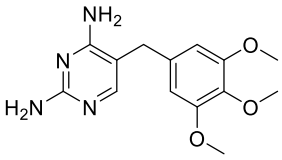
Sulfonamides	Diaminopyrimidines
Tout premier antibiotique commercial	**Inhibiteur de la dihydrofolate réductase**
 **11**	 **12**
Contient un groupement sulfonamide	**Contient un noyau pyrimidine**
Sulfanilamide, prontosil…	**Trimethoprime, pyrimethamime**
Inhibe l'élongation de l'ARN et bloque la multiplication	**Inhibiteur du métabolisme de l'acide folique**
1ère résistances dès 1942	**1ère résistances dès 1970**
Bactéries Gram positif	**Large spectre**
Ex : *S. aureus, E. fecalis*	Ex : *E. coli, S. saprophyticus*

Tableau 3 *Famille inhibant un métabolisme clé.*

- **Inhibition de la synthèse nucléique :**[20]

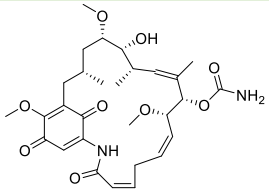
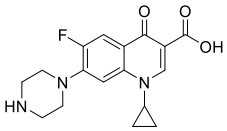
Ansamycines	Quinolones
Est aussi un antiviral	**Apparition rapide de résistances**
 **13**	 **14**
Un cycle aromatique formant un pont avec une chaîne aliphatique	**Cycle aromatique possédant un acide carboxylique**
Geldanamycin, rifamycin…	**Ciprofloxacin, levofloxacin…**
Inhibe la synthèse d'ARN, mais aussi celle de l'acide dihydrofolique conduisant à la mort cellulaire	**Inhibe la réplication et la transcription de l'ADN en bloquant la gyrase et la topoisomerase**
1ère résistances dès 1942	**1ère résistances dès 1968**
Bactéries Gram positif	**Large spectre**
Ex : *M. tuberculosis, M. leprae*	Ex : *B. anthracis, M. hominis*

Tableau 4 *: Familles inhibant la synthèse nucléique.*

Toutes les plus grandes familles d'antibactériens sont aujourd'hui impactées par des mécanismes de résistances, rendant de plus en plus difficile le traitement de certaines pathologies. Il est donc nécessaire de comprendre quels événements ont permis le développement de ces résistances, comment ces dernières sont transmises et surtout par quels moyens est-il possible de développer de nouvelles thérapies.

3. Les antibiotiques : Résistances et Transmissions

3.1. Situation actuelle

La pénicilline, premier antibactérien industriel développé, fut aussi le premier à être confronté au phénomène de résistance bactérienne de la souche *Staphylococcus aureus* dans les années 40.[21] C'est cet évènement qui a poussé les chercheurs à découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de développer de nouvelles familles d'antibactériens.

Les antibiotiques ont permis le développement de la médecine moderne en réduisant la mortalité infantile, augmentant l'espérance de vie. Leur utilisation se trouve même dans les transplantations, les chirurgies lourdes et les chimiothérapies.[22] Divers travaux et rapports d'organisations publiés[23] comme celui de l'OMS[24] envoient un signal d'alarme (AntiMicrobial resistance : AMR) pour prévenir du risque de résistances bactériennes d'ici 2050 et des conséquences sur la vie de la population. Cette résistance entraîne déjà près de 25000 décès en Europe, plus de 2 millions d'infections par des souches résistantes aux Etats-Unis, conduisant à 23000 décès par an. Le coût pour l'Union Européenne s'élève déjà à plus de 1,5 milliard d'euros. Si rien ne change, la mortalité de la population due aux résistances bactériennes pourrait s'élever à plus de 10 millions par an d'ici 2050.

Plusieurs facteurs ont été mis en évidence afin de justifier de la situation actuelle et de trouver des solutions (Schéma 4) :

- Surconsommation d'antibiotiques : le rapport de l'OMS met en lumière que plus la consommation augmente, plus les résistances apparaissent vite.
- Mauvaise utilisation/utilisation inutile : les prescriptions ne sont pas forcément adaptées aux symptômes, de plus l'automédication est un des facteurs responsables de cette crise.
- Utilisation d'antibiotiques à large spectre ou de derniers recours.
- Utilisation dans l'agriculture et la médecine vétérinaire.
- Peu de nouvelles molécules et familles d'antibactériens mises sur le marché ou passant les tests cliniques.

Lorsque l'on regarde le développement de médicaments et l'apparition de résistances, on se rend très vite compte que les résistances apparaissent extrêmement rapidement à la suite de la commercialisation d'une nouvelle classe d'antibiotique (Schéma 4) à cause du cycle d'acquisition naturel ; moins de 10 ans pour la pénicilline ou encore 1 année pour la méthiciline.[25]

---

[21] Rammelkamp, C. H.; Maxon, T, Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin, *Exp. Biol. Med.*, **1942**, *51*, 386–389.

[22] Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. K.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V., Molecular mechanisms of antibiotic resistance, N*ature*, **2015**, *13*, 42-51.

[23] De Kracker, M. E. A.; Stewardson, A. J.; Harbarth, S., Will 10 Million People die a year due to antimicrobial resistance by 2050?, *Plos. Med*, **2016**, *13*, e1002184.

[24] WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*

[25] Powers, J. H., Antimicrobial drug development-The past, the present, the future, *Clin. Microbiol. Infec.*, **2004**, *10*, 23-31.

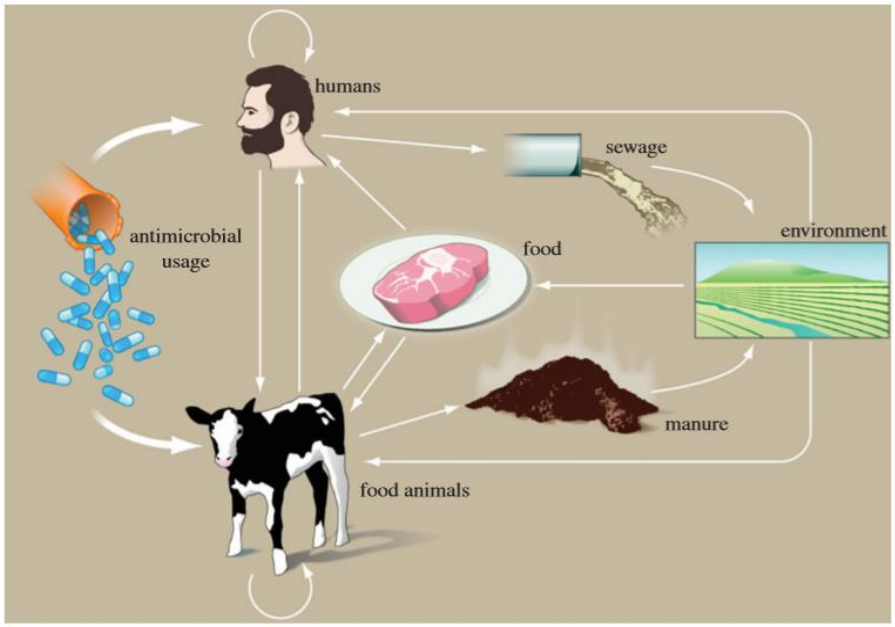


Schéma 4 : *Cycle naturel de création de résistances bactériennes.* [26]

Les différentes bactéries multi-résistantes (BMRs) peuvent être regroupées sous différentes familles : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA ; VISA pour vancomycine), entérobactéries productrices de béta-lactamase à spectre élargi (BLSE), entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC), entérocoques résistants à la vancomycine (ERV ; ERG pour glycopeptides), les *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (XDR). Aujourd'hui la situation est telle que des bactéries environnantes et du monde hospitalier sont devenues résistantes à plus d'une classe d'antibiotiques (Tableau 5) :[27]

Bactérie	Exemples de pathologies	Résistants à
Escherichia coli	Infection urinaire, sang	Fluoroquinolones, 3ème générations de céphalosporine
Staphylococcus aureus	Plaie cutanée, septicémie	Oxacilline, Vancomycine, linézolide
Streptococcus pneumoniae	Otite, méningite, pneumonie	Pénicilline
Shigella species	Diarrhée	Fluoroquinolones
Klesbsiella pneumoniae	Pneumonie, infection urinaire, sang	3ème générations de céphalosporine, 3ème générations de Carbapénème
Neisseria gonorrhea	Gonorrhée	3ème générations de céphalosporine
Enterococci **Vancomycine-resistant**	Infection intraabdominale	Vancomycine

Tableau 5 *: Bactéries environnantes résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques.*

[26] Woolhouse, M.; Ward, M.; Van Bunnik, B.; Farrar, J., Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment**,** *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **2015**, *370*.
[27] Khameneh, B.; Diab, R.; Ghazvini, K.; Sedigheh, B.; Bazzaz, B. S. F., Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them, *Microb. Pathogenesis,*, **2016**, *95*, 32-42.

3.2. Les résistances bactériennes

Les bactéries ont développé de nombreux mécanismes d'adaptation (propres à une bactérie ou pour une famille de composés bioactifs) [28a,b] afin de résister à une réponse immunitaire de l'hôte ou à l'action d'une molécule bioactive (Figure 8) :

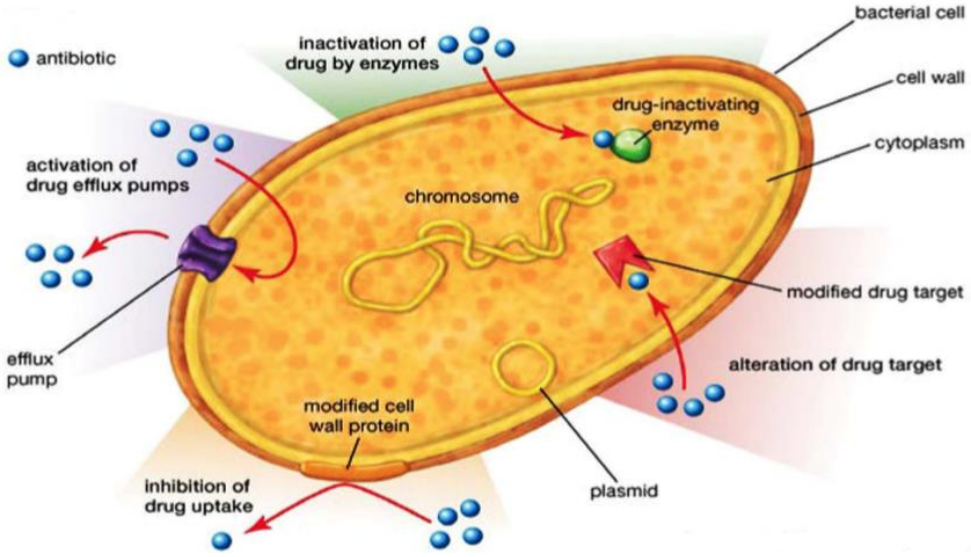


***Figure 8** : Représentation schématique des mécanismes de résistance bactérienne.*[29a,b]

Un des premiers mécanismes de résistance intrinsèque des bactéries afin de lutter contre une molécule bioactive est l'inactivation par des enzymes ; par des modifications : des enzymes spécifiques vont pouvoir acétyler (*N-acétyltransférases)*, adényler (*adényle transférase*), méthyler (*méthylène transférases*) ou phosphoryler (*O-phosphotransférases*) la molécule, la rendant obsolète. Plusieurs familles d'antibactériens sont impactées par ces enzymes : les aminoglycosides, les macrolides et les tétracyclines. La deuxième possibilité est la dégradation des composés bioactifs, par exemple *via* les *β-lactamases*. Ces enzymes (*céphalosporinases, pénicillinases, métallo-β-lactamases*) sont spécifiques d'une famille de composés.

Le second mécanisme mis en place est l'efflux de l'antibiotique. Les bactéries peuvent utiliser plusieurs sources d'énergie pour fonctionner : dissipation de protons (MFS, RND, SMR) ou d'ion sodium (MATE) ou par hydrolyse de l'ATP (ABC). Les pompes transmembranaires souvent utilisées en lien avec un autre mécanisme (modification de la cible ou de la molécule), vont évacuer la molécule. Elles sont composées de deux protéines, l'une permettant la ligation avec la molécule et l'autre créant le lien transmembranaire pour l'évacuer.

La protection de la cible en changeant la perméabilité de la paroi bactérienne afin d'empêcher la pénétration intracellulaire est un mode de résistance observé contre les aminoglycosides, les quinolones ou encore les carbapénèmes (perte de la porine D2 chez *P. aeruginosa*).

---

[28] a) Yelin, I.; Kishony, R., SnapShot: Antibiotic resistance, *Cell*, **2018**, *18*, 1136-1137. b) Bbosa, G.; Mwebaza, N.; Odda, J.; Kyegombe, D.; Ntale, M., Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, **2014**, *6*, 410-425.

[29] a) Peterson, E., & Kaur, P., Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.*, **2018** *9*. b) Wilcox, S., Encyclopædia-Britannica, **2013**, [14,52,54,55].

La modification de la cible est due à des enzymes responsables de la méthylation ou l'acétylation des résidus d'acides animés du site actif afin de bloquer la reconnaissance, par exemple :

- Celle des PBPs (Penicilin binding protein) afin d'empêcher la reconnaissance par les β-lactames.
- De la structure de la paroi cellulaire pour éviter la ligation des glycopeptides.
- Des protéines ribosomales pour empêcher l'inhibition de la synthèse protéique par les aminoglycosides.

Le bypass de la cible va permettre de créer des cibles de faibles affinités pour leurrer l'antibiotique *via* des enzymes spécifiques (*GyrB*). L'encagement de l'antibiotique par des protéines bactériennes empêchera la ligation de l'antibiotique avec sa cible.

3.3. Transmissions des résistances

Le développement de mécanismes de résistance est renforcé par le fait que les procaryotes résistants présentent des méthodes extrêmement efficaces pour transmettre leurs mécanismes de défenses : le transfert de gêne horizontal.[30] Ce mécanisme peut se diviser en 4 différentes stratégies (Schéma 5) :

- **Par conjugaison (1)** : nécessite une connexion *via* pili ou adhésine entre 2 entités. Une fois relié**e,** un transfert de plasmide (porteur de la résistance) est réalisé du porteur au réceptacle.
- **Par transformation (2)** : la bactérie va absorber, puis intégrer et enfin exprimer un fragment d'ADN présent dans son écosystème.
- **Par transduction (3)** : lors d'une transduction, un phage peut accidentellement récupérer un ADN bactérien d'une cellule précédemment infectée vers une nouvelle cellule ou il sera co-excisé puis exprimé.
- **Par transfert de gêne (4)** : lors de la lyse d'une cellule, des bactériophages peuvent transporter aléatoirement des brins d'ADN. Ces derniers seront transférés à des réceptacles voisins.

[30] Von Wintersdorff, C. J. H.; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; Van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H. M.; Wolffs, P. F. G., Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*.

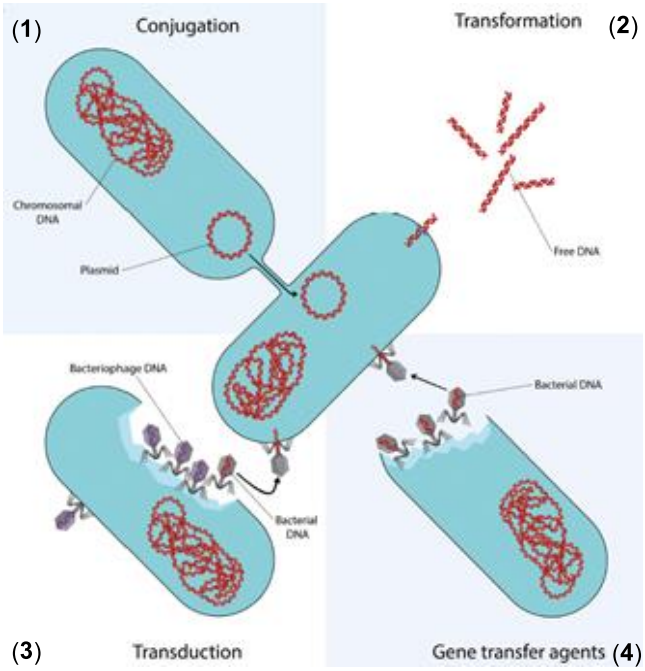


Schéma 5 *: Représentation des 4 mécanismes du transfert de gêne horizontal.*[21]

Aujourd'hui de nombreuses stratégies existent afin de contourner la résistance bactérienne.[31] On peut citer les peptides antimicrobiens (AMPs ; Microcins…), la phagothérapie (utilisation de phages comme OMKO1 pour lutter contre la formation de biofilms), une combinaison d'antibiotiques existants (colistine avec la tigecyline), l'utilisation de nanoparticules afin de réaliser une libération contrôlée, l'utilisation de liposomes chargés en molécules (rôle de reconnaissance de cible et de libération contrôlée), l'utilisation des produits naturels (flavonoïdes…), ou encore par la synthèse chimique.[32]

Il est possible par synthèse chimique de développer des molécules ciblant d'anciennes, mais aussi de nouvelles cibles thérapeutiques (enzymes, peptides, mécanismes biologiques…) (Figure 9) :[33]

- **<u>Inhibition de la synthèse protéique</u>** : en ciblant la *peptide déformylase* (*PDFs*). Ce sont des métalloenzymes permettant de retirer le groupement formyle porté par un initiateur méthionine dans les bactéries, mitochondries et chloroplastes. Elles sont essentielles à la croissance bactérienne. Le composé **15** est actuellement en phase I avec un IC_{50}= 4 nM sur *E.coli*.[34]
- **<u>Inhibition de la paroi cellulaire</u>** : en visant les *Mur ligases* (*Mur A-G*). Ces dernières sont responsables de la biosynthèse des peptidoglycanes composant de la paroi cellulaire. Il existe de nombreux inhibiteurs possédant des activités spécifiques sur chaque *Mur ligase*. Sur la *MurC* et *D*, un criblage a mis en évidence l'intérêt de dérivés triazines **16a,b,c**.

[31] Sultan, I.; Rahman, S.; Jan, A. T.; Siddiqui, M. T.; Mondal, A. H.; Haq, Q. M. R., Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front. Microbiol*., **2018**, *9*.
[32] Cattoir, V.; Felden, B., Future antibacterial strategies: From basic concepts to clinical challenges, *J. Infect. Dis*., **2019**, *220* , 350–360,
[33] Belete, T. M., Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents, *Hum. Microb. J.*, **2019**, *11*, 100052.
[34] Fieulaine, S.; de Sousa, R. A.; Maigre, L.; Hamiche, K.; Alimi, M.; Bolla, J.; Taleb, A.; Denis, A.; Pagès, J.; Artaud, I.; Meinnel, T.; Giglione, C., A unique peptide deformylase platform to rationally design and challenge novel active compounds, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 35429.

- **<u>Inhibition de la membrane cellulaire</u>** : en inhibant la synthèse de ses constituants (liposacharides, Vit. K…), la membrane cellulaire sera plus faible et conduira à la destruction de la bactérie. Par exemple la lysocine E **17** est efficace à 2 µg/mL sur *S. aureus.*[35]
- **<u>Inhibition de la division cellulaire</u>** : en inhibant ou dégradant (par l'activation d'une protéase) la *FtsZ* une enzyme essentielle à la survie de la bactérie. Elle permet l'assemblement des dernières protéines lors de la division cellulaire. La viriditoxine **18** est active à 2 µg/mL sur *S. aureus.*[36]
- **<u>Inhibition de la synthèse *de novo d*'ADN</u>** : en inhibant les enzymes impliquées dans cette voie biologique, Il sera possible d'arrêter la synthèse des différents constituants de l'ADN, empêchant ainsi les différentes étapes de réplications et d'élongations.

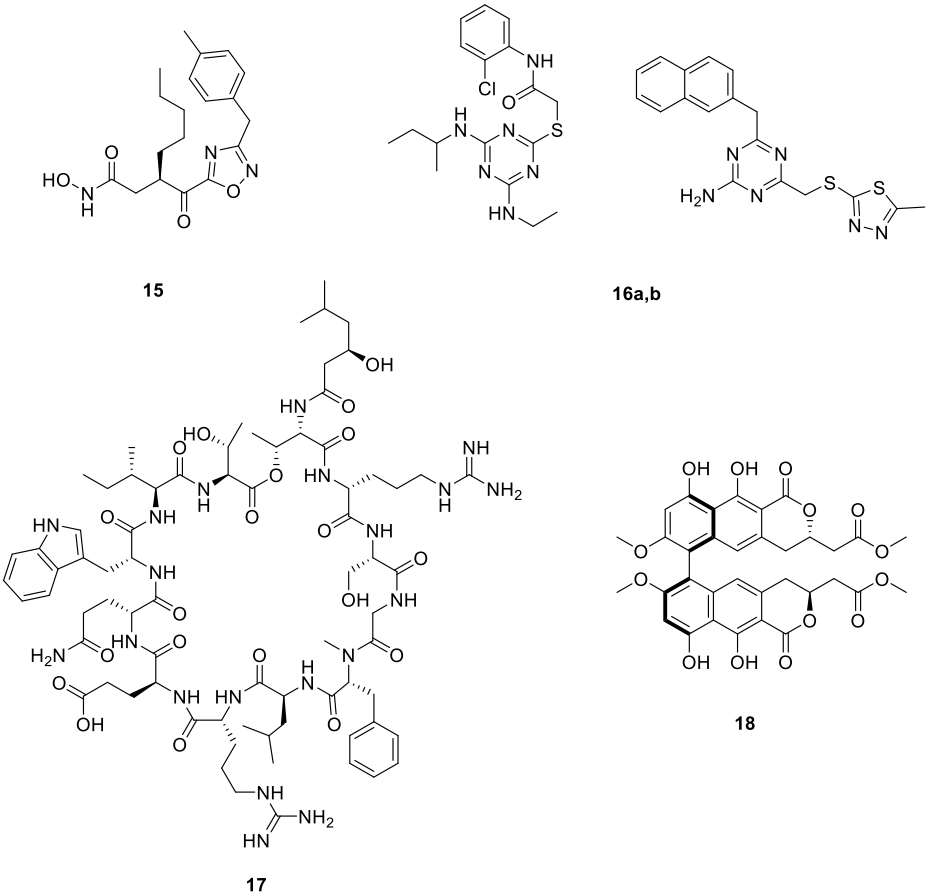


Figure 9 *: Nouvelles molécules visant de nouvelles cibles thérapeutiques.*

[35] Paudel, A.; Hamamoto, H.; Panthee, S.; Sekimizu, K., Menaquinone as a potential target of antibacterial agents. *Drug Discov. Ther*., **2016**, *10*, 123–128.
[36] Wang, J.; Galgoci, .; Kodali, S.; Herath, K; B.; Jayasuriya, H.; Dorso, K., Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibacterial agents, *J. Biol. Chem*., **2003**, *278*, 44424–44428.

4. Les *Thymidylates Synthases* (*TSases*)

4.1. Du cycle folate vers les *Thymidylates synthases*

A ce jour, la plupart des bactéries pathogènes (ex : *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Clostridium botulism*…) rencontrées et traitées par l'Homme ont développé des résistances envers une grande partie des solutions thérapeutiques existantes. Une des solutions envisagées dans ces recherches pour la lutte contre les résistances bactériennes a été la synthèse *de novo* de l'ADN et plus particulièrement les étapes conduisant à la biosynthèse de la thymidine-5'-triphosphate (dTTP). L'inhibition du dTTP empêche la réplication et la réparation de l'ADN bloquant ainsi son élongation et donc l'arrêt du cycle cellulaire conduisant à l'apoptose.[37] Cette cascade métabolique est bien décrite dans la littérature, mais une des formes les plus traitées est celle du cycle folate. C'est un cofacteur permettant la méthylation du dUMP **19** en dTMP **20** *via* une t*hymidylate synthase* (*TS*), c'est une méthylation réductrice. La méthylation du dUMP permettra la réduction du cofacteur. Par la suite le produit sera di- puis tri-phosphorylé par des *thymidines kinases* (TK1 ou 2), avant d'être intégré à l'ADN *via* une *ADN polymérase* durant la réplication (Schéma 6).[38a,b] Les deux enzymes les plus importantes dans ce mécanisme sont la *dihydrofolate reductase* (*DHFR*) et la *dihydroptéroate synthase* (*DHPS*) pour la biosynthèse des différents cofacteurs.

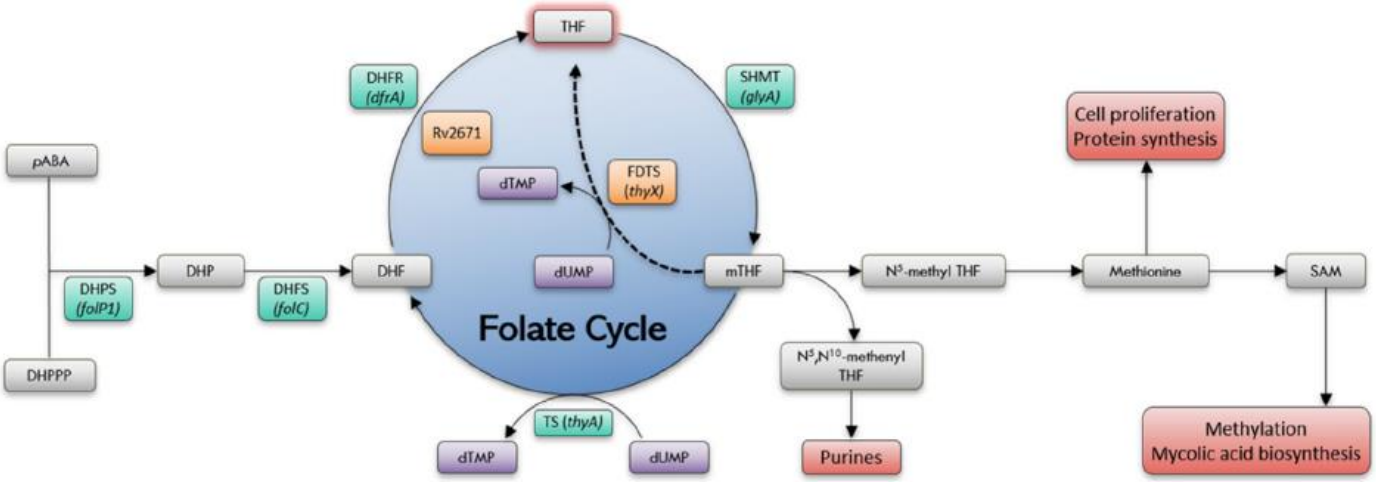


Schéma 6 *: Cycle folate dans la biosynthèse du dTMP* ***20*** *à partir du dUMP* ***19.*** [38b]

Ce processus est commun à de nombreuses espèces eucaryotes et procaryotes (animaux, plantes, microorganismes, Homme). Dans le cycle folate, deux cofacteurs sont essentiels, le dihydrofolate (DHF) et le méthyle tétrahydrofolate (mTHF). Le *DHPS* intervient dans la synthèse du DHF, en permettant le couplage de la partie ptérine à la partie acide *p*-aminobenzoïque. Par la suite, la *DHFR* va réduire le DHF en tétrahydrofolate (THF). Ce dernier deviendra le transporteur de méthylène pour le dUMP **19** en subissant une transformation en 5,10-CH_2-THF *via* une sé*rine hydroxyméthyl transférase* (SHMT1). Les produits folates de la biosynthèse seront par la suite utilisés dans diverses autres synthèses (pour la prolifération cellulaire, la synthèse protéique…).

[37] Chon, J. ; Stover, P. J.; Field, M. S., Targeting nuclear thymidylate biosynthesis, *Mol. Aspects Med.*, **2017**, *53*, 48-56.
[38] a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnson, P. G.; Lenz, H-J.; Ladner, R. D., Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy, *Nature*, **2014**, *11*, 282-298. b) Hajian, B.; Scocchera, E.; Shoen, C.; Krucinska, J.; Viswanathan, K.; Dayanandan,N. G.; Erlandsen, H.; Estrada, A.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Cynamon, M.; Wright, D., Drugging the folate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The role of multi-targeting agents, *Cell Chem. Biol.*, **2019**, 26, 781-791.

L'enzyme *ThyA* est présente dans l'ensemble des cellules eucaryotes et 70% des procaryotes pathogènes et permet donc, en présence des différents substrats naturels (dUMP, folate, NADPH), la biosynthèse du dTMP. En 2002, le Pr. Myllykallio et ses collaborateurs ont mis en évidence une *Flavin-Dependente Thymidylate Synthase* (*FDTS*) chez *Helicobacter Pylori* (*H. Pylori*). [39]

Cette enzyme encodée par le gène *ThyX* (anciennement *Thy1*) est absente des cellules eucaryotes mais présente dans environ 30 % des procaryotes pathogènes à Gram positif ou négatif, faisant de cette enzyme une cible thérapeutique de première ordre dans le contournement de résistances bactériennes et le développement de nouveaux composés bioactifs sélectifs (Figure 10).[40]

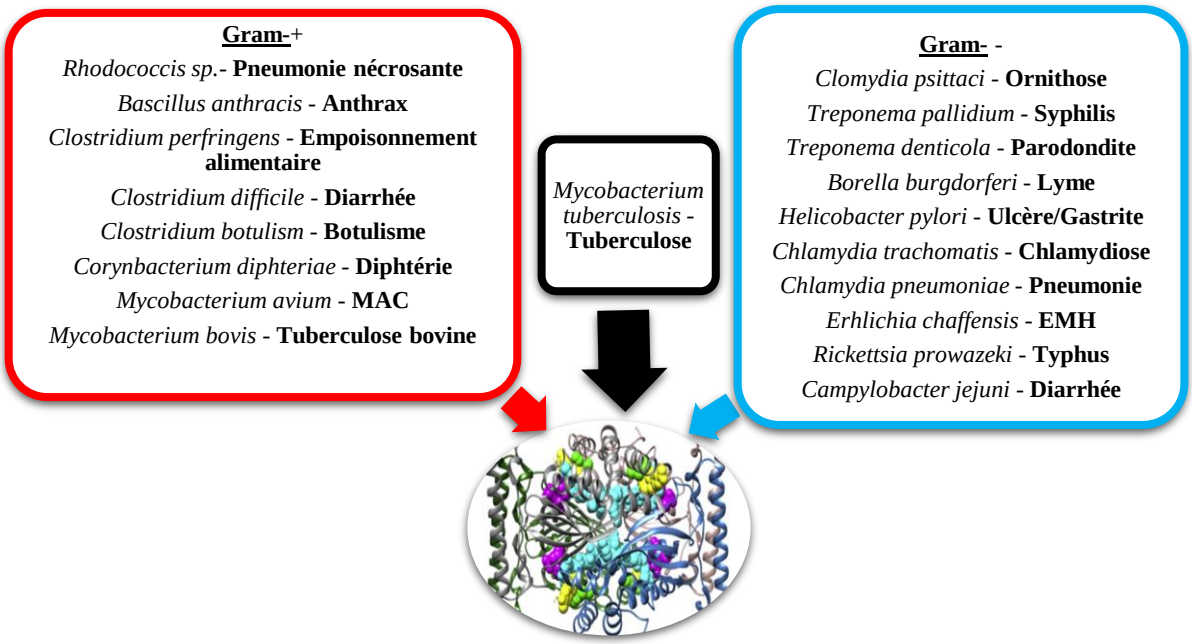


Figure 10 *: Microorganismes procaryotes pathogènes exprimant le gène de la FDTS (ThyX).*[40]

4.2. *ThyA* / *ThyX* : 2 enzymes orthologues

Les deux enzymes *ThyA* et *ThyX* sont considérées comme orthologues, c'est-à-dire qu'elles possèdent un même gène parent, mais au cours de l'évolution, ces deux enzymes ont développé un mécanisme d'action différent, une séquence génétique différente et une structure différente. Cela n'empêche pas qu'elles réalisent la même biosynthèse, celle de réaliser la méthylation réductrice du dUMP en dTMP (Schéma 7).[41]

[39] Myllykallio, H.; Lipowski, G.; Leduc, D.; Filee, J.; Forterre, P.; Liebl, U., An alternative Flavin-Dependent Mechanism for Thymidylate synthesis, *Science*, **2002**, *297*, 105-107.
[40] Mathews, I. I., Flavin-Dependent Thymidylate Synthase as a drug target for deadly microbes : Mutational study and a strategy for inhibitor design, *J. Bioterror. Biodef.*, **2014**, suppl 12, 004.
[41] Chernyshev, A.; Fleischmann, T.; Kohen, A., Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, *74*, 282-289.

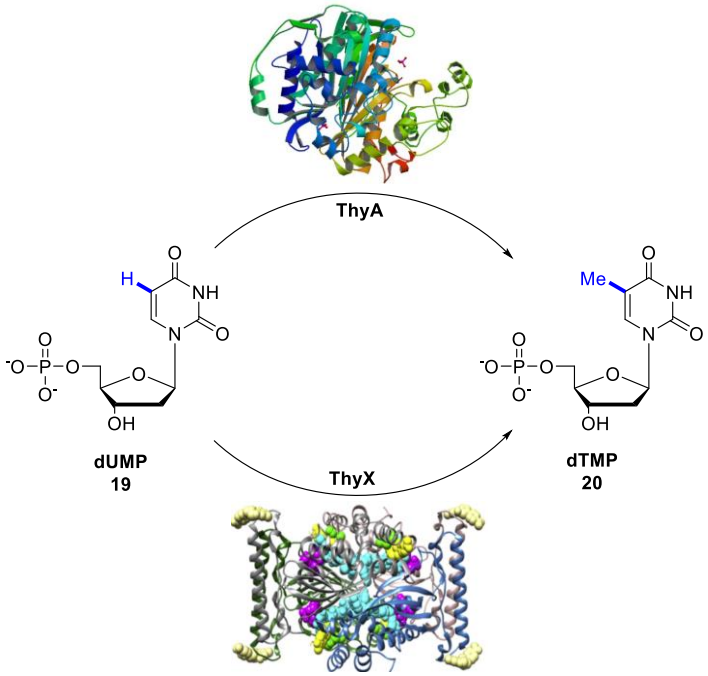


Schéma 7 *: Deux voies pour la biosynthèse du dTMP.*

4.2.1. Thymidylate Synthase humaine et bactérienne (ThyA)

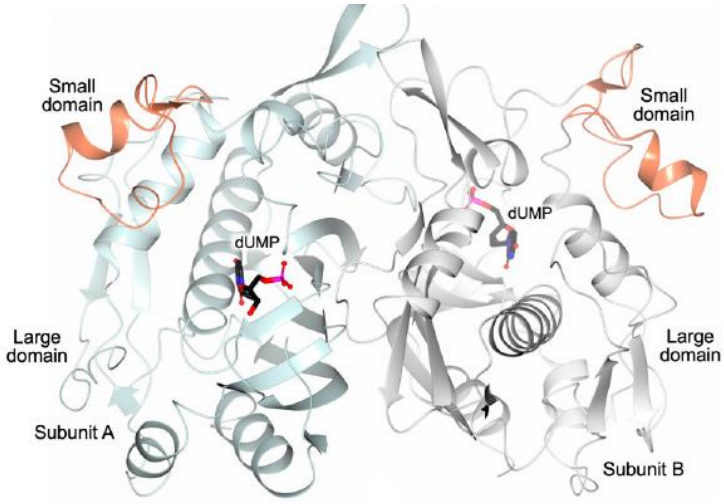


Figure 11 *: ThyA cristallisée en présence de dUMP chez Mycobacterium tuberculosis.*[45a]

Cette enzyme est un homodimère dont les 2 sites actifs se trouvent entre deux sous-unités appelées grand domaine avec une conformation fixe et petit domaine ayant une conformation variable. Cette enzyme fait intervenir un cofacteur, le méthylène tétrahydrofolate (CH_2H_4Folate), avec le dUMP **19** afin de former la dTMP **20** (Figure 11). Le cofacteur est régénéré en présence de la *DHFR via* le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) (Schéma 8). Cette enzyme est présente chez l'Homme et chez les bactéries afin de réaliser la biosynthèse du dTMP.

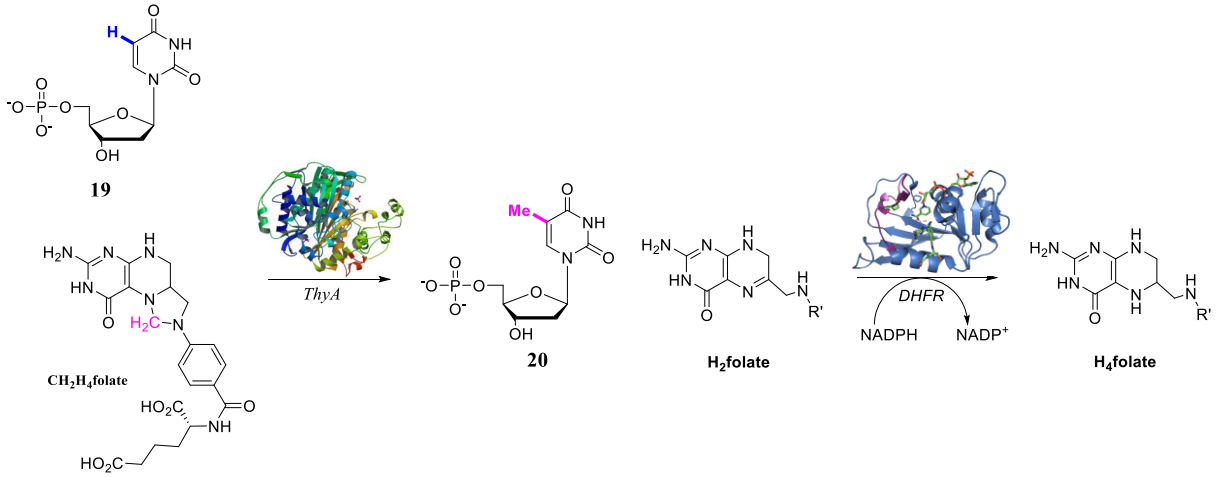


Schéma 8 *: Réaction générale de la Thymidylate synthase.*

La littérature sur l'enzyme humaine *ThyA* est relativement abondante, il existe près de 81 formes cristallisées de cette enzyme sur la Protein Data Bak (PDB). De plus son mécanisme a été longuement étudié au cours de ces dernières années (1er mécanisme en 1987). Il est connu sous le nom de *Thymidylate synthase* classique et se divise en 5 étapes. Le **dUMP 19** se lie en premier sur le site actif de la ThyA, suivi du cofacteur **CH_2H_4Folate**. Les deux premières étapes étant la protonation du **CH_2H_4Folate** et une addition de Michael de la **Cystéine 146** sur la position C^6 du **dUMP 19**. L'énolate ainsi formé peut se lier avec la position C^{11} du cofacteur *via* une condensation de Manich. Il y a ensuite élimination du THF *via* une réaction de Hoffman. La dernière étape est le transfert d'hydrure conduisant à la rupture de la liaison C^6**-Cystéine 146** et la libération du **dTMP 20** (Schéma 9).[42]

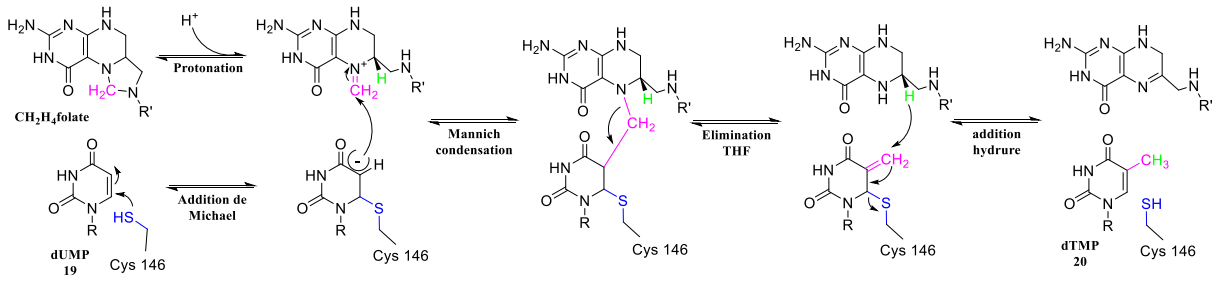


Schéma 9 *: Mécanisme classique de la Thymidylate Synthase.*[42]

Dernièrement, ce mécanisme a été revu et complété afin de résoudre certaines incohérences. Diverses expériences de cinétiques,[43] UV et modélisations,[44] ont été effectuées et ont montré que la liaison entre le substrat et le site actif ne serait pas covalente durant l'ensemble de la biotransformation. Dans ce nouveau mécanisme, les deux premières étapes et la dernière restent identiques. Il y aura une rupture de la liaison C^6**-Cystéine 146** suite à une déprotonation *via* un

[42] Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A., Trappin of an intermediate in the reaction catalyzed by Flavin-Dependent, Thymidylate Synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4442-4448.
[43] Kanaan, N.; Ferrer, S.; Martí, S.; Garcia-Viloca, M.; Kohen, A.; Moliner, V., Temperature dependence of the kinetic isotope effects in *Thymidylate Synthase*. A theoretical study. *J. Am. Chem. Soc*., **2011**, *133*, 6692–6702.
[44] Wang, Z.; Ferrer, S.; Moliner, V.; Kohen, A., QM/MM calculations suggest a novel intermediate following the proton abstraction catalyzed by *Thymidylate Synthase*., *Biochemistry*, **2013**, *52*, 2348–2358.

cofacteur basique dans le site actif, puis une nouvelle addition de Michael de cette même cystéine, conduisant à la formation du méthylène. (Schéma 10).[45a,b]

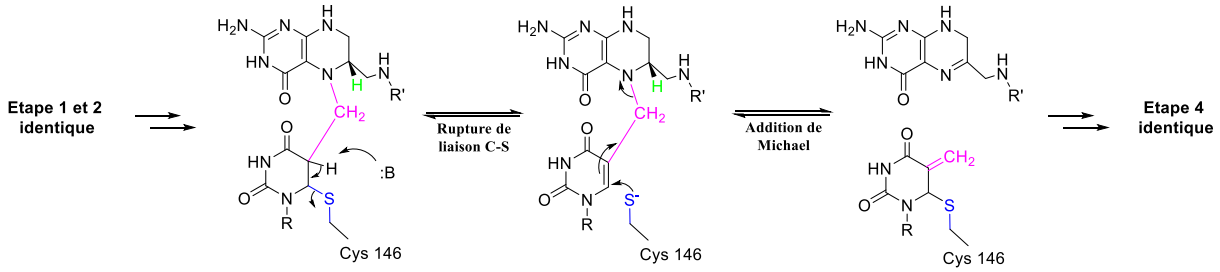


Schéma 10 : *Nouveau mécanisme proposé.*[45a,b]

Afin d'inhiber la *Thymidylate Synthase*, deux familles actives ont été publiées. Le problème majeur de ces molécules est la forte toxicité due à la faible sélectivité entre l'enzyme humaine et bactérienne. La première famille est celle des fluoropyrimidines visant directement l'enzyme (Figure 12).[46a,b,c] Ces 4 composés sont des inhibiteurs compétitifs du dUMP. L'inhibition de l'enzyme empêchera la formation du dTMP et donc conduira à l'arrêt de l'élongation de l'ADN.

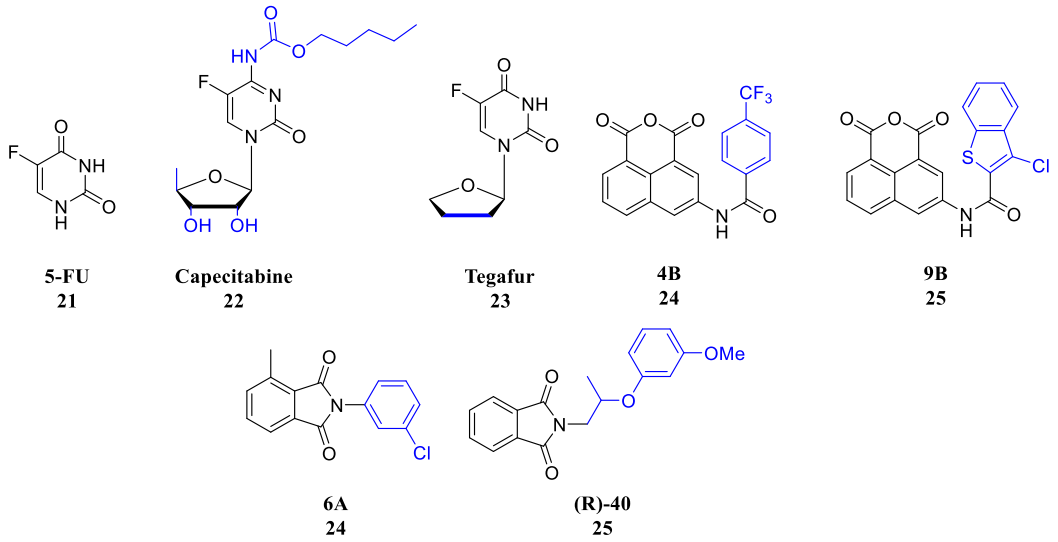


Figure 12 *: Inhibiteurs directs de la Thymidylate Synthase.*

Le premier inhibiteur de la *TS* a été le 5-FU **24** (MIC_{90} (H37Rv) = 3.1 µM) (vise synthèse d'ARN, d'ADN, la paroi cellulaire, mais aussi la *TS*). Ce composé est transformé en FdUMP **25** pour agir sur la *TS via* l'intervention d'une *thymidine phosphorylase* (DeoA) et d'une *thymidine kinase*. Afin de contourner ce problème de pharmacocinétique mais aussi de dégradation *via* des *dihydropyrimidine dehydrogenase* (DPD), des prodrogues de ce dérivé ont été développées. Le capecitabine **22** (MIC_{90}

[45] a) Pozzi, C.; Lopresti, L.; Tassone, G.; Mangani, S., Targeting methyltransferases in human pathogenic bacteria: Insights into *Thymidylate Synthase* (TS) and *Flavin-Dependent* (FDTS), *Molecules*, **2019**, *24*, 1638-1659. b) Kholodar, S.; Kohen, A., Noncovalent intermediate of *Thymidylate Synthase*: Fact or fiction?, *J. Aam. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 8056-8059.

[46] a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnson, P. G.; Lenz, H.; Ladner, R. D., Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer thérapy, *Nature*, **2014**, *11*, 282-298. b) Danenberg, P. V.; Langenbach, J.; Heidelberg, H., Structures of reversible and irreversible complexes of thymidylate synthetase and fluorinated pyrimidine nucleotides, *Biochem.*, **1974**, *13*, 926-933. c) Singh, V.; Brecik, M.; Mukherjee, R.; Evans, J. C.; Svetlíková, Z.; Blaško, J.; Surade, S.; Blackburn, J.; Warner, D.F.; Mikušová, K.; Mizrahi, V., The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil, *Chem. Biol.*, **2015**, *22*, 63-75.

(H37Rv) = 3.1 µM) est la première prodrogue du 5-FU **21** synthétisée. Elle est transformée en 5-FU **21** *via* une cascade de 3 enzymes : *carboyl esterase*, c*ytidine déaminase* et une t*hymidine/uridine phosphorylase*. Le tegafur **23** une autre prodrogue du 5-FU est souvent administré en combinaison avec de l'uracile. Il est transformé en sa forme active dans le foie *via* le cytochrome P-450. Il est dans un premier temps hydroxyméthylé en 5', puis dégradé *via thymidine/uridine phosphorylase* pour donner le 5-FU qui subira ensuite la cascade métabolique classique pour agir sur la *TS*.

Deux séries de composés polyhétérocycliques ont été reportés. La première à partir de dérivés du naphatalène **24** (Ki = 6.4 µM) et **25** (Ki = 6.5 µM) sur *E. coli*.[47] La seconde série de petits hétérocycles reportés est dérivée de phtalamide **26** (Ki (*Ef*) = 7.0 µM) et **27** (Ki (*Ef*) = 13.0 µM).[48]

La seconde est celle des antifolates.[49] Elle vise à inhiber la biosynthèse du cofacteur folate afin d'empêcher la production du transporteur de méthylène (Figure 13).[50]

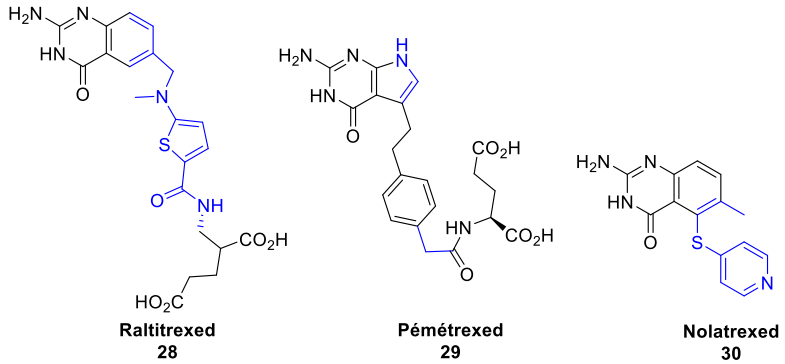


Figure 13 *: Inhibiteurs indirects Antifolates.*

Ils seront transportés dans la cellule *via* des transporteurs de folates. Ces 3 composés sont des inhibiteurs des enzymes responsables de la biosynthèse des cofacteurs de la cible enzymatique. Ils sont dans un premier temps transformés en leurs différentes formes actives *via* une *folypolyglutamate synhtase* (*FPGS*). **28** (Ki (TS) = 62 nM)[46a] est un dérivé des folates, il est considéré comme un antifolate, mais agit uniquement sur l'enzyme et non sur la synthèse *de novo* de ces derniers.[46a] Le composé **27** agit sur la *TS*, la *DHFR*, les g*lycinamides ribonuclétoides transformylases* responsables de l'acétylation du THF et *phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase* (*AICART*) responsable de la synthèse du tétrahydrofolate. Le composé **30** (inhibe à la fois la *TS* mais aussi la DH*FR*.

Une dernière série a été récemment publiée, celle des antifolates non classiques ionisés (INCAs) (Figure 14).[38b]

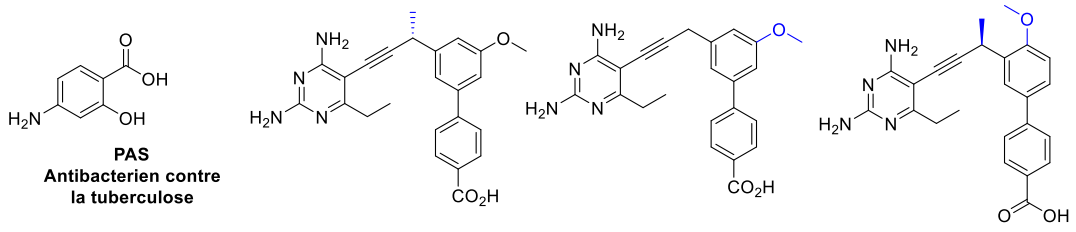
---

[47] Ferrari, S.; Ingrami, M.; Soragni, F.; Wade, R.C.; Costi, M.P. Ligand-based discovery of N-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isochromen-5-yl)-carboxamide and sulfonamide derivatives as thymidylate synthase A inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 663-668.

[48] a) Mangani, S.; Cancian, L.; Leone, R.; Pozzi, C.; Lazzari, S.; Luciani, R.; Ferrari, S.; Costi, M.P. Identification of the Binding Modes of N-Phenylphthalimides Inhibiting Bacterial Thymidylate Synthase through X-Ray Crystallography Screening, *J. Med. Chem*. **2011**, *54*, 5454–5467. b) Catalano, A.; Luciani, R.; Carocci, A.; Cortesi, D.; Pozzi, C.; Borsari, C.; Ferrari, S.; Mangani, S. X-ray crystal structures of Enterococcus faecalis thymidylate synthase with folate binding site inhibitors, *Eur. J. Med. Chem*. **2016**, *123*, 649–664

[49] Gonen, N.; Assaraf, G., Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance, *Drug Res.*, **2002**, *15*, 183-210.

[50] Qian-Ru, D.; Dong-Dong, L.; Ya-Zhou, P.; Jing-Ran, L.; Jian, S.; Fei, F.; Wei-Qing, Z.; Hai-Bin, G.; Hai-Lang, Z., Novel 1,3,4-oxadiazole thioether targeting thymidylate synthase as dual anticancer/antimicrobial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 2286-2297.



	31	32	33
Mtb DHFR K_i (nM)	0.91 ± 0.16	6.55 ± 0.26	9.9 ± 0.62
Hu DHFR K_i (nM)	60 ± 15	51 ± 3	144 ± 3.5

Figure 14 *: Inhibiteurs INCAs de la DHFR de Mtb.*[38b]

Les composés **31-33** ont été découverts à la suite d'un criblage et se retrouvent chargées à pH physiologique. Elles pénètrent de manière passive dans la cellule contrairement aux composés **28-30** qui activent des transporteurs transmembranaires et possèdent un temps de dissociation très lent permettant une occupation longue au sein de la cible. Ces composés ne présentent aucune toxicité cellulaire.

4.2.2. Flavine-Dependente Thymidyltates Synthases (ThyX)

- Structure et mécanismes :

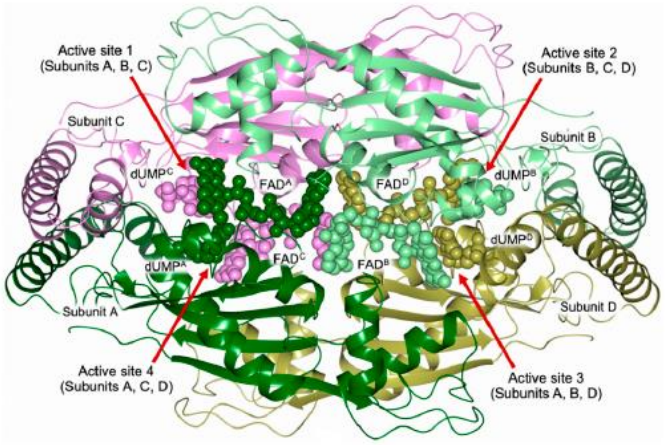


Figure 15 *: Mtb ThyX cristalisée.*[45a]

A la différence de la *ThyA*, la *ThyX* est un homotétramère possédant 4 sites actifs se trouvant à la jonction de 3 sous-unités, conférant à cette enzyme de nombreuses libertés conformationnelles (Figure 15). Cette enzyme fait intervenir un cofacteur le CH_2H_4Folate, le dUMP **19**, ainsi que de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (*NADPH*) afin de former la dTMP **20**. Mais dans ce mécanisme le cofacteur est régénéré par un cycle catalytique redox d'une Flavine Adénosine Dinucléotide (FAD). La *ThyX* est donc capable de catalyser deux bioconversions avec une seule enzyme contrairement à la *ThyA* (Schéma 11).

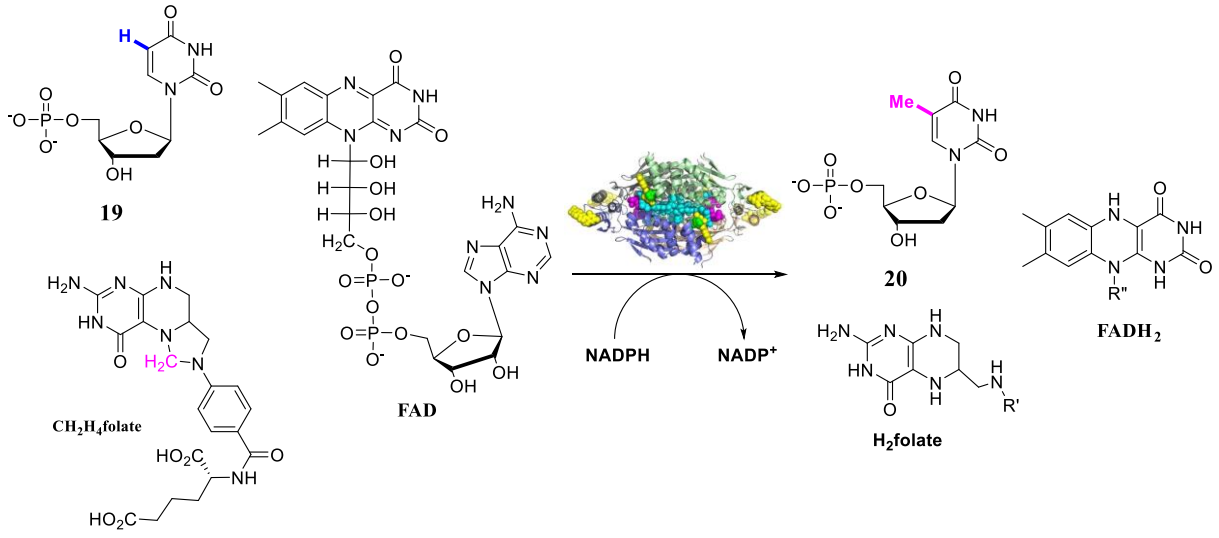


Schéma 11 *: Réaction générale de la* Flavine-Dependente Thymidylate Synthase.

A ce jour le mécanisme de méthylation *via* la *FDTS* n'est toujours pas totalement fixé, mais permet cependant le développement de nouvelles molécules. Une des plus grandes différences avec le mécanisme impliquant la *ThyA* est la non-ligation des substrats dans le site actif renforçant la nécessité de comprendre ce mécanisme et ses différents intermédiaires, afin de concevoir des molécules pouvant inhiber l'enzyme.

Le premier mécanisme publié fut celui par *Kohen et al*. en 2004. Celui-ci est décrit comme pouvant être divisé en deux, une première partie correspondant à la réduction lente (environ 25 ms) du FAD en $FADH_2$ et une seconde partie rapide, correspondant au transfert de méthylène et l'oxydation du $FADH_2$ en FAD (oxydation moins de 1 ms, non mesurable), le turnover de l'enzyme étant de 1 s (diagramme de Cleland). Dans ce premier mécanisme, le FAD n'est pas considéré comme porteur du méthylène, mais comme donneur d'hydrure lors de la dernière étape afin de former la dTMP **20**. Ce premier mécanisme reste sensiblement identique à celui de la *TS* classique (Schéma 12). [51]

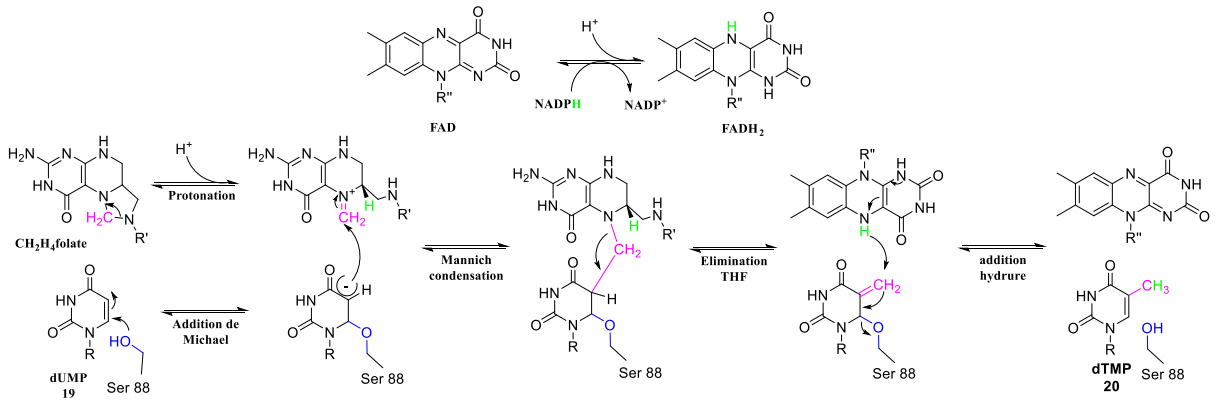


Schéma 12 *: Premier mécanisme de la FDTS proposé par Kohen et al.*[49]

[51] Agrawal, N.; Lesley, S. A.; Kuhn, P.; Kohen, A. mechanistic studies of a *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *Biochemistry*, **2004**, 43, 10295-10301.

Par la suite, les différents travaux ont porté sur la compréhension de la cinétique,[52] la modélisation des substrats et de leurs positionnements[53] à l'intérieur du site actif. En 2009, *Kohen et al.* ont publié dans *Nature* une nouvelle version de ce mécanisme (Schéma 13).[54] C'est dans ce mécanisme que l'idée qu'aucun des cofacteurs de l'enzyme ne sont liés au site actif a été validée. Celui-ci a été déterminé par la cristallisation du complexe FDTS-FAD-dUMP. La provenance de l'hydrure sur le méthylène C^5 a été déterminée *via* substitution par du D_2O sur la forme réduite du FAD. La première étape est un transfert d'hydrure du $FADH_2$ vers le dUMP **19**, les deux étapes suivantes restant identiques au précédent mécanisme. La dernière étape est un transfert d'hydrure de la position C^6 vers le méthylène en C^5.

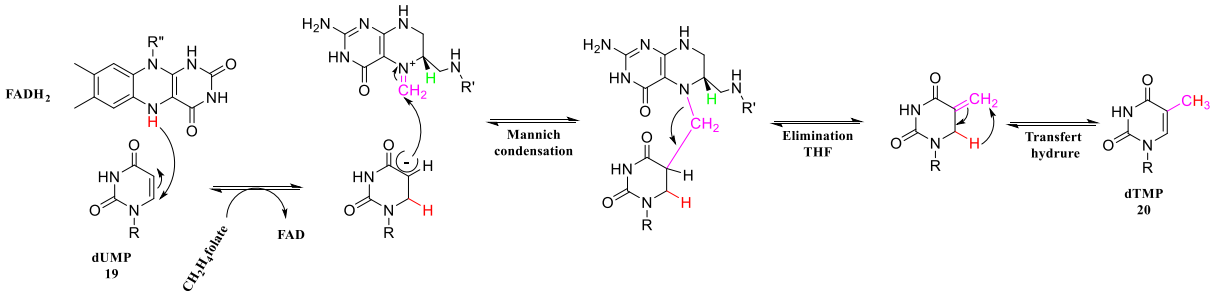


Schéma 13 *: Second mécanisme de la FDTS proposé.*[52]

Par la suite, plusieurs équipes ont cherché à identifier les différents intermédiaires,[55, 56] l'activation de la cascade biologique mise en jeu,[57] ainsi que la position des cofacteurs dans le site actif. Un nouveau mécanisme[53] a été proposé en 2012 par *Kohen et al.* suggérant un transfert d'hydrure après le transfert de méthylène, l'activation du dUMP **19** se faisant *via* une polarisation.

Le dernier mécanisme connu fait intervenir un nouvel intermédiaire, isolé par un quench (en présence d'eau et d'acide à l'étape 3) et mis en évidence par RMN,[58] qui montre la création d'un pont méthylène entre le FAD et le dUMP **19**. Ce nouveau mécanisme suggère donc que le rôle du FAD est le même que celui du CH_2H_4folate, c'est-à-dire un transporteur de méthylène. L'idée de non attachement au site actif est ainsi étayée par l'observation en modélisation moléculaire d'un stacking (interactions de types π-stacking entre des molécules possédant des sites aromatiques) des 3 molécules dans le site actif : folate -3.3 Å - FAD -3.5 Å - dUMP. (Schéma 14).[59]

[52] Mason, A.; Agrawal, N.; Washington, M. T.; Lesley, S. A.; Kohen, A., A lag-phase in the reduction of flavin dependent thymidylate synthase (FDTS) revealed a mechanistic missing link, *Chem. Commun.*, **2006**, 1781.
[53] Wang, Z.; Chernyshev, A.; Koehn, E. M.; Manuel, T. D.; Lesley, S. A.; Kohen, A., Oxidase activity of a flavin-dependent thymidylate synthase, *FEBS Journal*, **2009**, *276*, 2801–2810.
[54] Kohen, E. M.; Fleischmann, T.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Kohen, A., An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the thyX gene, *Nature*, **2009**, *458*, 919-924.
[55] Mishanina, T. V.; Koehn, E. V.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A.,Trapping of an Intermediate in the reaction catalyzed by *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *J. Am. Chem. Soc.*,**2012**,*134*, 4442-4448.
[56] Conrad, J. A.; Maldonado, M. O.; Hoppe, S. W.; Palfey, B. A., Detection of intermediates in the oxidative half-reaction of the FAD-Dependent Thymidylate Synthase from Thermotoga maritima: Carbon transfer without covalent pyrimidine activation, *Biochemistry*, **2014**, *53*, 5199-5207.
[57] Stull, F. W.; Bernard, S. M.; Sapra, A.; Smith, J. L.; Zuiderweg, E. R. P.; Palfey, B. A., Deprotonations in the reaction of *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3261-3269.
[58] Mishanina, T. V.; Yu, L.; Karunaratne, K.; Mondal, D.; Corcoran, J. M.; Choi, M. A.; Kohen, A., An unprecedented mechanism of nucleotide methylation in organisms containing thyX, *Science*, **2016**, *351*, 507-510.
[59] Choi, M.; Karunaratne, K.; Kohen, A., *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* as a new antibiotic target, *Molecules*, **2016**, *21*, 654-664.

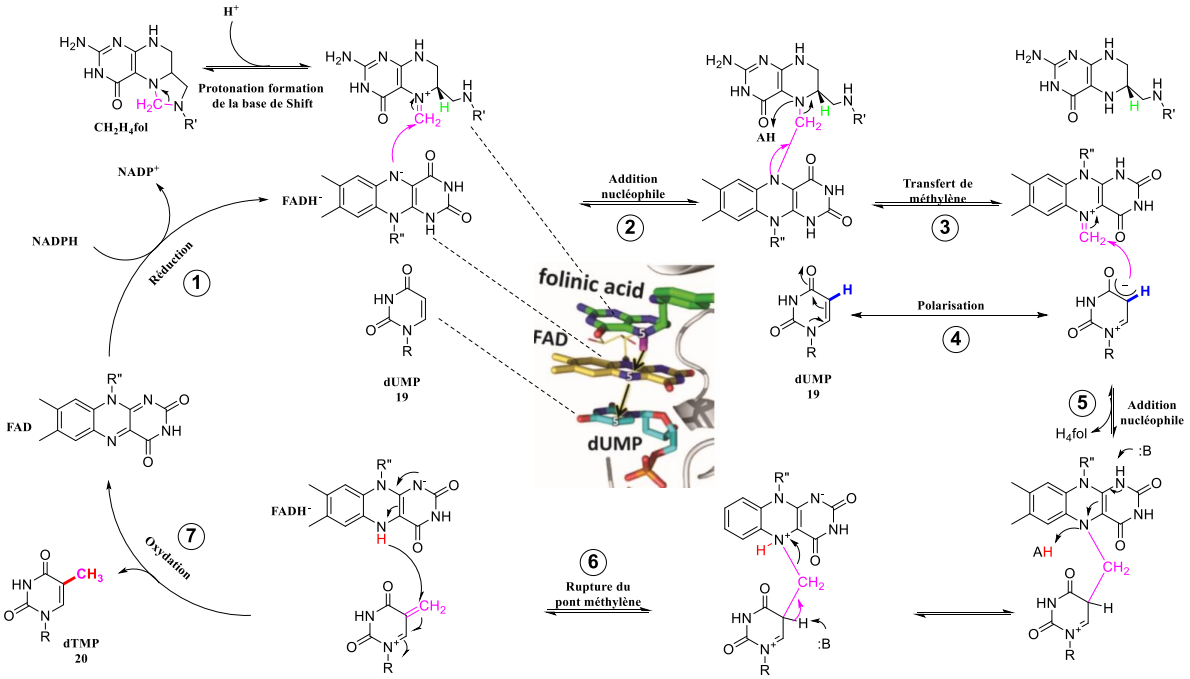


Schéma 14 *: Dernier mécanisme de la FDTS publié et accepté à ce jour.*[45a]

Dans ce dernier mécanisme, le côté séquentiel est encore plus marqué, le premier complexe qui sera formé est celui du FAD_{ox}-NADPH, une fois la réduction réalisée (**1**). Le dUMP **19** rentre afin de former le complexe $FADH^-$-$NADP^+$-dUMP (**2**). Le folate rentre seulement en dernier dans le site actif pour transférer le méthylène au FAD et le $NADP^+$ ressort (**3**). On a alors le complexe Folate-FAD_{red}-dUMP. La rupture du premier pont méthylène conduit à la formation du second pour donner le complexe FAD_{red}-dUMP (**4** et **5**). La rupture de ce dernier pont (**6**) conduit à l'oxydation du FAD et la sortie du folate puis celle du dTMP **20** afin de commencer un nouveau cycle (**7**). La première partie est relativement bien fixée tout comme la dernière, car les constantes cinétiques permettent leurs études *via* une méthode de quench chimique en flux. La plus grosse inconnue se trouve au niveau de l'oxydation du $FADH_2$ et du transfert de méthylène, car cette constante n'est pas mesurable par les appareils (< 1 ms).

- Propriétés physico-chimiques :

Les différents tests biologiques réalisés afin de déterminer la capacité inhibitrice ou non d'une molécule, font appel à des mécanismes d'oxydoréduction ou d'absorbance au niveau du FAD et du NADPH. Le FAD regroupe une plus large famille de dérivés. Le noyau de base est celui de l'isoallosazine **34**, il est le responsable des propriétés redox, UV et fluorescentes de la molécule. Il peut être diméthylé et conduire au lumichrome **35**. La riboflavine **37** (ou vitamine B2) est dérivé de la lumiflavine **36** substitué sur son N^{10} par une chaîne ribityle. Sous l'action d'une *riboflavine kinase* la forme biologiquement active nommée Flavine Mono Nucléotide (FMM **38**) est obtenu sous forme monophosphate. Le couplage avec la partie adénosine monophosphate conduit au FAD **39** se fait par l'intermédiaire d'une *FAD synthase* (Figure 16).[60]

[60] Galbàn, J.; Sanz-Vicente, I.; Navarro, J.; de Marcos, S., The ontronsic of FAD and its application in analytical chemistry : a review, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, *4*, 042005.

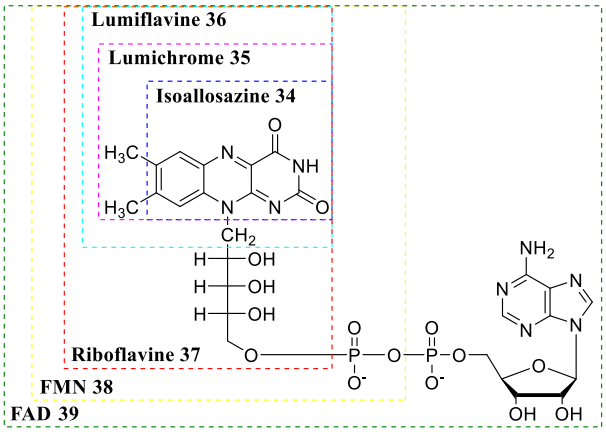


Figure 16 *: Famille des dérivés du FAD.*

Par sa structure dérivée de la vitamine B2 **37** et la disposition dans l'espace du FAD **39**, les propriétés physico-chimiques et fluorescentes sont pH dépendants.

Dans leurs formes stables, les dérivés de flavines sont de couleurs jaunes. Cette couleur provient du chromophore isoalloxazine (450 nm). L'allure du spectre UV est largement dépendante de l'ionisation du noyau isoalloxazine. Ce dernier possède trois formes : oxydée (ox), semiquinone (sq) et réduite (rd). Chacune de ces trois formes possédant trois autres formes suivant la valeur du pH (neutre, anionique, cationique). (Schéma 15).[58]

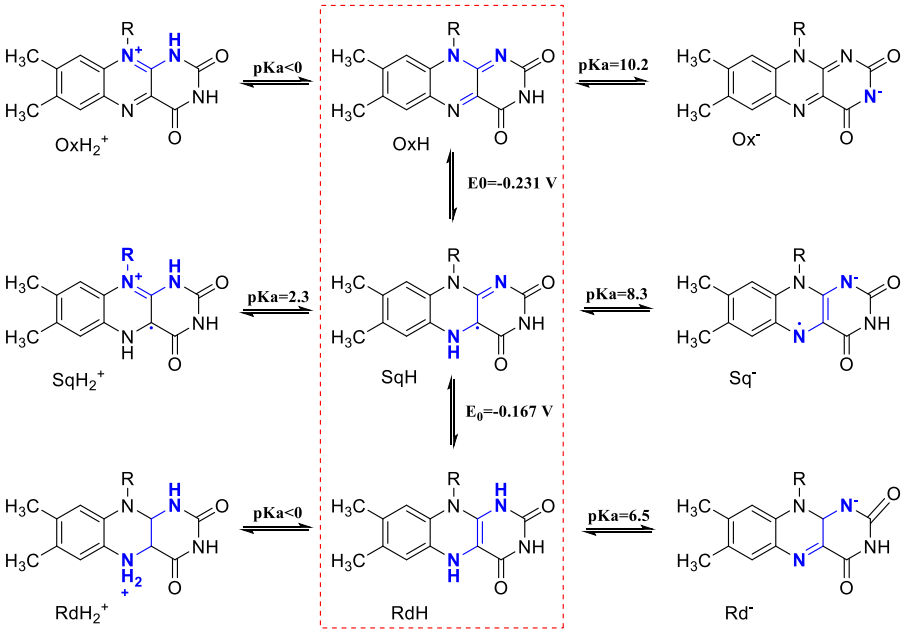


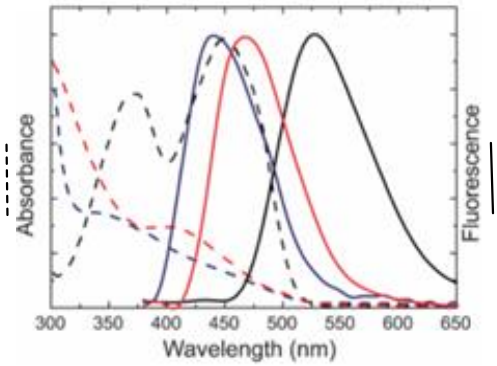
Schéma 15 *: Différentes formes rédox du FAD en fonction du pH.*[58]

Dans notre cas, nous nous intéressons qu'à la partie centrale. Les autres formes étant en dehors du pH physiologique. Sauf dans le cas de Rd^-, à pH physiologique le proton en N^1 peut être arraché (pKa : 6.5).

La réduction de OxH en SqH *via* un électron (E_0 = 0.231 V) change la longueur d'onde observée en UV, cette dernière est de couleur bleue (615 nm). L'addition d'un deuxième électron (E_0 = 0.167 V) conduit à la forme complétement réduite ne présentant aucune longueur d'onde maximale en UV

(incolore).[61] Ces observations ne sont vraies que dans le cas où le FAD est libre. Dans notre configuration, où le FAD vient d'une *flavoprotéine*, son potentiel est de 0 V.[62] Rapporté au mécanisme de la *FDTS*, il est logique de retrouver une valeur de E_0 (FAD) supérieur à celle du NADPH.

Comme le FAD possède différents λ_{max} suivant son état d'oxydation, il possèdera plusieurs émissions en fluorescence. De plus suivant le pH, la conformation du substrat n'est pas là même, impactant directement sur la fluorescence obtenue.[68] Plus la forme de la molécule est ouverte (pH neutre) plus l'intensité en fluorescence sera forte. Dans le cas où le pH sera environ de 3, la forme sera dite fermée et la fluorescence sera bien plus faible. Dans le cas de la flavine, plus la forme est réduite, plus la longueur d'onde d'émission est basse : OxH (525 nm), SqH (560 nm), RdH (425 nm) (Graphique 2).[63]



Graphique 2 *: Spectre de fluorescence. OxH (noir), SqH (rouge), RdH (bleu).*[61]

Ces propriétés physiques permettent aux *flavoprotéines* de jouer un rôle fondamental dans différentes biosynthèses.[58,64] Un grand nombre de ces enzymes sont capables de catalyser une à trois réactions en même temps ou de manière séquentielle dans le même mécanisme, il est donc difficile de les classer. C'est par leurs différents états redox et ionisés, qu'ils peuvent transférer un ou deux électrons et en recevoir (sous forme d'hydrogène ou d'hydrure), suivant le cas où le système est riche ou appauvri en électrons dans lequel ils se trouvent (ex : déshydrogénation, transfert ou ajustement de potentiel, photobiochimie…). Leurs capacités à posséder différents états de transition, se traduisant par des absorptions et des émissions différentes, confèrent un rôle central à ces composés dans la compréhension des différents mécanismes dans lesquelles ils sont impliqués.

4.3. Inhibiteurs de la *FDTS*

Compte tenu de sa récente découverte, la littérature ne rapporte que peu d'inhibiteurs. Le développement de molécules visant une activité inhibitrice de cet enzyme a été bien moins rapide que ceux de la *TS* classique. Deux expériences ont été développées afin de déterminer rapidement l'inhibition d'une molécule (Schéma 16) :

[61] Ghisla, S.; Edmondson, D., Flavin coenzymes, *eLS. John Wiley & Son*, **2014.**
[62] Miles, B., *Biological Redox Reactions*, **2003**.
[63] Zhao,R-k.; Lukacs, A.; Haigney, A.; Brust, R.; Greetham, G. M.; Towrie, M.; Tonge P. J.; Meech, S. R., Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully reduced flavins, *Phys. Chem. Chem. Phys*., **2011**, *13*, 17642–17648.
[64] Broderick, J-B., Coenzymes and cofactors, *eLS*, **2001**.

- ***ThyX* NADPH oxydase assay :**[65] on s'intéresse préférentiellement à la première étape de la biosynthèse. Dans ce test, on mesure par spectroscopie la capacité d'une molécule à empêcher la réduction du FAD par le NADPH (impliquant une non décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm), en empêchant cette réduction, on empêche la formation du $FADH^-$ et donc du dTMP. Cette méthode est simple de mise en place et permet donc un criblage rapide de molécules.
- ***ThyX* tritium release assay :**[66] on s'intéresse préférentiellement à la seconde partie du mécanisme. On mesure la réaction de méthylation du 5-^{3}H-dUMP par le dosage d'un marqueur radioactif, le tritium dans le milieu lors du transfert du groupement méthylène du folate *via* le FAD vers la position C^5-^{3}H du dUMP. Plus la quantité est importante, plus l'inhibition est faible.

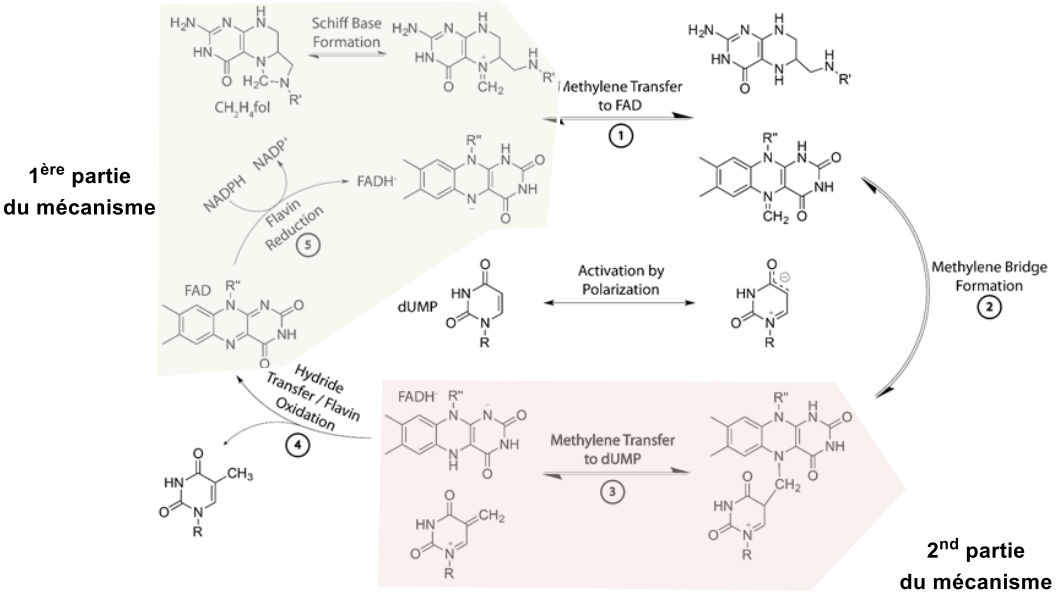
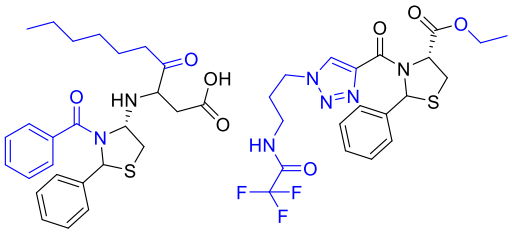


Schéma 16 *: Evaluation de l'inhibition de la FDTS.*

- 1ère partie du mécanisme :

La toute première série de molécules inhibitrices de la *FDTS* a été mentionnée en 2008 par *Myllykalio et al.*[67] Elle provient d'un docking de dérivés de la famille des éthylthiazolidine-4-carboxylates et permet une grande diversité moléculaire en peu d'étapes. En diminuant les degrés de liberté, les auteurs cherchaient à augmenter les interactions avec la protéine (Figure 17).

[65] Graziani, S.; Xia, Y.; Gurnon, J. R.; Van Etten, J. L.; Leduc, D.; Skouloubris, S.; Myllykallio, H.; Liebl, U., Functional analysis of FAD-dependent Thymidylate Synthase ThyX from Paramecium bursaria Chlorella Virus-1*, *J. Biologicol. Chem.*, **2004**, *279*, 54340–54347.
[66] Hunter, J. H.; Gujjar; R.; Pang, C. K. T.; Rathod, P. K., Kinetics and ligand-binding preferences of *Mycobacterium tuberculosis Thymidylate Synthases*, *ThyA* and *ThyX*, *PLoS ONE*, **2008**, *3*, 2237-2247.
[67] Önen, F. E.; Boum, Y.; Jacquement, C.; Spanedda, M. V.; Jaber, N.; Scherman, D.; Myllykallio, H.; Herscovici, J., Design, synthesis and evaluation of potent thymidylate synthase X inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 3628-3631.



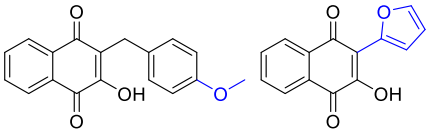
40
IC_{50}(ThyX) = 0.13 µM

41
IC_{50}(ThyX) = 0.057 µM

Figure 17 *: Dérivés thiazolidine possédant une activité sur la FDTS.*[61]

Les molécules **40** et **41** présentent respectivement des IC_{50} (*ThyX*) = 0.13 µM et 0.057 µM. Par la suite, les tests ont montré que la molécule **40** agissait comme un inhibiteur compétitif du dUMP. Tandis que pour la molécule **41** aucun mécanisme n'a été identifié, la seule certitude est que son mécanisme d'action est différent de la **40**. Ces molécules ont été testées aussi en milieu cellulaire, mais n'inhibent pas la prolifération bactérienne. Aucune autre étude sur ces structures n'a été depuis publiée.

Une seconde série de molécules provient d'un criblage réalisé par l'équipe de *Myllykalio et al.* de deux chimiothèques de produits naturels et synthétiques (+2200 molécules). Sur la base 75% inhibition sur la *ThyX* à 20 µM, 14 molécules ont été sélectionnées. Un second test sur enzyme purifiée a permis d'isoler un squelette de type hydroxyquinone **42**, lead (IC_{50} (*ThyX*) = 4.5 µM) (Figure 18).[68]



42 **43**

Figure 18 *: Inhibiteurs de la famille NQ.*

Par la suite une pharmacomodulation sur la position C^3 a permis de mettre en évidence le dérivé **43** (Ki (*ThyX*) = 28 nM), présentant de bonnes inhibitions sur la souche *ThyX Helicobacter pylori* (*HpThyX*).[69] Il se place au niveau de la cavité du dUMP et le remplace afin d'empêcher le transfert d'hydrure. Cette série a fait l'objet d'un dépôt de brevet.[70] Le problème avec ces structures est leur grande capacité red/ox pouvant causer la formation de composés oxygénés très réactifs générant un stress oxydant aux cellules.

Plus récemment, une série se reposant sur un motif hétérocyclique a été développée par *Herdewijn et al.* en 2019,[71] cette dernière est issue d'un criblage à haut débit de composés commerciaux, qui a

[68] Basta, T.; Boum, Y.; Briffotaux, J.; Becker, H. F.; Lamarre-Jouenne, I.; Lambry, J-C.; Skouloubris, S.; Liebl, U.; Graille, M.; van Tilbeurgh, H.; Myllykallio, H., Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX, *Open Biol.*, **2012**, *2*.

[69] Skouloubris, S.; Djaout, K.; Lamare, I.; Lambry, J-C. ; Anger, K. ; Briffotaux, J. ; Liebl, U. ; de Reuse, H. ; Myllykalio, H. ; Targeting of *Helicobacter pylori thymidylate synthase ThyX* non-mitotoxic hydroxy-naphtoquinones, *Open Biol.*, **2015**, *5*, 150015.

[70] Myllykallio, H.; Basta, T.; Boum, Y.; Liebl, U., Antimicrobial compounds of 1,4- naphtoquinone structure, France, Patent n° : WO2011EP55537. **2010**

[71] Modranka, J.; Li, J.; Parchina, A.; Vanmeert, M.; Dumbre, S.; Salman, M.; Myllykallio, H.; Becker, H. F.; Vanhoutte, R.; Margamuljana, L;; Nguyen, H.; Abu El-Asrar, R.; Rozenski, J.; Herdewijn, P.; De Jonghe, S.; Lescrinier, E., Synthesis and structure-activity relationship studies of benzo[*b*][1,4]oxazin-3(*4H*)-one analogues as inhibitors of *Mycobacterial Thymidylate Synthase X*. *ChemMedChem*, **2019**, *14*, 645-663.

permis d'isoler la famille des benzoxazine **44** (*via* deux squelettes de références ayant une IC_{50} (*ThyX*) = 0.71 et 0.9 µM). Une synthèse bioguidée par une relation structure /activité a permis d'obtenir la molécule lead la plus aboutie en modulant les substituants sur : la partie benzoxazine, puis la longueur du linker entre cette partie et la pipérazine, la partie pipérazine et enfin la partie *N*-phenylcarboxamide (Figure 19).

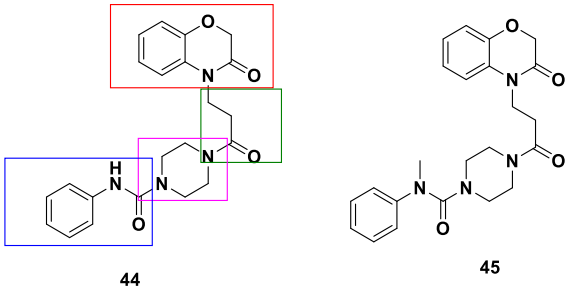
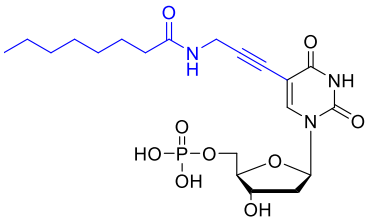


Figure 19 : *Molécules portant un motif pipérazine et benzoxazine inhibant la FDTS.*

Diverses modifications ont permis de synthétiser le composé benzoxazine **45** avec un IC_{50} (*ThyX*) = 0.69 µM. Les diverses modélisations et tests effectués ont montré que l'inhibition de la molécule était non compétitive envers le dUMP, compétitif envers le CH_2H_4folate et non compétitif avec le NADPH. La molécule semble se lier avec le complexe *ThyX*-NADPH ou *ThyX*-$NADP^+$.

- 2nd partie du mécanisme :

La dernière famille contrairement aux 3 premières n'est pas hétérocycliques, mais analogue de la 2'-déoxy-uridine-5'-monophosphate. Développée par *Herdewijn et al.* en 2011.[72] Ils ont reporté l'étude biologique de la substitution de la position C^5 du substrat naturel de l'enzyme par diverses chaînes (cyano vinyle, benzyliques, ou aliphatiques) sur la position (Figure 20).



46
IC_{50} (*ThyX*) = 0.91 µM
IC_{50} (*ThyA*) = >50 µM

Figure 20 *: Première inhibiteur nucléotidique.*

Ces diverses modifications ont conduit à une bonne sélectivité de l'inhibition de la *ThyX* avec des IC_{50} (*ThyX*) compris entre 27.8 et 0.91 µM pour le composé **46** et > 50 µM sur la *ThyA*. L'inhibition est perdue lors du couplage d'une fonction phénylique, alors qu'un cyanovinyle conserve l'activité tout en se montrant inactif sur *ThyA*. Les longues chaînes alcanes sur la fonction amide positionnée en C^5 présentent de bonnes activités antimicrobiennes sur *Mycobacterium tuberculosis*.

[72] Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 4847–4862.

Objectifs et plan de travail de la these

Dans le contexte actuel de résistance aux chimiothérapies antibactériennes, la découverte de la *FDTS* est une cible intéressante pour le développement de nouvelles familles d'antibiotiques contre des agents pathogènes prioritaires (anthrax, tuberculose, botulisme…). Les différentes modélisations et recherches sur le mécanisme de cet enzyme ont permis de mettre en lumière les caractéristiques que doivent présenter les futurs candidats médicamenteux. Les substrats naturels présents dans les sites actifs de l'enzyme possèdent chacun une localisation propre dans la poche, ces derniers ne se lient à aucun moment avec, ils se maintiennent à l'intérieur par des liaisons hydrogène et de type π-stacking. Lors de ce travail, la synthèse de trois nouvelles familles visant l'inhibition de la FDTS ont été élaborées (Figure 21). La première famille dérivée d'ANPs vise avec sa partie quinazoline à mimer le FAD ou le dUMP, dans le cas de la seconde famille d'ANPs, elle est composée de mime du dUMP. La dernière famille est composée d'hétérocycles polyazotés possédant des capacités à s'intercaler entre les différents substrats naturels afin d'inhiber l'enzyme.

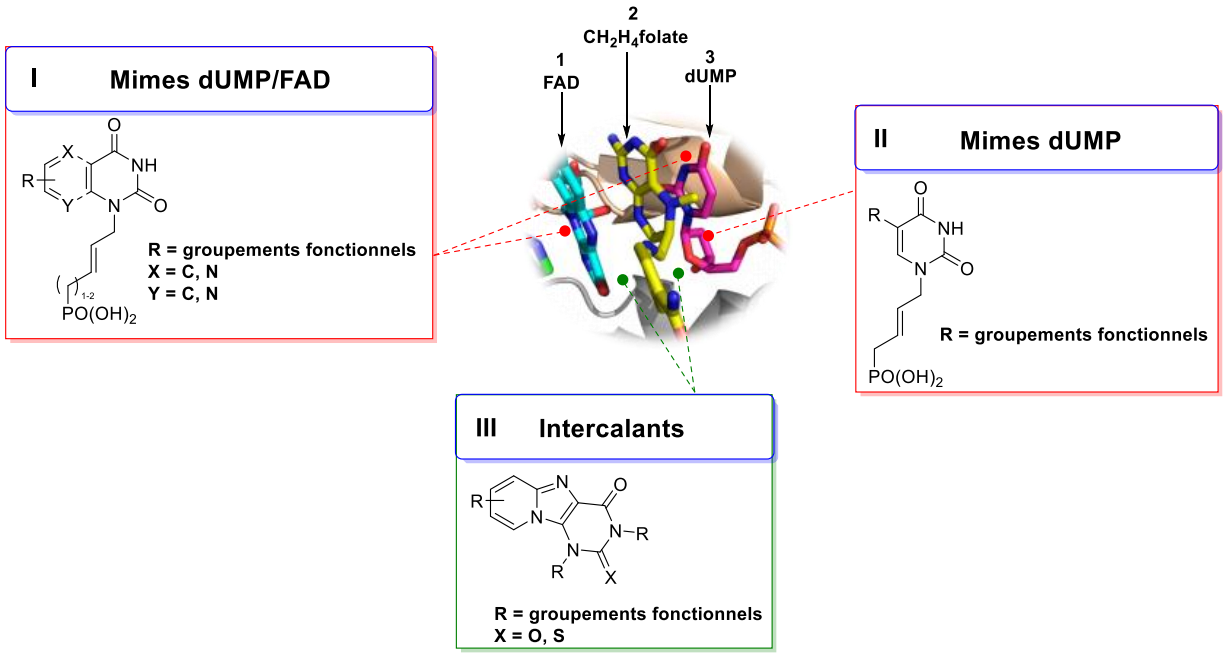


Figure 21 *: Futurs familles explorées.*

Les récentes publications mécanistiques et cristallographiques sur la *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* ont permis de mettre en évidence l'importance des interactions non covalentes dans le site actif de l'enzyme dans le maintien des substrats naturels (FAD et dUMP) et des cofacteurs (folate et NADPH), ces derniers se maintiennent sous la forme d'un empilement grâce à des interactions de π-stacking. Les deux substrats naturels semblent être les cibles les plus prometteuses afin de développer des familles à même d'être reconnues dans le site actif de l'enzyme.

Les différentes interactions mises en jeu sont (Figure 22) :

- **<u>Le dUMP</u>** possède des liaisons hydrogène entres O^2, O^4 et l'azote N^3 de la partie pyrimidine. Mais aussi la partie ribose sur le *3'-OH,* tout comme la partie phosphate en 5'. Il existe une interaction de type π-stacking entre le noyau pyrimidine-1,4-dione et ptérine du folate.
- **<u>Le FAD</u>** présente sur la partie isoalloxazine de multiples interactions hydrogène *via* O^2 et N^3, de plus la partie aromatique montre plusieurs interactions de type π-stacking entre un acide aminé du site actif et le folate. La chaîne ribityle et la partie adénosine ne font aucune

interaction avec la poche. Les dernières liaisons hydrogènes proviennent du diphosphate via ses oxygènes.

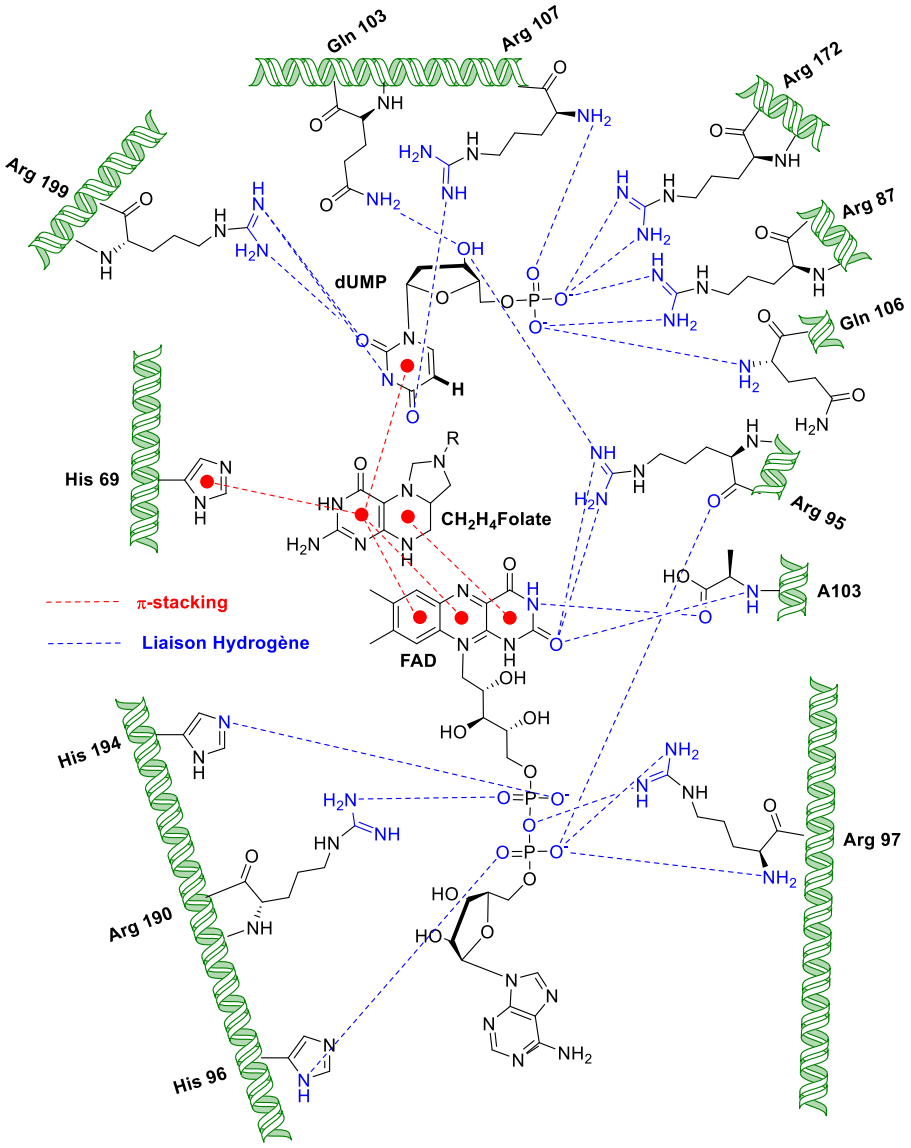


Figure 22 *: Interactions dans le site actif.*

- Famille **I** et **II** : Analogues mixtes FAD/dUMP :

Dans la conception des inhibiteurs, nous devons tenir compte des différentes interactions nécessaires au maintien dans le site actif (liaisons hydrogène et π-stacking). Nous avons décidé de développer deux familles : une première d'ANPs bicycliques pyrimidiques pouvant être un inhibiteur mixte du dUMP et du FAD, et une seconde d'uraciles C^5-subsitués pouvant être un inhibiteur du dUMP (Figure 23).

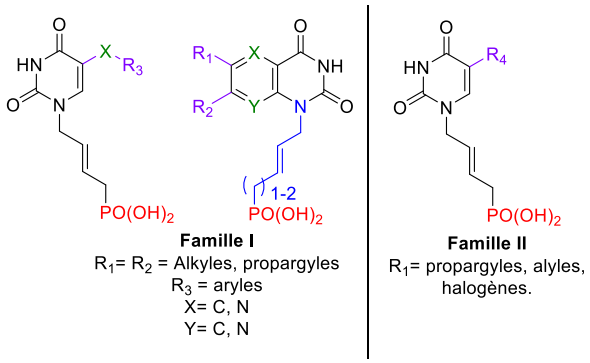


Figure 23 *: Familles d'analogues dUMP/FAD.*

Afin de bloquer l'action de l'hydrure provenant du FAD nous avons souhaité développer des dérivés bicycliques comme mimes mixtes du FAD/UMP substitués en N^1. Cette structure bicyclique permettra d'augmenter les interactions de type π-stacking, mais aussi dans le cadre d'un mime du dUMP de bloquer le transfert de méthyle sur la position C^5. Les composés dérivés d'uraciles auront plusieurs buts, dans un premier temps de bloquer le transfert de méthyle par la substitution de la position C^5 avec divers groupements, mais aussi de confirmer ou non l'utilisation d'une chaîne acyclique en tant que mime du ribose.[73] L'utilisation de longues chaînes aliphatiques a montré des inhibitions sur la croissance bactérienne.[74]

- Famille **III** : dérivés hétéroaromatiques cycliques intercalant.

Cette série provient d'un criblage hétéroclite d'une chimiothèque interne à notre groupe sur la *FDTS via* le NADPH oxidase assay à 200 µM et 50 µM de molécules regroupant les différentes caractéristiques recherchées comme inhibiteur (liaisons hydrogène, π-stacking). De ce criblage, est ressortie une série de molécules tricycliques dérivées de pyridopurine (17.8 % à 50 µM, montant à 42.9 % à 200 µM sans FAD). Nous appuyant sur ce squelette, nous avons développé une nouvelle série de molécules intercalantes permettant de rapides diversifications structurales (Figure 24).

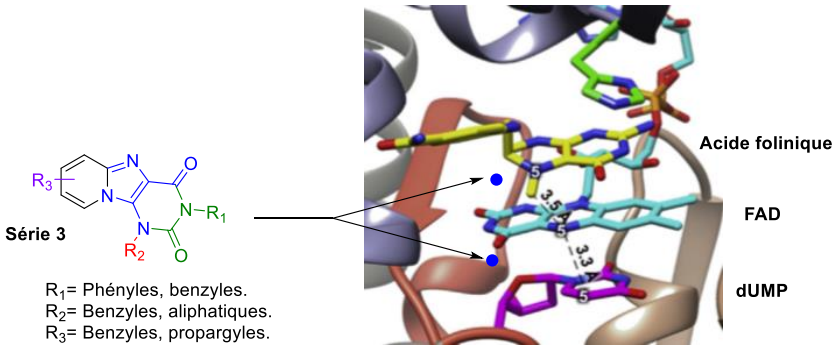


Figure 24 *: Intercalant hétérocycliques.*

[73] Topalis, D.; Pradèere, U.; Roy, R.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; Alexandre, J. A. C.; El-Amri, C.; Deville-Bonne, D.; Meyer, P.; Balzarini, J.; Agrofoglio, L. A., Novel antiviral C5-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonates selected as human *Thymidylate Kinase* substrates, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 222-23.

[74] Johar, M.; Manning, T.; Tse, C.; Desroches, N.; Agrawal, B.; Kunimoto, D. Y.; Kumar, R., Growth inhibition of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in vitro: effect of 1-â-D-2′-arabinofuranosyl and 1-(2′-deoxy-2′-fluoro-â-D-2′-ribofuranosyl) pyrimidine nucleoside analogs, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3696-3705.

Nous avons modifié le noyau pyrimidine en pyrimidine-2,4-dione afin de favoriser les interactions avec le FAD et le dUMP, cette structure est plus semblable à celle du noyau isoalloxazine du FAD même si la taille du cycle central est réduite d'un carbone (passage d'un cycle à 6 à 5). Dans cette structure, l'azote pouvant transporter le méthylène ne peut intervenir. Les différents groupements R_1, R_2, R_3, ont servi à étudier les interactions de type π-stacking, à créer de nouvelles interactions avec le site actif de l'enzyme, mais aussi à bloquer la position N^1. Nous avons inséré la plus grande diversité structurale possible afin d'obtenir le maximum d'informations sur l'activité biologique, les interactions et le positionnement dans le site actif.

Ces synthèses ont voulu être les plus convergentes en utilisant diverses réactions chimiques, allant de la synthèse nucléotidique à la métathèse croisée, en passant par des couplages pallado-catalysés, et à l'utilisation de modes d'activations verts. Les tests biologiques et de modélisations sur la *FDTS* ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr. Hannu Myllykalio et du Dr Hubert Becker au Laboratoire d'optique biomoléculaire (LOB) de l'Ecole Polytechnique de Palaiseau, Paris, France

.

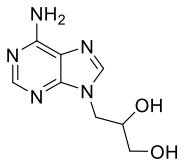
Chapitre 2 : Acyclo-nucleoside phosphonates comme mime du FAD/dUMP

1. Synthèse d'ANPs mimes mixtes dUMP/FAD

Les deux premières familles par lesquelles nous débutons la présentation des travaux de thèse présentent un intérêt important sur le plan théorique de par leurs capacités inhibitrices. Elles présentent les mêmes interactions que les substrats naturels (dUMP/FAD) au niveau de la base (non canonique pour la première famille, canonique pour la seconde). Elles pourraient à la fois inhiber le transfert de méthylène, mais aussi par l'alkylation de l'azote N^1 *via* une chaîne *trans*-but- et pent-2-ènyl inhiber le transfert d'hydrure. Cette chaîne acyclique présente un intérêt biologique indéniable dans la littérature.

1.1. Rappels sur les ANPs et motifs insaturés à intérêts biologiques

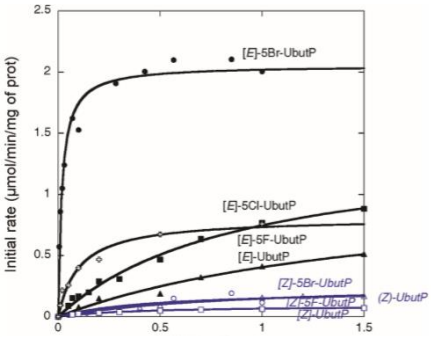
Les ANPs ont été découverts par *E. De Clercq* et *A. Holý* en 1978 deux ans après les débuts de leurs collaborations. Ce premier ANP : DHPA ((*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adénine), possédait une activité antivirale à large spectre (Figure 25). [75]



DHPA ((S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine

Figure 25 *: Premier ANP synthétisé.*

Depuis, de nombreux ANPs ont été décrits[76] et notre équipe, depuis maintenant plus de 10 ans possède une expérience indéniable dans la synthèse d'ANPs pour le développement d'antiviraux. Nous avons ainsi décrit une nouvelle famille d'ANP (> 300 molécules) pourvu d'un squelette *trans*-but-2-ènyl-phosphonate. Deux de nos trois familles de molécules cibles possèdent cette chaîne acyclique, leurs conférant un caractère novateur dans le design d'inhibiteurs de la *FDTS* visant une activité antibactérienne.

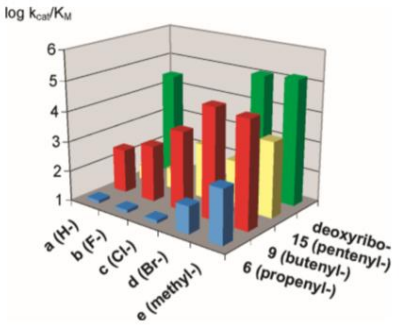


Graphique 3 *: Courbe de saturation de hTMPK*

A travers diverses études enzymatiques, nous avons montré que la chaîne *trans*-but-2-ènyle était capable de mimer la partie arrière du ribose.[73] Dans un premier temps nous avons évalué la capacité qu'avait l'enzyme (*hTPMK kinase*) à phosphoryler les différents composés suivant leur stéréochimie pour une même longueur de chaîne (Graphique 3). On remarque sur ce graphique, qu'ils sont des substrats de type Michaelis-Menten (saturation hyperbolique). De plus, le ratio montre un meilleur fonctionnement de l'enzyme sur les isomères [*E*] que [*Z*].

[75] De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Holý, A., (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: an aliphatic nucleoside analog with broad spectrum antiviral activity. *Science*, **1978**, *200*, 563–565.
[76] De Clercq, E.; Holý, A., Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drug, *Nature*, **2005**, *4*, 928-941.

Dans un second temps, nous avons évalué l'influence de la longueur de la chaîne pour une même stéréochimie (Graphique 4). La chaîne présentant les mêmes activités que la référence est la chaîne butényle, suivi par le motif pentényle. La chaîne propényle semble quant à elle non efficace.



***Graphique 4** : Histogramme d'efficacité de transfert du phosphore par hTMPK.*

In fine, nous avons pu en déduire que le critère le plus important dans la reconnaissance était la longueur de la chaîne, puis sa stéréochimie. Leurs modélisations et cristallisations, ont permis de mettre en lumière la preuve que la chaîne *trans*-but-2-ènyl et *cis*-pent-2-ènyl étaient capables de mimer chacune la partie haute $C^{1'}$-O-$C^{4'}$-$C^{5'}$ du ribose, et la partie basse $C^{1'}$-$C^{2'}$-$C^{3'}$-$C^{4'}$-$C^{5'}$ de ce dernier (Figure 26)[73].

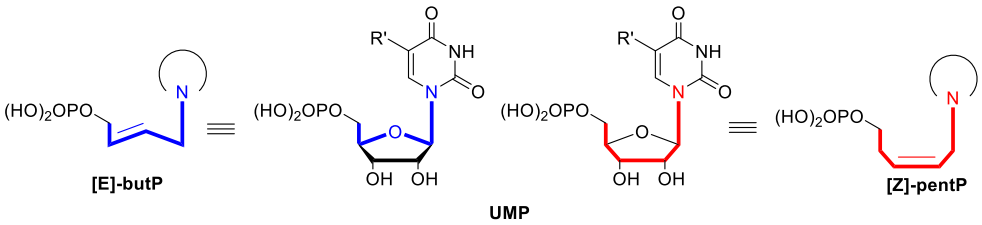


***Figure 26** : Mime des chaînes but-, pent-2-ènyl et le ribose.*

Nous avons alors développé une synthèse convergente utilisant comme étape clef une métathèse croisée d'oléfines (CM). Cette étape fait intervenir d'un côté une base pyrimidique N^1-crotylée-N^3 (protégée **47a-e** ou non **48a-e**) avec une oléfine diesters phosphonate correspondante (3-5 carbones **49-51**) conduisant au couplage des 2 parties et à un dégagement d'éthylène (Schéma 17).

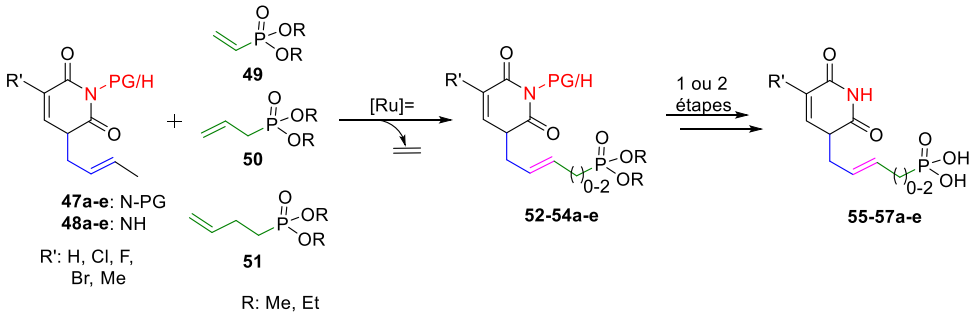


***Schéma 17** : Réaction générale de métathèse sur les pyrimidines protégées ou non.*

Cette synthèse a été publiée par notre équipe dès 2011[73] à partir de pyrimidines C^5 substituées par des groupements halogènes, hydrogène ou méthyle. Ces différents composés voient leurs azotes N^3 protégés de manière sélective en benzoyle (PG = Bz), ou en *tert*-butoxycarbonyle (PG = Boc). Ils ont été par la suite engagés dans des conditions de métathèse croisée avec différents synthons phosphonates correspondants obtenus par des réactions de Michaelis-Becker ou Arbuzov. La première sera préférée à la seconde, cette dernière faisant intervenir un dérivé phosphite qui subira une déprotonation lui permettant par la suite de substituer un halogénure d'alkyle. La réaction d'Arbuzov montre de trop grandes limitations comme l'isomérisation de l'alcène à hautes températures, ou la dégradation du produit. Les différents produits de couplages ont été obtenus avec des rendements allant de 37-94%. Ils ont par la suite été déprotégés séquentiellement en 1 ou 2 étapes (suivant la

protection ou non du N^3) par addition du NH_3/MeOH (pour les benzoyles) et acide trifluoroacétique (TFA, pour les Boc), pui *via* du TMSBr afin d'obtenir les acides phosphoniques correspondants **55-57a-e**.

1.2. Rappels sur la métathèse d'oléfines

La réaction de métathèse est devenue un outil synthétique central dans de nombreux domaines de la chimie : polymères,[77] produits naturels[78] et pharmaceutiques.[79] Développée dans les années 50 dans l'industrie pétrolière (Procédé Zielger-Nata), son essor et sa compréhension sont dus aux 3 lauréats du Prix Nobel de Chimie 2005 : Yves Chauvin,[80] Robert Schrock[81] et Robert Grubbs.[82] A l'origine cette réaction permettait la formation de liaison C=C à partir de deux alcènes, d'un catalyseur (métal à base de Ru ou Mo). Cette réaction est largement utilisée de par ses conditions de réactions douces, mais aussi rapides, formant des sous-produits facilement éliminables (éthylène et catalyseurs). L'intérêt de cette réaction est l'accessibilité à partir de l'oléfine obtenue, à des fonctions chimiques stables (alcool, alcane, acide carboxylique…), *via* diverses réactions chimiques (coupure oxydante, hydroboration, réduction...) :

- Types de réactions :[83] Métathèse Croisée (CM), Métathèse Cyclisante (RCM), Ouverture de cycle par Métathèse (ROM) ou encore Métathèse Polymérisante (ROMP).
- Fonctions chimiques :[84] entre deux alcènes, un alcène et un alcyne, deux alcynes ou encore plus récemment entre un alcène et une fonction carbonyle.
- Solvants :[85] dichlorométhane, tétrahydrofuran (THF), toluène et récemment l'eau.
- Modes d'activation : sans chauffage, thermique, sous ultrasons ou micro-ondes.

La première série de catalyseurs fut développée par Schrock au début des années 90, à base de molybdène **58**. Malheureusement ils ne furent pas transposables au monde industriel[86] de par leurs faibles stabilités en présence d'air et d'eau. *Grubbs et al.* ont quant à eux développé des catalyseurs à base de ruthénium :

- Catalyseur de Grubbs de 1ère génération **59**:[85] il possède deux ligands phosphines (cause de leur instabilité). Plus réactif que celui de Schrock, il accepte une plus large gamme de substrats, mais reste limité pour les oléfines substituées. Ce dernier reste sensible à l'air et à l'humidité.

[77] Novak, B. M.; Risse, W.; Grubbs, R. H., The development of well-defined catalysts for ring-opening olefin metathesis polymerizations (ROMP), *Adv. Poly. Sci*., **1992**, *10*, 48-69.
[78] Higman, C. S.; Lummiss, J. A. M.; Fogg, D. E.; Olefin metathesis at the dawn of implementation in pharmaceutical and specialty-chemicals manufacturing, , *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, *55*, 3552-3565.
[79] Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D., Metathesis reactions in total synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2005**, 44, 4490-4527.
[80] Chauvin, Y., Olefin metatesis: The early daus (Nobel Lecture), *Angew. Chem., Int. Ed*., **2006**, *45*, 3740-3748.
[81] Schrock, R. R., Multiple metal–carbon bonds for catalytic metathesis reactions (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed*., 2006, *45*, 3748-3759.
[82] Grubbs, R. H., Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed*., **2005**, *45*, 3760-3765
[83] Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A., The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction, *Nature*, **2007**, *450*, 243-252.
[84] Becker, M. R.; Watson, R. B.; Schindler, C. S., Beyond olefins: New metathesis directions for synthesis, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 7867-7881.
[85] Adjiman,C. S.; Clarke, A. J.; Cooperb, G.; Taylor, P. C., Solvents for ring-closing metathesis reactions, *Chem. Commun*, **2008**, *24*, 2806-2809.
[86] Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H., Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a group VIII carbene complex in protic media, *J. Am. Chem. Soc*. **1992**, *114*, 3974-3975.

- Catalyseur de Grubbs de 2nd génération **60a,b**:[87] un des ligands phosphine est substitué par un carbène *N*-hétérocyclique (NHC) donnant une liaison σ au métal. Ils sont plus réactifs que leurs prédécesseurs, acceptent une plus large gamme de substrats. Ils sont stables à la fois à l'air, mais aussi à l'eau.
- Catalyseur de Grubbs de 3ème génération **61a,b**:[88] pour s'affranchir de la présence de groupements coordonnants. La phosphine restante est remplacée par deux noyaux halogéno/H-pyridine. Ainsi, leur dissociation est plus rapide, et leur réassociation lente, lui donnant ainsi un turn-over favorable à la CM.

Steven P. Nolan publia un catalyseur actuellement défini comme catalyseur de Nolan-Grubbs de 2nd génération[89] **62** en 1999, où le noyau imidazolidinone du NHC est remplacé par un imidazole. Hoveyda[90] développa ses propres catalyseurs de première **63a** et seconde génération **63b,c** connu sous le nom de Hoveyda-Grubbs par la même substitution (ligand phosphine substitué par NHC). La différence provient d'un pont éther facilitant l'activation en chélatant le ruthénium. Aujourd'hui il existe un large catalogue de catalyseurs suivant les couplages mis en jeu, les fonctions adjacentes, la stéréochimie souhaitée et les conditions réactionnelles (Figure 27).

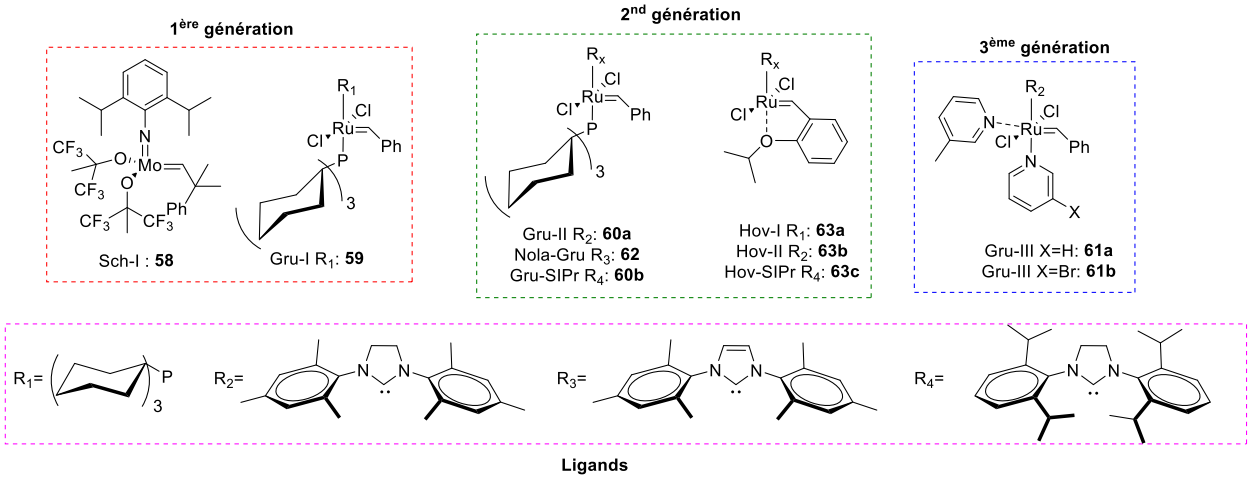


Figure 27 : Structure de quelques catalyseurs de métathèse.

Par la suite nous discuterons la réaction de métathèse croisée (CM) entres deux alcènes (Schéma 18).

***Schéma 18** : Différents types de métathèse existantes.*[79]

[87] Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H.,Synthesis and activity of a new generation of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene ligands, *Org. Lett.*, **1999**, *16*, 953-956.
[88] Love, J. A.; Morgan, J. P.; Trnka, T. M.; Grubbs, R. H., A Practical and highly active ruthenium-based catalyst that effects the cross metathesis of acrylonitrile. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4035-4037.
[89] Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L., Olefin metathesis-active ruthenium complexes bearing a nucleophilic carbene ligand , *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2674-2678.
[90] Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L; Hoveyda, A. H., Efficient and recyclable monomeric and dendritic Ru-based metathesis catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.

La métathèse croisée [91] permet le couplage de deux oléfines de substitutions et de réactivités différentes. Elle peut conduire à la formation d'un mélange d'homodimères et d'hétérodimères de stéréosélectivités différentes (Schéma 19).

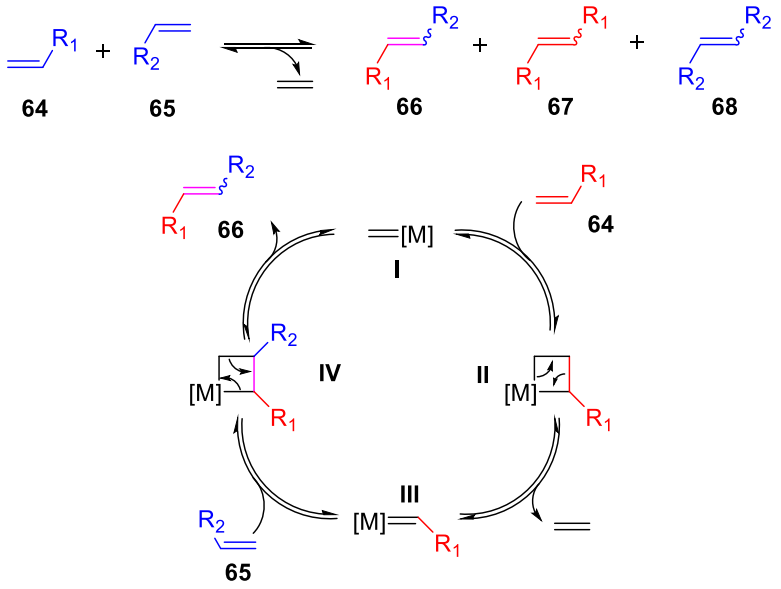


Schéma 19 *: Mécanisme de la métathèse croisée.*

Le mécanisme de cette réaction se déroule en 4 temps, tout d'abord, le substrat éthylénique **64** se coordonne avec le métal de transition **I** afin de former un premier métalocyclobutane **II**, en se réarrangeant, de l'éthylène est libéré, mais aussi un carbène **III**. Lors d'une nouvelle étape de coordination avec le carbène **III** et le second substrat éthylénique **65**, un autre métalocyclobutane est formé, puis il est réarrangé de la même manière afin de former le produit de couplage souhaité **66** et le produit de départ **I**.

Sur la base de ce mécanisme, on remarque que l'un des problèmes majeurs de ce couplage est la formation des deux homodimères **67** et **68**, provenant du couplage sur lui-même de chaque substrat. Le déplacement de l'équilibre de formation des homodimères vers l'hétérodimère souhaité est le but de cette réaction.

Grubbs et al.[89] ont publié un tableau empirique permettant le classement des alcènes et leurs réactivités afin d'optimiser les futures réactions (Tableau 6) permettant l'obtention d'un seul hétérodimère.

[91] Chatterjee, A. K.; Choi, T-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H., A general model for selectivity in olefin cross metathesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *125*, 11360-11370.

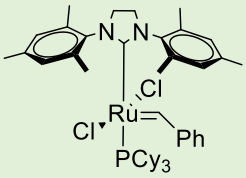
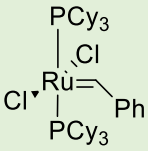
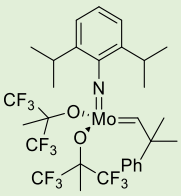
Catalyseurs / Types d'oléfines	Grubbs-II 	Grubbs-I 	Schrock 
Types I (Homodimérisation rapide)	Oléfines terminales, alcools primaires allyliques et esters, esters boroniques allyliques, halogénures d'allyles, styrènes (non encombrés en ortho), phosphonates allyliques, silanes allyliques, oxydes de phosphines allyliques, sulfures allyliques et Aaines protégées allyliques.	Oléfines terminales, silanes allyliques, alcools, éthers et esters primaires allyliques, esters boroniques allyliques et halogénures d'allyles.	Oléfines terminales, silanes allyliques.
Types II (Homodimérisation lente)	Styrènes (encombrés en ortho), acrylates, acrylamides, acides acryliques, acroléines, cétones vinyliques, alcools primaires allyliques non protégés, époxydes vinyliques, alcools secondaires allyliques et oléfines liées à des alcanes perfluorés.	Styrènes, alcools secondaires allyliques, dioxolanes vinyliques et boronates vinyliques.	Styrènes, stannanes allyliques.
Types III (Aucune homodimérisation)	Oléfines 1,1-disubstituées, oléfines trisubtituées et non encombrées, phosphonates vinyliques, phenylsulfones vinyliques, alcools quaternaires allyliques (substituants alcanes) et alcools tertiaires allyliques protégés.	Siloxanes vinyliques.	Amines tertiaires allyliques, acrylonitriles.
Types IV (Non réactif)	Oléfines nitrovinyliques, Alcools allyliques trisubstitués et protégés.	Oléfines 1-disubstituées, Carbonyles α,β-insaturés, Oléfines liées à des alcanes perfluorés, Oléfines avec une position allylique quaternaire et Amines tertiaires allyliques et protégées.	Oléfines 1,1-disubstituées.

Tableau 6 : *Classification des alcènes suivant le catalyseur.*[90]

- **<u>Les alcènes de types 1</u>** : forment aisément un homodimère, ces derniers peuvent être engagés dans un nouveau cycle catalytique. Ce sont les plus réactifs.
- **<u>Les alcènes de types 2</u>** : donnent plus lentement l'homodimère qui n'est que partiellement consommés dans un autre cycle catalytique. Leur réactivité est inférieure aux alcènes de types 1.
- **<u>Les alcènes de types 3</u>** : sont les moins réactifs. Ils ne s'homodimérisent pas. Ils peuvent être engagés dans une réaction de métathèse croisée avec des alcènes de types 1 ou 2.
- **<u>Les alcènes de type 4</u>** : trop encombrés, ou trop appauvris en électrons ils ne réagissent pas dans des conditions de métathèse croisée ; ils sont dits spectateurs.

Ce tableau donne des données empiriques permettant de classer et de faciliter le choix des différentes oléfines. Le contrôle de la sélectivité reste le nerf de la guerre sur cette réaction, ce tableau

n'est qu'un outil permettant des conditions initiales, les résultats pouvant évoluer suivant l'encombrement stérique et les groupements chimiques à proximité (Tableau 7) :

	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4
Type 1	statistique	sélective	sélective	Aucun couplage
Type 2	sélective	Non sélective	sélective	Aucun couplage
Type 3	sélective	sélective	Non sélective	Aucun couplage
Type 4	Aucun couplage	Aucun couplage	Aucun couplage	Aucun couplage

Tableau 7 *: Association des différents types d'oléfines.*[91]

Les derniers travaux internes au laboratoire, ont aussi montré qu'un excès d'une des deux oléfines, souvent de type 1 ou 2 permet d'augmenter et de faciliter la réaction. Ce dernier s'homodimérise vite pour réagir ensuite avec l'oléfine la moins réactive.

1.3. Rappel sur l'activation par ultrasons

L'activation sous ultrasons[92a,b,c] est considérée comme une alternative verte (consommation d'énergie, réactions régiosélectives, moins de produits secondaires….) vis-à-vis du chauffage thermique (Figure 28).

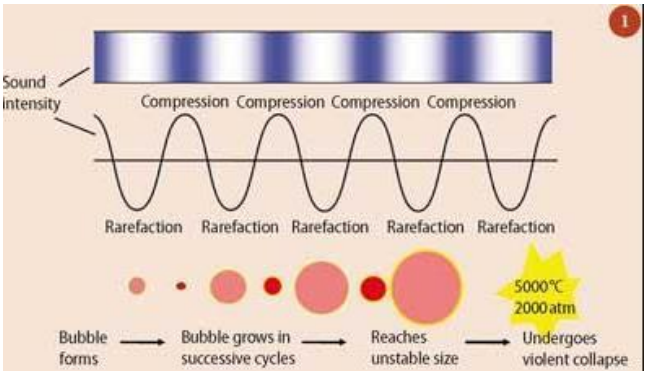


Figure 28 : *Principe des ultrasons.*

L'effet activant de cette méthode est induit par la cavitation acoustique. Pendant qu'une onde de pression acoustique se forme et se propage à travers le milieu réactionnel, elle induit la formation, la croissance et l'effondrement de bulles de la taille d'un micromètre. Au cours de cet effondrement, des conditions extrêmes se produisent dans la cavité et aux interfaces, notamment une température et une pression élevées. Ce transfert d'énergie provoqué par les ondes acoustiques peut renforcer les effets mécaniques dans les processus hétérogènes et peut induire de nouvelles réactivités. Ces derniers sont de plus en plus utilisés en métathèse d'oléfine, notre équipe a montré une augmentation des rendements conséquents sous la seule utilisation des ultrasons dans des conditions métathèse croisée d'oléfines.[93]

---

[92] a) Tomasek, J.; Schatz, J., Olefin metathesis in aqueous media, *Green Chem.*., **2013**, *15*, 2317-2338. b) Cravotto, G.; Cintas, P., Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitational chemistry fromacademia to innovative and large-scale applications, *Chem. Soc. Rev*., **2006**, *35*, 180–196. c) Varma, R. S., Chemical activation by mechanochemicalmixing, microwave and ultrasonsicirradiation, *Green Chem*., **2008**, *10*, 1129–1130.

[93] Sari, O.; Hamada, M.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio,L. A., The Preparation of Trisubstituted Alkenyl Nucleoside Phosphonates under Ultrasound-Assisted Olefin Cross-Metathesis, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 4390-4393.

1.4. Rappel sur l'activation par micro-ondes

La synthèse sous activation micro-onde a été développée vers la fin des années 80 par *Gedye et al*[94]. et *Giguere et al*[95]., elle est considérée comme un mode d'activation vert ; permet de diminuer les temps de réactions, augmenter les rendements et la sélectivités… (Figure 29).

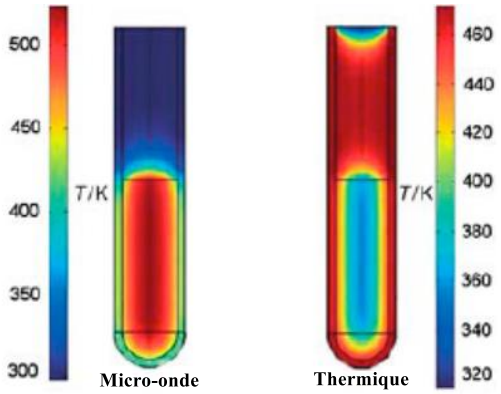


Figure 29 *: Différence entre un chauffage micro-onde et thermique.*

Dans le cas d'un chauffage thermique, c'est l'extérieur du réacteur qui est chauffé par convection ou conduction. L'intérieur du réacteur met donc plus de temps à arriver à la température de consigne et conduit donc à un chauffage non uniforme (partie droite de la Figure 29). Dans le cas d'un chauffage micro-onde, les ondes vont agir comme des champs électriques conduisant les molécules polaires du milieu à s'aligner par rotation. Les collisions entres elles, conduisent à des pertes d'énergies par effet Joule, permettant le chauffage du milieu réactionnel. Ce type de chauffage, permet donc une activation plus centralisée dans le réacteur et donc un chauffage uniforme du centre de ce dernier vers l'extérieur du tube.

1.5. Rétrosynthèse

La première série de molécules synthétisée, analogues de nucléotides/FAD se divise en deux familles, la première dérivée de quinazolindiones, et la seconde dérivée d'uraciles substitués en C^5 par un groupement benzyle ou aniline. Ces deux familles de bases hétérocycliques ont été substituées en N^1 par une chaîne *trans*-but- et *trans*-pent-2-ènyle phosphonates (Figure 30).

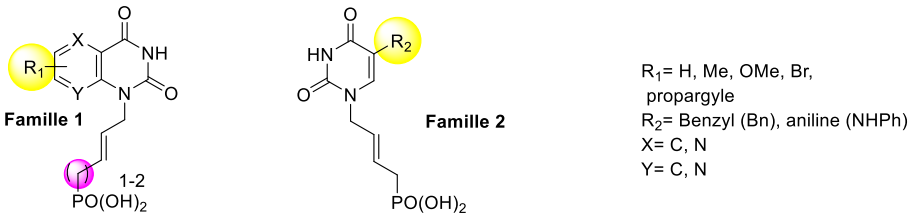


Figure 30 *: Structures générales et modifications de la première série*

[94] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J., The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tet. Lett.*, **1986**, *26*, 279-282.
[95] Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G., Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tet. Lett.*, **1986**, *27*, 4945-4948.

Les composés d'intérêts **A** et **D** peuvent être obtenus à la suite d'un couplage entre les parties quinazolines **C** et pyrimidines **E** avec les chaînes phosphonates **C.** (Schéma 20).

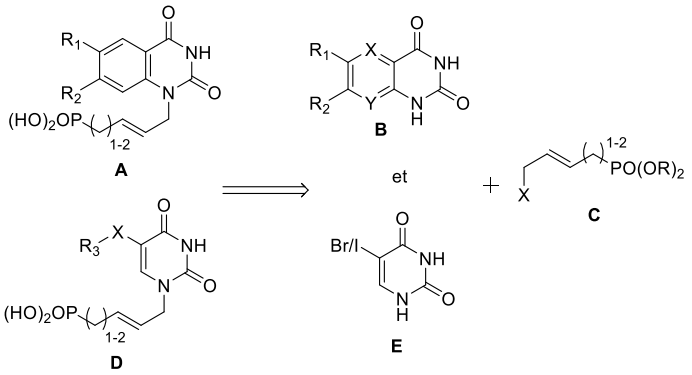


Schéma 20 *: Rétrosynthèse envisagée.*

La synthèse des hétérocycles **B** et **E** est relativement bien décrite dans la littérature.[96,97a,b] tout comme celles des chaînes diesters phosphonates **C**.[98] L'étape limitante est celle de couplage entre les deux parties. De manière théorique ce couplage peut s'effectuer de multiples façons (Schéma 21) :

- *Via* une réaction de Mistunobu[99] entre une fonction alcool **A** et l'hétérocycle **B**.
- Par une S_N2[100] sur un hétérocyclique non protégé ou mono protégé **B** en présence de la chaîne diesters phosphonate halogénée **C**.
- V*ia* un couplage organopalladé de type Tsuji-Trost[101] entre ce même hétérocycle **B** et une chaîne diesters phosphonate acétylée **I**.
- Avec réactions de couplages entre un dérivé carbonyle **E** et un ylure de phosphonate **H** (Wittg-Horner),[102] sulfoxide phosphonate **D** (Julia-Kosciensky oléfination dérivé de la Julia-Lythgoe).[103]
- Entre deux oléfines **G** et **F** (métathèse croisée)

[96] Fang, W-P.; Cheng, Y-E.; Cheng, Y-R.; Cherng, Y-J., Synthesis of substituted uracils by the reactions of halouracils with selenium, sulfur, oxygen and nitrogen nucleophiles under focused microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 3107-3113.
[97] a) Kopp, F.; Knochel, P., Functionalization of unprotected uracil derivatives using the halogen−magnesium exchange, *Org. Lett*., **2007** *99*, 1639-1641. b) Prabhakar, V.; Sudhakar, B. K.; Ravindranath, L. K.; Latha, J.; Venkateswarlu, B., Synthesis, characterisation and biological evaluation of quinazoline derivatives as novel anti-microbial Agents, *Organic. Chem. Curr. Res*., **2016**, *5*.
[98] Bessières, M.; Hervin, V.; Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohierc, J-F.; Agrofoglioa, L. A., Highly convergent synthesis and antiviral activity of (E)-but-2-enyl nucleoside phosphonoamidates, *Eur. J. Med. Chem*., **2018**, *146*, 678-686.
[99] Mitsunobu, O., The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis*, **1981**, 1.
[100] Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agofoglio, L. A., Olefin cross-metathesis for the synthesis of alkenyl acyclonucleoside phosphonates. *Curr. Protoc. Nu. Ac. Chem.*, **2014,** 59, 14.11.1- 14.11.17.
[101] Agrofoglio, L. A.; Amblard, F.; Nolan, S. P.; Charamon, S.; Gillaizeau, I.; Zevacoc, T. A.; Guenotd, P., Synthesis of L-cyclopentenyl nucleosides using ring-closing metathesis and palladium-mediated allylic alkylation methodologies, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8397–8404.
[102] Claridge, T. D. W.; Davies, S. G.; Lee, J. A.; Nicholson, R. L.; Roberts, P. M.; Russel, A. J.; Smith, A. D.; Toms, S. M., Highly (*E*)-selective Wadsworth-Emmons reactions promoted by methylmagnesium bromide, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5437-5440.
[103] Blakemore, P. R.; Cole, W. J.; Kocieński, P. J.; Morley, A., A Stereoselective synthesis of trans-1,2-disubstituted alkenes based on the condensation of aldehydes with metallated 1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl sulfones, *Synlett*, **1998**, *1*, 26-28.

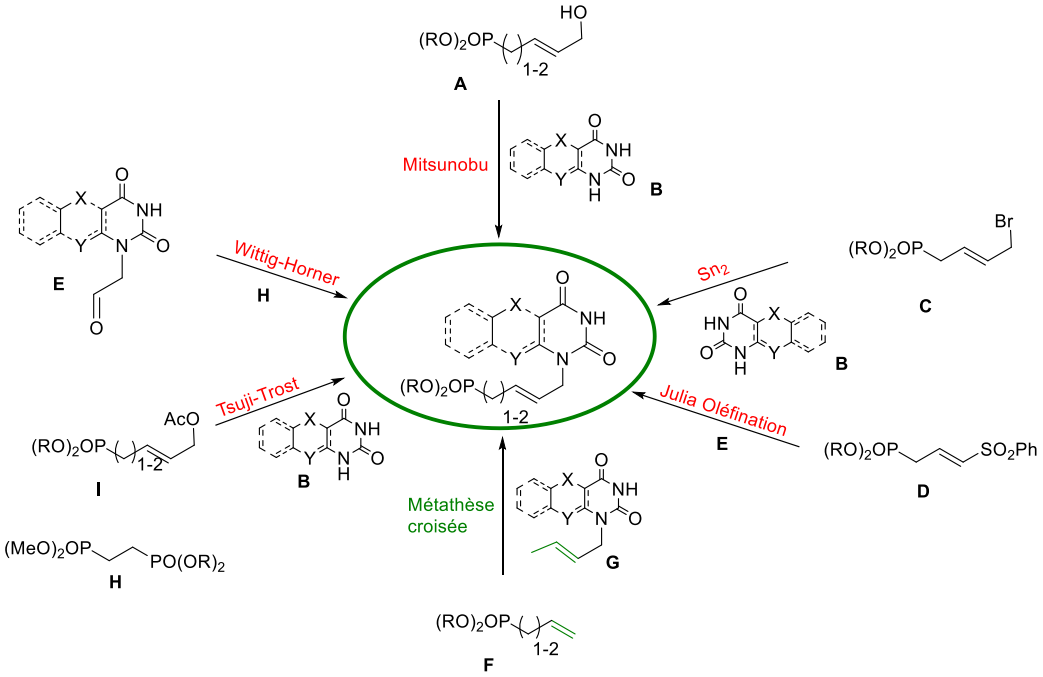


Schéma 21 *: Voise potentielles de couplage hétérocycle/chaîne.*

Sur la base de l'expertise du laboratoire dans le domaine de la métathèse croisée d'oléfines et la préparation de ces intermédiaires, cette réaction reste l'étape clef de notre stratégie. Il a donc été nécessaire après la synthèse des différentes bases :

- d'alkyler spécifiquement la position N^1 avec une chaîne crotyle.
- de protéger spécifiquement la position N^3, puis alkyler la position N^1 avec une chaîne crotyle.

Les nouvelles rétrosynthèses envisagées ont été les suivantes (Schéma 22) :

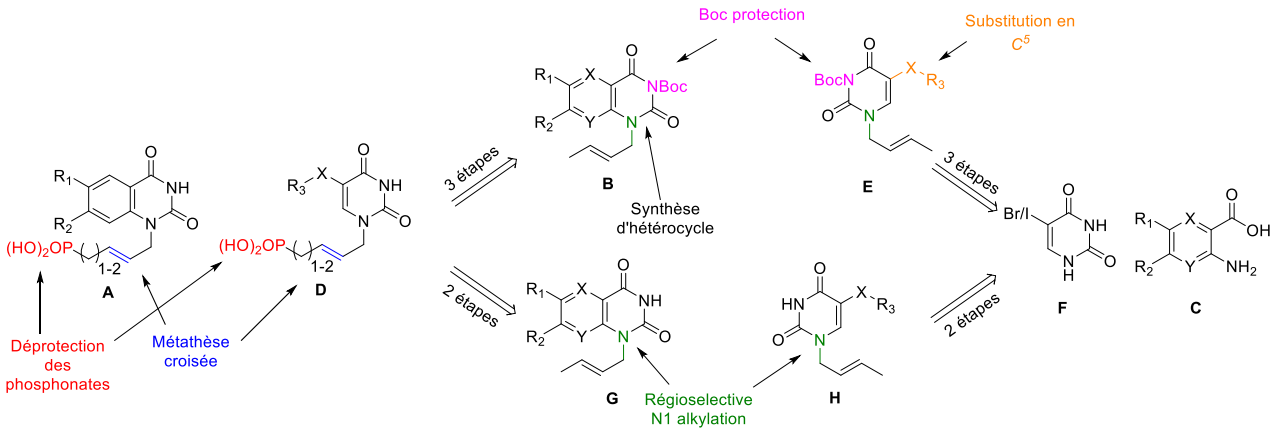


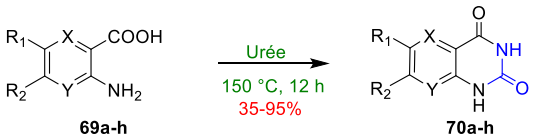
Schéma 22*:* Nouvelles rétrosynthèses.

1.6. Résultats et discussion

1.6.1. *Synthèse des dérivés N^1 alkényl phosphates*

- Préparation des hétérocycles

La première étape de cette voie de synthèse consiste en la préparation des bases quinazolindiones et C^5 (NHPh), (Bn)-uracile. Les premières ont été cyclisées **69a-h** *via* une condensation de l'urée à 150 °C. Cette réaction permet de travailler sans solvant (à cette température c'est l'urée qui solubilise les dérivés aminoacides) et de plus, les produits finaux sont isolés sans purification par précipitation en milieu acide (pH = 2) (Tableau 8).



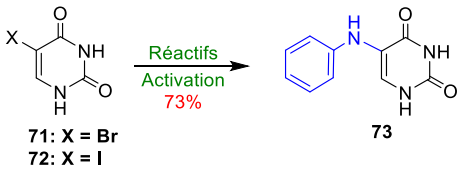
a : X = Y = CH, R_1 = R_2 = H
b : X = Y = CH, R_1 = Me, R_2 = H
c : X = Y = CH, R_1 = H, R_2 = OMe
d: X = Y = CH, R_1 = Br, R_2 = H
e: X = Y = CH, R_1 = H, R_2 = Br
f : X = Y = N, R_1 = R_2 = H
g : X = CH,Y = N, R_1 = R_2 = H
h : X= N, Y = CH, R_1 = R_2 = H

Entrées	X	Y	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	**CH**	**CH**	**H**	**H**	**70a**	89%
2	**CH**	**CH**	**Me**	**H**	**70b**	95%
3	**CH**	**CH**	**H**	**OMe**	**70c**	35%
4	**CH**	**N**	**H**	**H**	**70g**	74%
5	**N**	**CH**	**H**	**H**	**70h**	76%

Tableau 8 *: Résultats des cyclisations à l'urée.*

A haute température, l'urée est substituée par l'amine du dérivé **69** libérant de l'ammoniac, puis la deuxième amine de l'urée se cyclisera avec la fonction acide en libérant de l'eau pour former les produits **70a-c,g,h** avec des rendements allant de 35% à 95% (Tableau 8).

La seconde famille a nécessité une mise au point afin d'insérer avec de bons rendements les groupements aniline et benzyle à partir du 5-bromouracile **71** ou du 5-iodouracile **72**. Le 5-anilourcile **73** est obtenu par une substitution nucléophile sur une base pyrimidique pseudo aromatique.[104] Une mise au point a été nécessaire afin d'isoler le produit souhaité (Tableau 9). [105]



Entrées	X	Réactifs	Activations	Rendements
1	I	aniline	MW, 180 °C, 20 min	X
2	Br	aniline	MW, 180 °C, 20 min	X (agitation)
3	Br	aniline	Δ, 175 °C, 20 min	73%

Tableau 9 *: Optimisation de la S_{NAr} de l'aniline sur la position C^5 de l'uracile.*

[104] Fang, W.; Cheng, Y.; Cheng, Y.; Cherng, Y., Synthesis of substituted uracils by the reactions of halouracils with selenium, sulfur, oxygen and nitrogen nucleophiles under focused microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 3107-3113.
[105] Wilson, J. M.; Henderson, G.; Black, F.; Sutherland, A.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H.; Robins, D. J., Synthesis of 5-deazaflavin derivatives and their activation of p53 in cells , *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 77-86.

Dans les conditions initiales, aucune conversion du produit de départ n'a été observée (Entrée 1). La substitution de l'iode **72** par le brome **71** sous conditions micro-ondes n'a pas permis d'obtenir le couplage souhaité (Entrée 2). La réaction a été finalement réalisée sous chauffage classique avec un bon rendement de 73%. L'explication la plus logique de l'échec des entrées précédentes devrait être l'agitation du milieu durant l'activation.

Pour le composé **76**, deux voies de synthèse ont été envisagées : la première en deux étapes fait intervenir la formation d'un dérivé benzyle aldéhyde ester **75** qui se cyclise par la suite avec l'urée.[106] L'obtention du premier intermédiaire par une substitution nucléophile à partir du précurseur ester **74** en présence de NaH et d'éthyle formate s'est fait de manière quantitative. Malheureusement l'étape de condensation en présence d'urée n'a jamais permis l'obtention du produit **76** souhaité (Schéma 23).

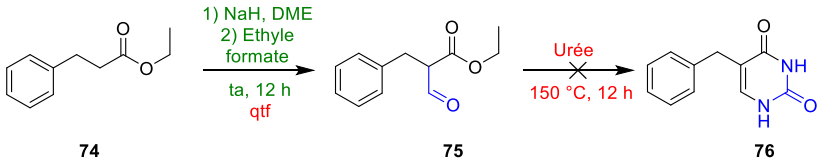


***Schéma 23** : Première voie de synthèse envisagée.*

La seconde voie de synthèse pour **76** a impliqué un « turbo » Grignard (Schéma 24). [25a]

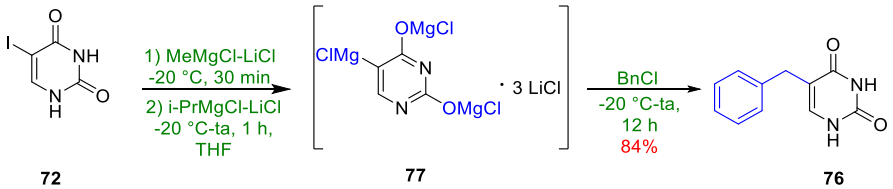


***Schéma 24 :** Synthèse du C^5-benzyle uracile via un turbo-Grignard.*

Le 5-iodouracile **72** étant peu soluble dans le THF, l'utilisation de MeMgCl a permis de déprotonner notre base. La solubilisation de la base[107] dans le THF en présence de LiCl permet l'augmentation de l'échange I/Mg[108]. La formation de l'intermédiaire **77** a été permise par l'ajout d'*iPr*MgCl. Ce dernier a été soumis à l'addition du chlorure de benzyle à -20 °C afin d'obtenir le dérivé **76** par précipitation avec 84 % de rendement.

Par ces deux méthodes, il a été possible de synthétiser sept hétérocycles, présentant des groupements chimiques pouvant réaliser des liaisons hydrogène et des interactions de type π-stacking avec le site actif de la *FDTS* (Figure 31).

[106] Yun, J, *et al*, US. Pat. Appl. Publ. **2012**, 20120142, 717, 07 jun.
[107] Krasovskiy, A.; Kopp, F.; Knochel, P., Soluble lanthanide salts ($LnCl_3 \cdot 2\,LiCl$) for the improved addition of organomagnesium reagents to carbonyl compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*: 497-500.
[108] Krasovskiy, A.; Knochel, P., A LiCl-mediated Br/Mg exchange reaction for the preparation of functionalized aryl- and heteroarylmagnesium compounds from organic bromides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3333-3336.

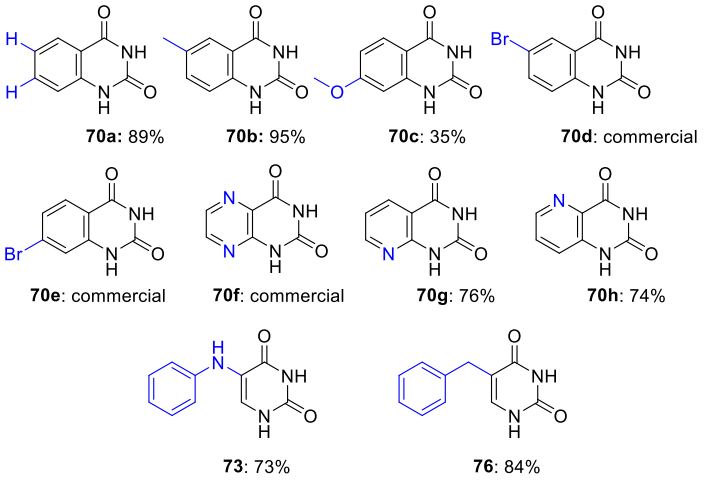


Figure 31 *: Chimiothèque de bases non canoniques.*

- Alkylation régiosélective des bases non canoniques

Notre équipe a publié précédemment une méthode permettant la perprotection suivie d'une mono-déprotection. Cette méthode va permettre de substituer les positions N^1 et N^3 *via* des groupements Boc[109] (Boc_2O, DMAP sous activation micro-ondes) ou Bz[110] (BzCl dans l'ACN/pyridine à température ambiante), puis de déprotéger sélectivement la position N^1 **78a,b** (soit par addition de SiO_2 dans le DCM/MeOH, ou par ajout de K_2CO_3 dans le dioxane). L'étape suivante étant l'alkylation de la position libre **79a,b** par différents groupements bromés *via* l'utilisation d'une base minérale à température ambiante (Schéma 25).

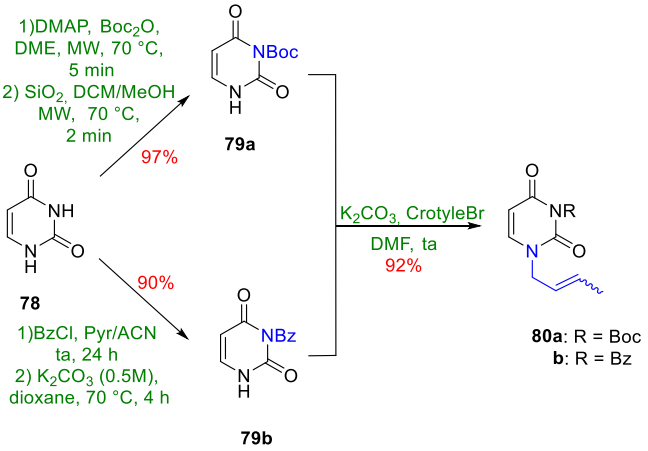


Schéma 25 *: Synthèse des dérivés* ***80a,b****..*

L'autre méthode est une alkylation régiosélective de la position N^1. Cette dernière peut être réalisée *via* des conditions de Vorbrüggen.[111] Après la silylation de la base pyrimidique **78**, la mise en présence d'un sucre perprotégé et activé sur la position anomérique (OAc, OBz) et d'un acide de lewis

[109] Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., A convenient, highly selective and eco-friendly N-Boc protection of pyrimidines under microwave irradiation, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 59747-59749.
[110] Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A., Sonication-assisted synthesis of (E)-2-methyl-but-2-enyl nucleoside phosphonate prodrugs, *Chemistry Select*, **2016**, *1*, 3108.
[111] Bookser, B. C.; Raffaele, N. B., High-throughput five minute microwave accelerated glycosylation approach to the synthesis of nucleoside libraries, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 173-179.

dans le milieu permettra la formation d'une liaison glycosidique **81a,b** entre N^1 et la position $C^{1'}$ du sucre. Plus récemment, *Hernandez-Reyes et al.*[112] ont publié une méthode dérivée de ce couplage, permettant l'insertion régiosélective d'un groupement allyle **83** sur l'uracile **78** *via* le passage par un intermédiaire silylé **82** puis une substitution en présence de TMSI formé *in situ* (Schéma 26).

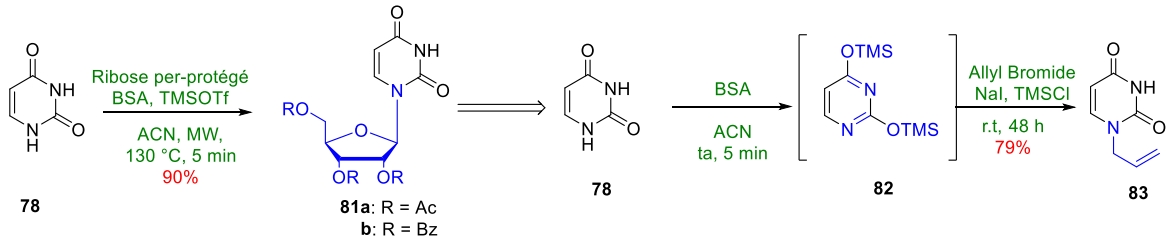


***Schéma 26** : N^1 alkylation via une réaction dérivé des conditions de Vorbrüggen.*

Il existe une approche reportée par *Balzarini et al.* [113] en 2013 permettant l'alkylation du N^1 en passant par une étape de perprotection **84** monodéprotection de la position N^1 **85** à partir de la quinazolindione **70a**. Le problème majeur de cette méthode est le faible rendement final < 20% **86** (Schéma 27).

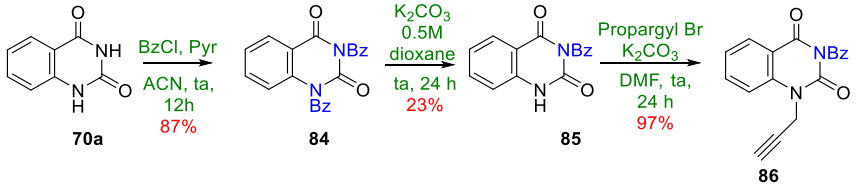


***Schéma 27** : Quinazolindione mono protection puis N^1 alkylation.*

Notre équipe a étudié et mis en évidence la grande complexité d'obtention de ces dérivés mono protégés par des groupements Bz ou Boc (travaux du Dr. Florian Chevrier-Thèse Octobre 2018) (Schéma 28).

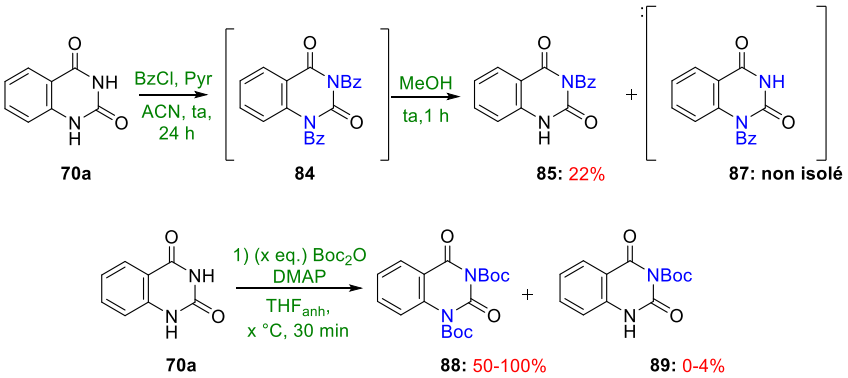


***Schéma 28** : Essais de protections régiosélectives*

[112] Hernández-Reyes, X. C.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; González-Zamora, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Morales-Serna, J. A.; Negrón-Silva, J. E., Synthesis of azanucleosides through regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by sulphated zirconia under microwave and solvent-free conditions, *Molecules*, **2012**, *17*, 3359-3369.
[113] Głowacka, I. E.; Balzarini, J.; Wróblewski, A. E.; The synthesis, antiviral, cytostatic and cytotoxic evaluation of a new series of acyclonucleotide analogues with a 1,2,3-triazole linker, Eur. *J. Med. Chem.*, **2013**, *70*, 703-722.

Les premiers essais ont porté sur la benzoylation de **70a** par ajout de BzCl au sein d'un mélange ACN/pyridine. Le produit de *per*-protection **84** n'a jamais été isolé. La déprotection dans le méthanol a conduit à un mélange non séparable de **85** et **87**. Nous avons essayé de mettre au point cette protection *via* les groupements Boc sur **70a**. Malgré les divers essais faisant varier le nombre d'équivalents de Boc_2O, le type d'activation : sous micro-ondes, sous ultrasons, thermique et ambiant, le produit mono-protégé **89** n'a jamais été isolé avec de bon rendement (4 %).

Ces difficultés de réactivité peuvent s'expliquer par les pKa des différents composés (Figure 32). Dans le système quinazoline **70a** le pKa de N^3 est supérieur à celui de l'uracile **78**, on peut donc en déduire que l'azote du premier **70a** est plus réactif que celui de **78**. Le pKa de l'azote N^1 de **70a** est non déterminé (> 14) mais doit être supérieur à celui de **78**. Ces différences sont dues aux effets mésomères sur la structure stabilisant l'anion et donc diminuant sa nucléophilie et donc sa réactivité. La nature du contre ion dans ce cas, peut être importante.

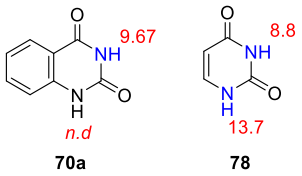


Figure 32 *: pKa des hétérocycles.*

Une autre synthèse en plusieurs étapes, publiée par *Pfister et al.*[114] Donnant accès aux dérivés quinazolinedione N^1-crotylé *à* partir d'anhydride isatoïque **90**, il est possible de substituer la position N^1, puis de former dans un second temps le noyau pyrmidine-2,4-dione *via* une condensation à l'urée dans le DMF conduisant à des rendements allant de faibles à modérés pour le produit **92** (Schéma 29).

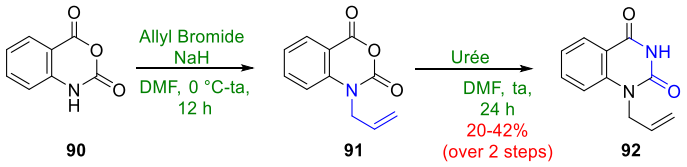


Schéma 29 *: N^1-alkylation via anhydride isatoïque*

Sur la base de ces différents travaux, nous avons développé une voie de synthèse permettant l'alkylation régiosélective en une seule étape de la position N^1 (Schéma 30).

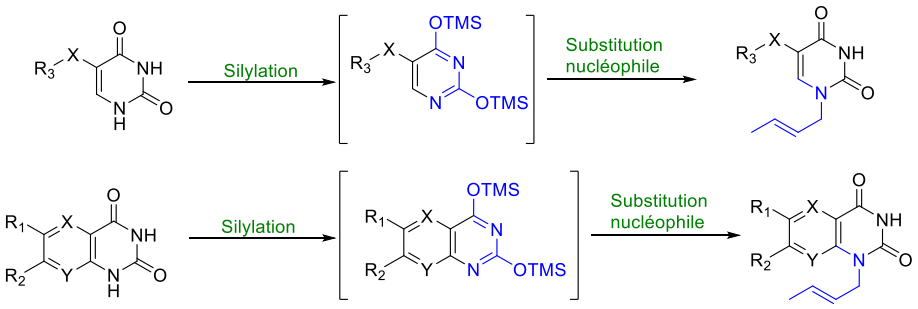
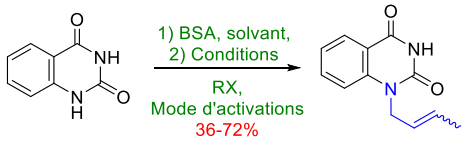


Schéma 30 *: Synthèse générale de la nouvelle N^1.*

[114] Hardtmann, G. E.; Koletar, G.; Pfister, O. R., The chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)dione (isatoic anhydrides) 1. The synthesis of N-substituted 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)diones. *J. Het. Chem.*, **1975**, *12*, 565-572.

Deux méthodes peuvent être employées afin de silyler nos bases. Les deux font intervenir du *bis*(triméthylsilyl)acétamide (BSA). Elle peut soit être réalisée à température ambiante en 1 h (solubilisation totale du produit), ou sous micro-ondes à 80 °C durant 5 min. Dans un second temps il a été nécessaire de mettre au point les meilleures conditions de substitution. La qualité et la sélectivité de la deuxième étape dépend de la qualité de silylation de nos composés. Durant cette seconde étape, la formation *in situ* du TMSI va permettre d'améliorer la substitution sur la chaîne halogénée (*E/Z 85:15*), par un mécanisme de clivage régiosélectif d'éther d'énol silylé (Tableau 10).

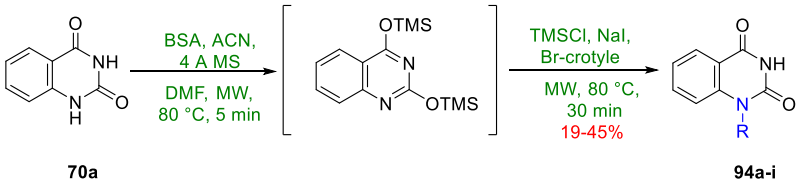


Entrées	Solvants	R-X (eq.)	Conditions pour 2)	Modes d'activation	Durées	Rendements
1	CH_3CN	2.5	TMSCl, NaI, 4 Å MS	rt	20 h	36%
2	CH_3CN	2.5	TMSCl, NaI, 4 Å MS	Δ / 80 °C	12 h	60%
3	CH_3CN	2.5	TMSCl, NaI, 4 Å MS	MW/ 80 °C	0.5 h	72%
4	CH_3CN	2.5	TMSCl, TBAI, 4 Å MS	MW/ 80 °C	0.5 h	67%

Tableau 10 *: Tableau d'optimisation de la N^1-alkylation.*

Sur la base des conditions publiées par *Hernandez-Reyes et al.* sur notre dérivé **70a**, après une quinzaine d'heures, des produits de dégradation apparaissent d'où ce faible rendement (Entrée 1). Pour diminuer le temps de réaction, nous avons chauffé la réaction permettant son augmentation à 60% (Entrée 2). Nous avons transposé par la suite les meilleures conditions (Entrée 2) sous micro-ondes afin de diminuer les temps de réactions. L'utilisation du tétrabuthylamonium iodide (TBAI) a été faite pour changer de donneur d'iodure afin de former le TMSI *in situ* et ainsi comparer l'efficacité par rapport au iodure de sodium (NaI).

Sur la base des conditions optimisées (Entrée 3), nous avons appliqué ces conditions sur divers substrats d'intérêts (Tableau 11).



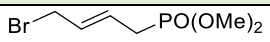
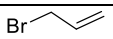
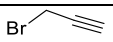
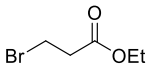
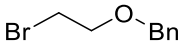
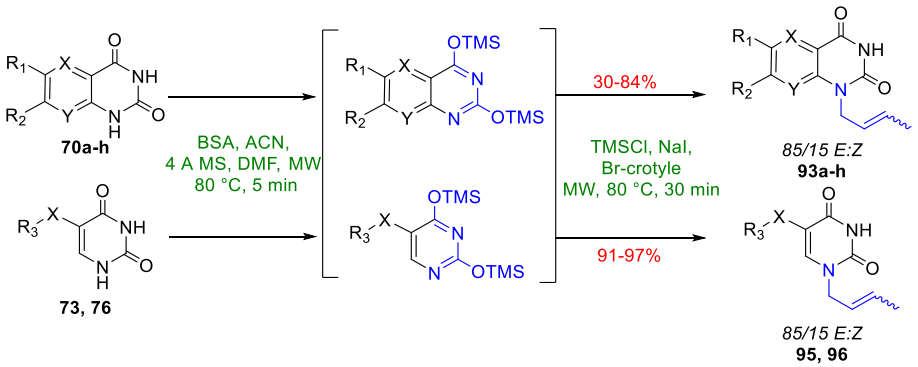
Entrées	Chaînes bromées R	Rendements
1		**94a** : mélange complexe non purifié
2		**94b** : 26%
3		**94c** : 19%
4	BnBr	**94d** : 45%
5	*n*-$BrC_5H_{10}Br$	**94e** : mélange complexe non purifié
6	*n*-BrC_4H_8Br	**94f** : mélange complexe non purifié
7		**94g** : mélange complexe non purifié
8		**94h** : mélange complexe non purifié

Tableau 11 *: Screening de différents groupements bromées*

Nous avons essayé d'insérer la chaîne diesters phosphonate bromée afin d'économiser un certain nombre d'étape. Malheureusement le produit d'intérêt **94a** n'a jamais pu être isolé, seulement un mélange complexe a été obtenu (Entrée 1) possiblement lié à la déprotection des esters phosphonates par le TMSI. La seconde entrée est une chaîne allyle, le produit désiré **94b** a pu être obtenu avec 26% de rendement, il pourra être engagé dans une réaction de métathèse par la suite. La troisième est un dérivé propargylique **94c** obtenu avec un faible rendement de 19%. Ces différences de rendement peuvent s'expliquer par l'addition du TMSI sur le carbone le moins encombré de l'instauration terminale, diminuant ainsi sa réactivité dans le milieu. La dernière chaîne à avoir pu être introduite est le benzyle **94d** avec un bon rendement de 45%. L'ensemble des entrées 5-8 correspondes à des chaînes (acycliques saturées, éther ou ester substituées) ont conduit à une non réactivités. Il est possible que le TMSI rompe les ponts éther, mais aussi déalkyle les esters. Dans le cas des chaînes aliphatiques bromées, un mélange complexe non purifiable a été observé. Il est donc nécessaire que l'halogène se trouve en α d'une insaturation. L'échange Br/I doit permettre de faciliter sa formation et donc sa réactivité par la suite. Dans un second temps la densité électronique doit jouer sur la réactivité.

Après avoir essayé d'introduire diverses chaînes (alkyle, benzyle…), nous avons appliqué les conditions ci-dessus sur nos différents hétérocycles synthétisés précédemment par addition de la chaîne crotyle. (Tableau 12).



Entrées	X	Y	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	CH	CH	H	H	93a	72%
2	CH	CH	Me	H	93b	84%
3	CH	CH	H	OMe	93c	70%
4	CH	CH	Br	H	93d	43%
5	CH	CH	H	Br	93e	37%
6	N	N	H	H	93f	30%
7	N	CH	H	H	93g	/
8	CH	N	H	H	93h	/
	X		R_3		Produits finaux	Rendements
9	NH		Ph		95	91%
10	CH_2		Ph		96	97%

Tableau 12 *: Résultats d'alkylation N^1sur l'ensemble des bases non canoniques.*

Pour l'ensemble des bases alkylées **70a-h**, **73** et **76**, les deux composés présentant un seul atome d'azote en position C^8 **93h** ou C^5 **93g**, n'ont pu être isolés. Pour le composé **93g**, la présence de l'atome d'azote en position C^5 oriente l'alkylation en position N^3, de plus pour les deux composés **93g,h**, le ratio de poly-alkylation est extrêmement important compliquant la purification. Les autres composés ont été synthétisés avec de très bons rendements **93a, b, c**, à modérés pour les trois autres (**93d**, **e, f**). Pour les composés **93d,e** cela s'explique par une solubilité différente des autres

hétérocycles et la formation de produits de dégradations. Pour le **93f** la présence des deux azotes sur l'aromatique désactive la réaction et réduit considérablement le rendement.

Les composés **95** et **96** montrent d'excellents rendements, par l'absence d'aromatique directement lié à la pyrimidine-2,4-dione, lui conférant une réactivité chimique proche d'un uracile substitué en C^5.

Afin de confirmer la régiosélectivté de l'alkylation de l'azote, nous avons réalisé des études RMN (par HMBC) pour chacun des produits synthétisés (Figure 33 et 34).

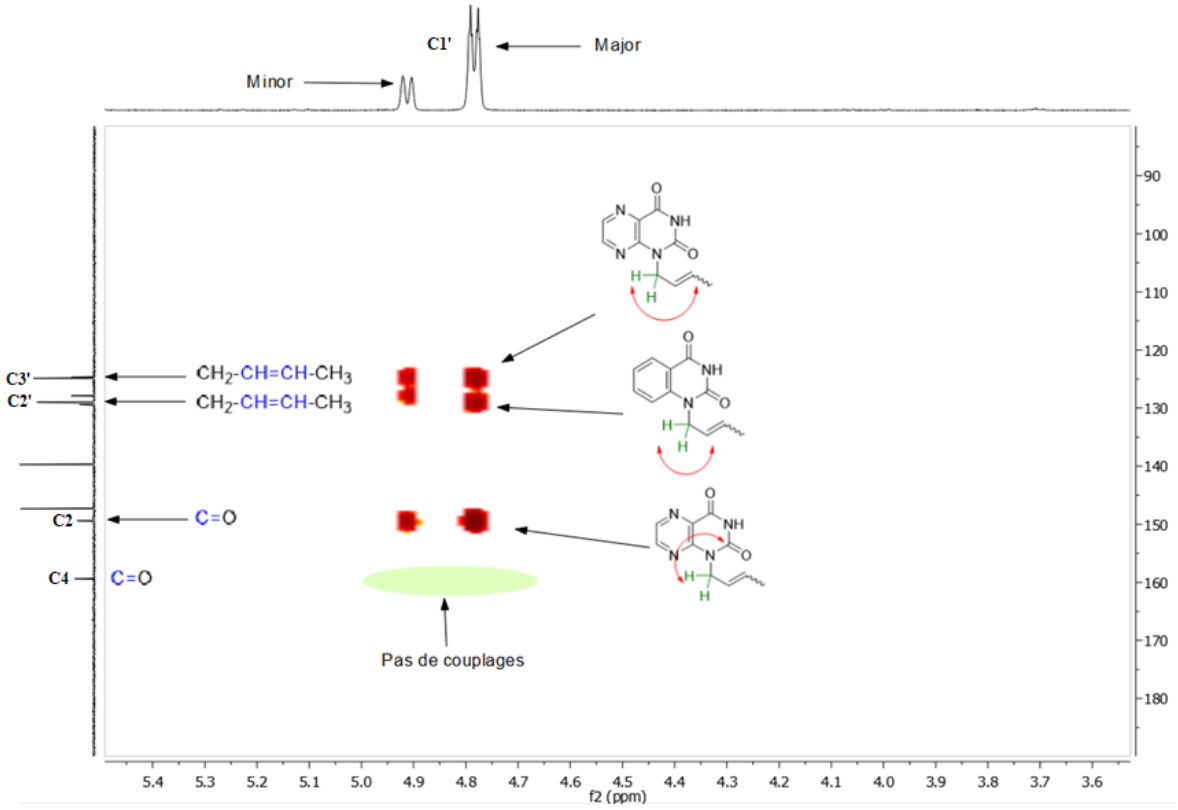


Figure 33 *: Détermination de la N^1-alkylation par RMN HMBC dans l'acétone-d_6.*

On est en présence d'un mélange *E/Z 85 :15* expliquant l'observation de massifs de mêmes multiplicités. En se plaçant au niveau du massif de $C^{1'}$ on identifie les couplages longues distances à travers l'espace avec les carbones de la structure. Il est nécessaire d'observer un seul couplage avec un carbone de carbonyle. Si deux couplages entre C^4 et $H^{1'}$ et C^2 et $H^{1'}$, cela nous indiquera que l'alkylation s'est réalisée en position N^3.

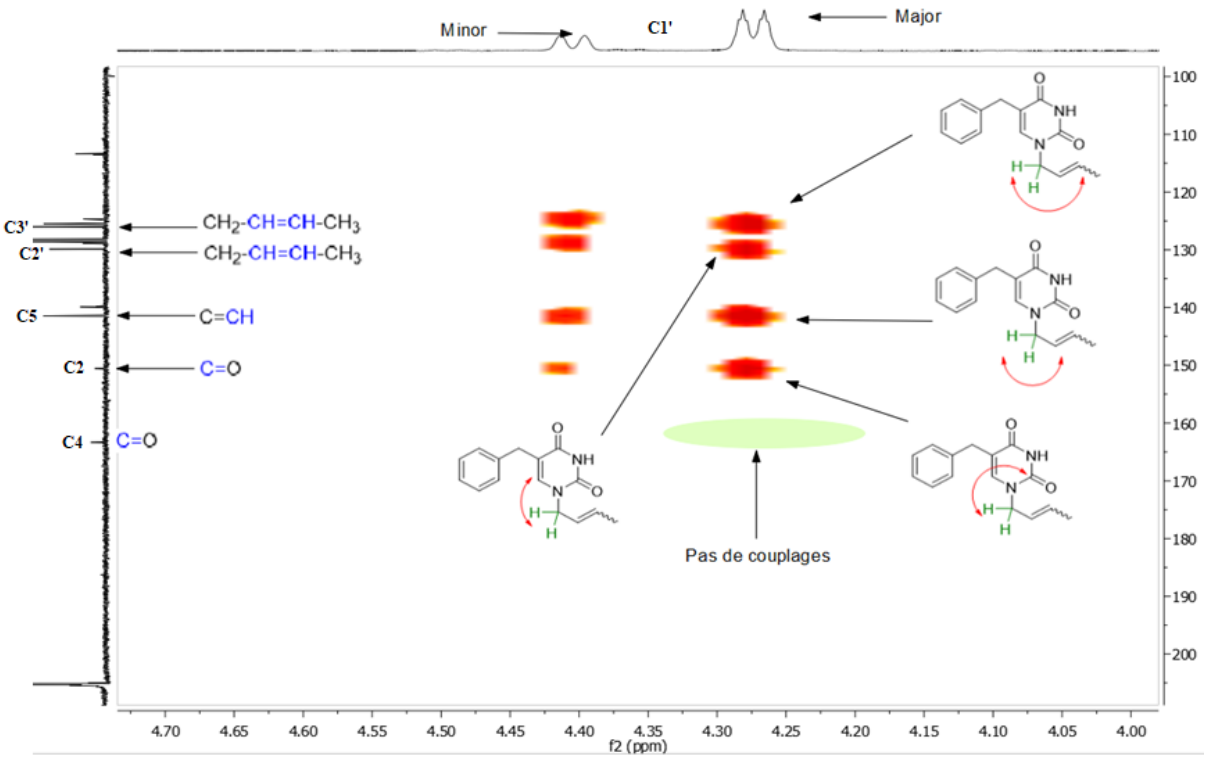


Figure 34 *: Détermination de la N^1-alkylation par RMN HMBC dans l'acétone-d_6.*

Lors de l'analyse des spectres RMN (HMBC) des dérivés d'uraciles, nous sommes particulièrement attentifs au couplage du massif $C^{1'}$ avec un seul carbonyle et les carbones quaternaires proches. La N^1 substitution est facilement déterminée, car elle ne présente qu'un seul couplage longue distance avec un C^2 carbonyle ainsi qu'avec le C^5. Dans le cas d'une N^3-alkylation, deux couplages auraient été observés avec les C=O mais aussi avec le C^5. Ce n'est pas le cas ici.

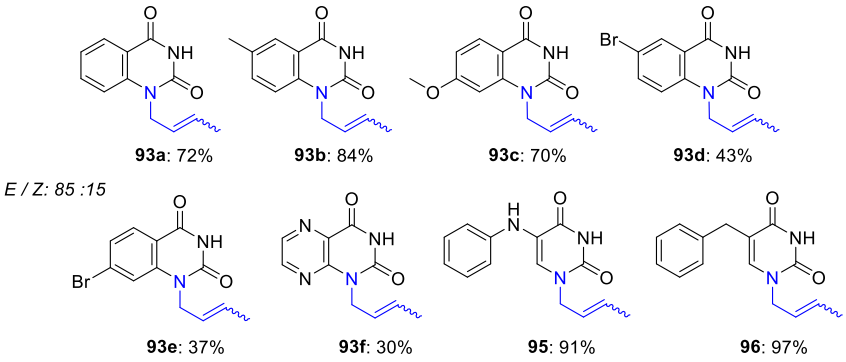


Figure 35 *: Chimiothèque des bases non canoniques alkylées.*

- Métathèse croisée d'alcènes

Dans cette voie de synthèse, compte-tenu des travaux antérieurs de l'équipe, nous avons décidé d'utiliser la chaîne crotyle ; cette dernière est considérée comme un alcène de type II, il sera donc nécessaire de lui présenter un alcène de type I : l'allyle phosphonate **98a** et l'homoallyle phosphonate

98b. Ces deux chaînes peuvent être obtenues dans des conditions d'Arbuzov[115] ou de Michaelis-Becker[116] (Schéma 31).

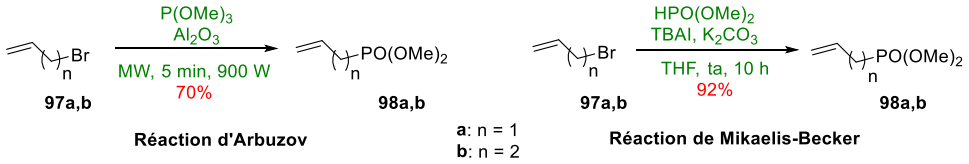


Schéma 31 *: Réaction d'Arbuzov et de Mikaelis-Becker.*

Dans la réaction d'Arbuzov, le doublet du triméthyle phosphite vient substituer le brome **97a,b**, puis *via* l'attaque de ce dernier sur le groupement OMe, **98a,b** est formé. Il est donc nécessaire d'éliminer le MeBr formé afin de déplacer l'équilibre de la réaction. Cette réaction se déroule dans des conditions plus dures (haute température) que celle de Michaelis-Becker, à température ambiante, durant laquelle une base minérale vient arracher le proton du diméthyle phosphite. L'anion ainsi formé substitue l'iode suite à l'échange Br/I **97a,b**.

- Couplage avec la chaîne allyle phosphonate.

Sur la base de nos travaux, nous avons décidé[73,117] (Schéma 32) de réaliser les premières réactions de métathèse croisée sur nos bicycles déprotégés au niveau du N^3 afin d'en limiter le nombre d'étapes.

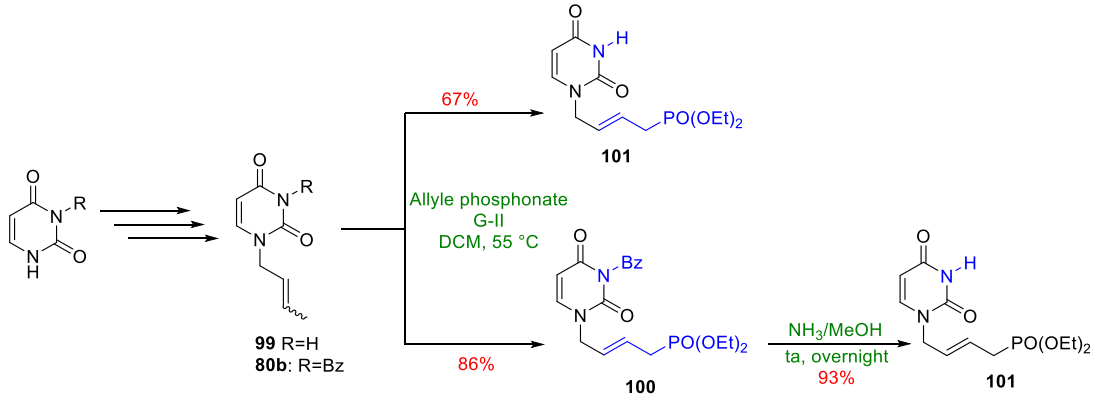
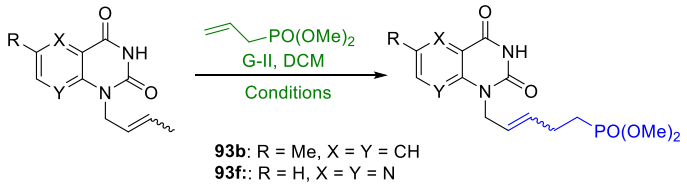


Schéma 32 *: Comparaison métathèse croisée N libre ou protégé.*

En série N^3-déprotégée, le rendement global du produit de couplage **101** est inférieur à celui obtenu avec la forme N^3-protégée **100**, mais il est ainsi possible de diminuer de deux le nombre d'étapes en conservant un bon rendement global lors de la synthèse.

Les premiers essais ont été réalisés entre le dérivé **93b** déprotégé et la chaîne **98a** dans le DCM en présence du catalyseur de Grubbs-II (G-II) (Tableau 13).

[115] Kaboudin, B.; Balakrishna, M. S., Surface-mediated solid phase reactions: Microwave assisted Arbuzov rearrangemeent on the solid surface, *Synt. Comm.*, **2001**, *31*, 2773-277.
[116] Liang, S.; Neisius, M.; Mispreuve, H.; Naescher, N.; Gaan, S., Flame retardancy and thermal decomposition of flexible polyurethane foams: Structural influence of organophosphorus compounds, *Polym. Degrad. and Stab.*, **2012**, *97*, 2428-2440,
[117] Kumamoto, H.; Topalis, D.; Broggi, J.; Pradère, H.; Roy, V.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Deville-Bonne, D.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Garin, D.; Crance, J-M.; Agrofoglio, L. A., Preparation of acyclo nucleoside phosphonate analogues based on cross-metathesis, Tetrahedron, **2008**, *64*, 3517-3526.

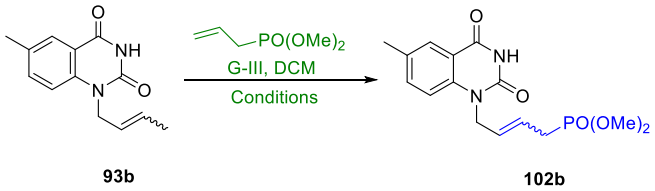


Entrées	X	Y	R	% Catalyseur	Conditions	Rendements	Observations
1	**CH**	**CH**	**Me**	3 x 5%	)))), 80 kHz, 55 °C, 24 h	X	Pas de conversion
2	**CH**	**CH**	**Me**	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	<5%	Peu de conversion
3	**N**	**N**	**H**	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	X	Empoisonnement du catalyseur

Tableau 13 *: Premiers essais de métathèse.*

Un second essai a été réalisé avec le composé didéazaquinazoline **93f**, conduisant dès l'ajout du catalyseur à une coloration bleue violette intense. Aucune conversion n'a été observée, la dégradation du catalyseur a été quasi immédiate. Au vu des rendements et des conversions en substrat de départ, on peut en déduire que la présence de NH libre **93b,f** ou d'un trop grand nombre d'azotes **93f** empoisonnent le catalyseur par la création d'adduits conduisant à son inactivation.[118]

Afin de contourner ce problème, nous avons décidé dans un second temps de changer de catalyseur. Le choix s'est porté sur le catalyseur de Grubbs-III **61b**, largement utilisé de part ces caractéristiques présentées précédemment (turn over plus important et donc une réactivé accrue) dans des métathèses polymérisante ou avec des dérivés présentant des amines libres[87] (Tableau 14).



Entrées	93b	Chaîne phosphonate	Catalyseur	Activations	Rendements
1	1 éq	4 éq	15 %	ta, 24 h	X
2	1 éq	4 éq	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	X
3	3 x 0.33 éq/h	4 éq	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	X
4	1 éq	3 x 1.3 éq/h	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	X
5	1 éq	4 éq	3 x 5 %/h	Δ, 55 °C, 24 h	X
6	1 éq	4 éq	15 %	)))), 80 kHz, 55 °C, 24 h	9%
7	1 éq	4 éq	15 %	)))), 80 kHz, 55 °C, 24 h, H_2O/PTS 2.5%	X

Tableau 14 *: Différents essais avec le catalyseur de 3ème génération.*

Le premier test réalisé à température ambiante à partir du dérivé **93b** avec la chaîne **98a** à température ambiante (Entrée 1) n'a pas permis d'isoler le composé souhaité **102b**. Nous avons donc décidé d'augmenter l'activation *via* l'utilisation d'un chauffage thermique à 55 °C. Aucune différence n'a été observée (Entrée 2). L'ajout séquentiel des différents réactifs a été mis en place afin de limiter la réactivité du catalyseur (Entrée 3-5). Aucune conversion du substrat de départ n'a été observée. Nous avons par la suite supposé que le mode d'activation n'était pas suffisant pour dissocier et activer le catalyseur. Le changement de mode d'activation entre thermique et sous ultrasons (Entrée 6) a

[118] Ireland, B. J.; Dobigny, B. T.; Fogg, B. E., Dedcomposition of a phosphine-free metathesis catalyst by amines and other bronsted acid, *ACS Catal.*, **2015**, *5*, 4690-4698.

permis d'isoler **102b** avec un rendement faible de 9%. Un test dans l'eau avec un agent de transfert de phase a été réalisé sur l'expérience du laboratoire, mais aucune conversion n'a été observée **93b**.

Au vu des difficultés de reproductibilité et de réactivité, nous avons décidé de retourner vers une voie synthétique faisant intervenir une étape de protection de la position N^3, suivi d'une métathèse d'oléfines et enfin d'une déprotection du groupement introduit conformément à notre experience[73] (Schéma 33).

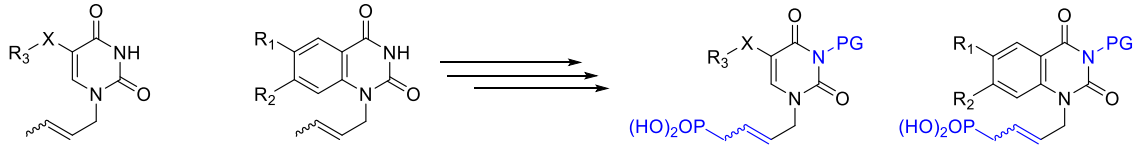
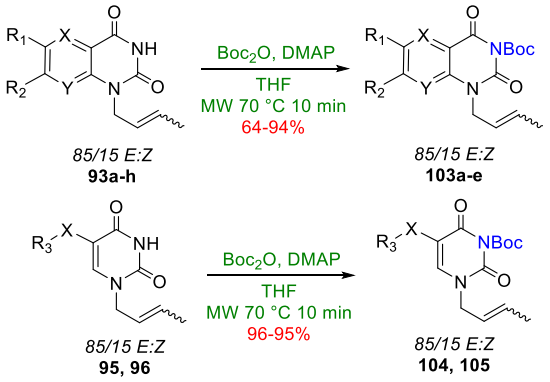


Schéma 33 : *Nouvelle voie de synthèse.*

Deux groupements protecteurs peuvent être utilisés afin de désactiver le doublet non liant de la position N^3 ; le groupement benzoyle et le groupement Boc. Différentes tentatives d'insertion du Bz[119] ont été réalisées au laboratoire sans jamais permettre l'obtention du produit attendu. Le choix du groupement protecteur s'est donc logiquement porté sur le groupement Boc[120] par sa facilité d'insertion et de déprotection dans des conditions acides sous activation micro-onde. (Tableau 15).



Entrées	X	Y	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	CH	CH	H	H	103a	90%
2	CH	CH	Me	H	103b	94%
3	CH	CH	H	OMe	103c	64%
4	CH	CH	Br	H	103d	80%
5	CH	CH	H	Br	103e	85%
	X		R_3		Produits finaux	Rendements
6	NH		Ph		104	96%
7	CH_2		Ph		105	95%

Tableau 15 ; *Résultat des protections du N^3 via un groupement Boc.*

Dans cette réaction, le DMAP va former avec Boc_2O un anhydride mixte, c'est un groupement activant afin d'aider à la substitution par la suite de l'amine sur ce dérivé. Le sous-produit formé se dégrade en CO_2 et en butanol. Les différents rendements sur nos composés vont de 64% à 96%. La

[119] Schröder, N.; Wencel-Delord, J.; Glorius, F., High-yielding, versatile, and practical [Rh(III)Cp*]-catalyzed ortho bromination and iodination of arenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 8298-8301.
[120] Yoosaf, K.; Llanes-Pallas, A.; Marangoni, T.; Belbakra, A.; Marega, R.; Botek, E.; Champagne, B.; Bonifazi , D.; Armaroli, N., From molecular to macroscopic engineering: Shaping hydrogen-bonded organic nanomaterials. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3262-3273.

protection des dérivés **93f-h** n'a pas été réalisée suite aux observations effectuées durant l'étape de métathèse croisée sur le composé **93f**.

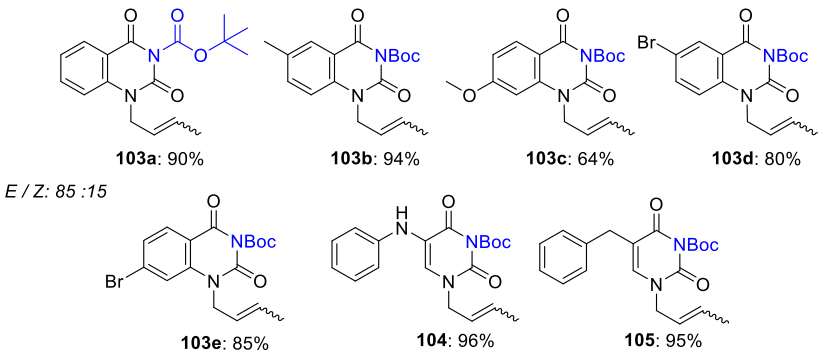
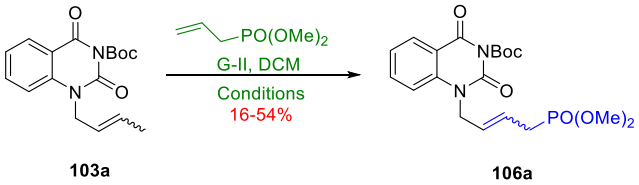


***Figure 36** : Résultats des N^3 protections via le groupement Boc.*

Le composé **103a** a alors subi une réaction de métathèse croisée sous activation ultrason (Entrée 1), et sous activation thermique (Entrée 2) en présence de la chaîne **98a** dans du DCM, en présence du catalyseur de G-II conduisant au produit de métathèse croisée **106a** (Tableau 16).



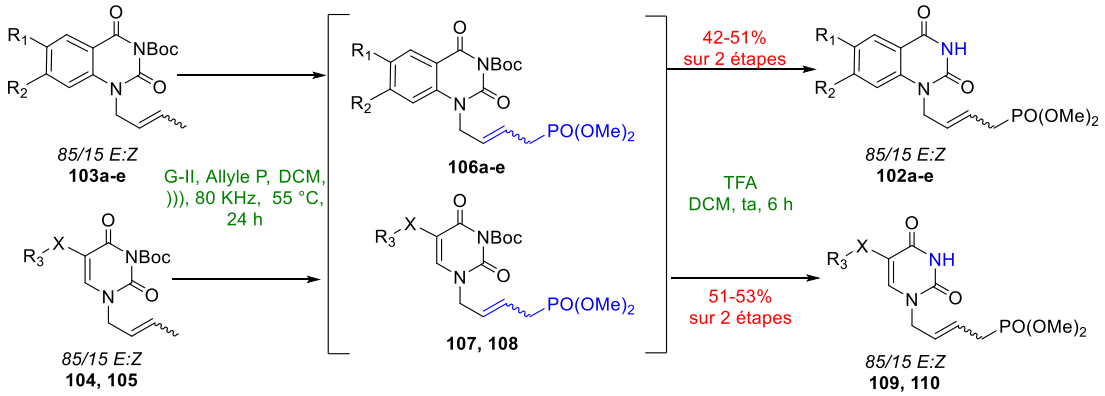
Entrées	% Catalyseur	Conditions	Rendements	Observations
1	3 x 5%	)))), 80 kHz, 55 °C, 24 h	54%	14% impuretés
2	15 %	Δ, 55 °C, 24 h	16%	Purification difficile

***Tableau 16** : Nouveaux essais de métathèse sur base protégée.*

La protection (désactivation) du N^3 permet d'obtenir des rendements supérieurs en métathèse d'oléfines qu'avec la position N^3 libre, mettant ainsi en évidence l'importance de cette protection afin d'éviter l'empoisonnement du catalyseur par le doublet non liant de l'azote. Les rendements se révèlent supérieurs sous ultrasons pour **106a**. Les ultrasons sont capables de dissocier plus facilement le catalyseur et de dégazer l'éthylène formé, permettant ainsi de déplacer l'équilibre. On remarque la présence d'impuretés provenant de l'homodimèrisation de la chaîne diesters allyle phosphonate **98a** possédant un Rf extrêmement proche du produit **106a** attendu.

Afin d'éliminer les traces d'homodimères de nos produits de couplage 1**06a-e**, **107**, **108**, nous avons décidé d'effectuer une première filtration rapide sur silice. Par ajout de TFA, nous avons déprotégé les groupements Boc de la position N^3 et ainsi augmenté la polarité de nos produits de couplages vis-à-vis des impuretés facilitant ainsi leurs purifications à cette étape. Les rendements ainsi obtenus sur deux étapes sont supérieurs à ceux obtenus suite à la métathèse croisée (Tableau 17).[121]

[121] Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G., Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α-amino acids, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 3675-3678.



Entrées	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements sur deux étapes
1	H	H	102a	51%
2	Me	H	102b	56%
3	H	OMe	102c	42%
4	Br	H	102d	48%
5	H	Br	102e	55%
	X	R_3	Produits finaux	Rendements sur deux étapes
6	NH	Ph	109	53%
7	CH_2	Ph	110	51%

Tableau 17 *: Résultats sur deux étapes de la métathèse et de la N^3 déprotection.*

La déprotection du groupement Boc s'effectue en condition acide (TFA), l'oxygène de la liaison C-O-*t*Bu du Boc capte le proton labile du TFA. Il se produira un départ du groupement $t\text{Bu}^+$ suivi d'un dégagement de CO_2 *via* une décarboxylation par l'arrachement de l'hydrogène de l'acide précédemment formé. Le produit en fin de réaction est sous forme de sel NH_2^+ CF_3COO^- qu'il est nécessaire de dissocier durant le traitement. Par cette méthode, nous avons pu isoler l'ensemble des produits **102a-e**, **109**, **110** désirés en deux étapes, avec des rendements compris entre 48% et 56%.

Cette méthode a été par la suite appliquée au couplage de la chaîne homoallyle phosphonate **98b** sur ces mêmes structures.

- Couplage avec la chaîne homoallyle phosphonate.

Le couplage d'une la chaîne homoallyle phosphonate **98b** sur l'uracile *N^1*-croylé-*N^3-protégé* a été décrit précédemment par notre équipe[73] avec de bons rendements (86%) (Schéma 34).

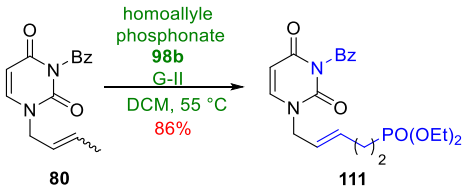


Schéma 34 *: Couplage par métathèse croisée de la chaîne **98b**.*

Nous avons durant la préparation de la chaîne homoallyle phosphonate à partir du diméthyle phosphite et du bromure d'allyle, la formation d'un mélange de produits insaturés **98b,c**. Le proton en α du phosphonate étant acide, il peut être arraché en présence de base (NaH, K_2CO_3) (Schéma 36). Nous avons donc utilisé le produit commercial sous forme éthyle **98d** afin de s'affranchir de ce problème.

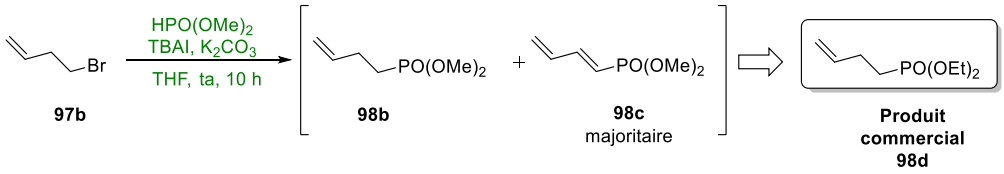
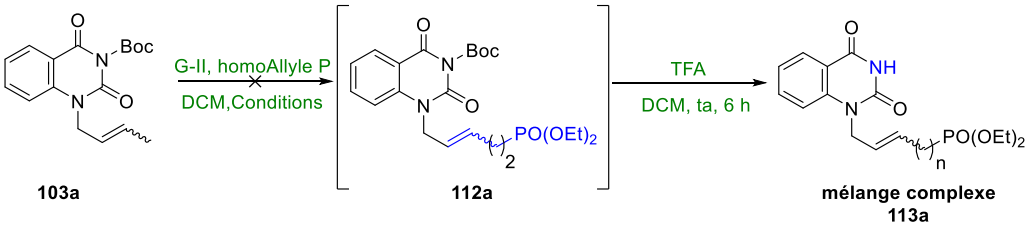


Schéma 35 *: Réarrangement lors de la synthèse de la chaîne* ***98b****.*

Nous avons alors effectué un premier test avec le dérivé **103a** et la chaîne **98d** dans le DCM en présence du catalyseur de G-II (Tableau 18).



Entrées	Conditions	Rendements	Observations
1	)))), 80 kHz, 55 °C, 24 h	X	Mélange complexe
2	Δ, 55 °C, 24 h	X	Mélange complexe

Tableau 18 *: Découvertes de l'isomérisation de nos composés.*

L'analyse du produit isolé a mis en évidence la présence de plusieurs signaux en RMN du phosphore (^{31}P), nous avons donc pensé à un réarrangement durant la réaction. En changeant le mode d'activation afin de réduire l'apport énergétique des ultrasons largement supérieurs à un chauffage thermique a conduit aux mêmes observations.

Des réactions permettent d'expliquer l'observation de ce mélange complexe : l'isomérisation d'un ou de l'autre voir même des deux alcènes. Ce phénomène conduit à la dégradation du catalyseur ou/et à la formation du mauvais produit de couplage. La présence de ligand carbénique de type NHC peut induire un réarrangement de la chaîne par l'arrachage du proton acide en α du phosphonate (Schéma 36).

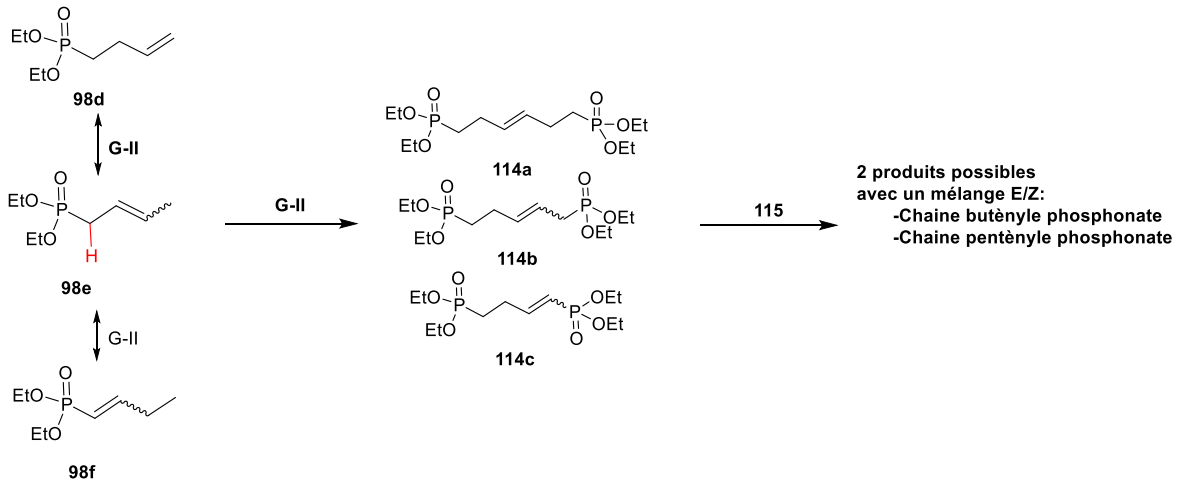


Schéma 36 *: Réarrangement et produit finaux possibles.*

L'homodimérisation aura lieu avec la chaîne diesters phosphonate la plus réactive, souvent l'alcène de type I (ici **98d**). Le catalyseur par sa décomposition peut déplacer l'insaturation de **98d** à **98e**. La présence d'un H acide en α peut déplacer l'équilibre précédent vers **98f**. De par leurs structures, chacun de ces isomères aura une vitesse d'homodimérisation différente conduisant alors à des mélanges complexes de **114a-c**.

Les diverses optimisations ont montré qu'un milieu concentré, un temps de chauffage long et une charge catalytique ou oléfinique importante favorisent ce phénomène. [122,123] Diverses études ont mis en évidence les temps de demi-vie des catalyseurs et la manière dont ils se dégradent (Schéma 37).[124a,b] Le mécanisme proposé suggère la formation d'un hydrure de dimère de ruthénium **115** avec le départ d'un groupement phosphine.

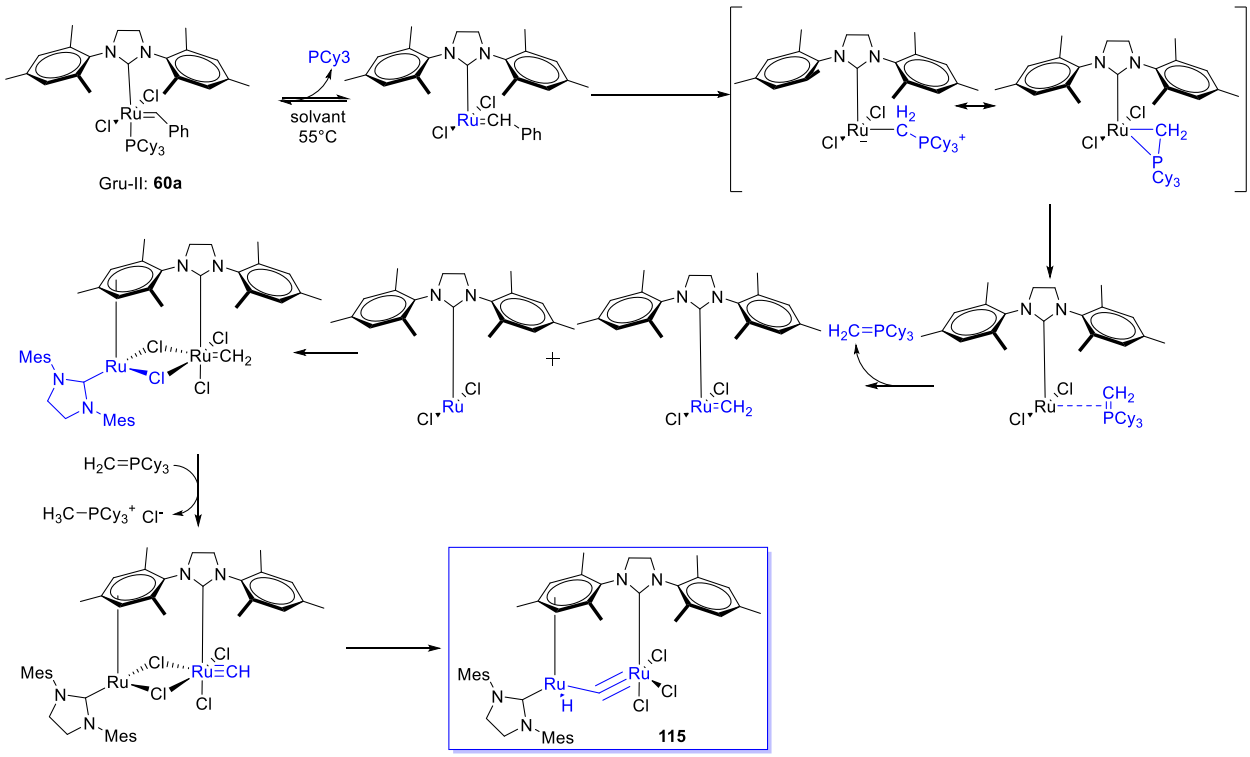


***Schéma 37** : Produit de décomposition du catalyseur **60a**.*

C'est l'espèce **115** qui est responsable des isomérisations ou désactivations du catalyseur. Dans la littérature de nombreuses études font état de ce phénomène sur différents substrats même si certaines équipes utilisent cette isomérisation afin de développer de nouvelles molécules (Schéma 38).[125]

[122] Kadyrov, R., Olefin Metathesis: Catalyst inhibition as a result of isomerization., *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 113-116.
[123] Leitao, E. M.; Dubberley, S. R.; Piers, W. E.; WU, Q.; McDonald, R., Thermal decoomposition modes for four-coordinate ruthenium phosphonium alkylidene olefin metathesis catalysts, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 11565-11572.
[124] a) Hong, S. H.; Wenzel, A. G.; Salguero, T. T.; Day, M. W.; Grubbs, R. H., Decomposition of ruthenium olefin metathesis catalysts, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7961-7968. b) Lafaye, K.; Bosset, C.; Nicolas, L.; Guérinot, A.; Cossy, J., Beyond catalyst deactivation: cross-metathesis involving olefins containing N-heteroaromatics,, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2223–2241.
[125] Schmidt, B.; Hauke, S., Cross metathesis of allyl alcohols: how to suppress and how to promote double bond isomerization, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 4194-4207.

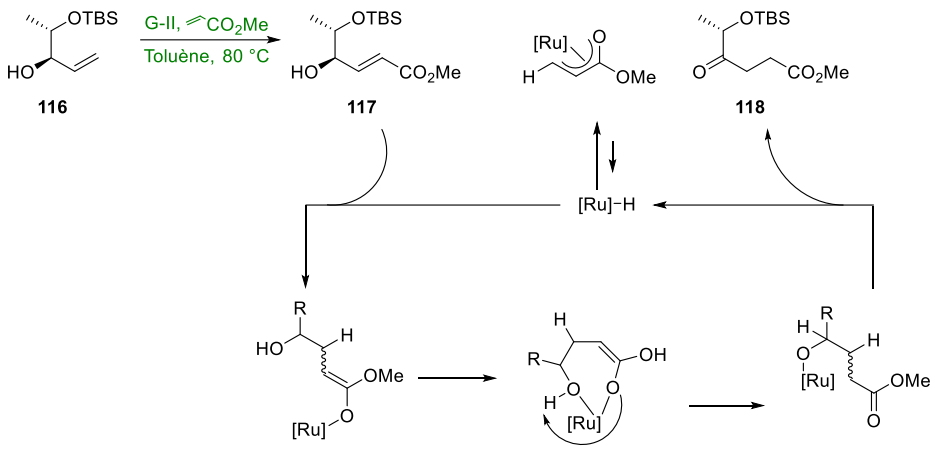


Schéma 38 *: Isomérisation non désirée durant CM.*

Grubbs *et al.*[126] ont exploré une méthodologie de synthèse faisant intervenir des cofacteurs pour empêcher l'isomérisation. Une de leurs premières idées a été d'utiliser des additifs conférant un pKa légèrement acide telle que : acide acétique ou des dérivés quinones. Les dérivés donneurs de radicaux comme le TEMPO, NHT ou méthoxyphénol se montrent inefficaces. Les 1,4-benzoquinones peu encombrées et appauvris en électrons étaient les plus efficaces afin d'empêcher cette réaction secondaire (dichloro, ou tétrafluoro). Les benzoquinones vont être réduites[127], elles se fixent sur l'espèce active à 14 é- du catalyseur afin de réduire sa décomposition. L'utilisation de ces additifs a permis de réduire les temps de réactions, la charge catalytique, ainsi que la formation de l'isomère.

Sur la base des travaux de Grubbs, nous avons essayé le couplage de **103a** avec la chaîne **98d** en présence de 1,4-benzoquinone (0.1 éq). Hélas, dans ces conditions aucune conversion n'a été observée. De plus la purification du réactif de départ fut compliquée par la présence de benzoquinones résiduelles dans chacune des fractions.

Le brut réactionnel a été envoyé en LC-MS (Figure 37). La séparation a été réalisée sur une colonne Xterra C18 2.1 x 150 mm ; 5 µm, avec un gradient d'élution (H_2O/ACN 0/1 à 20/80 en 6 min, puis 1 min à 20/80 et enfin un gradient 20/80 à 7/30 en 1.1 min), un débit de 0.4 mL/min, suivie UV et analyse en masse ESI 75 V à 350 °C.[128]

[126] Hong,S. H.; Sanders, D. P.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H., Prevention of undesirable isomerization during olefin metathesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* , 17160-17161.
[127] Csjernyik, G.; Éll, A. H.; Fadini, L.; Pugin, B.;Bäckvall, J-E., Efficient ruthenium-catalyzed aerobic oxidation of alcohols using a biomimetic coupled catalytic system, *J. Org. Chem.*, **2002**, *6*, 1657-1662.
[128] Plateforme ICOA, Nathalie Percina.

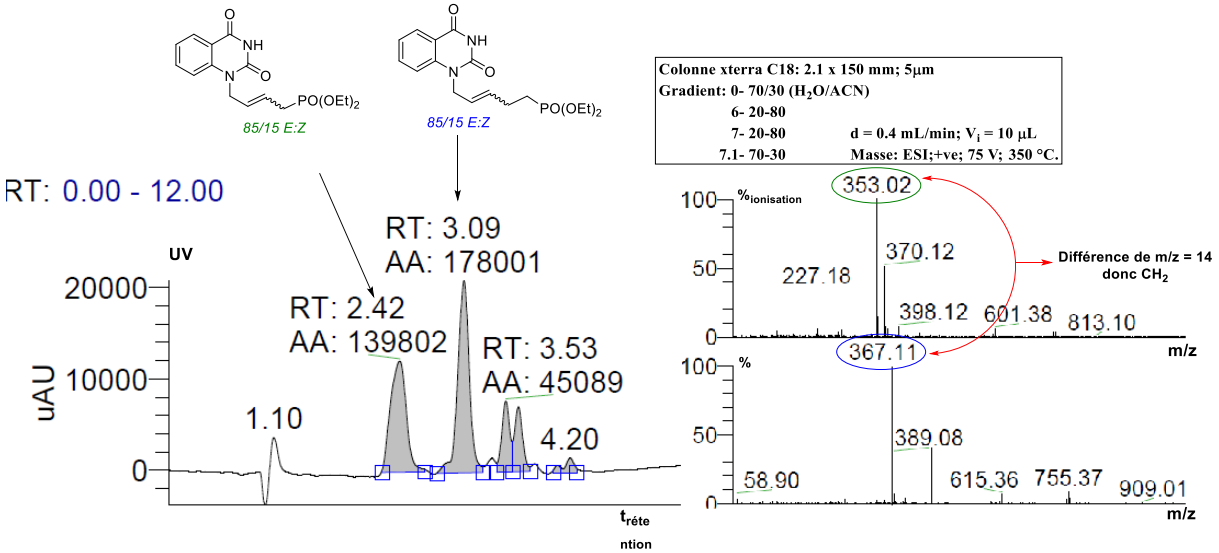
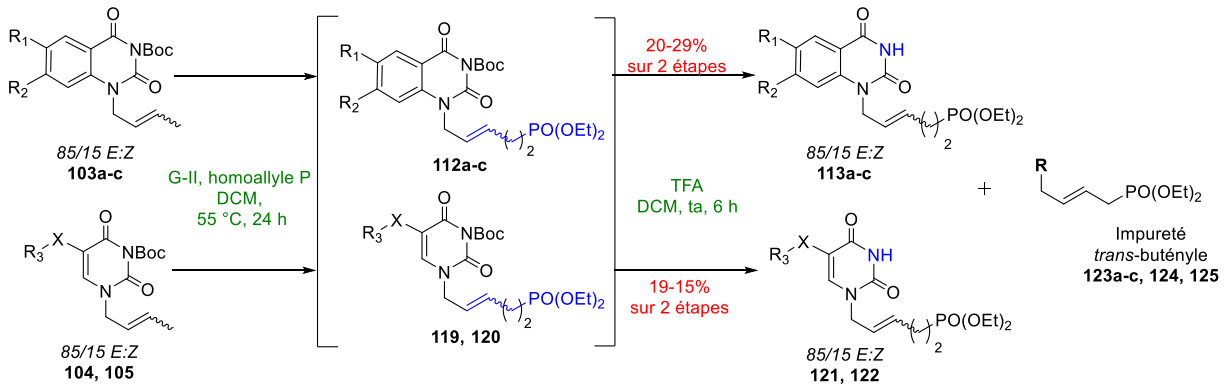


Figure 37 : Analyse LC/MS du mélange complexe.

Ces conditions ont alors été transposées sur un système de purification semi-préparatif Puriflash/Interchim, sur une colonne Gemini-NX C18, 150 x 30 mm, 5 µm avec un gradient de 15 min (1/0 vers 9/1 H_2O/ACN d : 75 mL/min) afin de purifier les différents mélanges après déprotection (Tableau 19).



Entrées	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	H	H	113a	20%
2	Me	H	113b	Mélange complexe
3	H	OMe	113c	29%
	X	R_3	Produits finaux	Rendements
4	NH	Ph	121	19%
5	CH_2	Ph	122	15%

Tableau 19 : *Résultat du couplage avec l'homoallyle phosphonate après purification semi-préparative.*

Seulement quatre composés ont pu être isolés avec une pureté > 85%. Le composé méthylé **113b** n'a pu être isolé avec une pureté suffisante (Figure 38).

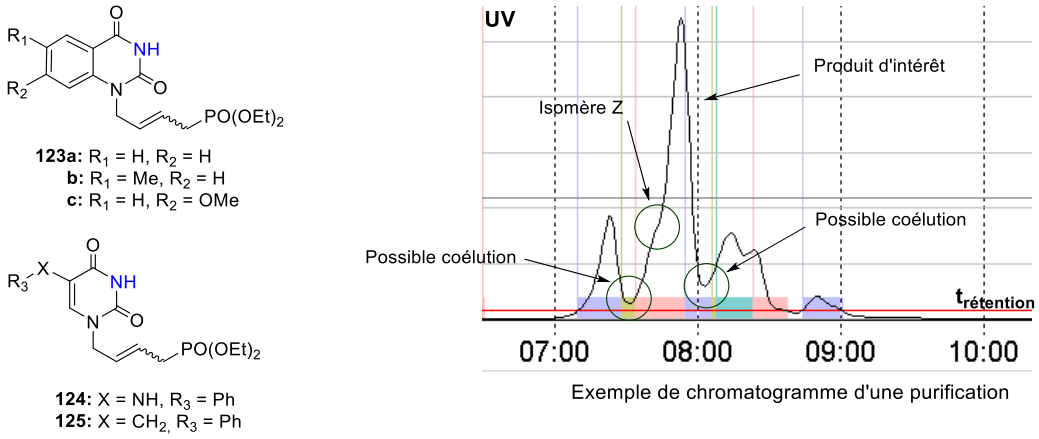


Figure 38 *: Impuretés des mélanges et chromatogramme de purification.*

Les rendements sont relativement faibles d'une part à cause de l'isomérisation conduisant à la formation des composés **113a-c**, **121**, **122** en mélange avec les composés **123a-c**, **124**, **125**, et d'autre part à cause du système de purification semi-préparative. Malgré les différents efforts de dilutions de nos bruts et de purifications des fractions contenant un mélange, les purifications se sont avérées extrêmement complexes.

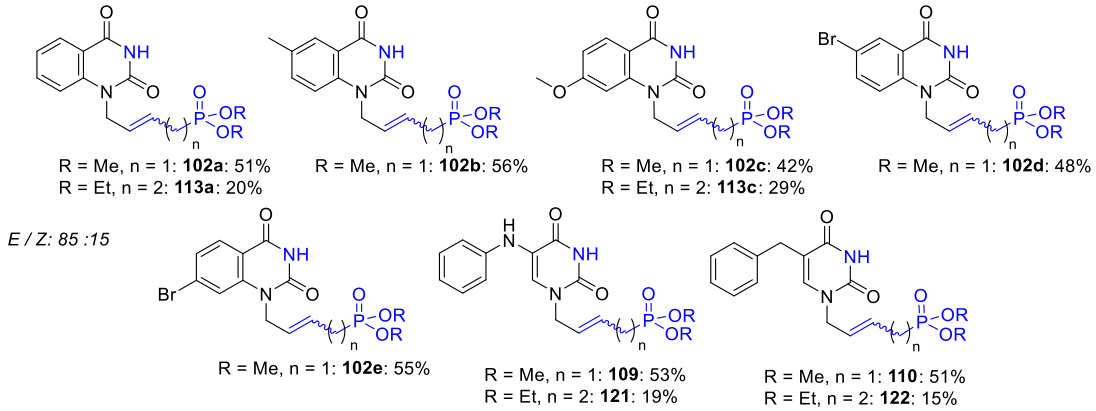


Figure 39 *: Résultats de la réaction de métathèse croisée et N³ déprotection « one-pot».*

- Formation des acides phosphoniques

La dernière étape de cette voie de synthèse est la déprotection des différents groupements phosphonates en acides phosphoniques. Cette réaction a été développée par *McKenna et al.*[129] en 1977. On retrouve dans la littérature différentes manières de réaliser la déprotection de groupements de type méthyle ou éthyle phosphonate. Notre équipe[117] a utilisé cette méthode de déprotection dans le DCM en présence de TMSBr à température ambiante et mis au point dans l'ACN sous activation micro-onde[130] à 80 °C (Schéma 39).

[129] McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; McKenna, M-C., The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *18*, 155-158.
[130] Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A., Sonication-Assisted Synthesis of (E)-2-Methyl-but-2-enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs, *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 3108–3113.

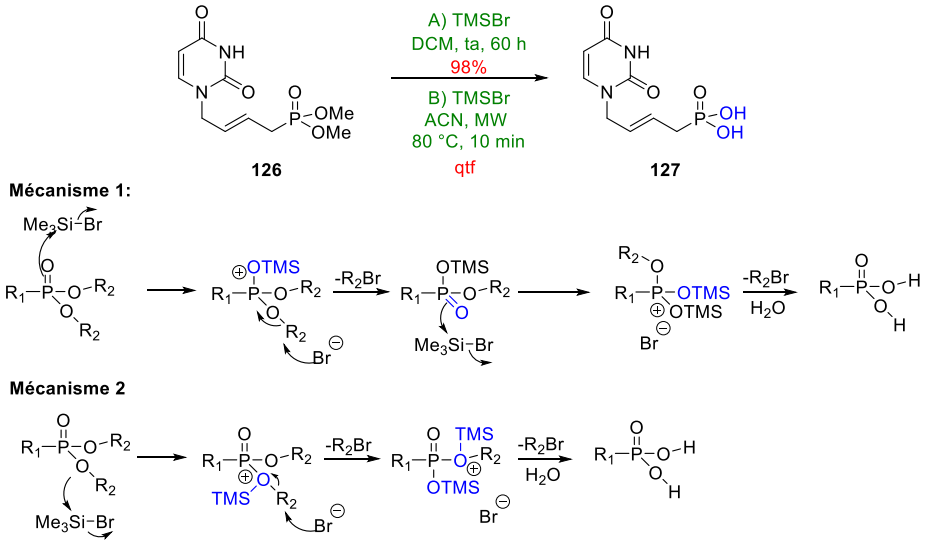
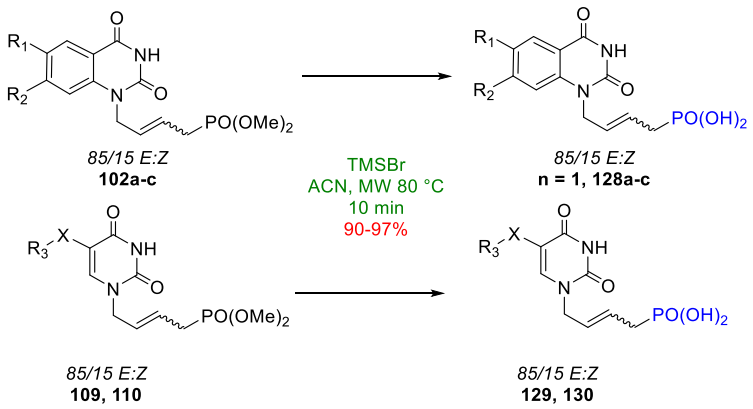


Schéma 39 *: Méthodes pour déprotéger les diesters phosphonates en acides phosphoniques*

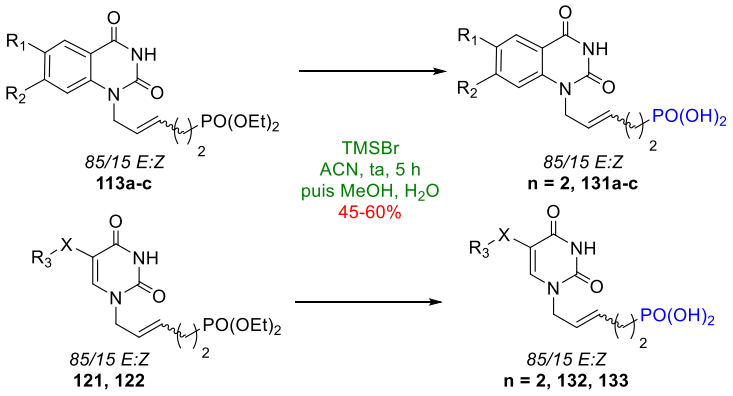
Deux mécanismes sont proposés dans la littérature,[129] et diffèrent par l'oxygène responsable de la substitution du TMSBr. A la fin de la réaction le milieu est hydrolysé avec du MeOH, le TMSBr est coévaporé au MeOH (afin d'éliminer le TMSBr), par ajout d'eau ultrapure les acides phosphoniques attendus sont formés après extraction de la phase aqueuse au DCM et lyophilisation. Les conditions micro-ondes ont été appliquées sur les produits *trans*-butényles **102a-c**, **109**, **110** (Tableau 20). Les produits *trans*-pentényles **113a,c**, **121**, **122** plus sensibles, ont été déprotégés à température ambiante dans l'ACN (Tableau 20).



Entrées	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	H	H	128a	95%
2	Me	H	128b	97%
3	H	OMe	128c	94%
	X	R_3	Produits finaux	Rendements
4	NH	Ph	129	91%
5	CH_2	Ph	130	90%

Tableau 20 *: Résultats des déprotections des chaînes trans-butényle.*

Les produits *trans*-pentényles **113a,c**, **121**, **122** plus sensibles, ont été déprotégés à température ambiante dans l'ACN (Tableau 21).



Entrées	R_1	R_2	Produits finaux	Rendements
1	H	H	131a	60%
2	H	OMe	131c	45%
	X	R_3	Produits finaux	Rendements
3	NH	Ph	132	X
4	CH_2	Ph	133	55%

Tableau 21 *: Résultats des déprotections des chaînes trans-pentényle.*

Seul le composé **132** n'a pas pu être isolé, le problème vient de la stabilité de la chaîne *trans*-pentényles conduisant à sa dégradation dans les conditions utilisées. Le composé **129** a été isolé et analysé en HRMS, le problème vient de sa stabilité dans le DMSO (lors de l'analyse RMN se traduisant par coloration rouge dans le tube et conduisant à un spectre RMN non analysable. Ce phénomène de dégradation peut s'expliquer par la formation d'un sel de HBr qui en présence de DMSO se dégrade en un mélange complexe de produits. Nous n'avons pu analyser ce mélange et déterminer sa constitution afin d'identifier les produits de dégradations.

Les pertes de rendement sur les trois autres composés peuvent s'expliquer de la même manière. Les autres produits ont été isolés avec de bons rendements (Figure 40).

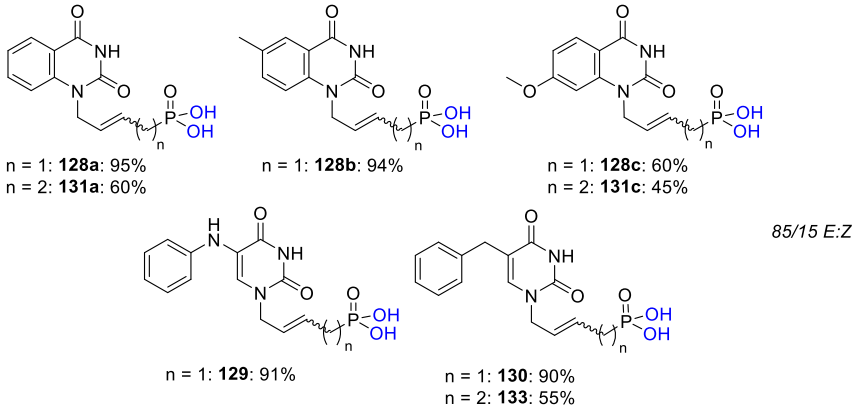


Figure 40 *: Produits déprotégés via du TMSBr*

Les sept composés finaux synthétisés et le composés **131b** (mélange de deux isomères 4C/5C), ainsi que le composé **129** instable durant les analyses ont été testés sur l'enzyme *ThyX Mtb* au sein du laboratoire d'optique biomoléculaire (LOB) de l'Ecole Polytechnique de Palaiseau, Paris.

1.6.2. Données biologiques

L'ensemble de ces molécules obtenues a été testées sur la première étape de la biosynthèse (NADPH oxidase assay) du cycle de la *FDTS*. Ce test consiste à étudier grâce à l'UV à 340 nm, l'évolution de la courbe d'oxydation du NADPH par le FAD au cours du temps en présence d'inhibiteur de référence et de molécules potentielles. Nous avons alors déterminé les vitesses initiales de chacune des courbes, et à partir de v_i calculé les pourcentages d'inhibition (Schéma 40).

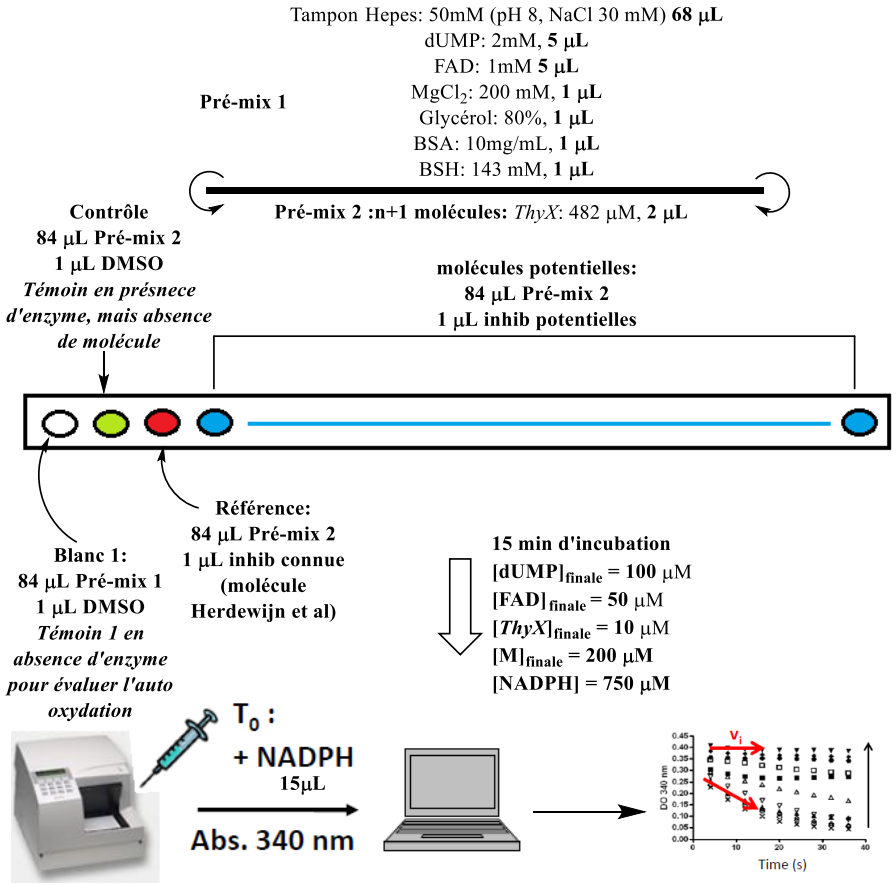


Schéma 40 *: Mode opératoire du NADPH oxidase assay.*

Le rôle de chaque réactif dans ce test est défini comme suit :

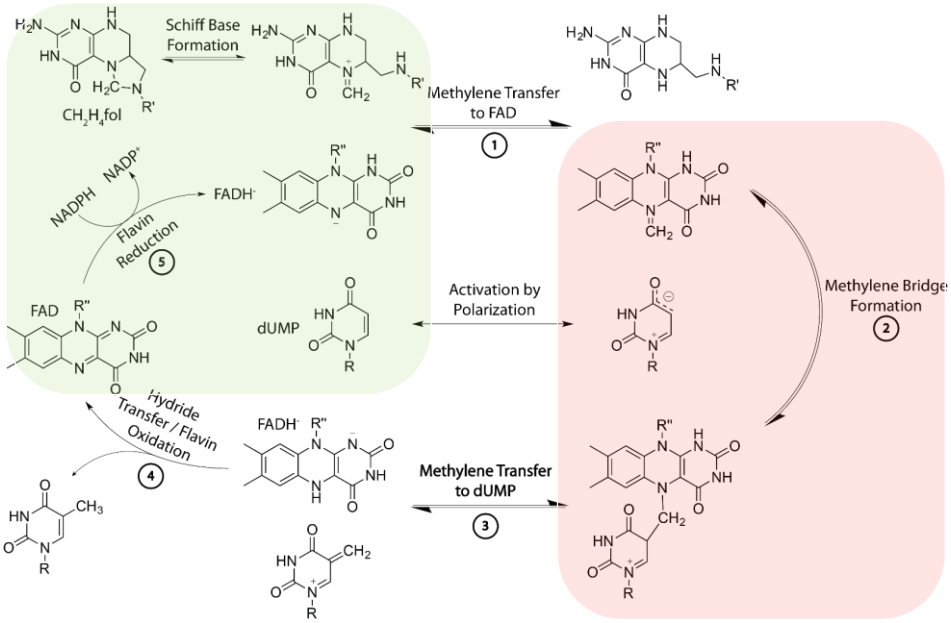
- Le tampon Hepes : sert à être dans les conditions de stabilité et d'activité maximale de l'enzyme ThyX, avec un pH supérieur au pH_i de *ThyX*.
- $MgCl_2$: sert à stabiliser l'enzyme en formant des chélations.
- FAD : toujours ajouté en excès afin de favoriser la fixation d'une molécule de FAD dans chaque site de l'enzyme. Après purification de *Mtb ThyX*, en moyenne sur 4 sites actifs de l'enzyme (tétramérique), seulement 1.1 à 1.5 contiennent du FAD.
- Glycérol : Stabilise la protéine et évite les agrégats.
- BSA : albumine de sérum bovin, va être utilisé pour maximiser les interactions des molécules avec l'enzyme en cassant les interactions non désirées avec d'autres protéines.
- BSH : β-mercaptoéthanol, permet de réduire les ponts disulfures non naturels.

L'activité inhibitrice de nos molécules se calcule grâce aux courbes de décroissances UV obtenues en fin d'expérience et à la formule suivante :

$$\%_{inhibition} = \frac{v_0 - v_i}{v_0} \times 100$$

Regréssion linéaire de la courbe obtenue sur M

Regréssion linéaire de la courbe obtenue sur avec enzyme sans molécule



La présence de substituants sur l'aromatique semble augmenter légèrement l'inhibition de l'enzyme (**128b,c**). Les dérivés d'uraciles substitués en C^5 (**129, 130**) montrent aussi une inhibition comparable aux bicycles substitués (Figure 41).

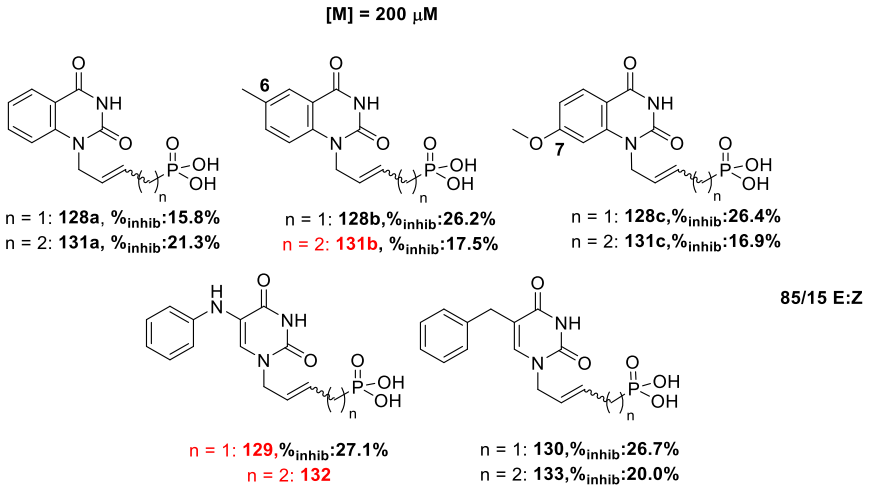


Figure 41 *: Inhibiteurs faibles de l'enzyme.*

La concentration en molécule (200 µM) par rapport à l'enzyme (10 µM) peut conduire à une non spécificité du site de fixation. Pour nous assurer que nos molécules allaient bien dans ce dernier, nous avons répété les essais et contrôler la marge d'erreur sur une dizaine de molécules présentant de

bonnes inhibitions. Cette dernière étant faible avec une erreur allant de 1 à 5%. Nous pouvons en conclure que se sont bien des inhibiteurs de la *FDTS*. De par leurs faibles inhibitions à forte concentration, il est difficile d'effectuer une étude sur l'influence de la chaîne acyclique. Ces derniers ne peuvent pas être considérés comme de forts inhibiteurs de la *FDTS*. Cependant la substitution de l'aromatique montrant une légère augmentation de l'inhibition, nous avons donc décidé d'insérer sur les positions C^6 et C^7 de l'aromatique de longues chaînes carbonées.

1.7. Diversification moléculaire *via* couplage organopalladé

1.7.1. Choix des chaînes aliphatiques

Johar et al.[74] ont montré l'importance de longues chaînes aliphatiques sur la position C^5 de l'arabinouridine afin d'inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (Figure 42). Le meilleur composé avec une longueur de chaîne à 10 carbones **134c** avec 100% d'inhibition en MIC à 10 µg/ml. Il suppose que ce type de dérivé pourrait agir sur la synthèse d'ADN et d'ARN.

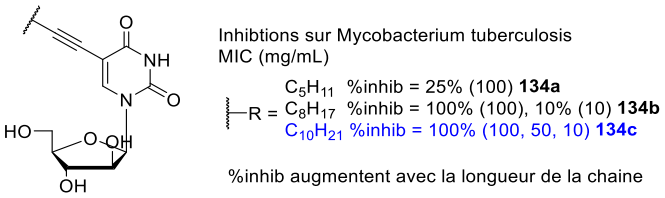


***Figure 42** : Chaînes inhibitrice de Mtb.*

Plus récemment, *Herdewijn et al.* ont publié divers analogues du dUMP substitués en C^5 par une chaîne alkyle à 13 carbones et leurs implications dans le mécanisme de la FDTS (biologie et modélisation) (Figure 43).[131]

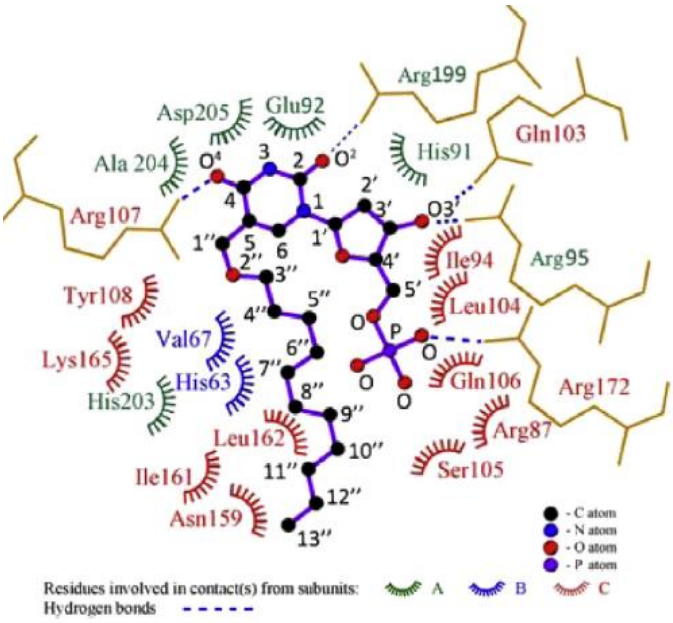


***Figure 43 :** Représentation 2D des interactions dans le site actif de longues chaînes aliphatiques[58].*

[131] Alexandrova, L. A.; Chekhov, V. O.; Shmalenyuk, E .R.; Kochetkov, S. N.; El-Asrar, R. A.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of C-5 modified 20-deoxyuridinemonophosphates as inhibitors of M. tuberculosis thymidylate synthase, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 7131–7137.

Ces longues chaînes alkyles peuvent combler la poche du site actif et ainsi bloquer les différentes interactions que pourraient produire les substrats naturels. Divers composés présentant des inhibitions intéressantes à 50 µM ont alors été identifiés[71] (Figure 44).

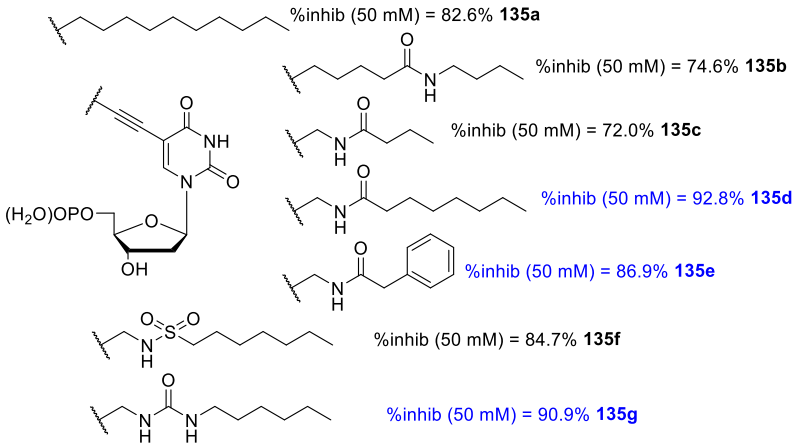


Figure 44 *: Développement des chaînes aliphatiques.*

Cette étude a montré l'importance d'avoir un motif amide donneur de liaisons hydrogène **135a** dans le site actif, puisque sa proximité avec la base canonique était essentielle dans l'inhibition avec les chaînes **135b**,**c**. La longueur de la chaîne a été optimisée (**135c,d**) et l'importance du π-stacking avec la chaîne **135e** démontrée.

Sur la base des résultats biologiques obtenus, nous avons alors décidé d'insérer différentes chaînes aliphatiques sur nos aromatiques. Nous avons effectué en collaboration avec le Dr. Jean-Christophe Lambry du LOB une modélisation prédictive d'un de ces composés C^7 substitué, de façon à observer sa position et ses interactions dans le site actif de l'enzyme *ThyX Mtb* (Figure 45).

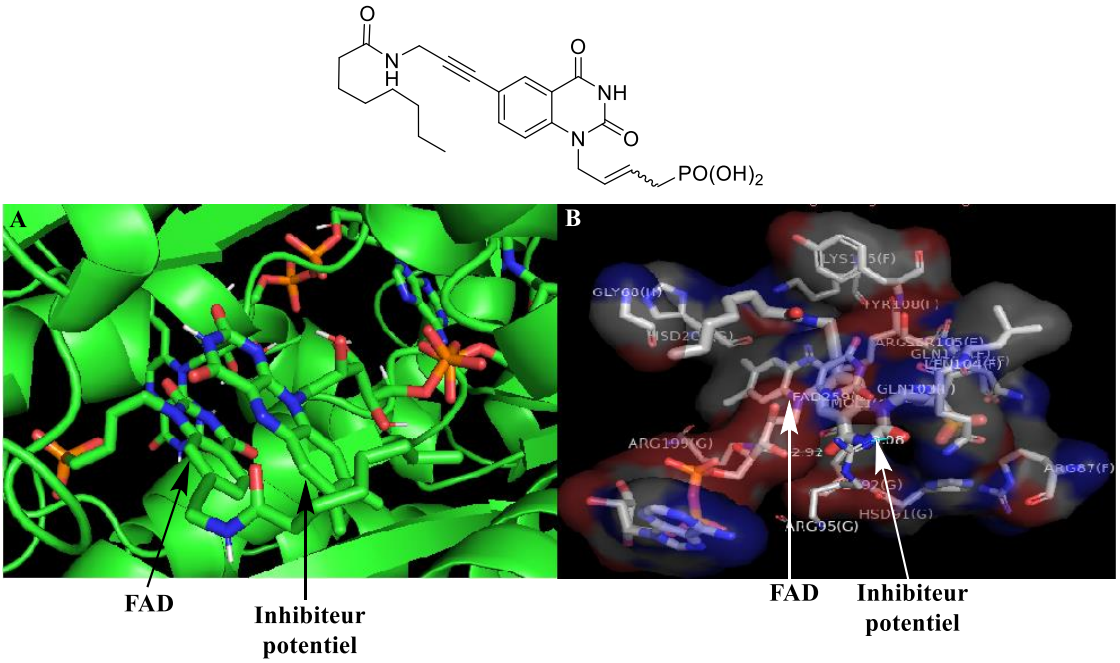


Figure 45 *: A : Modélisation dans le site actif. B : interactions avec les acides aminés résiduelles.*

Notre composé potentiel se place parallèlement au FAD grâce à des interactions de type π-stacking, de plus la chaîne aliphatique semble passer au-dessus du FAD. Cette conformation pourrait gêner l'approche des différents substrats de la position N^{10}. Il se forme également des interactions avec des acides aminés résiduels impliqués dans la stabilisation des substrats naturels dans la poche, comme par exemple (Figure 46) :

- Arg 199 : liaisons hydrogène avec les positions N^3- et O^2- du dUMP.
- Arg 95 : liaisons hydrogène avec les positions $O^{3'}$- du dUMP, mais aussi O^2- du FAD.

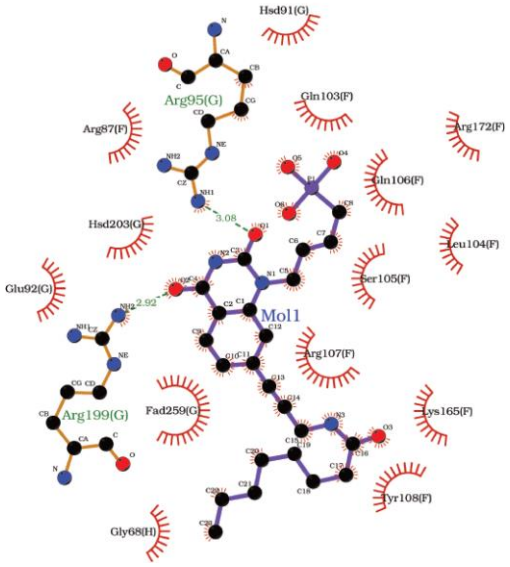


Figure 46 *: Représentation 2D des interactions.*

Afin de confirmer ou non les données apportées par la modélisation moléculaire nous avons décidé de développer une série de 3 substitutions sur ces deux positions et d'étudier l'activité en fonction de la position et du type de chaîne.

1.7.2. Rétrosynthèse envisagée

Sur la base de l'Etat de l'Art nous avons donc sélectionné 2 chaînes aliphatiques et une chaîne benzylique que nous avons introduit en position C^6 et C^7 de nos composés. Les dérivés phosphoniques **A** ont été obtenus à partir d'une déprotection des diesters phosphonates à la suite des couplages de Sonogashira sur les produits bromés en position C^6 et C^7 de métathèse croisée N^3-déprotégés **B** provenant des produits N^1-alkylés et N^3-protégé **C** (Schéma 41).

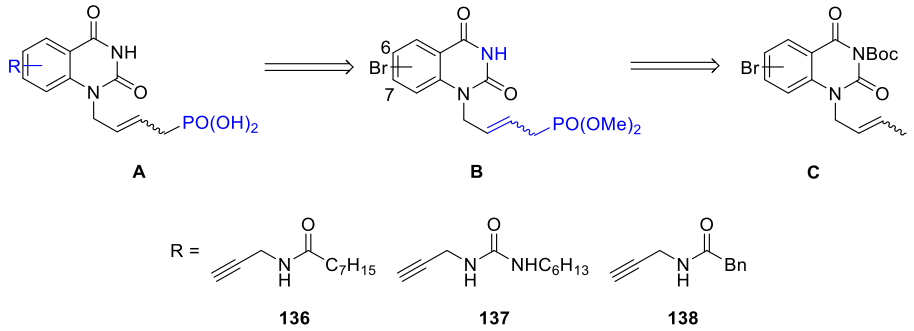


Schéma 41 *: Rétrosynthèse envisagée.*

Les premières étapes sont communes à celles mises en place précédemment (étape de protection N^3, métathèse croisée, déprotection). Le couplage de Sonogashira a été réalisé avec la position N^3 libre et la déprotection du diesters phosphonate dans les conditions décrites précédemment en présence de TMSBr. Le choix s'est porté sur ces trois chaînes : **136** et **137** pour leurs capacités à former des liaisons hydrogène sur leurs parties amides et urée, mais aussi des interactions hydrophobes avec leurs longues chaînes aliphatiques, et **138** afin de comparer la différence entre des interactions hydrophobes et de types π-stacking dans le site actif de l'enzyme, tout en conservant la partie amide. La triple liaison permettra de diriger la longue chaîne afin de combler au maximum le site actif.

1.7.3. Résultats et discussions

Les différentes chaînes utilisées lors du couplage de Sonogashira ont été préparées respectivement à partir de la propargyle amine **139** et de deux dérivés de chlorures d'acyles en présence de DIPEA dans le DCM et un dérivé d'isocyanate dans le DCM (Schéma 42) avec des rendements allant de 93% à quantitatif.

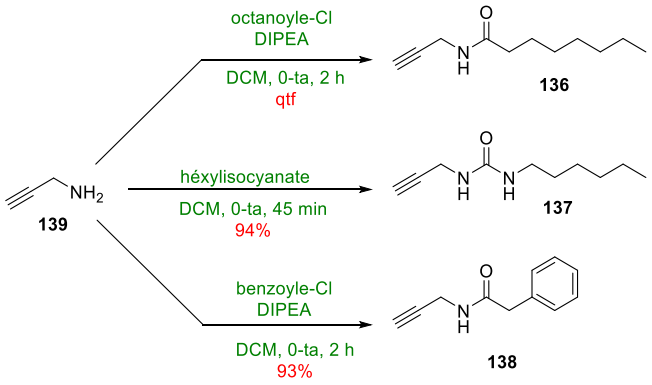


Schéma 42 : *Préparation des différentes chaînes.*

La réaction de Sonogashira[132] permet le couplage d'un halogénure d'aryle et d'un alcyne terminal. Cette réaction présente une littérature très abondante et peut être catalysée avec ou sans addition de Cuivre(I) (Cu(I)) (Schéma 43).[133]

[132] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.,et al., A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 4467–4470.
[133] Chinchilla, R.; Nàjera, C., Recent advances in Sonogashira reactions, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5084–5121.

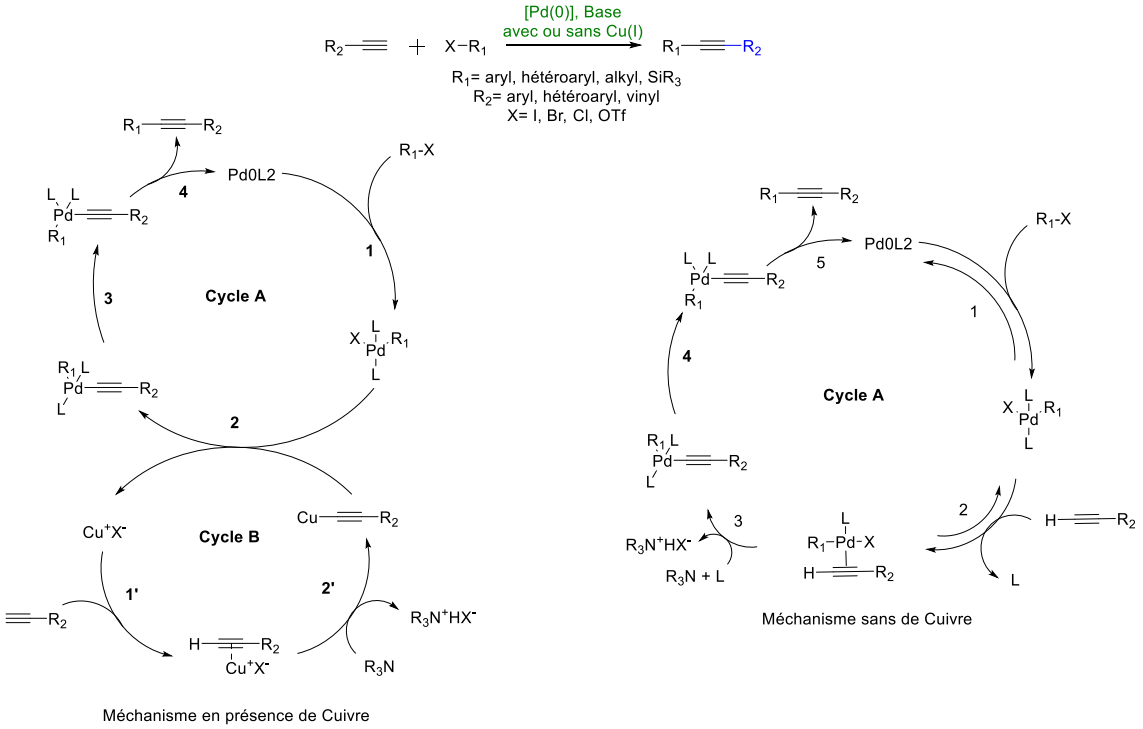


Schéma 43 : Mécanismes proposés pour le couplage de Sonogashira.[133]

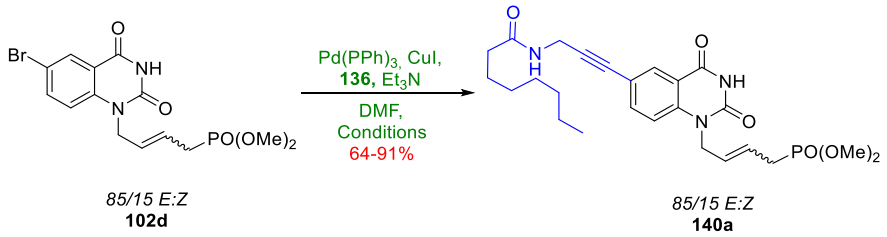
- <u>Le mécanisme en présence de Cu(I):</u> n'est pas encore totalement élucidé à cause de la compréhension exacte du rôle combiné des deux métaux ; la réaction est considérée être une réaction de couplage tandem palladium/cuivre.[134] L'étape **1** du cycle A correspond à l'addition oxydante du dérivé halogéné sur le palladium, plus l'halogène est électronégatif, plus cette étape sera difficile. L'étape suivante **2** est une transmétalation avec le Cu ligand. Les deux dernières (**3** et **4)** étapes étant une isomérisation *cis/trans* suivie par une élimination réductrice formant le produit de couplage et régénérant le catalyseur. Dans le cycle B, il est couramment admis que la base va aider à la formation du cuivre couplé avec un ligand du catalyseur au palladium (acétyle, phosphine…) en passant par un complexe π-alcyne rendant le proton terminal plus acide et donc permettant la substitution du cuivre.
- <u>Le mécanisme sans Cu(I) :</u> commence de la même manière que celui avec, par une étape d'addition oxydante. L'étape **2** est une étape réversible comme la première conduisant à la formation d'un complexe palladium-alcyne à travers une coordination π. Le proton acide facilitant son élimination par une base permettant la coordination de l'alcyne avec le métal. Les deux dernières étapes étant identiques au premier mécanisme.

On peut trouver dans la littérature de nombreux articles traitant des couplages organopalladés et plus particulièrement de Sonogashira sur des pyrimidines ou purines.[135] Il est possible de réaliser ces couplages sur des molécules polaires (nucléosides, nucléotides, ANPs…)[136,137] *via* l'utilisation d'un catalyseur (TPPTS) soluble dans l'eau.[138]

[134] Beaupérinn, M.; Job, A.; Cattey, H.; Royer, S.; Meunier, P.; Hierso, J-C., Copper(I) iodide polyphosphine adducts at low loading for Sonogashira alkynylation of demanding halide substrates: Ligand exchange study between copper and palladium, *Organometallics*, **2010**, *29*, 2815-2822.
[135] Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Sait, Y., Palladium-assisted routes to nucleosides, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875−1916.
[136] Kore, A. R.; Charles, I., Recent developments in the synthesis and applications of C5-substituted pyrimidine nucleosides and nucleotides, *Curr. Org. Chem.*, **2012**, *16*, 1996-2013.

- Voie des ANPs diesters phosphonate *bis*(OMe):

Les conditions de couplage sur les bicycles ont été mises au point sur **102d** en présence de la chaîne **136** (3 éq.) et d'iodure de cuivre (CuI) (20%) dans le DMF en utilisant comme base la triéthylamine (Et_3N) (3 éq.) et comme catalyseur le palladium tétrakis(triphénylphosphine) $Pd(PPh_3)_4$ (10%) (Tableau 22).



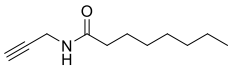
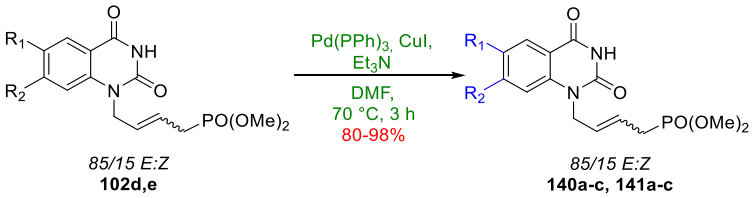
Entrées	Chaînes alcynes	Conditions	Rendements
1		25 °C, 24 h	15% + dégradation
2		Δ, 50 °C, 6 h	64%
3		Δ, 70 °C, 3 h	91%

***Tableau 22** : Optimisation du couplage de Sonogashira.*

Le premier essai a permis d'isoler **140a** avec un rendement de 15%, la conversion n'étant pas totale et présentant de la dégradation dans le temps ; nous avons alors (Entrée 2) décidé de chauffer la réaction à 50 °C afin de fournir plus d'énergie et ainsi augmenter la conversion du produit de départ. Nous avons pu réduire le temps de réaction par quatre et augmenter le rendement à 64%. A 70 °C pendant trois heures, le rendement passe à 91%. Ces conditions ont été alors appliquées à l'ensemble des chaînes **136**, **137** et **138** sur les deux positions souhaitées **102d** et **102e** (Tableau 23).



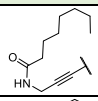
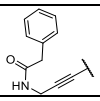
Entrées	R_1	R_2	Chaînes	Produits d'arrivés	Rendements
1	Br	H		**140a**	91%
2	H	Br		**141a**	96%
3	Br	H		**140b**	98%
4	H	Br		**141b**	80%
5	Br	H		**140c**	X
6	H	Br		**141c**	81%

***Tableau 23** : Résultats des couplages de Sonogashira sur les positions 6 et 7.*

[137] Dana Hockovà, D.; masojìdokovà, M.; Holý, A., Sonogashira cross coupling in the synthesis of cyclonucleoside phosphonates: Preparation of 6-[(phosphonomethoxy)alkynyl]- and 6-[(phosphonomethoxy)alkyl]pyrimidine, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2005**, *70*, 247-259.
[138] Hervé, G.; Len, C., Heck and Sonogashira couplings in agueous media-application to unprotected nucleosides and nucleotides, *Sustain. Chem. Process.*, **2015**, *3*.

Sur l'ensemble des six composés, seul **140c** n'a pas pu être isolé pur. Il a été impossible de séparer les traces de phosphines et d'impuretés qu'il contenait. Les autres composés ont été isolés avec des rendements allant de 80 à 98% (Figure 47).

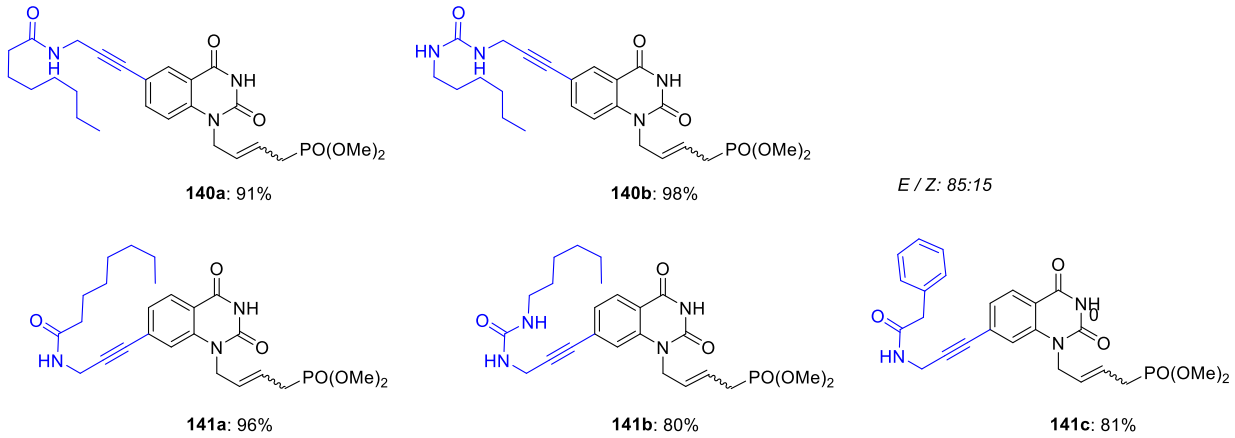
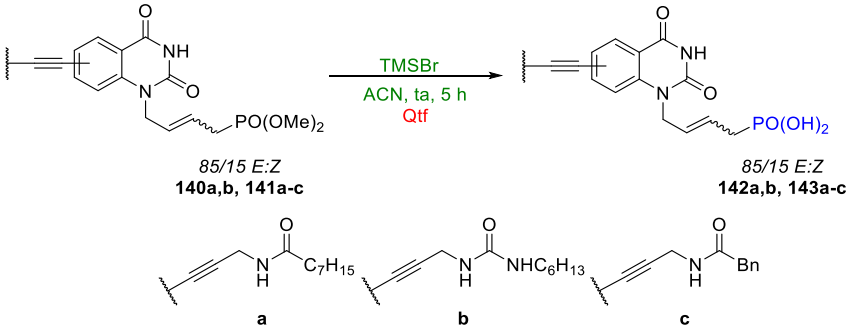


Figure 47 *; Produits couplés via Sonogashira.*

Les déprotections des groupements diesters phosphonate ont été effectuées dans les conditions précédemment décrites (TMSBr, ACN, ta). L'absence d'eau dans le milieu est obligatoire afin d'éviter toute addition sur la triple liaison *via* une hydrobromation (HBr) conduisant à l'addition de deux bromes sur le carbone le plus substitué (Règle de Markovnikov). Il peut aussi se produire une hydroxylation avec l'eau, en milieu acide conduisant à la formation d'une cétone (Tableau 24).



	Entrées	Produits de départs	Produits d'arrivés	Rendements
C^6	1	**140a**	**142a**	Mélange complexe
	2	**140b**	**142b**	Mélange complexe
C^7	3	**141a**	**143a**	Qtf
	4	**141b**	**143b**	Qtf
	5	**141c**	**143c**	Qtf

Tableau 24 *: Résultats de la déprotection via TMSBr.*

Dans le cas des produits possédant les chaînes en position C^7, ils ont tous été déprotégés de manières quantitatives. Pour les composés C^6 substitués, la chaîne se dégrade lors de la déprotection. On récupère à la fin un mélange complexe de produits non séparables analysés en masse (Figure 48).

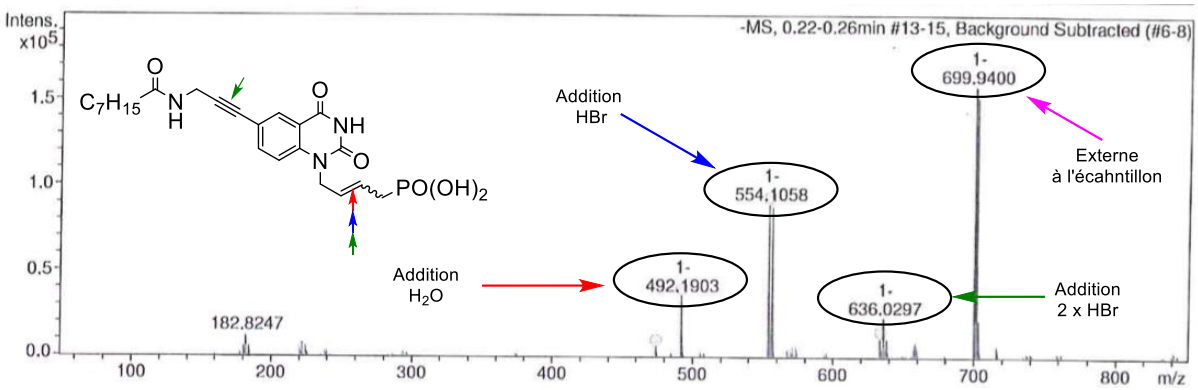


Figure 48 *: Exemple d'analyse HRMS obtenu après déprotection.*

Les hypothèses qui peuvent être formulées pour les différents massifs ne tiennent pas compte de la régiosélectivité des différents groupements. Le *m/z* attendu est de 475 sur ce composé :

- *m/z* =493 ; [M+18] addition d'une molécule d'eau, possiblement sur l'alcène qui est plus réactif que l'alcyne.
- *m/z* =554 ; [M+79] addition d'une molécule de HBr (présence d'un doublet avec le double M M+2) .
- *m/z* =636 ; [M+158] addition de deux molécules de HBr, soit une sur la double et une sur la triple, soit les deux sur la triple liaison.

Nous avons alors décidé de changer les groupements diesters phosphonate afin de pouvoir réaliser une déprotection en milieu basique et éviter alors la formation d'éventuels produits secondaires.

- Voie des bis(POC) diesters phosphonate :

Le groupement POC (carbonyloxymethyl) a été choisi car il peut être déprotégé en présence d'une base minérale très facilement (Schéma 44).

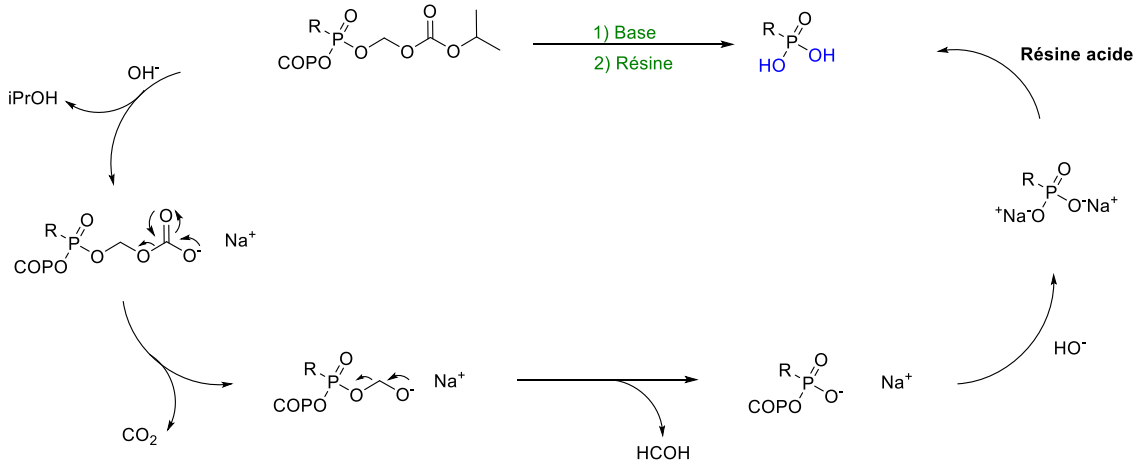


Schéma 44 *: Déprotection du groupement POC.*

La première étape de ce mécanisme est une saponification avec libération d'*iso*propanol. Dans un second temps la molécule subit une décarboxylation suivie d'une dégradation chimique. Ce mécanisme se reproduit sur la deuxième fonction OPOC puis par l'addition d'une résine échangeuse

d'ion, le pH est ramené aux alentours de 6. Les produits souhaités sont ainsi obtenus sous forme d'acides phosphoniques.

L'allyle phosphonate *bis*(POC) **144** a été synthétisé à partir du diméthyle phosphonate **98a** en présence de NaI_{act} et du chlorométhyle *iso*propyle carbonate (POCCl) à reflux avec 58% de rendement. Une réaction de métathèse croisée entre **144** et de la 6-bromoquinazolindione-N^1-crotylé-N^3-protégé **102d** a permis d'obtenir le produit **145** non isolé. Après déprotection du groupement protecteur Boc en présence de TFA, le produit **146** a été isolé avec 44% de rendement sur deux étapes (Schéma 45).

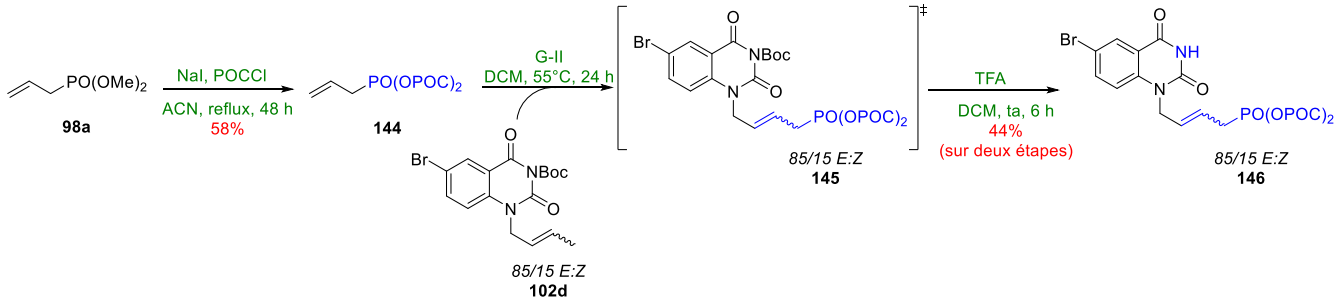
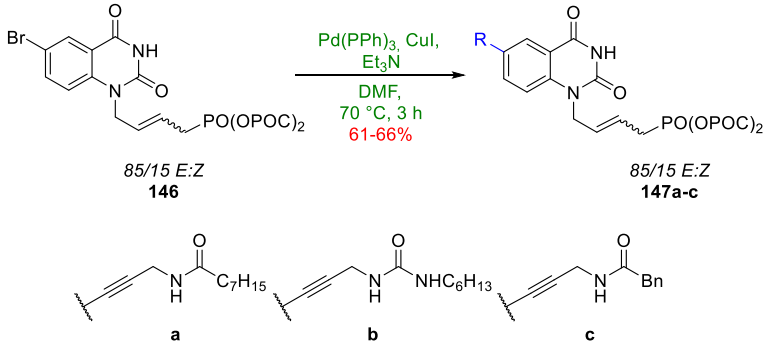


Schéma 45 : *Synthèse du précurseur **146** pour les couplages de Sonogashira.*

Il a par la suite été engagé dans des réactions dans des conditions de couplage de Sonogashira, avec différentes chaînes alcynes, dans les conditions développées précédemment (Tableau 25).



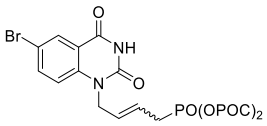
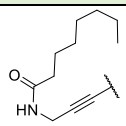
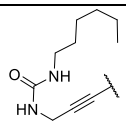
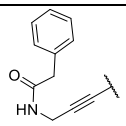
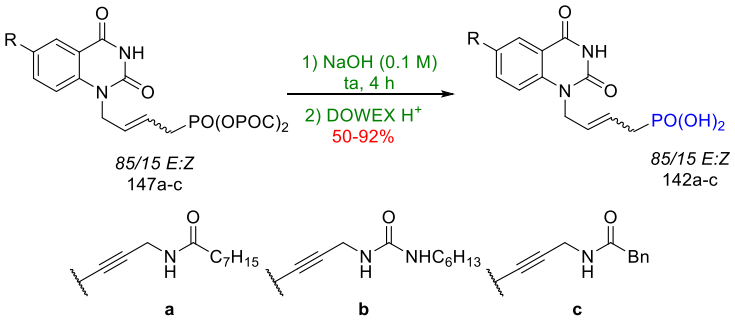
Entrées	Produit de départ	Chaînes	Produits d'arrivés	Rendements
1			**147a**	61%
2			**147b**	65%
3			**147c**	66%

Tableau 25 *: Résultats de couplage des chaînes avec le produit bis(POC) via Sonogashira.*

Les différents produits **147a-c** ont été isolés avec des rendements allant de 61% à 66%. Leurs fonctions POC ont alors été déprotégées en milieu basique, les dérivés phoshoniques sont obtenus

après passage sur résine DOWEX H^+ (afin d'avoir les acides phosphoniques sous forme OH) (Tableau 26).



Entrées	R	Produits d'arrivés	Rendements
1	**147a**	**142a**	86%
2	**147b**	**142b**	50%
3	**147c**	**142c**	92%

Tableau 26 : *Résultats de déprotection des fonctions POC.*

En présence de ces chaînes aliphatiques les composés **142a-c** possèdent en phase aqueuse un comportement de tensioactifs (tête polaire : acide phosphonique et longue queue apolaire). Ils augmentent la viscosité du milieu et se révèlent donc difficiles à filtrer sur fritté. L'ensemble des composés sous forme acide ont été testés sur *Mtb ThyX* (Figure 49).

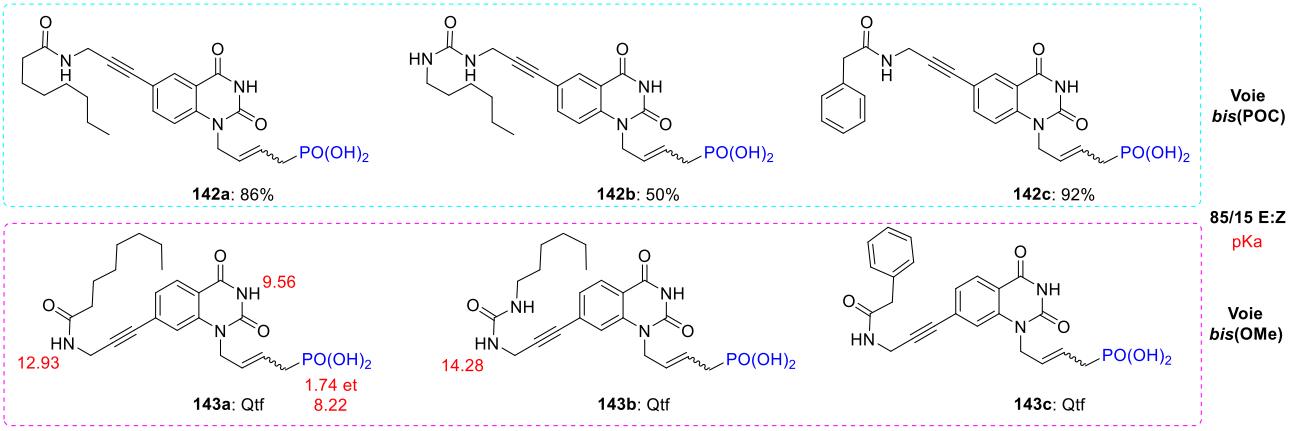


Figure 49 *: Dérivés Phosphoniques obtenus via les deux méthodes.*

1.8. Données biologiques

Ces molécules ont été testées sur la première étape de la biosynthèse (NADPH oxidase assay) du transfert de méthyle catalysé par la *FDTS*. Une de ces molécules a été testée par la suite sans FAD afin d'étudier l'influence du FAD sur l'inhibition du composé et sur la seconde partie du mécanisme en présence de dUMP tritié en C^5 avec le relargage du tritium afin d'étudier sa capacité inhibitrice dans le transfert de méthyle (Figure 50).

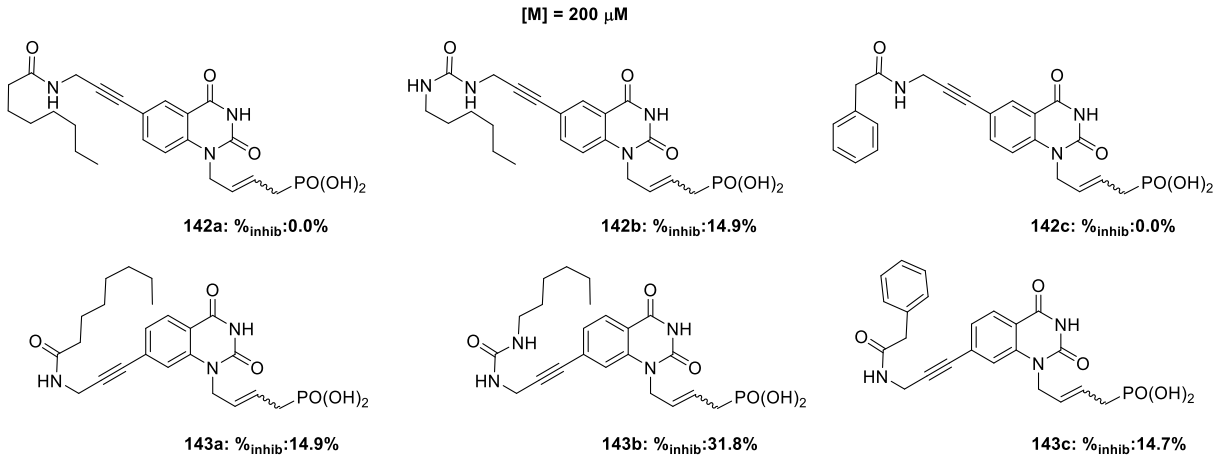


Figure 50 *: Inhibitions obtenues sur les dérivés couplés.*

On remarque cependant que la position de la chaîne a une influence sur les inhibitions : la position C^7 **143a-c** présentant de meilleure inhibition que la C^6 **142a-c**. La chaîne elle-même présente une influence sur le % d'inhibition : la présence de la fonction urée sur la seconde permet d'augmenter les interactions hydrogène mais aussi de donner un autre angle au reste de la structure.

L'ajout de FAD est nécessaire afin de s'assurer que l'ensemble des sites actifs de l'enzyme en possède (entre 1.1-1.5 en possède après purification de l'enzyme), mais un trop large excès peut conduire à problème de fixation dans le site actif et ainsi créer une compétition avec nos potentiels inhibiteurs (Figure 51).

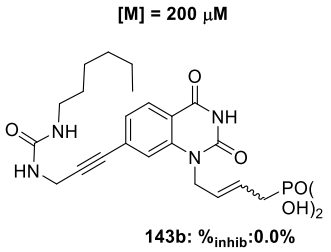


Figure 51 *: Inhibitions sans ajout de FAD.*

Si notre molécule était en concurrence avec le FAD la diminution de la concentration de ce dernier devrait permettre d'augmenter significativement l'inhibition. Or dans ce cas l'inhibition disparait complétement. Deux hypothèses peuvent être faites ; comme l'inhibition est faible à haute concentration en inhibiteur, le fait d'avoir une faible concentration en FAD dans l'enzyme augmente la difficulté de notre inhibiteur à se fixer dans le bon site actif. La deuxième hypothèse est que la molécule a besoin de la présence du FAD afin de créer des interactions hydrogène ou π-stacking afin de se stabiliser.

Le dernier test réalisé sur cette molécule porte sur la seconde partie du mécanisme en utilisant le test au tritium[65]. L'inhibition d'une molécule se calcule en fonction de la quantité de tritium libérée dans l'eau à chaque transfert de méthylène sur une molécule de dUMP par un détecteur de scintillation. Plus la concentration de tritium est importante dans le milieu, moins notre molécule inhibe cette partie du mécanisme de l'enzyme (Figure 52).

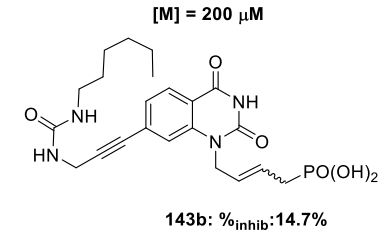


Figure 52 *: Inhibition sur la deuxième partie du mécanisme via le tritium release assay.*

Les résultats montrent une faible inhibition de notre molécule au niveau de la 2nd partie du mécanisme. On peut en déduire que ce composé à une plus grande capacité à empêcher la réduction du FAD que le transfert de méthylène.

1.9. Conclusion 1 et perspectives

Durant cette première partie nous avons synthétisé deux nouvelles séries d'ANPs, possédant des quinazolinediones substituées en C^6 et C^7. (Figure 53).

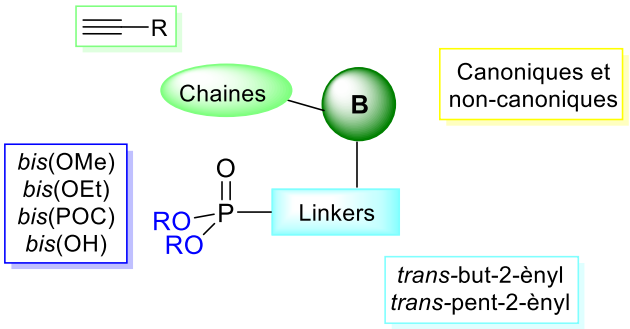


Figure 53 *; Modifications réalisées sur les ANPs.*

Afin de réaliser les diverses modifications, nous avons mis en place une synthèse convergente reposant sur trois étapes clés (Schéma 46) :

- une alkylation régiosélective : cette étape régiosélective nous a permis d'accéder rapidement au précurseur de métathèse N^1-alkylé par une chaîne *trans*-butényle.
- une réaction de métathèse croisée : avec une chaîne *trans*-butényle (*bis*(OMe), *bis*(POC) et pentényle (*bis*(OMe), *bis*(OEt)) phosphonate. Permettant l'accès à une large gamme d'ANPs.
- un couplage de Sonogashira : nous permettant l'insertion de longue chaîne alkyle dont les activités biologiques ont été démontrées sur des souches bactriennes.

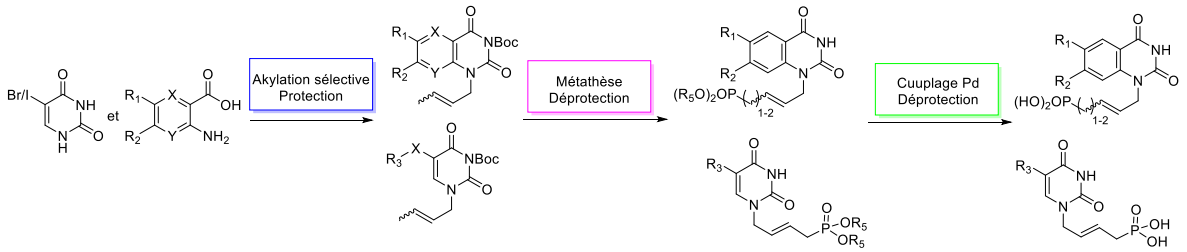


Schéma 46 *: Schéma général d'obtentions des différents dérivés d'ANPs.*

Nous avons ainsi décrit une quinzaine d'ANPs contenant une base non canonique non explorée (Figure 54) :

- Une modulation sur la chaîne diesters phosphonate.
- Sur les hétérocycles azotés ou non.
- Sur les groupements présents sur les hétérocycles.

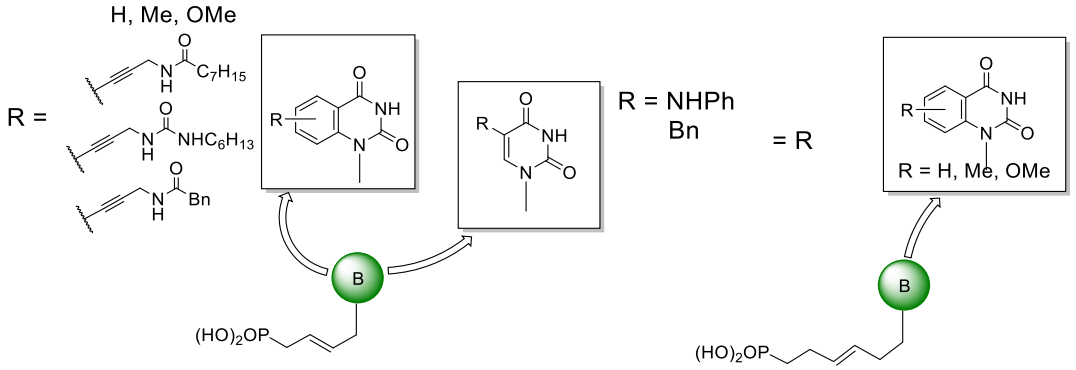


Figure 54 *: Diversification des bases sur les chaînes diesters phosphonates.*

Les résultats biologiques obtenus sur les différents ANPs ont mis en évidence une faible inhibition à de forte concentration en molécule. Les ANPs possédant une base non canonique substituée par une chaîne aliphatique ou aromatique ont permis de maintenir de légères inhibitions faisant d'eux de faibles inhibiteurs de la *FDTS.*

Au vu des différents résultats on peut être amené à se poser les questions suivantes : qu'est ce qui fait que nos différentes molécules ne présentent pas plus d'inhibition. Cela provient-il de la chaîne phosphonate qui ne crée pas les interactions nécessaires avec le site actif (absence du *3'-OH*). De la présence d'un aromatique sur la pyrimidin-2,4-dione (perte d'affinité avec le site actif dû à la différence de distance entre les atomes). (Figure 55).

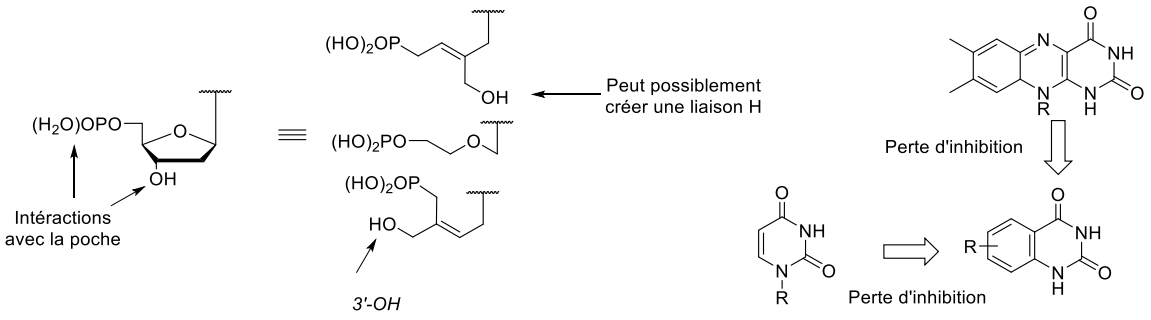


Figure 55 *: Influence de la position des groupements sur les mimes*

Afin de répondre à ces questions, nous allons synthétiser des produits développer au laboratoire pouvant être utile dans la compréhension du comportement des chaînes acycliques dans le site actif de la *FDTS*, puis une série de molécule autour du 5-iodouracile.

2. Synthèse d'ANPs mimant le dUMP

Dans cette partie, nous nous sommes d'abord intéressés à synthétiser des dérivés C^5-subsittué-N^1-*trans*-butényle phosphonate uracile afin de comprendre l'influence de chaîne acyclique et de la base hétérocyclique dans la poche de l'enzyme. Nous nous placerons ainsi dans le cas d'un mime du dUMP. Les modélisations du dUMP effectuées dans le site actif de la *FDTS* de *ThyX Mtb* nous ont permis d'obtenir les informations suivantes (Figure 56) :

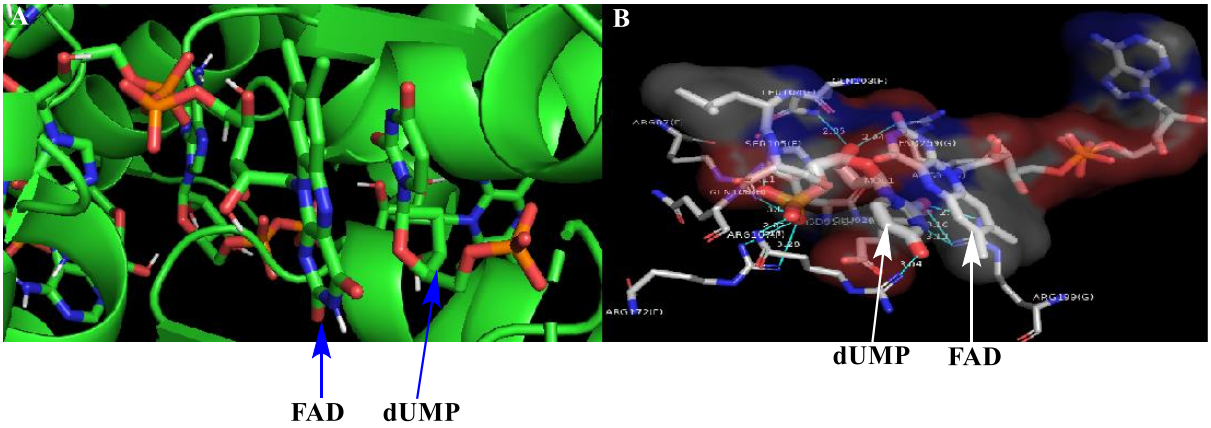


Figure 56 : A : Modélisation dans le site actif. B : Interactions avec les acides aminés résiduelles.

On remarque sur ces deux modélisations que les chaînes phosphoniques sont à l'opposées l'une de l'autres, de plus le noyau uracile se place parallèlement au noyau isoalloxazine laissant supposer des interactions de types π-stacking (Figure 57).

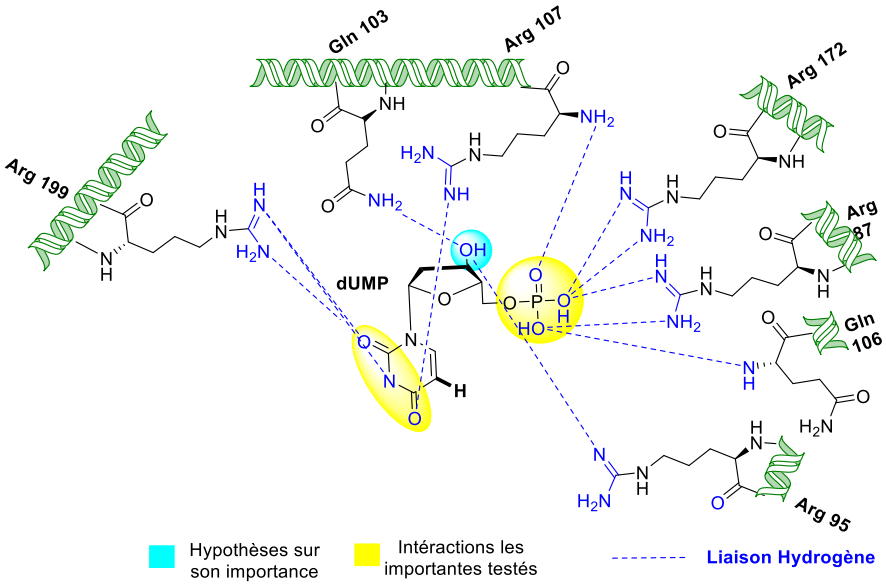


Figure 57 *: Représentation 2D des interactions.*

La partie base crée des interactions entre O^2, N^3 O^4 avec différentes Arg, Gln (interactions hydrogène), tout comme le *3'-OH* du 2'-déoxy-ribose. Le 5'-monophosphate compte le plus d'interactions et sert d'ancre dans l'enzyme. Avec ces molécules, nous pourrons mettre en évidence l'influence des interactions du *3'-OH* sur l'inhibition.

Dans cette partie, nous avons développé la synthèse de dérivés d'uracile sous forme acyclique. La position 5 sera substituée par divers atomes (H, Me, F, Cl, Br, I) mais aussi par des chaînes aliphatiques telles que décrites précédemment. Les produits C^5-H et C^5-F ont un intérêt tout particulier, le premier car sa version ribose (dUMP) en excès tant à inhiber l'activité de l'enzyme. Le second car la 5-FU et la 5-FdUMP sont des inhibiteurs connus de la *ThyA* et la *ThyX*. Les produits provenant des couplages sont les analogues acycliques de produits déjà reportés présentant des activités non négligeables sur la *ThyX*.[72]

2.1. Rétrosynthèse

Deux séries distinctes ont été synthétisées (Schéma 47) :

- La première porte sur la fonctionnalisation de l'uracile par divers groupements chimiques.
- La seconde portant sur des couplages à partir du 5-iodouracile (5-IU) sous forme *trans*-but-2-ényle phosphonate obtenu par la voie de synthèse précédemment établie.

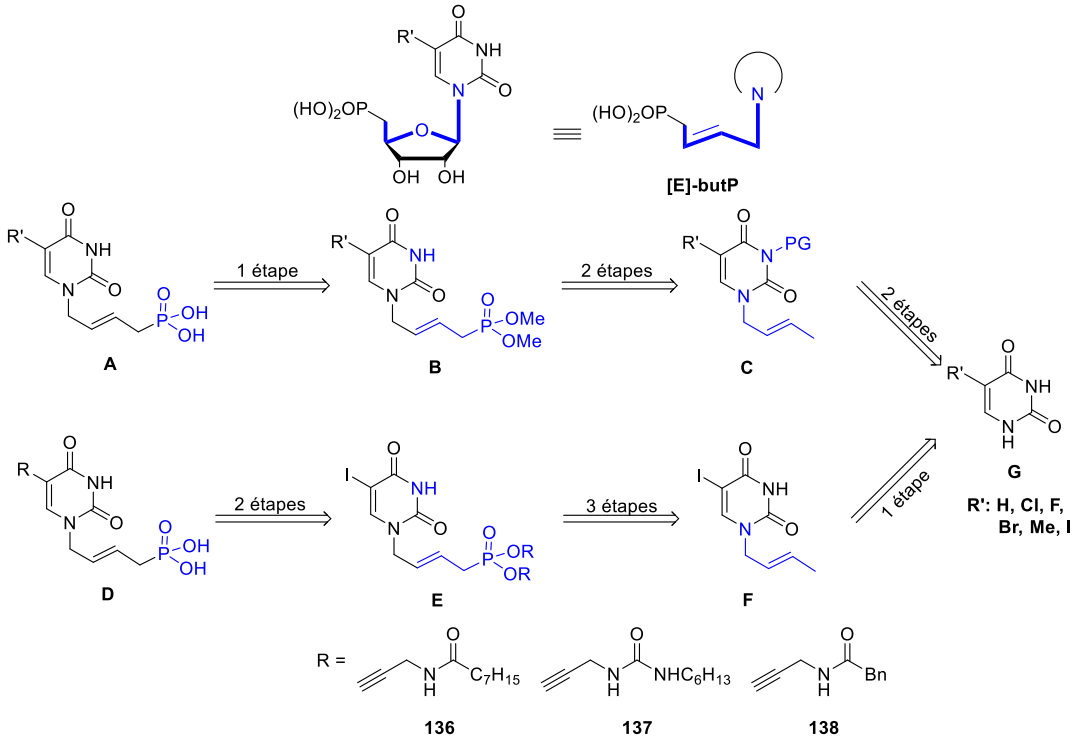


Schéma 47 *: Rétrosynthèse envisagée pour les deux familles.*

La première série a déjà été réalisée et publiée au laboratoire lors de la thèse du Dr. Ugo Pradère.[73] Elle sera donc rapidement présentée. Dans le cas de la seconde, deux voies ont été étudiées, en passant par la chaîne *bis*(OMe) phosphonate et la chaîne *bis*(POC) phosphonate. Dans le cas de ces deux voies

de synthèse, des étapes de protections (**G** à **C**), d'alkylations sélectives (**G** à **F**), de métathèses croisées (C à B et **F** à **E**) et de couplages organopalladés (couplage de **E** avec **136-138**) ont été utilisées.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. *Uracile substitués en C^5*

La synthèse de ces dérivés ANPs nous a permis d'étudier l'influence de la fonctionnalisation en position C^5 de l'uracile, mais aussi d'une substitution ribose/chaîne acyclique sur des inhibiteurs connus de notre cible thérapeutique (Schéma 48).

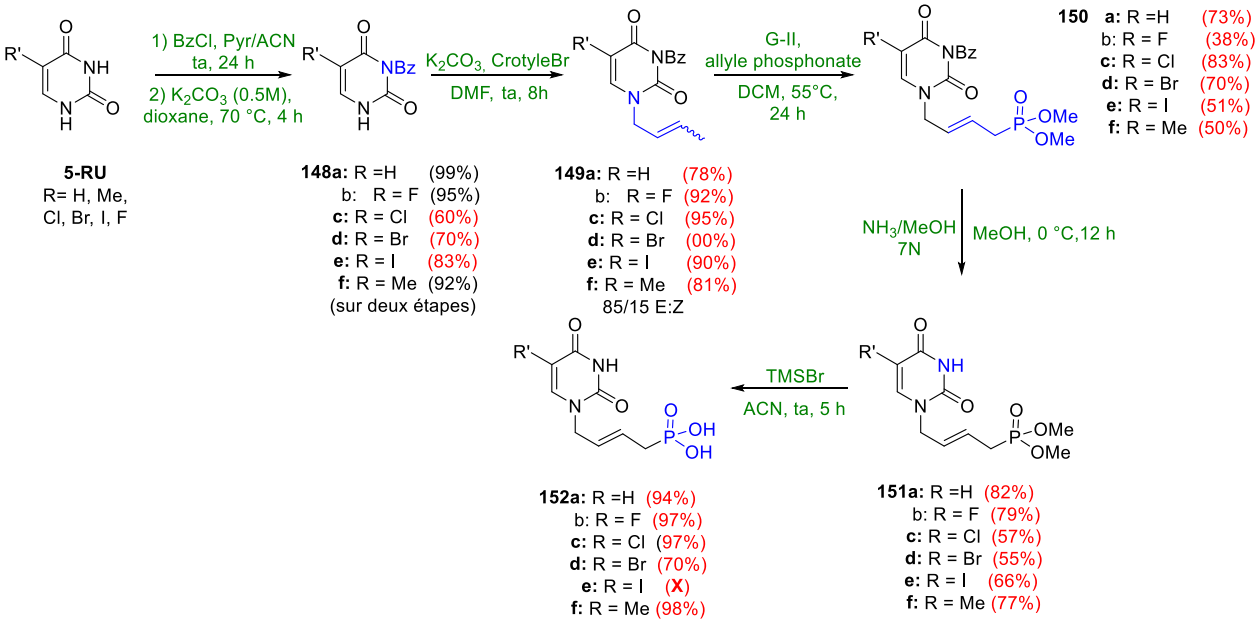


***Schéma 48** : Synthèse des dérivés C^5 substitués.*

A partir des dérivés de l'uracile substitués en C^5, il est possible de protéger sélectivement la position N^3 *via* une étape de perbenzoylation suivie d'une mono-débenzoylation sélective de la position N_1 dans le dioxane en présence de K_2CO_3, afin d'obtenir les composés **148a-f** avec des rendements allant de 70% à 99%. Le groupement crotyle a été introduit *via* une N^1-alkylation dans le DMF avec une base minérale pour conduire aux composés **149a-f** avec des rendements de 80% à 95%. Une réaction de métathèse croisée entre **149a-f** et l'allyle diméthylphosphonate dans les conditions décrites précédemment (G-II, DCM, 55 °C) a permis d'isoler les composés **150a-f** avec des rendements allant de 38% à 80% pour les isomères E. Après la déprotection dans l'ammoniac/méthanol **151a-f (**avec des rendements de 55% à 82%), puis avec du TMSBr, les produits sous formes acides **152a-d,f** ont été obtenus avec d'excellents rendements > 94%.

Le composé **152e** n'a pas pu être obtenu, ce dernier lors de la déprotection subit une déhalogénation réductive, conduisant au composé **152a**. Ce phénomène a été mentionné par *Balzarini et al.*[139] (Schéma 49).

[139] Hockova, D.; Holy, A.; Masojdkova, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J., 5-Substituted-2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidines acyclic nucleoside phosphonate analogues with antiviral activity, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5064-5073.

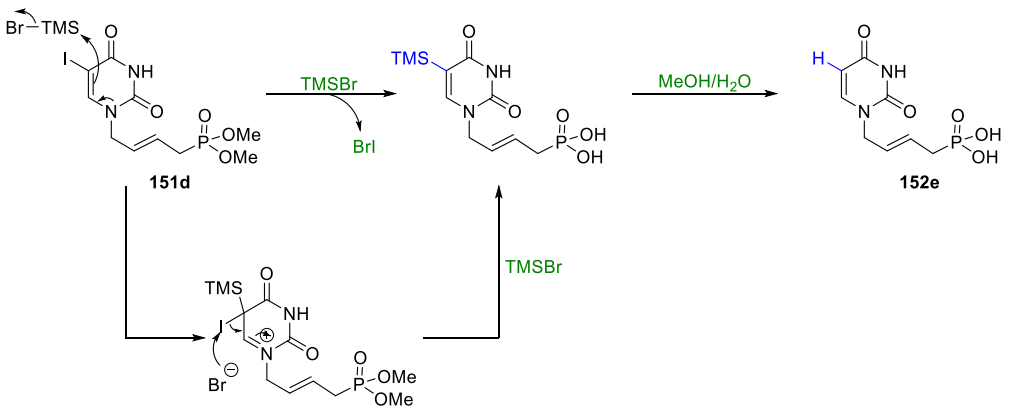


Schéma 49 *: Réaction possible d'élimination de l'iode en C^5.*

Nous supposons que le brome vient arracher l'iode en position C^5 à la suite de la substitution du TMSBr par ce dernier *via* un déplacement du doublet non-liant de l'azote N^1. C'est une addition/élimination d'un vinyle silane. Lors de l'ajout du méthanol et d'eau, le vinylsylane subit une réaction de proto-désylilation.

2.2.2. *Série uraciles C^5-subsituées : chaîne bis(OMe) phosphonate*

La série qui a été développée par la suite a porté sur la synthèse d'ANPs substitués en C^5 par des chaînes précédemment décrites afin de conserver les interactions dans le site actif.

La première voie de synthèse envisagée est celle développée sur les quinazolines, le 5-I-U a été alkylé de manière régiosélective puis couplé *via* une métathèse croisée avec la chaîne diméthyle phosphonate. Une mise au point de l'étape de couplage organopalladé a été effectuée puis les différents produits ont été déprotegés afin de former les acides phosphoniques (Schéma 50).

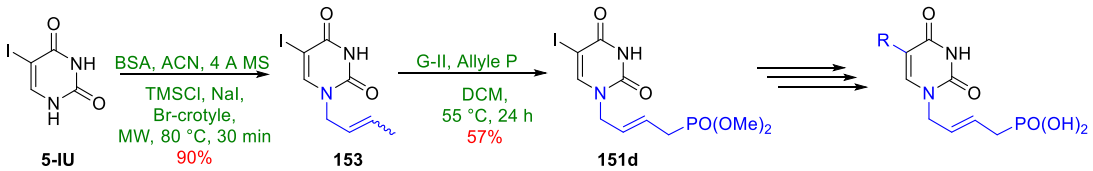


Schéma 50 *: Synthèse du synthons avant couplage de Sonogashira.*

L'intermédiaire **151d** a pu être synthétisé en deux étapes *via* une alkylation régiosélective sur la position N^1 décrite précédemment avec 90% de rendement suivie d'une réaction de métathèse croisée avec un rendement de 57%. Ce dernier a été engagé dans une réaction de couplage de Sonogashira avec les chaînes **136**, **137**, **138**.

Lors du couplage de Sonogashira sur la position C^5 de l'uracile dont la position N^3 est libre, il est possible de former un coproduit résultant de la cyclisation entre l'alcyne et la position O^4 : oxazolopyrimidine. La formation de ce produit a été décrite par *Castro et al.*[140] et *Bleackley et al.*[141] en

[140] Castro, C. E.; Gaughan, E. J.; Owsley, D. C., Indoles, benzofurans, phthalides, and tolanes via copper(I) acetylides, *J. Org. Chem.*,**1966**, *31*, 4071-4078.
[141] Bleackely, R. C.; Jones, A. L.; Walker, R. T, Incorporation of 5-substituted uracil derivatives into nucleic acid-III Synthesis of 5-substituted uracils derived from 5-acetyluracil, *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 2795-2797.

présence de CuI(I) dans le méthanol avec un chauffage ; de plus cette réaction est accélérée en présence d'une base[142] (Schéma 51).

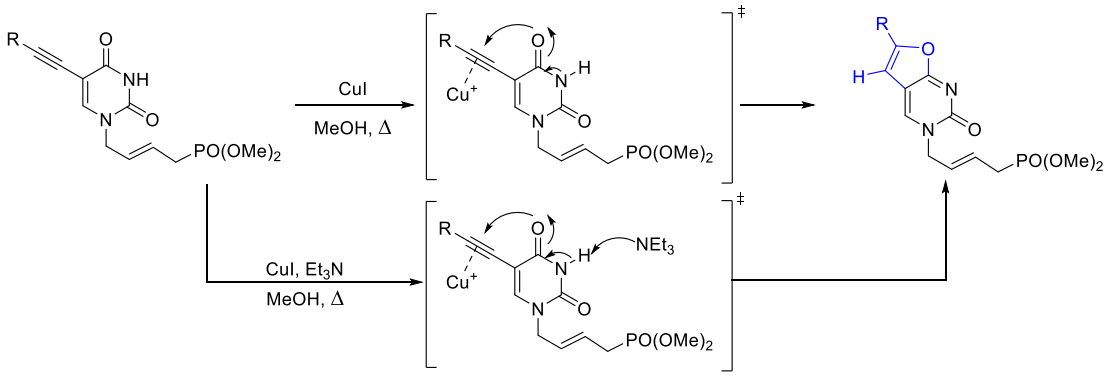
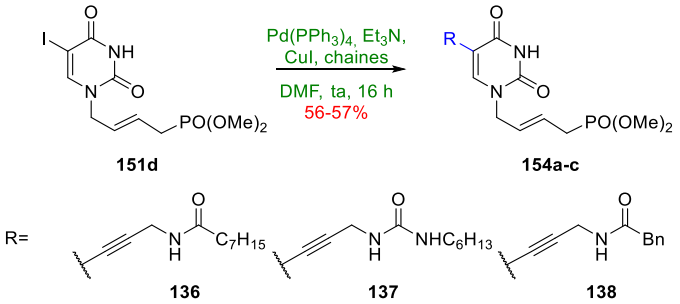


Schéma 51 *: Réarrangement général conduisant à une oxazolopyrimidine lors du couplage de Sonogashira.*

La présence de la position N^3 libre étant nécessaire au mécanisme de cyclisation, nous avons réalisé ce couplage *via* deux protections sur l'azote : un protégé par un groupement Boc et l'autre par un Bz. Une fois le couplage effectué avec de bons rendements (50-76%), l'ajout d'acide trifluoroacétique (déprotection du groupement Boc) ou NH_3/MeOH (déprotection du groupement Bz), ont conduit à la dégradation des chaînes aliphatiques par addition sur la triple liaison.

Nous avons donc travaillé avec la position N^3 libre. En concentrant le milieu réactionnel (passage de 0.087 M à 0.18 M), nous avons pu isoler les différents produits dans des rendements modérés à température ambiante (Tableau 27).



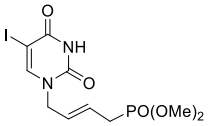
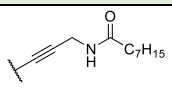
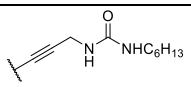
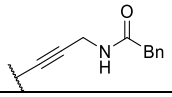
Entrées	Produit de départ	Chaînes	Produits d'arrivés	Rendements	Coproduits
1			**154a**	56%	**155a** Observé non isolé
2			**154b**	56%	**155b** Observé non isolé
3			**154c**	57%	**155c** Observé non isolé

Tableau 27 *: Produit de la réaction de Sonogashira.*

[142] Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L. A., Highly efficient AgNO3-catalyzed preparation of substituted furano-pyrimidine nucleosides, *Synlett*, **2004**, *13*, 2406-2408.

Afin de s'assurer de l'absence des produits de cyclisation non désiré **155a-c**, on peut dans un premier temps regarder la présence d'une fluorescence bleue (en CCM) sous la lampe UV à 254 nm après purification (Figure 58).

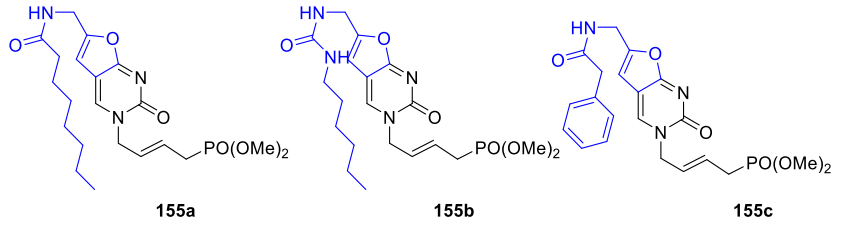


Figure 58 *: Oxazolopyrimidine formées lors du couplage.*

Dans un second temps, la séquence RMN 2D HMBC, permet de déterminer si le C^5 couple à longue distance avec un carbone quaternaire ou secondaire (Figure 59). On observe par cette analyse le couplage avec les protons de la chaîne phosphonate mais aussi avec le carbone acétylénique. On distingue aussi le couplage entre ce proton en position C^6 et le carbone de O^4 confirmant la présence d'un carbonyle.

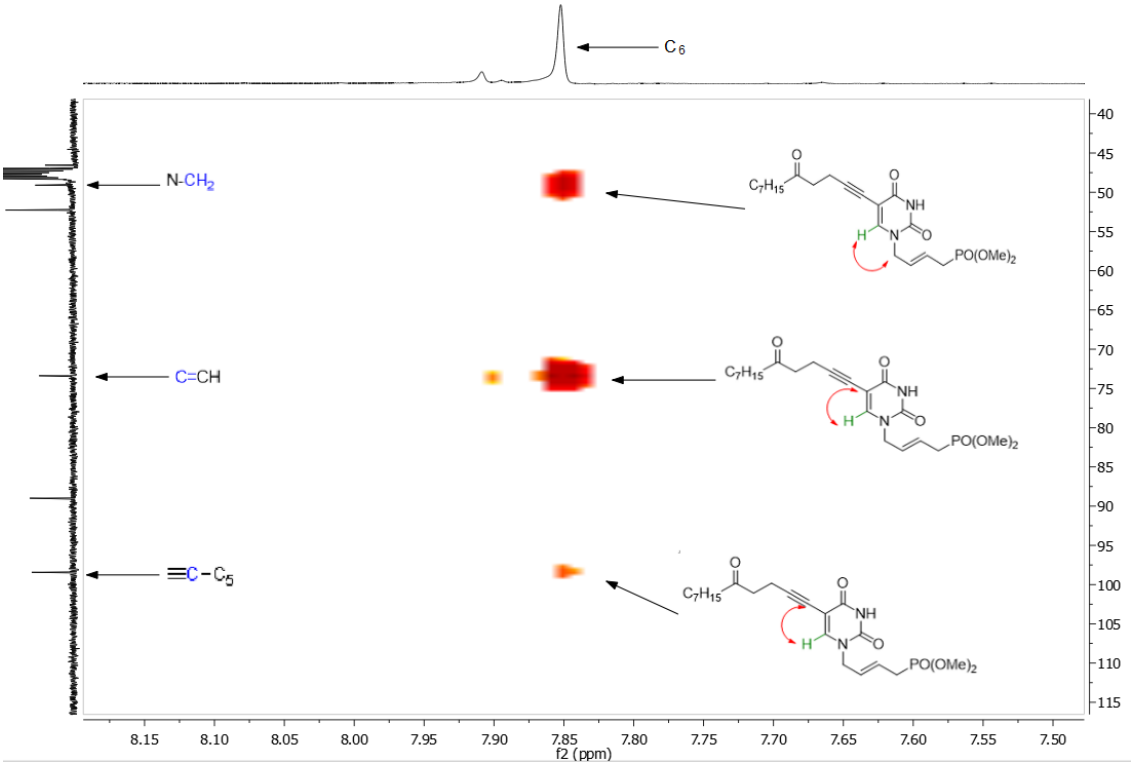
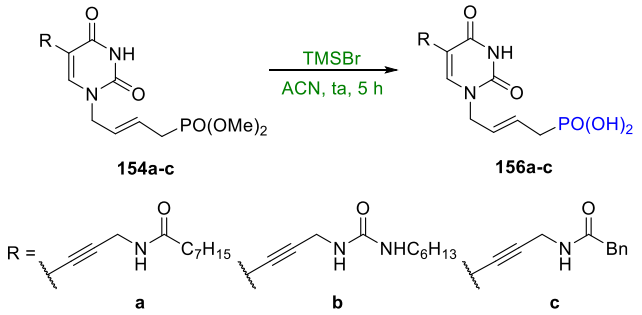


Figure 59 *: Analyse HMBC Méthanol-d_4.*

Les composés ont été ensuite engagés dans une étape de déprotection en présence de TMSBr à température ambiante (Tableau 28).



Entrées	R	Produits d'arrivés	Rendements
1	a	156a	Mélange complexe
2	b	156b	Mélange complexe
3	c	156c	Mélange complexe

Tableau 28 *: Déprotection des groupements méthyles.*

La déprotection des composés **154a-c** a conduit à un mélange complexe qui a été analysé par HRMS. Nous avons isolé un mélange de deux produis **157a-c** et **158a-c** avec un ratio 60/40. Il est impossible de séparer ces deux composés. Le premier produit correspond à la molécule déprotégée dont la triple liaison *via* un intermédiaire putatif a été transformée en carbonyle **157a**. Le second produit correspond au produit déprotégé hydrobromé **158a** (Schéma 52).

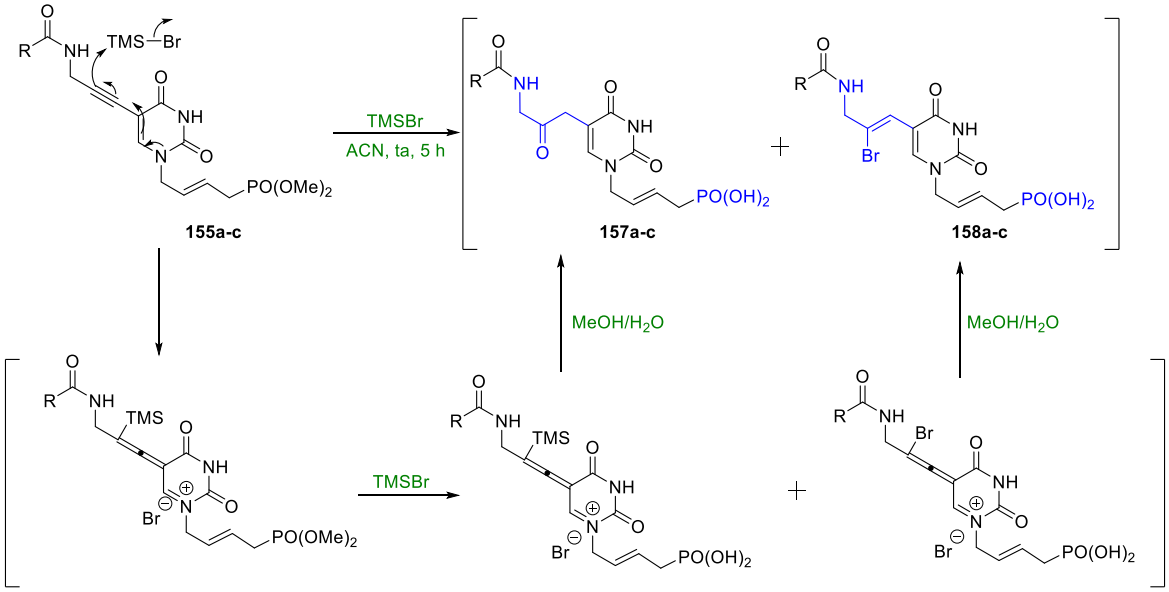


Schéma 52 *: Produit obtenu lors de la déprotection avec le TMSBr.*

Une des hypothèses qui peut être avancées afin d'expliquer la formation de ces sous-produits est la réactivité de la triple liaison dans ce système. [143] La délocalisation du doublet non liant de l'azote N^1 entrainant la substitution du TMSBr par la triple permettant la formation d'un allène silylé. Ce dernier pourrait réagir à la fois avec les bromures du milieu mais aussi avec l'eau en fin de réaction conduisant à la formation des deux produits observés **157a-c** et **158a-c**.

[143] Kögler, M.; Busson, R.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Louat, T.; Munier-Lehmann, H.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of 6-aza-2′-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of Thymidine Monophosphate Kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biodivers.*, **2012**, *9*, 536-556.

2.2.3. *Série uracile apliphatique-C^5-subsitué : chaîne bis(POC) phosphonate*

Pour des raisons différentes que précédemment (6-alkylquinazolindiones), il a été nécessaire d'appliquer cette méthodologie de synthèse développée au laboratoire par notre équipe[144] au **5-IU** afin de pouvoir isoler les composés d'intérêt. La synthèse du précurseur de la réaction de Sonogashira s'est déroulée de la même manière que précédemment avec un rendement de 45% lors de l'étape de métathèse croisée (Schéma 53).

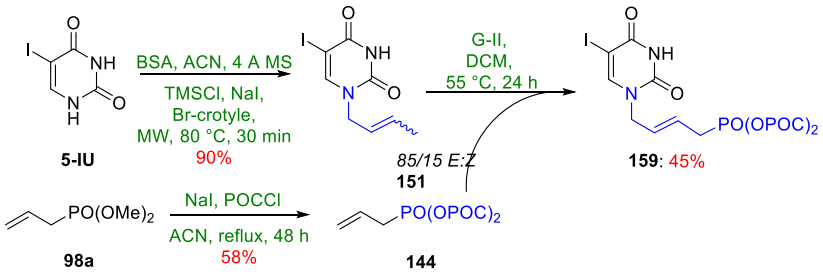
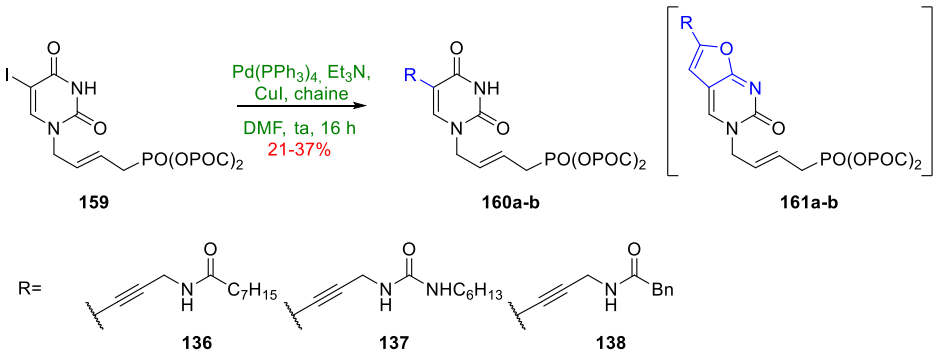


***Schéma 53** : Synthèse du précurseur de la réaction de Sonogashira.*

L'intermédiaire **159** a été alors engagé dans les conditions développées pour l'insertion des chaînes **136**, **137** et **138** sur le dérivé *bis*(POC) (Tableau 29).



Entrées	Produits de départ	Chaînes	Produits d'arrivés	Rendements	Coproduits
1	**159**	**136**	**160a**	37%	Observé non isolé
2		**137**	**160b**	21%	Observé non isolé
3		**138**	**160c**	Mélange complexe	Observé non isolé

***Tableau 29** : Résultats du couplage de Sonogashira sur les dérivés bis(POC).*

Les rendements des produits **160a,b** sont relativement faibles à cause de la formation de l'oxazolidinone **161a-c** sur un long temps de réaction. L'absence d'apport énergétique augmente la difficulté à convertir le réactif. Dans le cas de **160c**, nous n'avons pas réussi à séparer le produit désiré du coproduit cyclisé. L'HMBC nous a permis de confirmer la non cyclisation des produits isolés (Figure 60).

[144] Pradère, U.; Clavier, H.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A., The shortest strategy for generating phosphonate prodrugs by olefin cross-metathesis – Application to acyclonucleoside phosphonates. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 7324-7330.

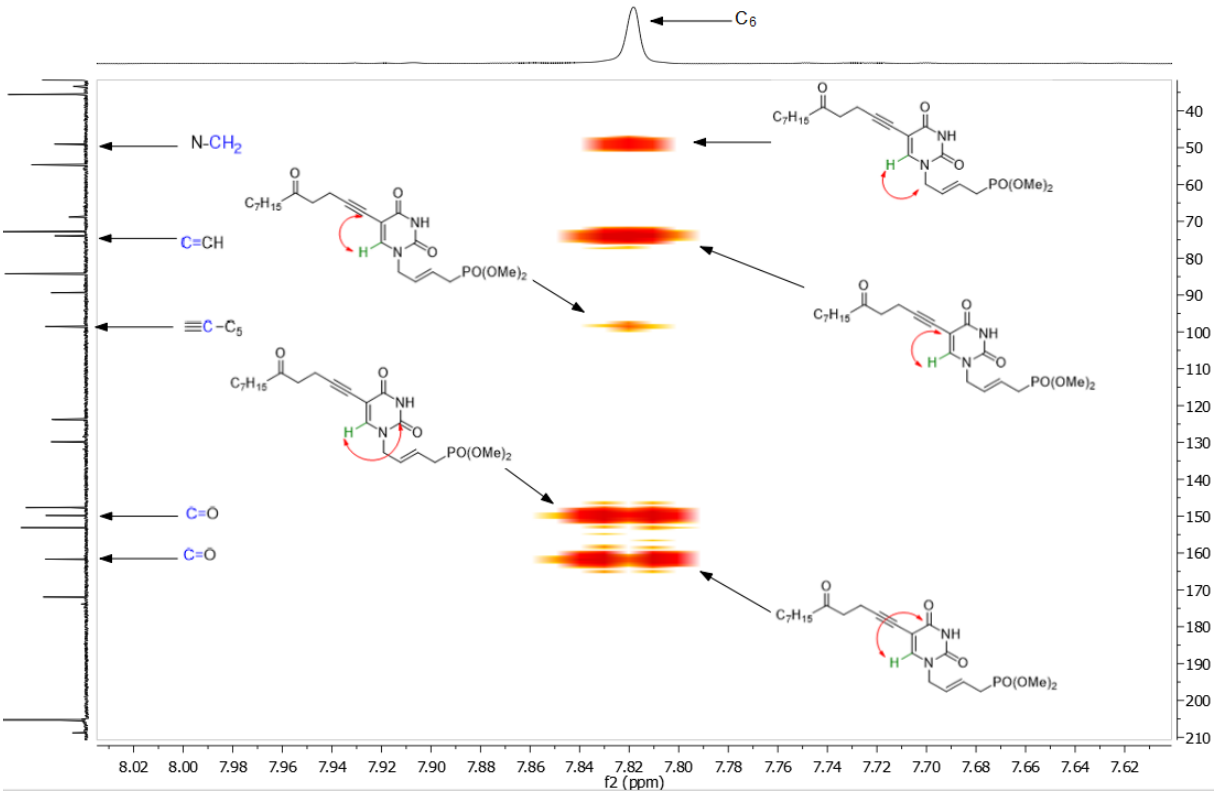
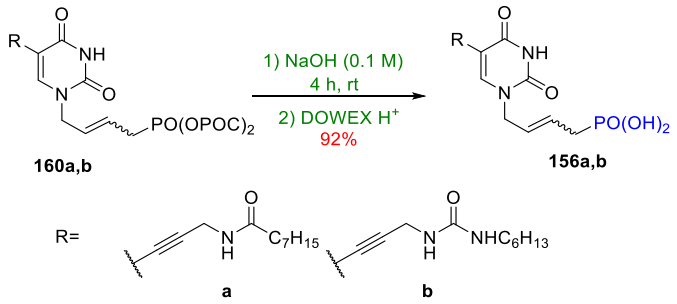


Figure 60 *: Contrôle HMBC*

Les deux composés **160a,b** *bis*(POC) ont été déprotégés en milieu basique ($NaOH/H_2O$), puis protonés **156a,b** sur résine échangeuse d'ions avec un rendement de 92% (Tableau 30).



Entrées	Chaîne	Produits d'arrivés	Rendements
1	**a**	**156a**	92%
2	**b**	**156b**	92%

Tableau 30 *: Résultats des déprotections des groupements bis(POC).*

Les sept composés synthétisés ont été évalués sur la *FDTS* (Figure 61).

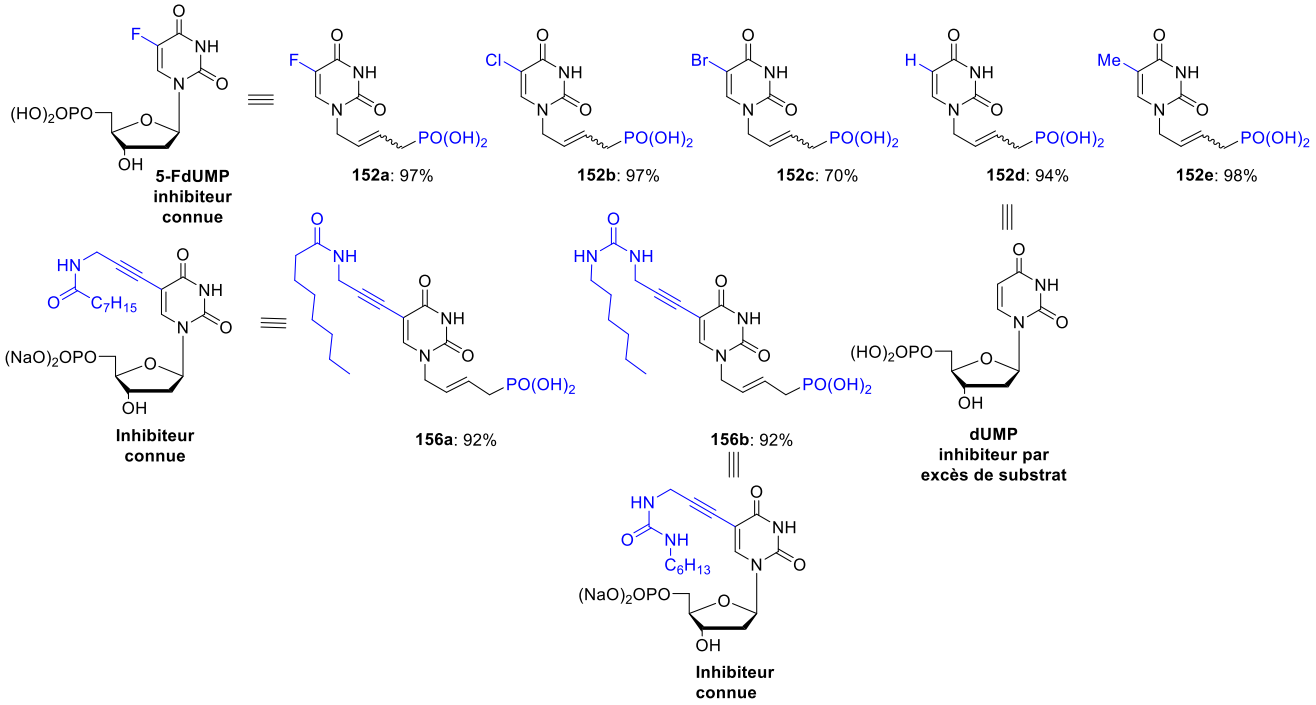


Figure 61 : ANPs synthétisés et testés.

2.3. Données biologiques

Ces deux séries de molécules **152a-e** et **156a,b** ont été testées sur la première étape de la biosynthèse de la *FDTS* afin de pouvoir répondre aux hypothèses posées au début de la partie sur la synthèse des ANPs (Figure 62).

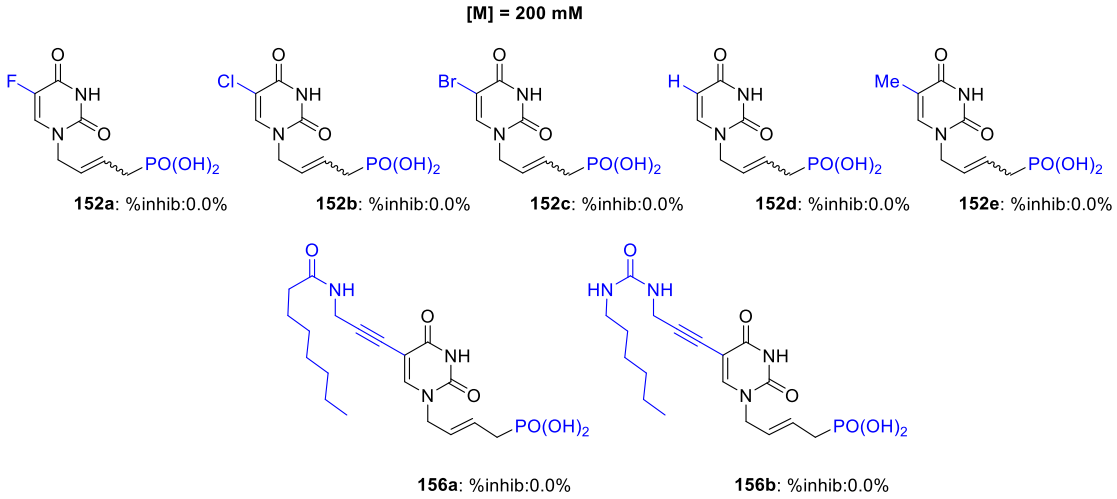


***Figure 62** : Inhibitions des molécules via le NADPH oxidase assay sur la 1ère partie du mécanisme.*

Ces deux séries de molécules n'inhibent pas l'enzyme malgré une forte concentration. Nous savons qu'à haute concentration le dUMP est un inhibiteur naturel de la *FDTS*, le 5-FU et 5-FdUMP (Figure 60) sont aussi des inhibiteurs de la *FDTS*. Or ici aucun des deux dérivés synthétisés **152a** et

152d mimant ces 3 inhibiteurs n'ont montré d'activité. La même observation peut être faite avec **156a** et **156b** qui sont les analogues acycliques des composés 2'-déoxyribosyle décrits par *Herdewijn et al.*[71]

Nous pouvons déduire de ces résultats et observations que la substitution d'un groupement ribosidique par notre chaîne acyclique (afin de mimer cette partie)[73] conduit à la perte quasi totale de l'inhibition. La conformation de cette dernière dans le site actif de l'enzyme ne lui permet pas d'avoir les mêmes interactions que le substrat naturel. Il est fortement possible que le *3'-OH* (du ribose) joue un rôle essentiel pour la fixation dans le site actif de la *FDTS*. Dans le cas de cette dernière hypothèse la substitution par une autre chaîne acyclique pourrait résoudre ce problème.

2.4. Conclusion 2 et perspectives

Durant cette première partie nous avons synthétisé deux séries d'ANPs, possédant un uracile substitué en C^5 dans le but d'étayer deux hypothèses (Figure 63) *:*

- La chaîne *trans*-butényle est-elle un mauvais mime du ribosyl dans le site actif.
- La perte d'inhibition provient-elle de la substitution d'un uracile par une quinazoline.

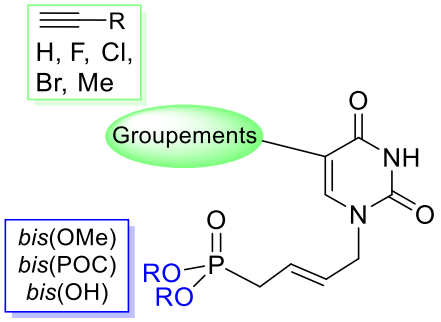


Figure 63 *: Modifications réalisés sur les ANPs.*

Afin de répondre à ces différentes hypothèses, nous avons mis deux synthèses convergentes (Schéma 54):

- Pour la synthèse d'une première famille d'ANP décrite précédemment au laboratoire, dérivé d'uracile C^5-substituées par des halogènes et alcanes.
- Pour la synthèse d'une seconde famille d'ANP novatrice dérivé d'uracile C^5- aliphatique substituées par des chaînes alcynes.

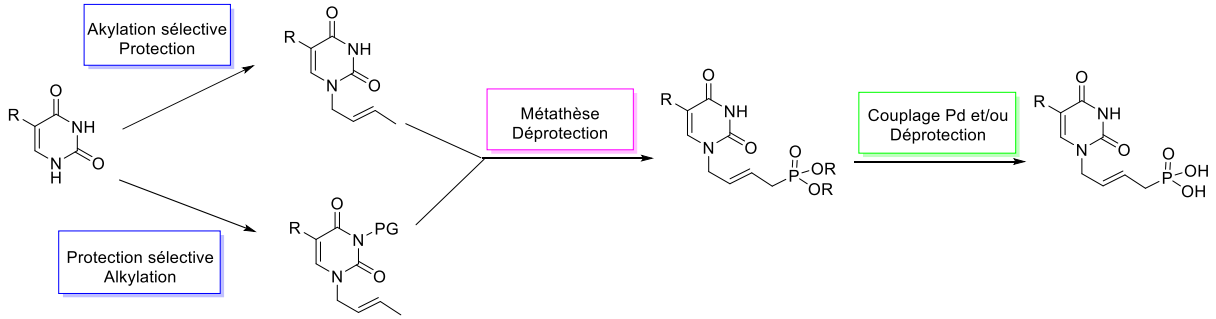


Schéma 54 *:* Schéma général d'obtentions des différents dérivés d'ANPs.

Les sept composés ainsi synthétisés n'ont montré aucune inhibition à 200 µM *via* le NADPH oxidase assay sur la première étape de la biosynthèse. Dans cette série, quatre composés étaient des mimes acycliques de molécules actives sur l'enzyme :

- Les deux premiers des analogues acycliques de la 5-FdUMP et dUMP.
- Les deux derniers des analogues acycliques de composés décrits par *Herdewijn et al*.

Au vu de ces résultats, nous pouvons en conclure que la chaîne *trans*-butényle n'est pas un bon mime du ribosyle, elle conduit à une perte totale d'inhibition. Ils existent plusieurs raisons à ce phénomène :

- Mauvaise conformation dans le site actif ne permettant pas un mime efficace.
- Absence de liaison essentielle dans le maintien de la molécule (par exemple le *3'-OH*).

Dans un second temps, on remarque que pour les dérivés quinazolines, l'inhibition est supérieure à celle des uraciles substitués malgré la présence de la chaîne *trans*-butényle. On peut donc en conclure que l'augmentation des interactions de type π-stacking par la présence d'un aromatique permet de contre balancer la perte d'inhibition induite par cette chaîne.

Deux voies peuvent être explorées. La première en utilisant un autre type de chaîne ANP comme montré précédemment. L'expérience acquise par le laboratoire nous permet de développer deux nouvelles séries d'ANPs (Figure 64).

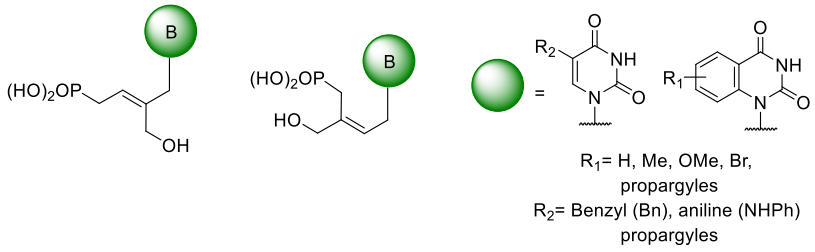


Figure 64 *: 2 nouvelles voies.*

Ces 2 types de chaînes présentent plusieurs intérêts en comparaison de la *trans*-butényle :

- Des conformations dans le site actif de l'enzyme différentes des précédentes.
- La présence des CH_2-OH en 2' (Thèse Ozkan Sari) ou 3' permettraient la création de nouvelles interactions dans l'enzyme afin de se rapprocher au plus près des interactions des substrats naturels.

3. Conclusion générale et perspective

Au cours de ce projet, nous avons décrit deux nouvelles familles d'ANPs avec de nombreuses modulations structurales, qui ont été testés sur le cycle de la *FDTS* de l'enzyme *MTb ThyX*. Ces deux familles avaient pour but d'étudier le comportement de dérivés acycliques (interactions, modélisations, inhibitions) dans l'enzyme.

- La première famille composée de bases hétérocycliques non canoniques dérivées des quinazolines :

- La taille de la chaîne acyclique entre l'acide phosphonique et la quinazoline. Cet espaceur contient 4 à 5 carbones et une insaturation en 2'. Les résultats biologiques ont montré une faible inhibition pour les 2 chaînes. La chaîne *trans*-butényle possédant néanmoins une inhibition supérieure.
- La substitution des positions C^6 et C^7 de la quinazoline par divers groupements méthyle, méthoxy, halogène ou alcynes sur ces deux positions ont également mis en évidence de faibles inhibitions. Néanmoins les petits groupements types méthyle et méthoxy ont présenté des inhibitions supérieures aux autres.

Dans le cas de cette famille quinazoline, l'augmentation des interactions de type π-stacking sur la base ainsi que des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes *via* les substitutions couplées au mime du ribosyle par une chaîne *trans*-butényle n'ont pas conduit aux résultats escomptés.

- La seconde, composée de bases pyrimidiques canoniques dérivées de l'uracile :
  - La substitution de la position C^5 par divers atomes d'halogènes, d'hydrogène, d'alcanes ou encore alcynes n'ont pas montré d'activités inhibitrice de *Mtb ThyX*.

Avec cette dernière famille, nous avons ainsi confirmé l'impossibilité de mimer la partie ribosyle *via* une chaîne *trans*-butényle et *trans*-pentényle en mettant en évidence la non inhibition de l'enzyme par des analogues structuraux acycliques de composés reportés sur l'enzyme.

Dans le but de compléter les informations relatives aux interactions de nos hétérocycles, mais aussi du ribosyle, il pourrait être nécessaire de tester dans un premier le D_4T, l'AZT et dans un second temps, l'ensemble de nos hétérocycles non canoniques sous forme nucléotidiques sur l'enzyme (Figure 65).

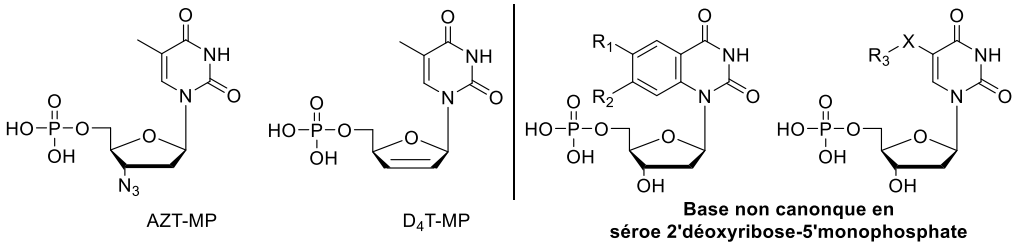


Figure 65 *: 2 nouvelles séries.*

Dans le cas des dérivés nucléotidiques nous pourrions dans un premier temps étudier l'influence de l'oxygène en 3' grâce au D_4T-MP et à l'AZT-MP. Dans un second temps, l'étude de nos bases quinazoline substituées en série 2'-déoxyribose-5'-monophosphate, permettrait une meilleure compréhension de l'importance de l'hétérocycle dans le site actif.

De plus une modélisation dans le site actif de l'enzyme *ThyX Mtb* de deux analogues structuraux du FAD a permis de déterminer deux squelettes potentiels (Figure 66).

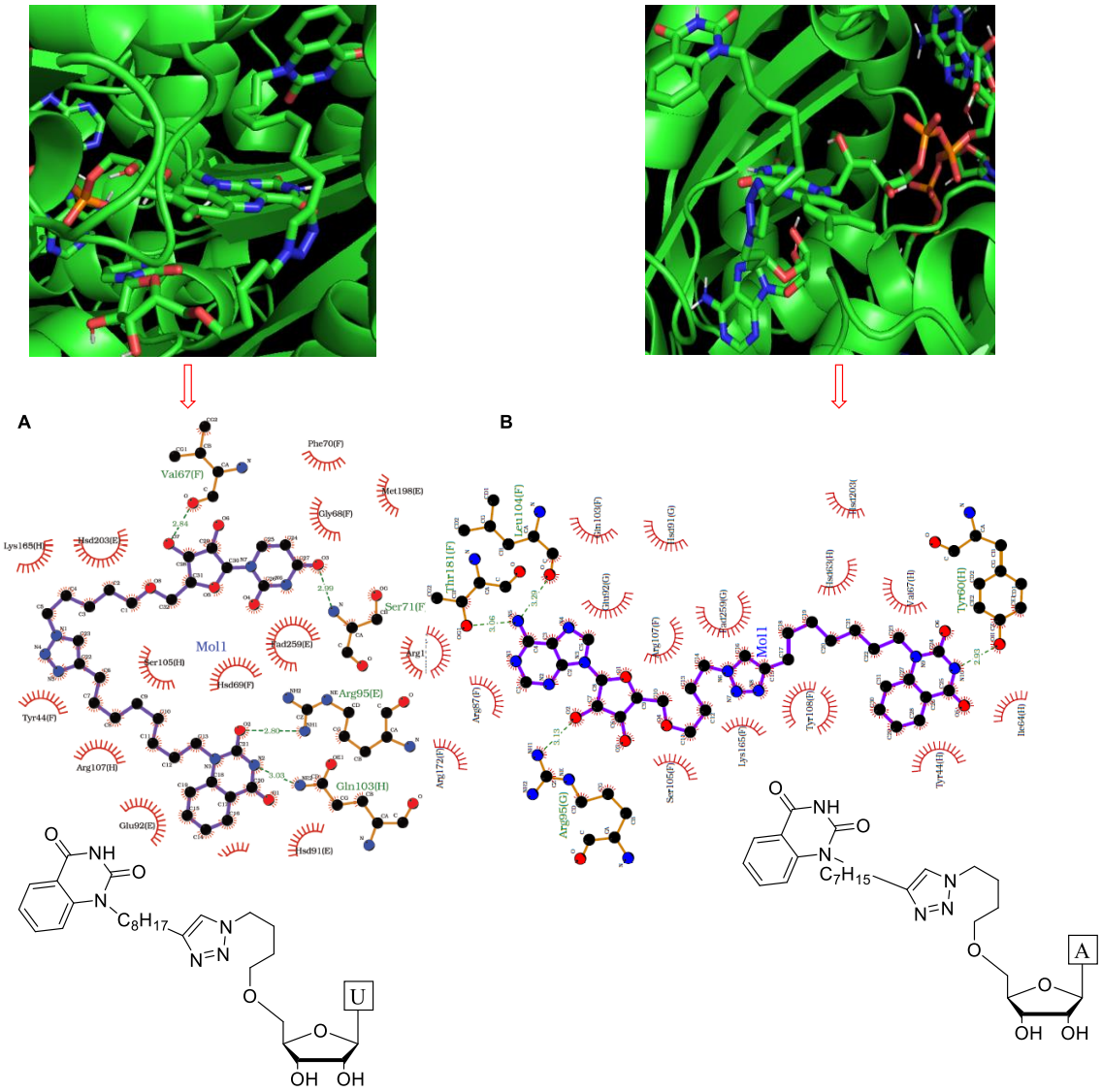


Figure 66 *: Modélisations de structures présentant un intérêt biologique.*

Ces deux structures sont directement inspirées du FAD. Nous avons essayé de mimer chacune des parties de la chaîne afin d'obtenir la conformation la plus proche du substrat naturel. Ils créent des interactions avec des acides aminés impliqués dans le maintien des substrats naturels dans le site actif de l'enzyme. Ils se positionnent chacun de manières différentes, mais les deux tendent à bloquer la partie N^{10} de la flavine.

Une structure générale peut être produite à partir des différentes observations réalisées avec la modélisation (Figure 67) :

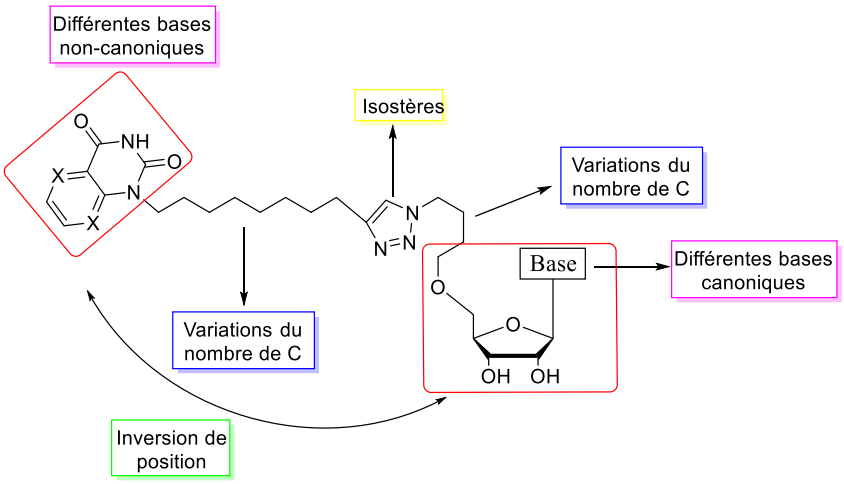


Figure 67 *: Structures à explorer obtenue par modélisation.*

La position de la base non canonique mime de la partie isoalloxazine et de la partie nucléoside pourrait être inversée en jouant sur la longueur de la chaîne carbonée entre N^1 et $O^{5'}$. La base non canonique mime du noyau isoalloxazine pourra être modulée afin d'augmenter son affinité avec le site actif. La substitution d'une adénosine par une uridine, thymidine, cytidine, ou guanosine, permettrait d'étudier l'influence du nucléoside sur l'inhibition. La dernière partie modulable intéressante est celle nommée isostère, elle pourra être mono-, di-phosphate, changé en amide, ou en triazole.

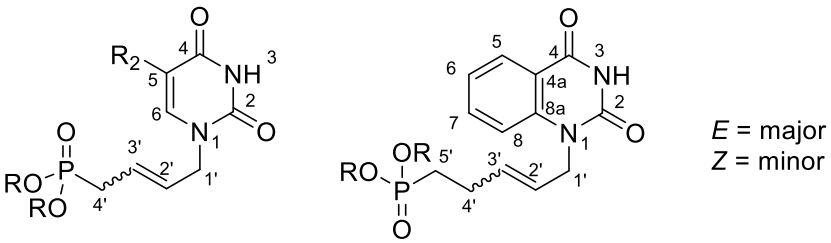
Dans les mimes du FAD développés à ce jour, ce composé original semble le plus intéressant à tester biologiquement.

Partie expérimentale
chapitre II

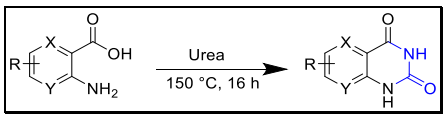
GENERAL

Commercially available chemicals were of reagent grade and used as received. All reactions requiring anhydrous conditions were carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry Ar or N_2. Microwave reactions were carried out in a Biotage Initiator apparatus. The reactions under ultrasound were carried out with Elmasonic P30H apparatus with a frequency of 80 kHz and effective power of 100 W. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with phosphomolybdic acid (PMA) stain, potassium permanganate solution or ninhydrin stain, followed by charring at around 150°C. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040-0.063 mm, E. Merck). Solid were not recrystalized. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 or Bruker Avance 400 Spectrometers. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. 1H and 13C signals were attributed on the basis of H–H and H–C correlations. High Resolution Mass spectra were performed on a Bruker Q-TOF MaXis spectrometer by the "Fédération de Recherche" ICOA/CBM (FR2708) platform.

<u>Numérotation des ANPs</u>

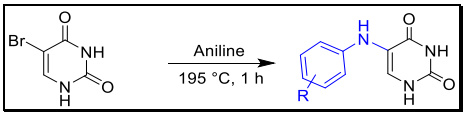


GENERAL PROCEDURE 1: Urea cyclisation.



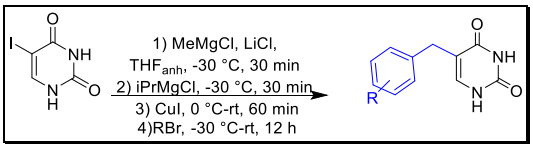
Amino acid compound (1 eq.) and urea (20 eq.) were grinded with a mortar pillar and then heated at 150 °C for 12 h under inert atmosphere in a dry flask. After the mixture was cooled down to 100 °C, 15 mL of water was added and the resultant mixture was stirred for another 15 min. After the reaction mixture was cooled down to room temperature, it was filtered if necessary and aqueous solution of NaOH (1 M, 150 mL) was then added. The mixture was mixed at room temperature another 1 h. After acetic acid was added dropwise until pH 5. Pure compounds were obtained by filtration of precipitates.

GENERAL PROCEDURE 2: Aniline derivatives substitution.



In a dry flask under inert atmosphere, 5-bromo-uracil (5 g, 1 eq., 26.18 mmol) and aniline derivatives (7.16 ml, 3 eq., 75.54 mmol) were heated at 195 °C for 1 h. After completion of the reaction, a mixture of $H_2O/HCCl_3$ was added to the reaction and stirred during 15 min. The mixture was filtered off and the solid washed with water and ethanol. The solid was dissolved in 5% aqueous NaOH and the residues were filtered off. The filtrate was neutralized with acetic acid and the obtained solid was filtered off and washed with water to afford the desired compound.

GENERAL PROCEDURE 3: Benzyl derivatives substitution.



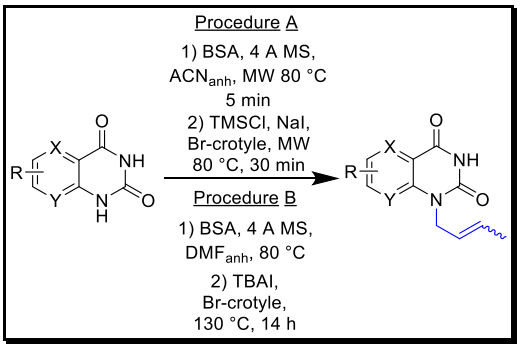
Preparation of LiCl (**S1**): A suspension of dry LiCl (2.25 g, 53 mmol) in dry THF (125 ml, 0.5 M) is left stirring at room temperature for 24 h under inert atmosphere until complete dissolution of LiCl. The solution is stored under inert atmosphere upon use.

Preparation of CuI.2LiCl (**S2**): Under inert atmosphere in a dry flask, dry CuI (0.4 g, 0.1 eq., 2.1 mmol) and LiCl (1.8 g, 2 eq., 42.0 mmol) were mixed in dry THF (21 ml, 0.1M).

5-Iodouracil (5 g, 1 eq., 21.0 mmol) was placed in a dry flask under inert atmosphere. Applying vigorous stirring, the substrate was dried for 15 min under reduced pressure. Solution **S1** (85 ml, 2 eq., 22.0 mmol) was added and stirred 30 min at room temperature. The solution was cooled down to -30 °C and MeMgCl in dry THF (14.3 ml, 2 eq., 22.0 mmol) was added dropwise. After completion of the addition, the resulting solution was stirred at -30 °C for further 30 min, i-PrMgCl·LiCl in dry THF (19.23 ml, 1.2 eq., 25.2 mmol) was then dropwised and the resulting mixture was allowed to warm up to room temperature. After 1 h, the mixture was cooled to –30 °C and **S2** (0.21 mL, 0.01 eq., 0.21 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was allowed to warm up to room temperature for

30 min. Benzyl bromide (3.21 ml, 1.3 eq., 27.3 mmol) was added at -30 °C dropwise and stirred at 30 min before allowed to warm up at room temperature for 24 h. After the completion of the reaction, it was quenched by addition of MeOH (25 ml). The precipitate was filtered off and dried to afford the pure compound.

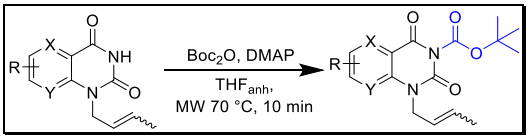
GENERAL PROCEDURE 4: *N*[1] crotylation.



Procedure A: In a microwave tube to a suspension of bicyclic compound (1 eq.) in anhydrous acetonitrile (0.5 M), BSA (2.5 eq.) and 4 Å molecular sieves were sequentially added under inert atmosphere. Then tube was sealed and stirred under microwave irradiation at 80 °C for 5 min. TMSCl (1 eq.), NaI_{act} (1,12 eq.) and crotyl bromide (2 eq.) were successively added. The vial was sealed and heated under microwave irradiation for 30 min at 80 °C. The volatiles were removed, and the residue diluted in a solution of saturated $NaHCO_3$ and EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were washed with $Na_2S_2O_3$ solution and brine, dried over $MgSO_4$ filtered and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (98:2) as eluent.

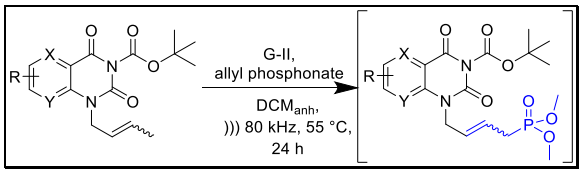
Procedure B: To a dry DMF (0.5 M) suspension of compound (1 eq.) was added BSA (2.5 eq.) and a spatula of 4 Å molecular sieves under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred at 80 °C until a clear solution was observed. To this resulting solution was added TBAI (catalytic) and crotyl bromide (2 eq.) and the resulting mixture was heated at 130 °C overnight. The volatiles were then removed under reduced pressure, and the crude product was dissolved in solution of saturated $NaHCO_3$ and EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were washed with $Na_2S_2O_3$ solution and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (98:2) as eluent.

GENERAL PROCEDURE 5: Boc protection.



Under inert atmosphere to a solution of alkylated compound (1 eq.) in dry THF (0.25 M) were successively added dimethylaminopyridine (0.5 eq.) and dicarbonate de di-tert-butyle (2 eq.). The sealed tube was heated under microwave irradiation at 70 °C for 10 min. Sealed tube was degas before opened. Volatiles were evaporated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with PE/AcOEt (8:2) as eluent.

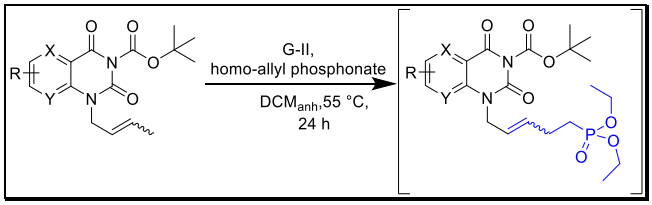
<u>GENERAL PROCEDURE 6:</u> Metathesis Cross coupling with allyl phosphonate.



<u>Procedure A:</u> A mixture of protected alkylated bicycle (1 eq.) and dimethyl allylphosphonate (4 eq.), were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.1 M), 5 mol% Grubbs 2nd generation catalyst was added. The mixture was sonicated at 55 °C (80 kHz, 100 W) under inert atmosphere. After 2 h, 5 mol% of the Grubbs-II catalyst was added to the solution. The reaction was sonicated for 2 h at 55 °C before the addition of a third portion of 5 mol% of the ruthenium catalyst. The reaction was sonicated 18 h under those conditions. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Crude product was applied on short flash chromatography with AcOEt as eluent to afford mix of desired compound and homodimer used directly on deprotection step.

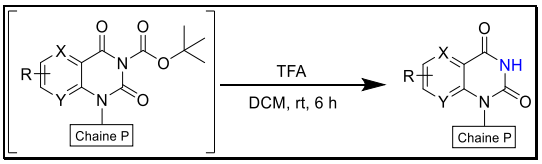
<u>Procedure B:</u> A mixture of protected alkylated bicycle (1 eq.) and dimethyl allylphosphonate (4 eq.), were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.1 M). Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) was added. The mixture was refluxed at 55 °C under inert atmosphere for 24 h. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Crude product was applied on short silica gel flash chromatography with AcOEt as eluent to afford mix of desired compound and homodimer used directly on deprotection step.

<u>GENERAL PROCEDURE 7:</u> Metathesis Cross coupling with homo-allyl phosphonate.



A mixture of protected alkylated bicycle (1 eq.) and diethyl but-2-enylphosphonate (4 eq.) were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.1 M). Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) was added. The mixture was refluxed at 55 °C under inert atmosphere for 24 h. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Crude product was applied on short flash chromatography with AcOEt as eluent to afford mix of desired compound and homodimer used directly on deprotection step.

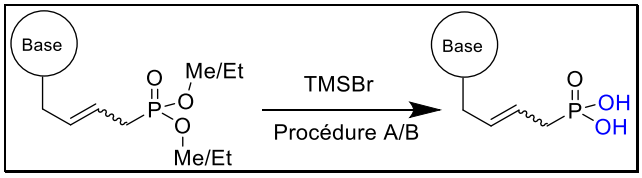
<u>GENERAL PROCEDURE 8:</u> Boc deprotection



A solution of phosphonate compound (1 eq.) in freshly distilled DCM (0.05 M), was stirred with trifluoroacetic acid (20 eq.) under inert atmosphere for 6 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted in AcOEt and washed twice with saturated $NaHCO_3$ solution, dried over $MgSO_4$

filtered and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (97:3) as eluent. For C5 chain, purification was performed on semi-prep installation (15 min gradient from 1 water to 9/1 water/ACN).

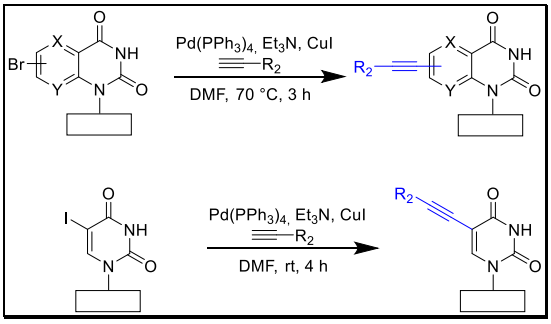
GENERAL PROCEDURE 9: Phosphonate deprotection.



Procedure A: To a dry ACN (15 mL) solution of bicycle phosphonate diesters (1 eq.), TMSBr (15 eq.) was added under inert atmosphere and heated under microwave irradiation at 80 °C for 10 min. MeOH was added and evaporated with heating. MeOH was added again, and this procedure was repeated four times. The residue dissolved in ultrapure H_2O and extracted with DCM. The aqueous layer was lyophilized to yield the pure compound.

Procedure B: To dry ACN (10 mL) solution of pyrimidine phosphonate diesters (1 eq.), TMSBr (15 eq.) was added under inert atmosphere and stirred at room temperature for 5 hours. MeOH was added and evaporated with heating. MeOH was added again, and this procedure was repeated four times. The residue dissolved in ultrapure H_2O and extracted with DCM. The aqueous layer was lyophilized to yield the pure compound.

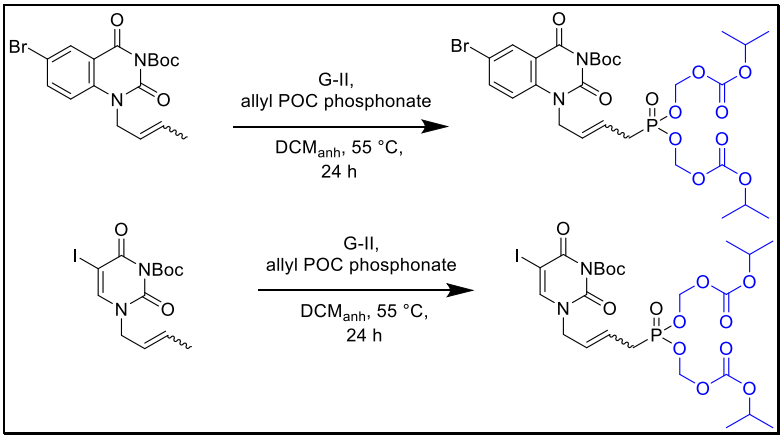
GENERAL PROCEDURE 10: Sonogashira cross-coupling.



Procedure A: Under inert atmosphere, to a solution deprotected Br-compound (1 eq.) in dry DMF (0.087 M) were successively added copper iodide (0.2 eq.), triethylamine (3 eq.), alkynyl group (3 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (10 mmol%). The reaction mixture was heated at 70 °C for 3 h. The reaction was quenched with EtOAc and co-evaporated with heptane. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography using an elution gradient of DCM/MEOH (from 97:3 to 95:5) to give pure product.

Procedure B: Under inert atmosphere, to a solution deprotected I-pyrimidine *bis*(OMe) compound (1 eq.) in dry DMF (0.18 M) were successively added copper iodide (0.2 eq.), triethylamine (3 eq.), alkynyl group (4 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (10 mmol%). The reaction mixture stirred at room temperature for 16 h. The reaction was quenched with EtOAc and co-evaporated with heptane. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (98:2) as eluent.

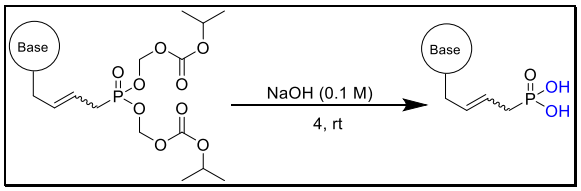
GENERAL PROCEDURE 11: Metathesis Cross coupling with allyl POC phosphonate.



Procedure A: A mixture of protected alkylated bromide compound (1 eq.) and *bis*POC allylphosphonate (3 eq.), were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.1 M). Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) was added. The mixture was refluxed at 55 °C under inert atmosphere for 24 h. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Crude product was applied on short silica gel flash chromatography using an elution gradient of PE/AcOEt (from 8:2 to1:1) to give pure product.

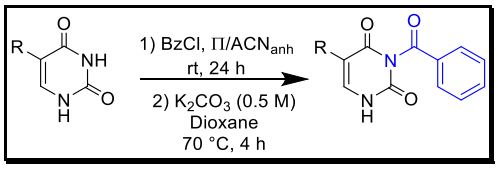
Procedure B: A mixture of protected alkylated iodo-uracil (1 eq.) and dimethyl allylphosphonate (1.5 eq.), were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.04 M). Grubbs 2nd generation catalyst (5 mol%) was added. The mixture was refluxed at 55 °C under inert atmosphere for 24 h. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with PE/AcOEt (1:1) as eluent.

GENERAL PROCEDURE 12: Poc Deprotection.



BisPOC compound were dissolved in an ultrapure water solution of sodium hydroxide (0.1M). After 4 h stirring at room temperature, the solution was passed acidified to pH 5 with DOWEX 50W8 resin. The solution was filtered and the filtrate was washed two times with DCM. Inorganic layer was lyophilized to give pure compound.

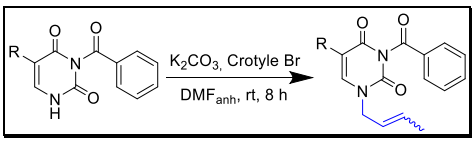
GENERAL PROCEDURE 13: Benzoyl mono-protection.



Pyrimidine derivative (1 eq.) was stirred under inert atmosphere in a mixture of dry pyridine and dry acetonitrile (2:5, v:v). After benzoyl chloride (3 eq.) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was

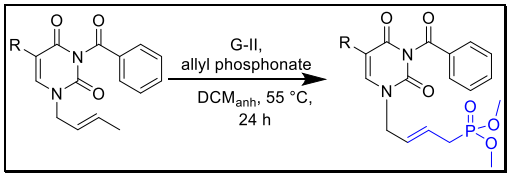
partitioned twice between DCM/H_2O (1:1, v:v). The organic layer was separated and then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a mixture of aqueous potassium carbonate (0.5 mol/L)/ dioxane (1:2, v:v) and stirred for 4 h at 70 °C. The pH was adjusted to 5 with acetic acid and the residue was then concentrated under reduced pressure. The mixture was filtered off and the residue was washed with cold water to afford pure compounds.

GENERAL PROCEDURE 14: *N*[1] Substitution.



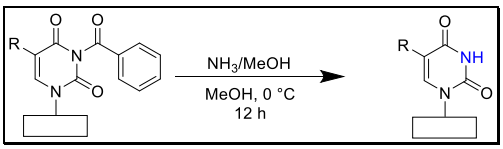
To a DMF (0.28 M) mixture of protected compound (1 eq.) were added K_2CO_3 (1.05 eq.) and crotyl bromide (1.05 eq.) under argon atmosphere. After 8 h stirring at room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and then washed twice with NH_4Cl solution. The aqueous phases were extracted three times with EtOAc (30 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography using an elution gradient of PE/AcOEt (from 7:3 to1:1) to give pure product.

GENERAL PROCEDURE 15: Metathesis Cross coupling with allyl phosphonate.



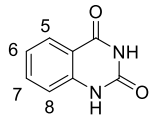
A mixture of protected alkylated pyrimidine (1 eq.) and dimethyl allylphosphonate (4 eq.), were stirred at room temperature in freshly distilled DCM (0.06 M). Grubbs 2nd generation catalyst (5 mol%) was added. The mixture was refluxed at 55 °C under inert atmosphere for 24 h. Volatiles were eliminated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with AcOEt as eluent.

GENERAL PROCEDURE16: Benzoyl deprotection



N-benzoylated phosphonate compounds (1 eq.) was stirred in methanolic ammonia (100 eq.) at 0 °C 14 h under inert atmosphere. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (9:3) as eluent.

Quinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (70a)



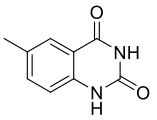
Chemical Formula: $C_8H_6N_2O_2$
Molecular Weight: 162,1480

Following the general procedure 1, from anthranilic acid (10 g, 1 eq., 72 mmol) and urea (87.6 g, 20 eq., 1.46 mol). The title compound was obtained after filtration as a white solid (10.4 g, 89%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 11.20 (bs, 2H, 2xNH), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.5 Hz, H_5), 7.63 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.3, 1.5 Hz, H_6), 7.33-7.04 (m, 2H, $H_{8,7}$).

CAS: 86-96-4.

6-Methylquinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (70b)



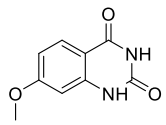
Chemical Formula: $C_9H_8N_2O_2$
Molecular Weight: 176,1750

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after filtration the desired product as a white solid (95%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 11.12 (bs, 2H, 2 x NH), 7.64 (s, 1H, H_5), 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz, H_8), 7.06 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H_7), 2.32 (s, 3H, C-CH_3).

CAS: 62484-16-6.

7-Methoxyquinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (70c)



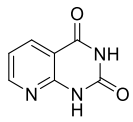
Chemical Formula: $C_9H_8N_2O_3$
Molecular Weight: 192,1740

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after filtration the desired product as a brown/orange solid (35%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 11.02 (bs, 2H, 2 x NH), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_5), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz, H_6), 6.58 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_8), 3.78 (s, 3H, O-CH_3).

CAS: 62484-12-2.

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (70g)



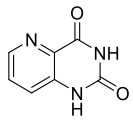
Chemical Formula: $C_7H_5N_3O_2$
Molecular Weight: 163,1360

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after filtration the desired product as a white solid (76%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.54 (bs, 2H, 2 x NH), 8.59 (dd, 1H, *J* = 4.8, 1.9 Hz, H_7), 8.25 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.9 Hz, H_5), 7.24 (dd, 1H, *J* = 7.8, 4.8 Hz, H_6).

CAS: 21038-66-4.

Pyrido[3,2-*d*]pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (70h)



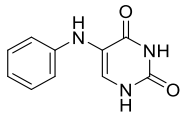
Chemical Formula: $C_7H_5N_3O_2$
Molecular Weight: 163,1360

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after filtration the desired product as a brown solid (74%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.39 (bs, 2H, 2 x NH), 8.44 (dd, 1H, *J* = 4.1, 1.6 Hz, H_6), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.4, 4.1 Hz, H_7), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.6 Hz, H_8).

CAS : 37538-68-4.

5-(Phenylamino)pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (73)



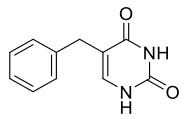
Chemical Formula: $C_{10}H_9N_3O_2$
Molecular Weight: 203,2010

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after filtration the desired product as a white solid (73%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 10.95 (bs, 2H, 2 x NH), 7.26 (s, 1H, H_6), 7.06 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, 2xH_{arom}), 6.83 (bs, 1H, H_{arom}), 6.74-6.54 (m, 3H, 2xH_{arom}, NH).

CAS : 4870-31-9.

5-Benzylpyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (76)



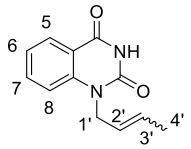
Chemical Formula: $C_{11}H_{10}N_2O_2$
Molecular Weight: 202,2130

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after filtration the desired product as a white solid (84%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 10.86 (bs, 2H, 2 x NH), 7.30-7.14 (m, 6H, H_6, 5xH_{Arom}), 3.49 (s, 2H, C-CH_2).

CAS : 18493-83-9.

1-(But-2-en-1-yl)quinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (93a)



Chemical Formula: $C_{12}H_{12}N_2O_2$
Molecular Weight: 216,2400

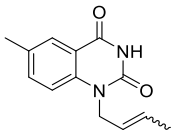
Following the general procedure 4, from quinazolindione (0.5 g, 1 eq., 3.08 mmol), with BSA (1.91 ml, 2.5 eq., 7.7 mmol) in ACN (15 ml, 0.1 M). Following by TMSCl (0.46 ml, 1 eq., 3.08 mmol), NaI (0.55 g, 1.2 eq., 3.7 mmol), and bromocrotyl 85% (0.67 ml, 2 eq., 6.16 mmol). The title compound was obtained after purification as a white solid (0.48 g, *E/Z ratio = 85/15*, 72%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 10.23 (bs, 1H, NH), 8.09 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.7 Hz, H_5), 7.79-7.67 (m, 1H, H_7), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_8), 7.29 (dt, 1H, *J* = 10.0, 7.8 Hz, H_6), 5.84-5.37 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.83 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.70 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.88-1.82 (m, 1H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.66 (dq, 3H, *J* = 6.3, 1.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 57397-87-2.

Rf : 0.58 (DCM/MeOH 95:5).

1-(But-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (93b)



Chemical Formula: $C_{13}H_{14}N_2O_2$
Molecular Weight: 230,2670

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 84%).

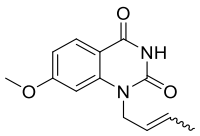
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.15 (bs, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, H_5), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H_7), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, $H_{8\text{-major}}$), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, $H_{8\text{-minor}}$), 5.82-5.47 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.83-4.77 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.67 (dt, 2H, *J* = 5.1, 1.4 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 2.39 (s, 3H, C-CH_3), 1.84 (ddt, 3H, *J* = 7.0, 1.8, 1.1 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.65 (dq, 3H, *J* = 6.3, 1.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 162.4 (**C**=O), 150.8 (**C**=O), 140.1 (**C**$_{quat}$), 136.8 (**C**$_{arom}$), 133.0 (**C**$_{quat}$), 129.4 (**CH**=CH), 129.1 (**C**$_{quat}$), 128.4 (**C**$_{arom}$), 125.8 (CH=**CH**), 115.8 (**C**$_{arom}$), 44.4 (N-**CH$_{2\text{-major}}$**), 40.5 (N-**CH$_{2\text{-minor}}$**), 20.3 (C-**CH$_3$**), 17.7 (CH-**CH$_{3\text{-major}}$**), 13.3 (CH-**CH$_{3\text{-minor}}$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{15}N_2O_2$: 231.1128, found: 231.1127.

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 95:5).

1-(But-2-en-1-yl)-7-methoxyquinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (93c)



Chemical Formula: $C_{13}H_{14}N_2O_3$
Molecular Weight: 246,2660

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a white/brown solid (*E/Z ratio = 85/15*, 70%).

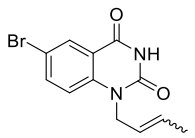
^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.03 (bs, 1H, NH), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_5), 6.89-6.77 (m, 2H, $H_{6,8}$), 5.88-5.50 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.83-4.81 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.76 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.93 (s, 3H, O-CH_3), 1.87 (d, 3H, *J* = 5.6 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.71-1.63 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 166.0 (**C**=O), 144.1 (**C**=O), 130.7 (**C**$_{quat}$), 130.6 (**CH**=CH), 130.1 (**C**$_{quat}$), 129.4 (**C**$_{arom}$), 125.8 (CH=**CH**), 122.2 (**C**$_{quat}$), 110.3 (**C**$_{arom}$), 100.3 (**C**$_{arom}$), 56.2 (O-**CH$_3$**), 44.68 (N-**CH$_{2\text{-major}}$**), 40.6 (N-**CH$_{2\text{-minor}}$**), 17.8 (CH-**CH$_{3\text{-major}}$**), 13.3 (**CH$_{3\text{-minor}}$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{15}N_2O_2$: 247.1077, found: 247.1077.

Rf : 0.67 (DCM/MeOH 95:5).

6-Bromo-1-(but-2-en-1-yl)quinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (93d)



Chemical Formula: $C_{12}H_{11}BrN_2O_2$
Molecular Weight: 295,1360

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a beige solid (*E/Z ratio = 85/15*, 43%).

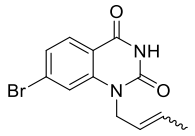
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.38 (bs, 1H, NH), 8.16 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_5), 7.85 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.5 Hz, H_7), 7.39 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_8), 5.82-5.72 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.61-5.54 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.83 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.70 (dt, 2H, *J* = 5.2, 1.4 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.85 (dd, 3H, *J* = 7.0, 1.7 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.67 (dq, 3H, J = 6.4, 1.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.2 (**C**=O), 150.5 (**C**$_{quat}$), 150.2 (**C**=O), 141.5 (**C**$_{quat}$), 138.3 (**C**$_{arom}$), 130.8 (**C**$_{arom}$), 129.4 (**CH**=CH), 125.3 (CH=**CH**), 118.3 (**C**$_{arom}$), 115.4 (**C**$_{quat}$), 44.7 (N-**CH**$_{2\text{-major}}$), 40.7 (N-**CH**$_{2\text{-minor}}$), 17.8 (CH-**CH**$_{3\text{-major}}$), 13.3 (CH-**CH**$_{3\text{-minor}}$).

HRMS-ESI (m/z) $[M]^+$ calcd for $C_{12}H_{12}N_2O_2Br$: 295.0075, found: 295.0076.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

7-Bromo-1-(but-2-en-1-yl)quinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (93e)



Chemical Formula: $C_{12}H_{11}BrN_2O_2$
Molecular Weight: 295,1360

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a beige solid (*E/Z ratio = 85/15*, 37%).

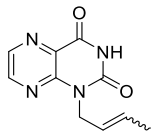
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.22 (bs, 1H, NH), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_5), 7.69 (d, *J* = 1.5 Hz 1H, H_8), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.5 Hz, H_6), 5.89-5.75 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.67-5.57 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.89 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.76 (dt, 2H. *J* = 5.8, 1.3 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.88 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.70 (dd, 3H, *J* = 6.5, 1.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 159.6 (**C**=O), 148.8 (**C**$_{quat}$), 148.6 (**C**=O), 142.4 (**C**$_{quat}$), 138.6 (**C**$_{arom}$), 130.1 (**C**$_{arom}$), 127.2 (**CH**=CH), 124.9 (CH=**CH**), 119.1 (**C**$_{arom}$), 115.3 (**C**$_{quat}$), 45.4 (N-**CH**$_{2\text{-major}}$), 41.4 (N-**CH**$_{2\text{-minor}}$), 17.8 (CH-**CH**$_{3\text{-major}}$), 14.5 (CH-**CH**$_{3\text{-minor}}$).

HRMS-ESI (m/z) $[M]^+$ calcd for $C_{12}H_{12}N_2O_2Br$: 295.0075, found: 295.0077.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

1-(But-2-en-1-yl)pteridine-2,4(*1H,3H*)-dione (93f)



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}N_4O_2$
Molecular Weight: 218,2160

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a yellow solid (*E/Z ratio = 85/15*, 30%).

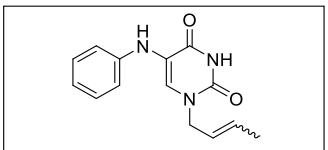
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.65 (bs, 1H, NH), 8.74 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_7), 8.58 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_6), 5.87-5.56 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.91-4.89 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.79 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz, $H_{1'\text{-mjnor}}$), 1.84-1.82 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.66-1.63 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 160.2 (**C**=O), 150.2 (**C**=O), 148.2 (**C**$_{quat}$), 140.6 (**C**$_{quat}$), 130.1 (**CH**=CH), 129.8 (**C**$_{arom}$), 128.5 (**C**$_{arom}$), 125.7 (CH=**CH**), 43.4 (N-**CH**$_{2\text{-major}}$), 39.1 (N-**CH**$_{2\text{-minor}}$), 17.8 (CH-**CH**$_{3\text{-major}}$), 13.2 (CH-**CH**$_{3\text{-minor}}$).

HRMS: (ESI/APCI): m/z: calcd for $[M-H]^+$ $C_{10}H_{110}N_4NaO_2$ 218.0694, found 218.0696.

Rf : 0.57 (DCM/MeOH 95:5).

1-(But-2-en-1-yl)-5-(phenylamino)pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (95)



Chemical Formula: $C_{14}H_{15}N_3O_2$
Molecular Weight: 257,2930

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 91%).

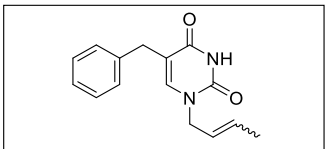
^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-d_6) δ 10.21 (bs, 1H, NH), 7.44 (s, 1H, H_6), 7.18 (dd, 2H, *J* = 8.6, 7.4 Hz, 2 x H_{arom}), 7.01-6.94 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 6.82-6.73 (m, 1H, H_{arom}), 6.32 (bs, 1H, NH), 5.89-5.55 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.39-4.45 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.32 (ddt, 2H, *J* = 6.0, 2.2, 1.1 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.83-1.81 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.73 – 1.67 (m, 2H, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-d_6) δ 162.2 (**C**=O), 145.6 (**C**=O), 130.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.5 (C=**CH**), 129.9 (2 x $\mathbf{C_{arom}}$), 126.5 (**CH**=CH), 125.7 (CH=**CH**), 120.3 ($\mathbf{C_{arom}}$), 118.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 116.5 (2 x $\mathbf{C_{arom}}$), 49.75 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 44.7 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 17.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-major}}}$), 13.1 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-minor}}}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{14}H_{16}N_3O_2$: 258.1234, found: 258.1234.

Rf : 0.4 (DCM/MeOH 95:5).

5-Benzyl-1-(but-2-en-1-yl)pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (97)



Chemical Formula: $C_{15}H_{16}N_2O_2$
Molecular Weight: 256,3050

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 97%).

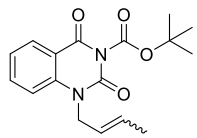
^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-d_6) δ 10.06 (bs, 1H, NH), 7.35 (s, 1H, H_6), 7.31-7.11 (m, 5H, 5 x H_{arom}), 5.82-5.41 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.39 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.26 (dt, 2H, *J* = 6.0, 1.1 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.59 (s, 2H, CH_2), 1.72-1.71 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.69-1.64 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-d_6) δ 164.2 (**C**=O), 151.5 (**C**=O), 142.3 (C=**CH**), 140.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.8 (**CH**=CH), 129.5 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.1 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 126.9 (CH=**CH**), 125.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 114.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 49.6 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 44.5 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 33.0 (C-$\mathbf{CH_2}$), 17.7 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-major}}}$), 13.0 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-minor}}}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{17}N_2O_2$: 257.1284, found: 257.1285.

Rf : 0.48 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (103a)



Chemical Formula: $C_{17}H_{20}N_2O_4$
Molecular Weight: 316,3570

Following the general procedure 5, from N^1-crotyl quinazolindione (0.7 g, 1 eq., 3.24 mmol), with Boc_2O (1.41 g, 2 eq., 6.48 mmol) and DMAP (0.2 g, 0.5 eq., 1.62 mmol) in THF (13 ml, 0.25 M). The title compound was obtained after purification as a white solid (0.96 g, *E/Z ratio = 85/15*, 94%).

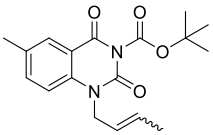
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.12 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.6 Hz, H_5), 7.81 (ddd, 1H, *J* = 8.8, 7.8, 1.6 Hz, H_7), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_8), 7.36 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_6), 5.86-5.71 (m, 1H, $H_{2'}$), 5 66-5.41 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.87 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.73 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.68 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.68 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.61 (s, 9H. H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 160.1 (**C**=O), 148.9 (**C**=O), 141.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 126.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 130.0 (**CH**=CH), 129.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 128.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.2 (CH=**CH**), 124.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 86.5 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 45.5 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}major}}$), 41.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}minor}}$), 27.6 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$), 17.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-}major}}$), 13.4 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-}minor}}$).

HRMS-ESI (m/z) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{17}H_{20}N_2O_4Na$: 339.1314, found: 339.1314.

Rf : 0.81 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 1-(but-2-en-1-yl)-6-methyl-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (103b)



Chemical Formula: $C_{18}H_{22}N_2O_4$
Molecular Weight: 330,3840

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 94%).

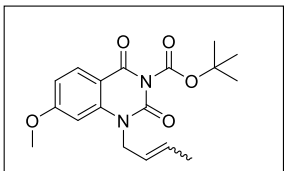
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91 (s, 1H, H_5), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H_7), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 5.84-5.70 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.65-5 40 {m, 1H, $H_{3'}$), 4.34 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.70 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 2.41 (s, 3H, C-CH_3), 1.85 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, $H_{4'\text{minor}}$), 1.67 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.60 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 159.3 (**C**=O), 148.1 (**C**=O), 138.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 136.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 133.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 129.0 (**CH**=CH), 127.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 124.3 (CH=**CH**), 115.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 85.5 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 44.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}major}}$), 40.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}minor}}$), 26.7 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$), 19.4 (C-$\mathbf{CH_3}$), 16.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-}major}}$), 12.4 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-}minor}}$).

HRMS-ESI (m/z) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{18}H_{22}N_2O_4Na$: 353.1470, found: 353.1469.

Rf : 0.81 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 1-(but-2-en-1-yl)-7-methoxy-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (103c)



Chemical Formula: $C_{18}H_{22}N_2O_5$
Molecular Weight: 346,3830

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 64%).

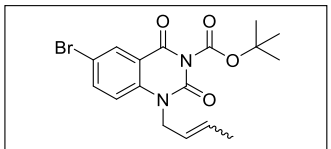
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 8.03 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_5), 6.92 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.3 Hz, H_6), 6.89 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_8), 5.92-5.73 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.67-5.42 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.86 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.73 (dt, 2H, *J* = 5.6, 1.3 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.96 (s, 3H, O-CH_3), 1.88 (d, 3H, *J* = 9.7 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.73-1.67 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$), 1.59 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 159.6 (**C**=O), 149.2 (**C**=O), 149.1 (**C**$_{quat}$), 143.3 (**C**$_{quat}$), 130.9 (**C**$_{arom}$), 130.1 (**CH**=CH), 129.0 (**C**$_{quat}$), 125.3 (CH=**CH**), 111.2 (**C**$_{arom}$), 109.2 (**C**$_{quat}$), 100.6 (**C$_{arom}$**), 86.3 (O-**C**$_{quat}$), 56.4 (O-**CH$_3$**), 45.3 (N-**CH$_{2\text{-major}}$**), 41.2 (N-**CH$_{2\text{-minor}}$**), 27.6 (3 x C-**CH$_{3Boc}$**), 17.8 (CH-**CH$_{3\text{-major}}$**), 13.4 (CH-**CH$_{3\text{-minor}}$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{23}N_2O_5$: 347.1600, found: 347.1602.

Rf : 0.81 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 6-bromo-1-(but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (103d)



Chemical Formula: $C_{17}H_{19}BrN_2O_4$
Molecular Weight: 395,2530

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 80%).

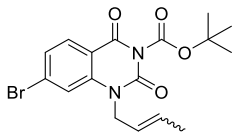
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 8.18 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_5), 7.92 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.5 Hz, H_7), 7.46 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_8), 5.88-5.71 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.65-5.40 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.86 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.76-4.69 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 1.85 (d, 3H, *J* = 8.6 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.67 (dd, 3H, *J* = 6.5, 1.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.60 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 159.1 (**C**=O), 148.6 (**C**=O), 148.5 (**C**$_{quat}$), 140.6 (**C**$_{quat}$), 139.1 (**C**$_{arom}$), 130.9 (**C**$_{arom}$), 130.1 (**CH**=CH), 124.8 (CH=**CH**), 118.7 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{quat}$), 116.1 (**C**$_{quat}$), 86.9 (O-**C**$_{quat}$), 44.5 (N-**CH$_{2\text{-major}}$**), 41.2 (N-**CH$_{2\text{-minor}}$**), 27.6 (3 x C-**CH$_{3Boc}$**), 178 (CH-**CH$_{3\text{-major}}$**), 13.4 (CH-**CH$_{3\text{-minor}}$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_4Na$: 418.0420, found: 418.0420.

Rf : 0.80 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 7-bromo-1-(but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (103e)



Chemical Formula: $C_{17}H_{19}BrN_2O_4$
Molecular Weight: 395,2530

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 85%).

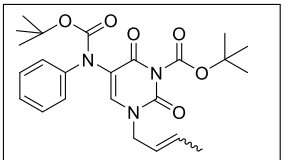
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.7 Hz, H_5), 7.68 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H_6), 7.59-7.50 (m, 1H, H_8), 5.91-5.78 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.69-5.45 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.90 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.78 (dd, 2H, *J* = 5.4, 1.4 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.90 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.71 (dd, 3H, *J* = 6.5, 1.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.62 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 159.6 (**C**=O), 148.8 (**C**=O), 148.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 142.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 129.8 (**CH**=CH), 127.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.0 (CH=**CH**), 119.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 86.8 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 45.4 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 41.4 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 27.6 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$), 17.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-major}}}$), 14.51 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-minor}}}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_4Na$: 418.0422, found: 418.0422.

Rf : 0.80 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 3-(but-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-5-(phenylamino)-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate(104)



Chemical Formula: $C_{24}H_{31}N_3O_6$
Molecular Weight: 457,5270

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 96%).

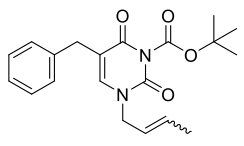
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 7.93 (s, 1H, $H_{6\text{-minor}}$), 7.91 (s, 1H, $H_{6\text{-major}}$), 7.39-7.28 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.18 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, H_{arom}), 5.86-5.76 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.67-5.49 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.37 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.75 (d, 3H, *J* = 8.0 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.70 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.57 (s, 9H, H_{Boc}), 1.42 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d$_6$*) δ 159.5 (**C**=O), 154.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 149.0 (**C**=O), 148.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 143.5 (C=**CH**), 131.8 (**CH**=CH), 129.3 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 126.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.6 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 125.6 (CH=**CH**), 124.72 ($\mathbf{C}_{quat}$), 118.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 86.8 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 81.6 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 50.7 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 45.9 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 28.22 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$), 27.6 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$) , 17.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-major}}}$), 14.5 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-minor}}}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{32}N_3O_6$: 458.2285, found: 458.2285.

Rf : 0.70 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 5-benzyl-3-(but-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate (105)



Chemical Formula: $C_{20}H_{24}N_2O_4$
Molecular Weight: 356,4220

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 95%).

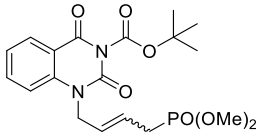
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 7.47 (s, 1H, H_6), 7.30-7.26 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.23-7.16 (m, 1H, H_{arom}), 5.83-5.74 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.62-5.48 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.44 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.31 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.62 (s, 2H, C-CH_2), 1.69 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 1.55 (s, 9H, H_{Boc}).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.6 (**C**=O), 149.2 (**C**=O), 142.4 (C=**CH**), 140.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.7 (**CH**=CH), 130.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 129.6 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.2 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 127.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.8 (CH=**CH**), 114.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 86.3 (O-$\mathbf{C}_{quat}$), 50.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 45.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 33.1 (C-$\mathbf{CH_2}$), 27.6 (3 x C-$\mathbf{CH_{3Boc}}$), 17.8 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-major}}}$), 13.1 (CH-$\mathbf{CH_{3\text{-minor}}}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{20}H_{24}N_2NaO_4$: 379.1628, found: 379.1626.

Rf : 0.71 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 1-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (106a)



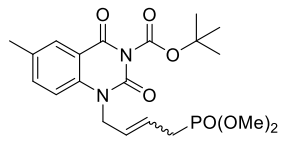
Chemical Formula: $C_{19}H_{25}N_2O_7P$
Molecular Weight: 424,3898

Following the general procedure 6A, from *N*^{1}-crotyl-*N*^{3}-Boc-quinazolindione (0.45 g, 1 eq., 1.41 mmol), with dimethylallyl phosphonate (0.92 g, 4 eq., 5.63 mmol) and G-II (0.18 g, 0.15 eq., 0.21 mmol) in DCM (14.1 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{19}H_{25}N_2NaO_7P$: 447.1756, found: 447.1757.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-6-methyl-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (106b)



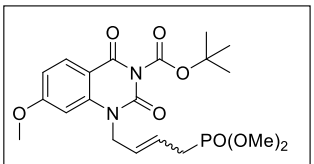
Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_2O_7P$
Molecular Weight: 438,4168

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{20}H_{27}N_2NaO_7P$: 461.1446 found: 461.1448.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-7-methoxy-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (106c)



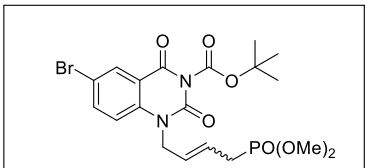
Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_2O_8P$
Molecular Weight: 454,4158

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{20}H_{27}N_2NaO_8P$: 477.1577, found: 477.1580.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 6-bromo-1-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (106d)



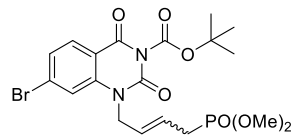
Chemical Formula: $C_{19}H_{24}BrN_2O_7P$
Molecular Weight: 503,2858

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{19}H_{24}BrN_2NaO_7P$: 526.0398, found: 526.0396.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 7-bromo-1-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (106e)



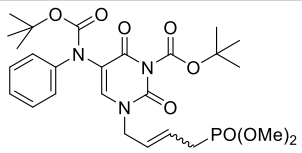
Chemical Formula: $C_{19}H_{24}BrN_2O_7P$
Molecular Weight: 503,2858

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{19}H_{24}BrN_2NaO_7P$: 526.0398, found: 526.0397.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 3-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-5-(phenylamino)-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate (107)



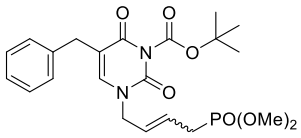
Chemical Formula: $C_{26}H_{36}N_3O_9P$
Molecular Weight: 565,5598

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{26}H_{36}N_3NaO_9P$: 588.2081, found: 588.2078.

Rf : 0.41 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 5-benzyl-3-(4-(dimethoxyphosphoryl)but-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate (108)



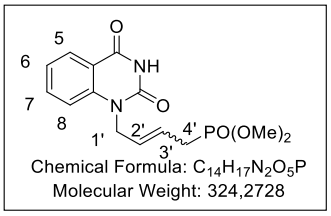
Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_2O_7P$
Molecular Weight: 464,4548

The title compound was prepared according to the general procedure 6A, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{22}H_{29}N_2NaO_7P$: 487.1604, found: 487.1603.

Rf : 0.43 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (102a)



Following the general procedure 8, from N^1-butylphosphonate-N^3-Boc-6-brromo quinazolindione (0.61 g, 1 eq., 1.44 mmol), with TFA (1.74 mL, 20 eq., 28.75 mmol) in DCM (28.8 ml, 0.05 M). The title compound was obtained after purification as a white/green solid (0.19 g, *E/Z ratio = 85/15*, 51% over two steps).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.60 (bs, 1H, NH), 8.00 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.5 Hz, H_5), 7.72 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 7.8, 1.5 Hz, H_7), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 7.26 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_6), 5.78-5.51 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.80-4.77 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.68 (t, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.70 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.66 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.58 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.53 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.93 (dd, 2H, *J* = 21.7, 6.7 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.66 (dd, 2H, *J* = 21.7, 6.7 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

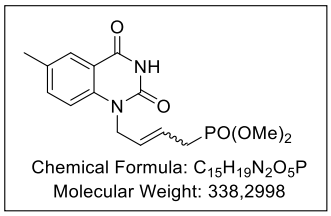
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.7 (**C**=O), 150.0 (**C**=O), 140.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 135.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 129.2 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.4 Hz, **CH**=CH), 127.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 122.55 ($\mathbf{C}_{arom}$), 122.5 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.3 Hz, CH=**CH**), 115.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 52.2 (O-$\mathbf{CH_3}$), 52.2 (O-$\mathbf{CH_3}$), 43.2 (N-$\mathbf{CH_2}$), 27.9 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 136.7 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$).

^{31}P NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 29.58 (P_Z), 29.25 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{14}H_{17}N_2O_5P$: 325.2695, found: 325.2696.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(6-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (102b)



The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as a white/green foam (*E/Z ratio = 85/15*, 56% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.25 (bs, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, H_5), 7.55 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz, H_7), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_8), 5.82-5.62 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.88 (t, 2H, *J* = 3.6 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.74 (t, 1H, *J* = 4.6 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.76 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.74 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.63 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.61 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.92 (dd, 2H, *J* = 22.5, 6.1 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.61 (dd, 2H, *J* = 21.8, 6.9 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 2.38 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 162.4 (**C**=O), 150.8 (**C**=O), 140.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 136.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 133.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 129.2 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 15.1 Hz, **CH**=CH), 128.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 123.8 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.8 Hz, CH=**CH**), 117.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 52.9 (O-$\mathbf{CH_{3\text{-}minor}}$), 52.8 (O-$\mathbf{CH_{3\text{-}minor}}$), 52.7 (O-$\mathbf{CH_{3\text{-}major}}$), 52.7 (O-$\mathbf{CH_{3\text{-}major}}$),

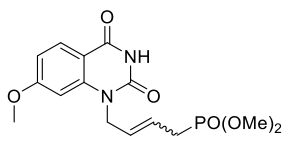
44.4 (N-**$CH_{2\text{-major}}$**), 40.7 (N-**$CH_{2\text{-minor}}$**), 29.5 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 138.58 Hz, CH-**$CH_{2\text{-major}}$**), 26.5 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.3 Hz, CH-**$CH_{2\text{-minor}}$**), 20.3 (C-**$CH_{3\text{-major}}$**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 28.76 (P_Z), 28.28 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{19}N_2O_5P$: 339.1104, found: 339.1104.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(7-methoxy-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (102c)



Chemical Formula: $C_{15}H_{19}N_2O_6P$
Molecular Weight: 354,2988

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 42% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.42 (bs, 1H, NH), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_5), 6.83 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.2 Hz, H_6), 6.77 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H_8), 5.64-5.60 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.79-4.73 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.69 (t, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.89 (s, 3H, O-CH_3), 3.69 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.66 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.55 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.53 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.96 (dd, 2H, *J* = 22.6, 6.4 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.68 (dd, 2H, *J* = 21.6, 6.8 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

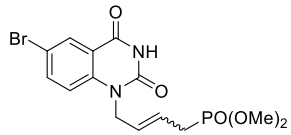
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 164.6 (**C**=O), 161.2 (**C_{quat}**), 150.3 (**C**=O), 142.6 (**C_{quat}**), 129.3 (**C_{arom}**), 128.7 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.5 Hz, **CH**=CH), 122.6 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.9 Hz, CH=**CH**), 110.0 (**C_{arom}**), 108.8 (**C_{quat}**), 99.3 (**C_{arom}**), 55.7 (C-O-**CH_3**), 52.3 (O-**$CH_{3\text{-minor}}$**), 52.3 (O-**$CH_{3\text{-minor}}$**), 52.2 (O-**$CH_{3\text{-major}}$**), 52.1 (O-**$CH_{3\text{-major}}$**), 43.3 (N-**$CH_{2\text{-major}}$**), 36.85 (N-**$CH_{2\text{-minor}}$**), 27.8 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 136.4 Hz, CH-**$CH_{2\text{-major}}$**), 24.3 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 136.7 Hz, CH-**$CH_{2\text{-minor}}$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 29.35.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{20}N_2O_6P$: 355.1053, found: 355.1053.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(6-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (102d)



Chemical Formula: $C_{14}H_{16}BrN_2O_5P$
Molecular Weight: 403,1688

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as a white/green solid (*E/Z ratio = 85/15*, 48% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.43 (bs, 1H, NH), 8.15 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_5), 7.85 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.5 Hz, H_7), 7.40 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_8), 5.82-5.67 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.92-4.90 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.77 (t, 2H, *J* = 5.2 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.76 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.73 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.64 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.61 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.61 (dd, 2H, *J* = 22.2, 6.6 Hz, $H_{4'}$).

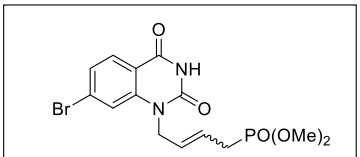
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.2 (**C**=O), 150.8 (**C**=O), 141.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 138.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 130.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 129.4 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.2 Hz, **CH**=CH), 125.4 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.0 Hz, CH=**CH**), 119.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 118.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 52.3 (O-$\mathbf{CH_3}$), 52.2 (O-$\mathbf{CH_3}$), 43.2 (N-$\mathbf{CH_2}$), 28.0 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 136.5 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 28.07.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M]^+$ calcd for $C_{14}H_{17}BrN_2O_5P$: 403.0052, found: 403.0053.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(7-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (102e)



Chemical Formula: $C_{14}H_{16}BrN_2O_5P$
Molecular Weight: 403,1688

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 55% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.72 (s, 1H, NH), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_5), 7.58 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H_8), 7.44 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.6 Hz, H_6), 5.76-5.66 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.63-5.51 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.80 (t, 2H, *J* = 3.8 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.69 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.70 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.67 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.59 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.56 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.95 (dd, 2H, *J* = 22.5, 6.5 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.68 (dd, 2H, *J* = 21.7, 7.1 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

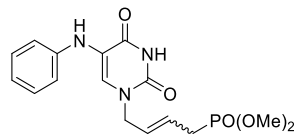
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.2 (**C**=O), 149.8 (**C**=O), 141.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 129.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 129.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 128.3 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.5 Hz, **CH**=CH), 125.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 122.3 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.8 Hz, CH=**CH**), 117.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 114.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 52.2 (O-$\mathbf{CH_3}$), 52.2 (O-$\mathbf{CH_3}$), 43.2 (N-$\mathbf{CH_2}$), 28.0 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 136.3 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 29.16 (P_E), 28.93 (P_Z).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M]^+$ calcd for $C_{14}H_{17}BrN_2O_5P$: 403.0052, found: 403.0051.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-5-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (109)



Chemical Formula: $C_{16}H_{20}N_3O_5P$
Molecular Weight: 365,3258

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as a white/blue foam (*E/Z ratio = 85/15*, 53%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.71 (bs, 1H, NH), 7.59 (s, 1H, $H_{6\text{-minor}}$), 7.44 (s, 1H, $H_{6\text{-major}}$), 7.17 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, 2 x H_{arom}), 6.98 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, 2 x H_{arom}), 6.75 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 6.47 (bs, 1H, NH), 5.77 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, $H_{2',3'}$), 4.50 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.41-4.35 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 3.70 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.67 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.63 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 2.87 (dd, 2H, *J* = 22.6, 7.6 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.67 (dd, 2H, *J* = 21.7, 5.6 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

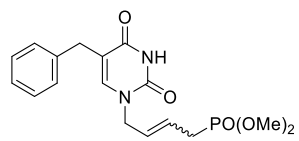
^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 162.5 (**C**=O), 150.3 (**C**=O), 145.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.2 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.4 Hz, **CH**=CH), 130.0 (C=**CH**), 129.9 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 125.1 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.9 Hz, CH=**CH**)., 120.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 116.5 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 52.9 (O-$\mathbf{CH_3}$), 52.8 (O-$\mathbf{CH_3}$) , 49.5 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 45.2 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 29.4 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 138.38 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 25.1 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 137.9 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 28.73.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{21}N_3O_5P$: 366.1213, found: 366.1213.

Rf : 0.30 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(5-benzyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (110)



Chemical Formula: $C_{17}H_{21}N_2O_5P$
Molecular Weight: 364,3378

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 51%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.43 (bs, 1H, NH), 7.65 (s, 1H, $H_{6\text{-minor}}$), 7.41 (s, 1H, $H_{6\text{-major}}$), 7.31-7.22 (m, 5H, 5 x H_{arom}), 5.79-5.59 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.47 (t, 2H, *J* = 4.4 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.32 (t, 2H, *J* = 4.4 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 3.73 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.69 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.65 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.59 (s, 2H, C-CH_2), 2.86 (dd, 2H, *J* = 22.6, 6.6 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.66 (dd, 2H, *J* = 21.7, 5.8 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

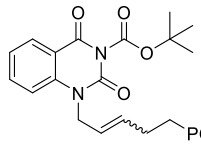
^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 164.4 (**C**=O), 151.6 (**C**=O), 142.5 (C=**CH**), 140.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.0 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.4 Hz, **CH**=CH), 129.4 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.0 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 126.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.2 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.9 Hz, CH=**CH**), 114.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 52.9 (O-$\mathbf{CH_3}$), 52.8 (O-$\mathbf{CH_3}$), 49.3 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 44.8 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$), 33.0 (C-$\mathbf{CH_2}$), 29.3 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 138.22 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-major}}}$), 25.1 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 137.8 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-minor}}}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 28.81 (P_Z), 28.58 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{22}N_2O_5P$: 365.1258, found: 365.1260.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(5-(diethoxyphosphoryl)pent-2-en-1-yl)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (112a)



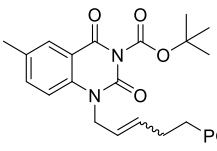
Chemical Formula: $C_{22}H_{31}N_2O_7P$
Molecular Weight: 466,4708

Following the general procedure 7, from N^1-crotyl-N^3-Boc-quinazolindione (0.45 g, 1 eq., 1.41 mmol), with dimethyl homoallyl phosphonate (1.08 g, 4 eq., 5.64 mmol) and G-II (0.18 g, 0.15 eq., 0.21 mmol) in DCM (14.1 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{22}H_{31}N_2NaO_7P$: 489.1761, found: 489.1761.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(5-(diethoxyphosphoryl)pent-2-en-1-yl)-6-methyl-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (112b)



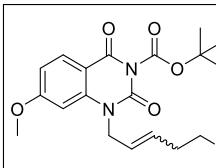
Chemical Formula: $C_{23}H_{33}N_2O_7P$
Molecular Weight: 480,4978

The title compound was prepared according to the general procedure 7, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{33}N_2NaO_7P$: 503.1915, found: 503.4917.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 1-(5-(diethoxyphosphoryl)pent-2-en-1-yl)-7-methoxy-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (112c)



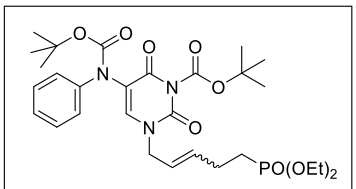
Chemical Formula: $C_{23}H_{33}N_2O_8P$
Molecular Weight: 496,4968

The title compound was prepared according to the general procedure 7, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{33}N_2NaO_7P$: 519.1873, found: 519.1866.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 3-(5-(diethoxyphosphoryl)pent-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-5-(phenylamino)-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate (119)



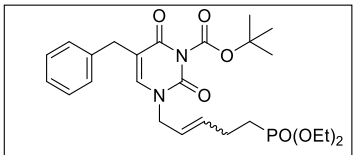
Chemical Formula: $C_{29}H_{42}N_3O_9P$
Molecular Weight: 607,6408

The title compound was prepared according to the general procedure 7, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{42}N_3O_9P$: 608.2737, found: 608.2731.

Rf : 0.48 (DCM/MeOH 95:5).

Tert-butyl 5-benzyl-3-(5-(diethoxyphosphoryl)pent-2-en-1-yl)-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidine-1(*2H*)-carboxylate (120)



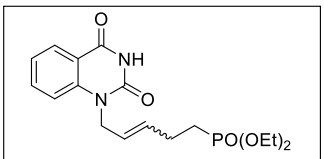
Chemical Formula: $C_{25}H_{35}N_2O_7P$
Molecular Weight: 506,5358

The title compound was prepared according to the general procedure 7, affording after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{25}H_{35}N_2NaO_7P$: 529.2074 found: 529.2081.

Rf : 0.48 (DCM/MeOH 95:5).

Diethyl (5-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate (113a)



Chemical Formula: $C_{17}H_{23}N_2O_5P$
Molecular Weight: 366,3538

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (20% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.32 (s, 1H, NH), 8.09 (dd, 1H, *J* = 7.8, 3.5 Hz, H_5), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.7, 7.8, Hz, H_7), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{8imp}), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 7.32-7.20 (m, 1H, H_6), 5.89-5.61 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.76-4.69 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.24-4.07 (m, 2H, O-$CH_{2\text{-minor}}$), 4.12-3.96 (m, 4H, 2 x O-$CH_{2\text{-major}}$), 2.60-2.45 (m, 2H, $H_{4'\text{-imp}}$), 2.39- 2.20 (m, 2H, $H_{4'}$), 1.83-1.66 (m, 2H, $H_{5'}$), 1.24 (td, 6H, *J* = 7.0, 4.1 Hz, 2 x CH_2-CH_3).

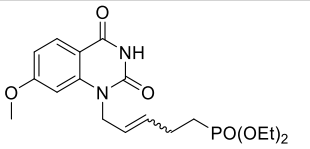
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 162.4 (**C**=O), 150.9 (**C**=O), 142.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 142.1 ($\mathbf{C}_{quat\text{-imp}}$), 136.0 ($\mathbf{C}_{arom\text{-imp}}$), 135.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 133.4 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 16.2 Hz, **CH**=CH), 132.0-131.2 (m, **CH**=CH_{imp}), 128.8 ($\mathbf{C}_{arom\text{-imp}}$), 128.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.1 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 10.1 Hz, CH=**CH**), 123.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 117.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115. ($\mathbf{C}_{arom\text{-imp}}$), 62.1-62.0 (m, O-$\mathbf{CH_{2\text{-imp}}}$), 62.0-61.9 (m, O-$\mathbf{CH_{2\text{-imp}}}$), 61.7 (O-$\mathbf{CH_2}$), 61.7 (O-$\mathbf{CH_2}$), 42.5 (N-$\mathbf{CH_2}$), 31.4 (CH-$\mathbf{CH_{2\text{-imp}}}$), 26.0 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 4.6 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$), 25.7 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 141.4 Hz, $\mathbf{CH_2}$-P), 16.8 (CH_2-$\mathbf{CH_{3\text{-imp}}}$), 16.8 ($CH_2$-$\mathbf{CH_3}$), 16.7 ($CH_2$-$\mathbf{CH_{3\text{-imp}}}$), 16.7 ($CH_2$-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 30.14 (*trans*pentenyl product), 26.37 (imp *trans*butenyl).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{24}N_2O_5P$: 367.1417, found: 367.1419.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH 95:5).

Diethyl (5-(7-methoxy-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate (113c)



Chemical Formula: $C_{18}H_{25}N_2O_6P$
Molecular Weight: 396,3798

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (29% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.40 (s, 1H, NH), 7.91 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_5), 6.85 (dt, 1H, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H_6), 6.75 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H_8), 5.79-5.61 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.62-5.51 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.63 (dd, 2H, *J* = 5.5, 1.6 Hz, $H_{1'}$), 3.93 (dqd, 4H, *J* = 8.4, 6.9, 1.6 Hz, 2 x O-CH_2), 3.87 (s, 3H, O-CH_3), 2.26-2.12 (m, 2H, $H_{4'}$), 1.81-1.68 (m, 2H, $H_{5'}$), 1.18 (t, 6H, *J* = 7.1 Hz, 2 x CH_2-CH_3).

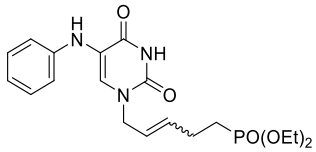
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 164.6 (**C**=O), 161.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 150.3 (**C**=O), 142.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.9 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 15.9 Hz, CH=**CH**), 129.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.1 (**CH**=CH), 109.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 108.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 99.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 60.8 (O-$\mathbf{CH_2}$), 60.8 (O-$\mathbf{CH_2}$), 55.8 (O-$\mathbf{CH_3}$), 43.3 (N-$\mathbf{CH_2}$), 24.7 (CH-$\mathbf{CH_2}$), 24.0 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 138.6 Hz, $\mathbf{CH_2}$-P), 16.2 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$), 16.2 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 30.92 (*trans*pentenyl product), 27.08 (imp *trans*butenyl).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{24}N_2O_6P$: 397.1524, found: 397.1523.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH 95:5).

Diethyl (4-(2,4-dioxo-5-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate (121)



Chemical Formula: $C_{19}H_{26}N_3O_5P$
Molecular Weight: 407,4068

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as a white foam (15% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.45 (s, 1H, NH), 7.50 (s, 1H, $H_{6\text{-imp}}$), 7.45 (s, 1H, H_6), 7.18 (dd, 2H, *J* = 8.5, 7.4 Hz, 2 x H_{arom}), 6.99 (dd, 2H, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 2 x H_{arom}), 6.93 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, $H_{arom\text{-imp}}$), 6.82-6.73 (m, 1H, H_{arom}), 6.51 (s, 1H, NH_{imp}), 6.39 (s, 1H, NH), 5.89 (dt, 1H, *J* = 15.2, 6.5 Hz, $H_{2'}$), 5.75-5.62 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.36 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, $H_{1'}$), 4.05 (dtt, 4H, *J* = 14.2, 7.1, 3.5 Hz, 2 x O-CH_2), 2.41-2.27 (m, 2H, $H_{4'}$), 1.89-1.75 (m, 2H, $H_{5'}$), 1.26 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz, 2 x CH_2-CH_3).

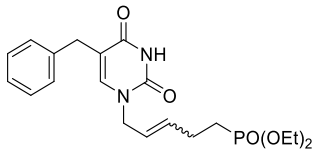
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 162.3 (**C**=O), 150.2 (**C**=O), 146.1 (C=**CH$_{imp}$**), 145.6 (C=**CH**), 135.0 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 16.1 Hz, **CH**=CH), 129.9 (2 x **C**$_{arom}$), 129.8 (**C**$_{arom\text{-imp}}$), 125.9 (CH=**CH**), 120.2 (**C**$_{arom}$), 118.8 (**C**$_{quat}$), 116.54 (2 x **C**$_{arom}$), 116.1 (**C**$_{arom\text{-imp}}$), 61.8 (O-**CH$_2$**), 61.8 (O-**CH$_2$**), 49.4 (N-**CH$_2$**), 26.8 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 4.5 Hz, CH-**CH$_2$**), 26.4 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 145.44 Hz, **CH$_2$**-P), 16.8 (CH_2-**CH$_3$**), 16.7 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 30.52 (*trans*pentenyl product), 26.70 (imp *trans*butenyl).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{26}N_3O_5P$: 408.1683, found: 408.1685.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

Diethyl (5-(5-benzyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate (122)



Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_2O_5P$
Molecular Weight: 406,4188

The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as white foam (19% over two steps).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.16 (bs, 1H, NH), 7.39 (s, 1H, H_6), 7.30-7.23 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.17 (ddt, 1H, *J* = 8.4, 5.0, 2.3 Hz, H_{arom}), 5.87-5.73 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.66-5.50 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.29 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, $H_{1'}$), 4.16-3.96 (m, 4H, 2 x O-CH_2), 3.60 (s, 2H, C-CH_2), 2.31 (dq, , 2H *J* = 13.6, 7.1 Hz, $H_{4'}$), 1.90-1.66 (m, 2H, $H_{5'}$), 1.27 (t, , 6H *J* = 7.1 Hz, 2 x CH_2-CH_3).

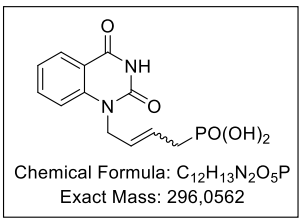
^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 164.3 (**C**=O), 151.6 (**C**=O), 142.3 (C=**CH**), 140.8 (**C**$_{quat}$), 135.1 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 15.3 Hz, **CH**=CH), 129.5 (2 x **C**$_{arom}$), 129.1 (2 x **C**$_{arom}$), 126.9 (**C**$_{arom}$), 125.7 (CH=**CH**), 114.4 (**C**$_{quat}$), 61.9 (O-**CH$_2$**), 61.8 (O-**CH$_2$**), 49.3 (N-**CH$_2$**), 33.0 (C-**CH$_2$**), 26.0 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 4.6 Hz, CH-**CH$_2$**), 25.7 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 140.5 Hz, **CH$_2$**-P), 16.8 (CH_2-**CH$_3$**), 16.77 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl3) δ 30.16 (*trans*pentenyl product), 26.50 (imp *trans*butenyl).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{20}H_{28}N_2O_5P$: 407.1735, found: 407.1730.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH 95:5).

(4-(2,4-Dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (128a)



Following the general procedure 9, from *N*^{1}-buthylphosphonate-quinazolindione (0.15 g, 1 eq., 0.46 mmol), with TMSBr (0.91 ml, 15 eq., 6.9 mmol) in ACN (15 ml). The title compound was obtained after lyophilisation as a white solid (0.13 g, *E/Z ratio = 85/15*, 95%).

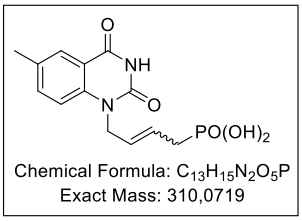
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.58 (bs, 1H, NH), 9.32 (bs, 2H, 2 x H_{POH}), 7.99 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.3 Hz, H_5), 7.77-7.63 (m, 1H, H_7), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_8), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_6), 5.77-5.49 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.78-4.73 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.69-4.59 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 2.67 (dd, 2H, *J* = 21.2, 5.7 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.38 (dd, 2H, *J* = 21.3, 5.6 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.8 (**C**=O), 150.0 (**C**=O), 140.8 (**C**$_{quat}$), 135.2 (**C**$_{arom}$), 127.4 (**C**$_{arom}$), 127.1 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.0 Hz, **CH**=CH), 125.0 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.2 Hz, CH=**CH**), 122.5 (**C**$_{arom}$), 115.7 (**C**$_{quat}$), 115.1 (**C**$_{arom}$), 43.4 (N-**CH$_2$**), 32.0 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 134.4 Hz, CH-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 22.04 (P_Z), 21.72 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{12}H_{13}N_2O_5P$: 296.0635, found: 296.0634.

(4-(6-Methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (128b)



The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 97%).

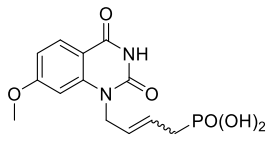
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.48 (s, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, H_5), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_7), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_8), 6.00-5.59 (bs, 2H, 2 x H_{POH}), 5.61-5.48 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.71-4.66 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.65-4.52 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 2.61 (dd, 2H *J* = 22.5, 7.5 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.32 (dd, 2H, *J* = 22.5, 7.5 Hz, H $H_{4'\text{-major}}$), 2.27 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 162.2 (**C**=O), 150.4 (**C**=O), 139.1 (**C**$_{quat}$), 136.5 (**C**$_{arom}$), 132.2 (**C**$_{quat}$), 127.7 (**CH**=CH), 127.5 (**C**$_{arom}$), 125.2 (d, J^2_{C-P} = 10.2 Hz, CH=**CH**), 115.9 (**C**$_{quat}$), 115.6 (**C**$_{arom}$), 43.8 (N-**CH$_2$**), 32.4 (d, J^1_{C-P} = 134.2 Hz, CH-**CH$_2$**), 20.4 (C-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 21.81 (P_Z), 21.62 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{13}H_{14}N_2O_5P$: 309.0645, found: 309.0645.

(4-(7-Methoxy-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (128c)



Chemical Formula: $C_{13}H_{15}N_2O_6P$
Exact Mass: 326,0668

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 94%).

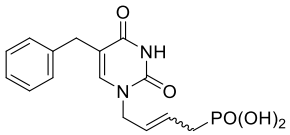
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.40 (s, 1H, NH), 7.88 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_5), 6.81 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_6), 6.76 (s, 1H, H_8), 6.48 (bs, 2H, 2 x H_{POH}), 5.77-5.53 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.81-4.72 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.70-4.58 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 3.87 (s, 3H, H_{13}), 2.66 (dd, 2H, *J* = 20.8, 6.9 $H_{12\text{-minor}}$), 2.40 (dd, 2H, *J* = 21.4, 6.7 Hz, $H_{12\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.7 (**C**=O), 161.3 (**C**$_{quat}$), 150.4 (**C**=O), 142.8 (**C**$_{quat}$), 129.3 (**C**$_{arom}$), 127.9 (d, J^3_{C-P} = 13.1 Hz, **CH**=CH$_{\text{-minor}}$), 125.1 (d, J^2_{C-P} = 10.3 Hz, CH=**CH$_{\text{-major}}$**), 124.4 (d, *J* = 10.8 Hz, CH=**CH$_Z$**), 110.2 (**C**$_{arom}$), 108.8 (**C**$_{quat}$), 99.2 (**C**$_{arom}$), 55.8 (O-**CH$_3$**), 43.6 (N-**CH$_2$**), 32.0 (d, *J* = 134.3 Hz, CH-**CH$_{2\text{-major}}$**), 28.3 (d, J^1_{C-P} = 133.1 Hz, CH-**CH$_{2\text{-minor}}$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ 22.19 (P_Z), 21.80 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{13}H_{14}N_2O_6P$: 325.0594, found: 325.0594.

(4-(5-Benzyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (130)



Chemical Formula: $C_{15}H_{17}N_2O_5P$
Exact Mass: 336,0875

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white foam (*E/Z ratio = 85/15*, 91%).

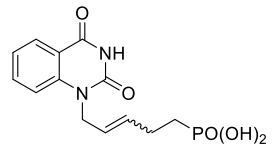
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.25 (bs 1H, NH), 8.89 (s, 2H, 2 x H_{POH}), 7.60 (s, 1H, $H_{6\text{-minor}}$), 7.57 (s, 1H, $H_{6\text{-major}}$), 7.27-7.17 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.17-7.09 (m, 1H, H_{arom}), 5.71-5.41 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.32 (dd, 2H, *J* = 6.5, 3.2 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.24 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 2.62 (dd, 2H, *J* = 22.1, 7.6 Hz, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.48-2.38 (m, 2H, $H_{4'\text{-major}}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.7 (**C**=O), 150.7 (**C**=O), 142.2 (C=**CH**), 139.9 (**C**$_{quat}$), 128.4 (2 x **C**$_{arom}$), 128.3 (2 x **C**$_{arom}$), 128.0 (d, J^3_{C-P} = 14.1 Hz, **CH**=CH), 126.0 (**C**$_{arom}$), 125.9 (d, J^2_{C-P} = 10.4 Hz, CH=**CH**), 112.5 (**C**$_{quat}$), 48.4 (N-**CH$_2$**), 32.8 (d, J^1_{C-P} = 134.3 Hz, CH-**CH$_2$**), 31.9 (C-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 22.85 (P_Z), 22.25 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{15}H_{16}N_2O_5P$: 305.0799, found: 305.0800.

(5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid (131a)



Chemical Formula: $C_{13}H_{15}N_2O_5P$
Exact Mass: 310,0719

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white foam (60%).

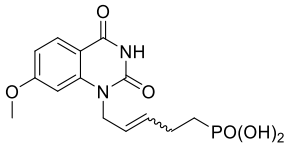
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.54 (s, 1H, NH), 11.52 (s, 0.6H, $H_{3\text{-imp}}$), 8.11-7.92 (bm, 10H, H_{OH}, H_5), 7.78-7.66 (m, 2H, H_7, $H_{7\text{-imp}}$), 7.44 (d, 0.59H, *J* = 8.5 Hz, $H_{8\text{-imp}}$), 7.37-7.30 (m, 1H, H_8), 7.24 (td, 2H, *J* = 7.5, 4.5 Hz, H_6, $H_{6\text{-imp}}$), 5.71-5.50 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.65-4.55 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.09-3.97 (m, 0.9H, $H_{1'\text{-imp}}$), 2.34 (ddd, 2H, *J* = 18.2, 13.4, 5.9 Hz, $H_{4'\text{-imp}}$), 2.15 (td, 2H, *J* = 9.7, 5.0 Hz, $H_{4'}$), 1.62-1.45 (m, 2H, $H_{5'}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.9 (**C**=O), 161.8 (**C**=O_{imp}), 150.1 (**C**=O), 140.9 (**C**$_{quat}$), 140.8 (**C**$_{quat\text{-imp}}$), 135.4 (**C**$_{arom\text{-imp}}$), 135.2 (**C**$_{arom}$), 132.6 (d, J^3_{C-P} = 17.3 Hz, **CH**=CH), 130.1-129.5 (m, **CH**=CH_{imp}), 127.7 (**C**$_{arom\text{-imp}}$), 127.5 (**C**$_{arom}$), 123.7 (CH=**CH**), 123.6-123.2 (m, CH=**CH**$_{imp}$), 122.57 (**C**$_{arom}$), 115.7 (**C**$_{quat}$), 115.2 (**C**$_{arom}$), 115.0-114.6 (m, **C**$_{arom\text{-imp}}$), 43.4 (N-**CH$_2$**), 26.4 (d, J^1_{C-P} = 135.7 Hz, **CH$_2$**-P), 25.3 (d, *J* = 3.9 Hz, CH-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 26.59, 22.94 (P_{imp}).

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{13}H_{14}N_2O_5P$: 309.0645, found: 309.0646.

(5-(7-Methoxy-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid (131c)



Chemical Formula: $C_{14}H_{17}N_2O_6P$
Exact Mass: 340,0824

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white foam (45%)

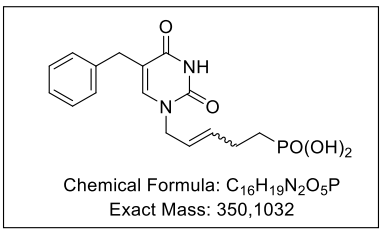
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.39 (s, 1H, NH), 9.80 (s, 2H, 2 x H_{POH}), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz H_5), 6.83 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.1 Hz, H_7), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz H_8), 5.82-5.69 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.59-5.42 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.67-4.57 (m, 2H, $H_{1'}$), 3.89 (s, 0.98H, *J* = 2.5 Hz, O-$CH_{3\text{-imp}}$), 3.84 (s, 3H, O-CH_3), 2.17 (td, 2H, *J* = 10.4, 5.3 Hz, $H_{4'}$), 1.64-1.48 (m, 2H, $H_{5'}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 164.8 (**C**=O$_{imp}$), 164.6 (**C**=O), 161.3 (**C**$_{quat}$), 150.3 (**C**=O), 142.7 (**C**$_{quat}$), 132.8 (d, J^3_{C-P} = 17.5 Hz, **CH**=CH), 129.4 (**C**$_{arom}$), 123.7 (CH=**CH**), 109.8 (**C**$_{arom}$), 109.0 (**C**$_{quat}$), 99.4 (**C**$_{arom}$), 55.9 (O-**CH$_3$**), 43.5 (N-**CH$_2$**), 26.9 (d, J^1_{C-P} = 135.7 Hz, **CH$_2$**-P), 25.4 (d, *J* = 3.9 Hz, CH-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 26.14, 25.41 (P$_{imp}$).

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{14}H_{16}N_2O_6P$: 339.0751, found: 309.0752.

(5-(5-Benzyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid (133)



The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white foam (55%).

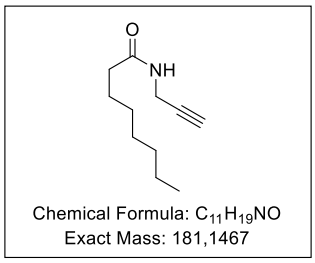
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.38 (s, 0.13H, NH $_{-imp}$), 11.24 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 2H, 2 x H$_{POH}$), 7.52 (s, 1H, H$_6$), 7.28 -7.10 (m, 5H, 5xH$_{arom}$), 7.14 (m, 2.04H, H$_{arom-imp}$), 5.67 (dd, 1H, *J* = 14.2, 7.6 Hz, H$_{2'}$), 5.56-5.44 (m, 1H, H$_{3'}$), 4.19 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, H$_{1'}$), 3.49 (s, 2H, C-CH$_2$), 2.41-2.25 (m, 0.77H, H$_{4'-imp}$), 2.19 (p, 2H, *J* = 10.9, 8.9 Hz, H$_{4'}$), 1.67-1.54 (m, 2H, H$_{5'}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.7 (**C**=O), 150.7 (**C**=O), 142.1 (C=**CH**), 139.9 (**C**$_{quat}$), 134.0 (**C**$_{arom-imp}$), 133.9 (**C**$_{arom-imp}$),132.7 (**CH**=CH), 128.4 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 126.0 (**C**$_{arom}$), 124.5 (**C**$_{arom-imp}$), 123.6 (CH=**CH**),112.62 (**C**$_{quat}$), 48.2 (N-**CH$_2$**), 31.8 (C-**CH$_2$**), 26.8 (d, J^1_{C-P} = 135.8 Hz, **CH$_2$**-P), 25.3 (d, *J* = 4.0 Hz, CH-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 26.72, 22.98 (P$_{imp}$).

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{16}H_{18}N_2O_5P$: 349.0961, found: 309.0958.

3-Nonanamidoprop-1-yn-1-yl (136)

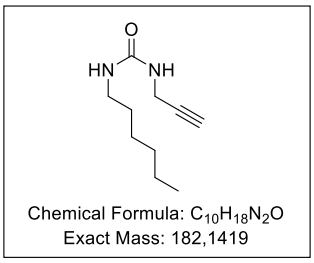


Propargylamine (1 eq.) was dissolved in anhydrous DCM (0.4 M), DIPEA (1.3 eq.) was added and the solution was cooled to 0 °C. Octanoyl chloride (1.1 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched with water, then diluted with DCM and washed with $NaHCO_3$ solution and brine. Organic layer was dried over MgSO4 and evaporated. The title compound was obtained without further purification as a solid (qtf).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 5.56 (bs, 1H, H_4), 4.06 (dd, 2H, *J* = 5.2, 2.6 Hz, H_3), 2.25-2.15 (m, 3H, $H_{1,6}$), 1.69-1.56 (m, 2H, H_7), 1.38-1.20 (m, 8H, $H_{8,9,10,11}$), 0.92- 0.81 (m, 3H, H_{12}).

CAS: 422284-34-2.

3-Hexylureido)prop-1-yn-1-yl (137)

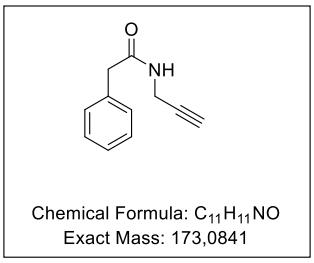


Propargylamine (1 eq.) was dissolved in anhydrous DCM (0.4 M) under an Ar atmosphere, and the resulting yellow solution was cooled to 0 °C. Hexyl isocyanate (1 eq.) dissolved in anhydrous DCM (0.78 M) was added drop-wise, the ice bath was removed, and the reaction mixture was stirred at rt for 45 min. The solvent was evaporated to obtained title compound as a solid (94%) without further purification

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 4.40 (bs, 2H, $H_{4,6}$), 3.99 (dd, 2H, *J* = 5.5, 2.5 Hz, H_3), 3.22-3.12 (m, 2H, H_7), 2.23 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_1), 1.56-1.43 (m, 2H, H_8), 1.38-1.22 (m, 6H, $H_{9,10,11}$), 0.94-0.81 (m, 3H, H_{12}).

CAS: 1311414-23-9.

2-Phenylacetamido)prop-1-yn-1-yl (138)

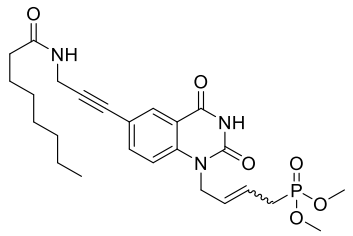


Propargylamine (1 eq.) was dissolved in anhydrous DCM (0.41 M), DIPEA (1.3 eq.) was added and the solution was cooled to 0 °C. Phenylacetyl chloride (1.1 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched with water, then diluted with DCM and washed with $NaHCO_3$ solution and brine. Organic layer was dried over MgSO4 and evaporated. The title compound was obtained without further purification as a solid (93%).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42-7.22 (m, 5H, H_{arom}), 5.54 (bs, 1H, H_4), 4.01 (dd, 2H, *J* = 5.3, 2.6 Hz, H_3), 3.60 (s, 2H, H_6), 2.18 (t, 1H, *J* = 2.6 Hz, H_1).

CAS: 174271-37-5.

Dimethyl (4-(6-(3-nonanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (140a)



Chemical Formula: $C_{25}H_{34}N_3O_6P$
Molecular Weight: 503,5358

Following the general procedure 10A, from N^1-crotyl-6-brromo quinazolindione (0.12 g, 1 eq., 0.3 mmol), with CuI (0.011 g, 0.2 eq., 0.06 mmol), Et_3N (0.24 ml, 3 eq., 0.9 mmol), C7 alkyn chain (0.162 g, 3 eq., 0.9 mmol) and $Pd(P\Phi_3)_4$ (0.034 g, 0.1 eq., 0.03 mmol) in DMF (3.42 ml, 0.087 M). The title compound was obtained after short purification as a light orange solid (0.14 g, *E/Z ratio = 85/15*, 91%).

^{1}H NMR (250 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 8.12 (s, 1H, H_5), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_7), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 5.90-5.80 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.75-5.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.85-4.73 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.22 (s, 2H, H_{17}), 3.85 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.80 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.73 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.68 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.03 (dd, 2H, *J* = 21.9, 7.1 Hz, $H_{4'\text{-}minor}$), 2.73 (dd, 2H, *J* = 21.9, 7.1 Hz, $H_{4'\text{-}major}$), 2.26 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, C-CH_2), 1.75-1.57 (m, 2H, CH_2), 1.45-1.22 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.96-0.86 (m, 3H, CH_3).

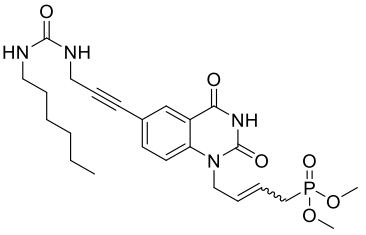
^{13}C NMR (63 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 176.0 (NH-**C**=O), 163.3 (**C**=O), 151.7 (**C**=O), 142.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 138.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 131.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 130.1 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 20.8 Hz, **CH**=CH), 129.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 123.3 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 17.5 Hz, CH=**CH**), 116.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 87.3 (CH_2-**C**), 81.4 (C≡**C**-C), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 53.4 (O-$\mathbf{CH_3}$), 43.8 (N-$\mathbf{CH_2}$) 36.8 (O=C-$\mathbf{CH_2}$), 32.9 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 30.2 (m, N-$\mathbf{CH_2}$-C, 2x$\mathbf{CH_2}$), 29.2 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.8 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$-P), 26.9 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 23.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 14.3 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 30.41 (P_E), 22.92 (P_Z).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{35}N_3O_6P$: 504.2257, found: 504.2256.

Rf : 0.21 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(6-(3-(3-hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (140b)



Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_4O_6P$
Molecular Weight: 504,5238

The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (*E/Z ratio = 85/15*, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 8.09 (s, 1H, H_5), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_7), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_8), 5.86-5.77 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.70-5.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.78-4.73 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.13 (s, 2H, C-CH_2), 3.81 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.78 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.69 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.66 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.14 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, NH-CH_2), 2.70 (dd, 2H, *J* = 21.9, 7.2 Hz, $H_{4'}$), 1.49 (p, 2H, *J* = 7.1, 6.6 Hz, CH_2), 1.36-1.30 (m, 6H, 3 x CH_2), 0.95-0.84 (m, 3H, CH_3).

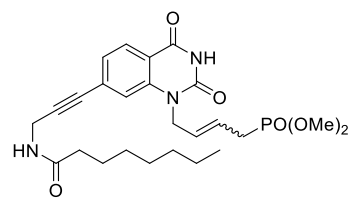
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 179.1 (NH-**CO**-NH), 163.6 (**C**=O), 153.3 (**C**=O), 141.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 139.1 ($\mathbf{C}_{arom}$),131.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 130.3 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.5 Hz, **CH**=CH), 128.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 123.3 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.2 Hz, CH=**CH**), 116.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 88.6 (CH_2-**C**), 81.2 (C≡**C**-C), 53.5 (O-$\mathbf{CH_3}$), 53.5 (O-$\mathbf{CH_3}$), 44.9 (N-$\mathbf{CH_2}$), 41.1 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 32.7 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 31.2 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 31.0 (NH-$\mathbf{CH_2}$-C), 29.3 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 140.3 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$-P), 27.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 23.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 14.3 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 30.36 (P_E), 19.98 (P_Z).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{34}N_4O_6P$: 505.2208, found: 505.2210.

Rf : 0.20 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(7-(3-nonanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (141a)



Chemical Formula: $C_{25}H_{34}N_3O_6P$
Molecular Weight: 503,5358

The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (*E/Z ratio = 85/15*, 96%).

^{1}H NMR (250 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 8.07 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_5), 7.40 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, H_8), 7.31 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_6), 5.86 (dt, 1H, *J* = 14.9, 4.8 Hz, $H_{2'}$), 5.78-5.55 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.80 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, $H_{1'}$), 4.29 (s, 2H, C-CH_2), 3.90 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.85 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.77 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.73 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 2.77 (dd, 2H, *J* = 21.9, 7.1 Hz, $H_{4'}$), 2.30 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, C-CH_2), 1.70 (p, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH_2), 1.46-1.28 (m, 8H, 4 x CH_2), 1.01-0.88 (m, 3H, CH_3).

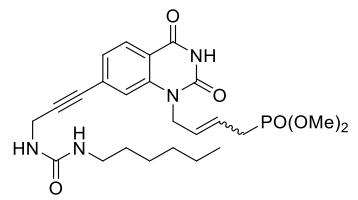
^{13}C NMR (63 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 175.9 (CH_2-**CO**-NH), 163.5 (**C**=O), 151.9 (**C**=O), 142.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.2 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.5 Hz, **CH**=CH), 129.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 127.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 123.0 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.3 Hz, CH=**CH**), 119.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 90.8 (CH_2-**C**), 82.2 (C≡**C**-C), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 53.5 (O-$\mathbf{CH_3}$), 44.9 (N-$\mathbf{CH_2}$), 36.8 (CO-$\mathbf{CH_2}$), 32.8 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 30.2 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 30.1 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 30.1 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 29.3 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.8 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$-P), 26.8 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 23.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 14.3 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 30.31 (P_E), 22.90 (P_Z).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{35}N_3O_6P$: 504.2256, found: 504.2257.

Rf : 0.21 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(7-(3-(3-hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (141b)



Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_4O_6P$
Molecular Weight: 504,5238

The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (*E/Z ratio = 85/15*, 80%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 8.07 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_5), 7.40 (s, 1H, H_8), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_7), 5.84 (dt, 1H, *J* = 15.1, 5.8 Hz, $H_{2'}$), 5.63 (dq, 1H, *J* = 15.1, 7.3 Hz, $H_{3'}$), 4.78 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, $H_{1'}$), 4.20 (s, 2H, C-CH_2), 3.86 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.83 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.74 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.71 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.15 (dt, 2H, *J* = 15.0, 7.1 Hz, NH-CH_2), 2.74 (dd, 2H, *J* = 21.9, 7.3 Hz, $CH_{4'}$), 1.52 (q, 2H, *J* = 7.3, 6.8 Hz, CH_2), 1.44-1.30 (m, 6H, 3 x CH_2), 0.94 (q, 3H, *J* = 5.0, 4.5 Hz, CH_3).

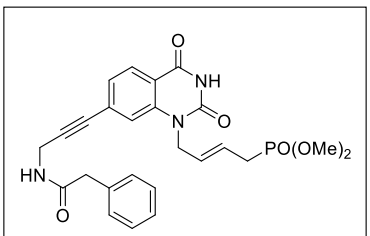
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 163.5 (**C**=O), 160.6 (NH-**CO**-NH), 151.9 (**C**=O), 142.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.3 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.5 Hz, **CH**=CH), 129.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 127.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 122.9 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.4 Hz, CH=**CH**), 119.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 92.2 (CH_2-**C**), 81.9 (C≡**C**-C), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 44.8 (N-$\mathbf{CH_2}$), 41.1 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 32.7 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 31.2 (NH-$\mathbf{CH_2}$-C), 31.0 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 29.3 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.3 Hz, CH-$\mathbf{CH_2}$-P), 27.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 27.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 23.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 14.3 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 30.32 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{34}N_4O_6P$: 505.2210, found: 505.2209.

Rf : 0.20 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-7-(3-(2-phenylacetamido)prop-1-yn-1-yl)-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (141c)



Chemical Formula: $C_{25}H_{26}N_3O_6P$
Molecular Weight: 495,4718

The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (81%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.36 (bs, 1H, NH), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_5), 7.40 (s, 1H, H_8), 7.38-7.34 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.33-7.28 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.27-7.19 (m, 2H, H_7, H_{arom}), 5.77 (td, 2H, *J* = 5.2, 4.8, 3.5 Hz, $H_{2',3'}$), 4.80 (t, 2H, *J* = 4.1 Hz, $H_{1'}$), 4.24 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, C-CH_2), 3.79 (s, 3H,

$H_{POMe\text{-}minor}$), 3.76 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.64 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.62 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.58 (s, 2H, C-CH_2), 2.73-2.63 (m, 2H, $H_{4'}$).

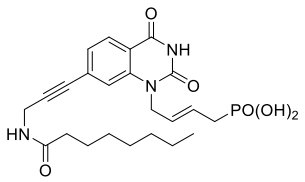
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 170.8 (CH_2-**CO**-NH), 161.9 (**C**=O), 150.8 (**C**=O), 142.2 (**C**$_{quat}$), 137.1 (**C**$_{quat}$), 130.2 (**C**$_{quat}$), 130.0 (2 x **C**$_{arom}$), 129.7 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.4 Hz, **CH**=CH), 129.1 (2 x **C**$_{arom}$), 128.9 (**C**$_{arom}$), 127.3 (**C**$_{arom}$), 125.8 (**C**$_{arom}$), 124.1 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.8 Hz, CH=**CH**), 119.2 (**C**$_{arom}$), 116.7 (**C**$_{quat}$), 90.9 (CH_2-**C**), 82.3 (C≡**C**-C), 52.9 (O-**CH$_3$**), 52.9 (O-**CH$_3$**), 44.7 (N-**CH$_2$**), 43.3 (CO-**CH$_2$**), 29.4 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.3 Hz, CH-**CH$_2$**-P).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 28.32 (P_E).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{27}N_3O_6P$: 496.16.31, found: 496.1629.

Rf : 0.23 (DCM/MeOH 95:5).

(4-(7-(3-Octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (143a)



Chemical Formula: $C_{23}H_{30}N_3O_6P$
Exact Mass: 475,1872

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a beige solid (qtf).

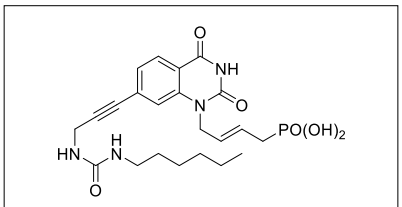
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.65 (bs, 1H, NH), 8.38 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_5), 7.35 (s, 1H, H_8), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_6), 5.61 (t, 2H, *J* = 3.6 Hz, $H_{2',3'}$), 4.65 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz, $H_{1'}$), 4.15 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, NH-CH_2), 2.37 (dd, 2H, *J* = 21.9, 4.8 Hz, $H_{4'}$), 2.11 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH_2), 1.49 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH_2), 1.22 (d, 8H, *J* = 6.3 Hz, 4 x CH_2), 0.83 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.9 (NH-**CO**), 161.1 (**C**=O), 149.8 (**C**=O), 140.7 (**C**$_{quat}$), 128.7 (**C**$_{quat}$), 127.7 (**C**$_{arom}$), 126.7 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.1 Hz, **CH**=CH), 125.2 (**C**$_{arom}$), 124.6 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.1 Hz, CH=**CH**), 117.3 (**C**$_{arom}$), 115.2 (**C**$_{quat}$), 91.0 (CH_2-**C**), 80.6 (C≡**C**-C), 43.2 (N-**CH$_2$**), 34.9 (CO-**CH$_2$**), 31.9 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 135.3 Hz, **CH$_2$**-P), 31.0 (CH_2-**CH$_2$**), 28.4 (CH_2-**CH$_2$**), 28.4 (NH-**CH$_2$**), 28.3 (CH_2-**CH$_2$**), 25.0 (CH_2-**CH$_2$**), 21.9 (CH_2-**CH$_2$**), 13.8 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 21.37.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{23}H_{29}N_3O_6P$: 474.1797, found: 474.1799.

(4-(7-(3-(3-Hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (143b)



Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_4O_6P$
Exact Mass: 476,1825

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a beige solid (qtf).

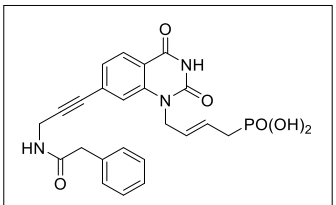
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.65 (bs, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_5), 7.35 (s, 1H, H_8), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_7), 5.61 (t, 2H, *J* = 3.7 Hz, $H_{2',3'}$), 4.66 (d, , 2H, *J* = 5.0 Hz, $H_{1'}$), 4.10 (s, 2H, NH-CH_2), 2.97 (dt, 2H, *J* = 12.0, 6.6 Hz, CH_2), 2.38 (dd, 2H, *J* = 21.7, 4.8 Hz, $H_{4'}$), 1.35 (q, 2H, *J* = 6.7, 6.3 Hz, NH-CH_2), 1.24 (bs, 6H, 3 x CH_2), 0.85 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.2 (NH-**CO**-NH), 157.5 (**C**=O), 149.9 (**C**=O), 140.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 129.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 127.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.9 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.1 Hz, **CH**=CH), 125.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.7 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.1 Hz, CH=**CH**), 117.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 92.4 (CH_2-**C**), 80.5 (C≡**C**-C), 43.2 (N-$\mathbf{CH_2}$), 31.9 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 134.3 Hz, $\mathbf{CH_2}$-P), 31.0 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 29.8 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 29.7 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 29.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 26.0 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 22.0 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 13.9 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 21.41.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M\text{-}H]^-$ calcd for $C_{22}H_{28}N_4O_6P$: 475.1751, found: 475.1751.

(4-(2,4-Dioxo-7-(3-(2-phenylacetamido)prop-1-yn-1-yl)-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (143c)



Chemical Formula: $C_{23}H_{22}N_3O_6P$
Exact Mass: 467,1246

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a beige solid (qtf).

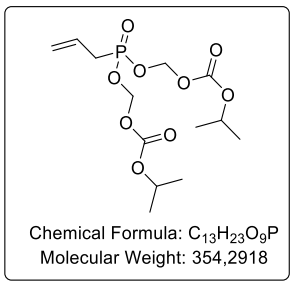
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.64 (bs, 1H, NH), 8.66 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_5), 7.36 (s, 1H, H_8), 7.33-7.16 (m, 6H, H_7, 5 x H_{arom}), 5.78-5.52 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.66 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, $H_{1'}$), 4.18 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, NH-CH_2), 3.48 (s, 2H, CH_2), 2.44-2.31 (m, 2H, $H_{4'}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 170.0 (NH-**CO**), 161.0 (**C**=O), 149.9 (**C**=O), 140.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 136.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 130.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 128.9 (2x$\mathbf{C}_{arom}$), 128.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 128.1 (2x$\mathbf{C}_{arom}$), 127.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.6 (**CH**=CH), 126.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.8 (CH=**CH**), 117.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 90.6 (CH_2-**C**), 80.8 (C≡**C**-C), 43.3 (N-$\mathbf{CH_2}$), 41.9 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 31.9 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 135.3 Hz, $\mathbf{CH_2}$-P), 28.7 (CO-$\mathbf{CH_2}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 21.33.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{23}H_{21}N_3O_6P$: 466.1174, found: 466.1178.

((Allylphosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) diisopropyl bis(carbonate) (144)



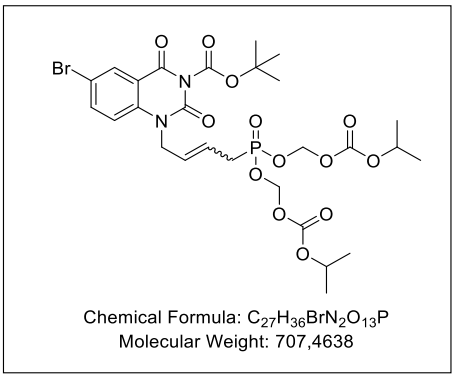
To an acetonitrile (0.66 M) solution of dimethyl allylphosphonate (1 eq.), anhydrous sodium iodide (2 eq.) and chloromethyl isopropyl carbonate (2.5 eq.) were added. This solution was stirred at reflux for 72 h under N_2 atmosphere. After cooling, the mixture was diluted with diethyl ether, washed by water and aqueous solution of $Na_2S_2O_3$. The organic layers were dried over magnesium sulfate, evaporated and purified by silica gel column chromatography (EDP/AcOEt, 7/3) to give desired product as a colorless liquid (58%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.77-5.72 (m, 1H, H_2), 5.69 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz H_4), 5.64 (d, *J* = 5.1 Hz, H_4), 5.29-5.26 (m, 2H, H_1), 4.93 (p, 2H, *J* = 6.3 Hz, H_6), 2.74 (ddt, 2H, *J* = 22.8, 7.4, 1.1 Hz, H_3), 1.33 (d, 12H, *J* = 6.3 Hz, H_{Poc}).

CAS: 1258789-64-8.

Rf : 0.42 (EDP/AcOEt 1:1).

Tert-butyl 1-(4-(bis(((isopropoxycarbonyl)oxy)methoxy)phosphoryl)but-2-en-1-yl)-6-bromo-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazoline-3(*2H*)-carboxylate (145)

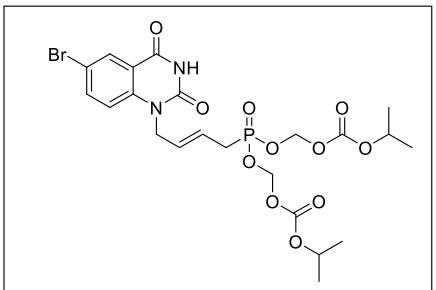


Following the general procedure 11A, from N^1-crotyl-N^3-Boc-6-brromo quinazolindione (0.45 g, 1 eq., 1.14 mmol), with bis(POC)allyl phosphonate (1.61 g, 3 eq., 4.56 mmol) and G-II (0.145 g, 0.15 eq., 0.17 mmol) in DCM (11.4 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after short purification dark green oil fraction was send in TFA deprotection.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M]^+$ calcd for $C_{27}H_{37}BrN_2O_{13}P$: 707.1200, found: 707.1211.

Rf : 0.3 (EDP/AcOEt 1:1).

(((4-(6-Bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) diisopropyl bis(carbona (146)



The title compound was prepared according to the general procedure 8, affording after purification the desired product as an oil (44% over two steps).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.45 (bs, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H_5), 7.85 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_7), 7.38 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_8), 5.85-5.77 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.72-5.62 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.60 (s, 4H, 2 x H_{CH_2POC}), 5.57 (s, 2H, CH_{2POC}), 4.88 (p, 2H, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.77 (t, 2H, *J* = 5.2 Hz, $H_{1'}$), 2.76 (dd, 2H, *J* = 22.6, 7.2 Hz, $H_{4'}$), 1.29 (d, 12H, *J* = 6.3 Hz, 4 x CH_{3POC}).

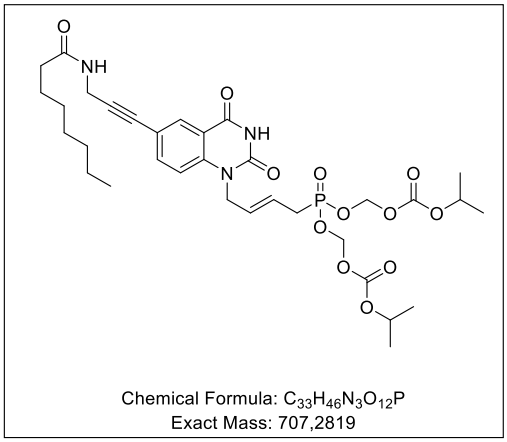
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.3 (**C**=O), 154.0 (2 x **C**=O_{POC}), 150.6 (**C**=O), 141.4 (**C**$_{quat}$), 138.4 (**C**$_{arom}$), 130.8 (**C**$_{arom}$), 130.5 (d, J^3_{C-P} = 15.1 Hz, **CH**=CH), 122.4 (d, J^2_{C-P} = 12.2 Hz, CH=**CH**), 119.03 (**C**$_{quat}$), 118.4 (**C**$_{arom}$), 115.6 (**C**$_{quat}$), 85.0 (O-**CH$_{2POC}$**), 85.0 (O-**CH$_{2POC}$**), 73.6 (2 x O-**CH$_{POC}$**), 44.8 (N-**CH$_2$**), 31.8 (d, J^1_{C-P} = 139.3 Hz, CH-**CH$_2$**), 21.7 (4 x CH-**CH$_{3POC}$**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.55.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M]^+$ calcd for $C_{22}H_{29}BrN_2O_{11}P$: 607.0687, found: 607.0688.

Rf : 0.49 (DCM/MeOH 95:5).

Diisopropyl ((((4-(6-(3-octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)*bis*(oxy))*bis*(methylene)) *bis*(carbonate) (147a)



The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (61%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.29 (bs, 1H, NH), 7.89 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H_5), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H_7), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 5.81-5.54 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 5.51 (s, 2H, O-CH_{2POC}), 5.46 (s, 2H, O-CH_{2POC}), 4.78 (h, 2H, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.69-4.59 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.12 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, NH-CH_2), 2.72-2.58 (m, 2H, $H_{4'}$), 2.11 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH_2), 1.49 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH_2), 1.30-1.04 (m, 20H, 4 x CH_2, 4 x CH_{3POC}), 0.82-0.69 (m, 3H, CH_3).

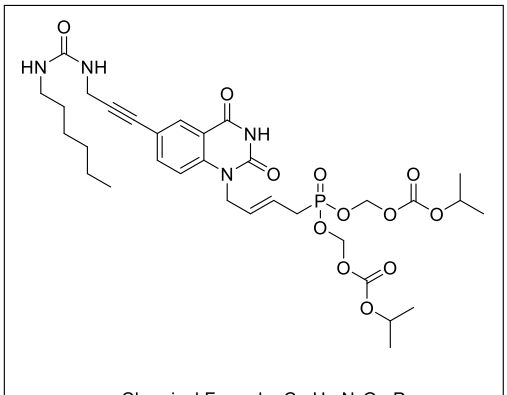
^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 172.9 (NH-**CO**), 161.7 (**C**=O), 153.9 (2 x **C**=O), 150.7 (**C**=O), 141.7 (**C**$_{quat}$), 138.3 (**C**$_{arom}$), 131.5 (**C**$_{arom}$), 130.6 (d, J^3_{C-P} = 15.1 Hz, **CH**=CH), 122.3 (d, J^2_{C-P} = 11.8 Hz, CH=**CH**), 118.0 (**C**$_{quat}$), 117.2 (**C**$_{arom}$), 116.4 (**C**$_{quat}$), 87.8 (CH_2-**C**), 85.0 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 x O-**CH$_{2POC}$**), 81.1 (C≡**C**-C), 73.6 (2 x O-**CH$_{POC}$**), 44.8 (N-**CH$_2$**), 36.4 (CO-**CH$_2$**), 32.4 (CH_2-**CH$_2$**), 31.1 (d, J^1_{C-P} = 139.2 Hz, CH_2-**CH$_2$**), 30.1 (CH_2-**CH$_2$**), 29.9 (NH-**CH$_2$**), 29.6 (CH_2-**CH$_2$**), 26.3 (CH_2-**CH$_2$**), 23.2 (CH_2-**CH$_2$**), 21.7 (4 x **CH$_{3POC}$**), 14.3 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.67.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{33}H_{47}N_3O_{12}P$: 708.2889, found: 708.2891.

Rf : 0.3 (DCM/MeOH 95:5).

(((4-(6-(3-(3-Hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)*bis*(oxy))*bis*(methylene) diisopropyl *bis*(carbonate) (147b)



The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (65%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.37 (bs, 1H, NH), 8.05-7.98 (m, 1H, H_5), 7.70-7.61 (m, 1H, H_7), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 5.90-5.76 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.76-5.65 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.61 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, O-CH_{2POC}), 5.58 (d, 2H, *J* = 1.3 Hz, O-CH_{2POC}), 4.88 (hept, 2H, *J* = 6.3 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.76 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, $H_{1'}$), 4.18 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz, C-CH_2), 3.20-3.07 (m, 2H, NH-CH_2), 2.76 (dd, 2H, *J* = 22.6, 7.2 Hz, $H_{4'}$), 1.47 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH_2), 1.29 (bd, 18H, *J* = 6.2 Hz, 3 x CH_2, 4 x CH_{3POC}), 0.96-0.75 (m, 3H, CH_3).

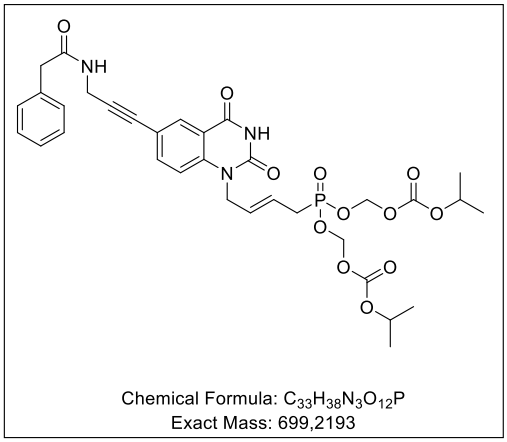
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.7 (**C**=O), 158.5 (NH-**CO**-NH), 154.0 (2 x **C**=O), 150.7 (**C**=O), 141.6 (**C**$_{quat}$), 138.3 (**C**$_{arom}$), 131.5(**C**$_{arom}$), 130.7 (d, J^3_{C-P} = 15.2 Hz, **CH**=CH), 122.3 (d, J^2_{C-P} = 11.8 Hz, CH=**CH**), 118.3 (**C**$_{quat}$), 117.2 (**C**$_{quat}$), 116.4 (**C**$_{arom}$), 89.1 (CH_2-**C**), 85.0 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-**CH$_2$**-O), 80.9 (C≡**C**-C), 73.7 (2 x O-**CH**), 44.8 (N-**CH$_2$**), 40.7 (NH-**CH$_2$**), 32.3 (CH_2-**CH$_2$**), 31.9 (NH-**CH$_2$**-C), 31.8 (CH_2-**CH$_2$**), 31.0 (d, J^1_{C-P} = 139.3 Hz, CH-**CH$_2$**-P), 27.3 (CH_2-**CH$_2$**), 23.3 (CH_2-**CH$_2$**), 21.8 (4 x C-**CH$_{3POC}$**), 14.3 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.61.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{46}N_4O_{12}P$: 709.2844, found: 709.2834.

Rf : 0.28 (DCM/MeOH 95:5).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-6-(3-(2-phenylacetamido)prop-1-yn-1-yl)-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (147c)



The title compound was prepared according to the general procedure 10A, affording after purification the desired product as a light orange solid (66%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.30 (bs, 1H, NH), 8.04 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H_5), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H_7), 7.39 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_8), 7.37-7.26 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.26-7.18 (m, 1H, H_{arom}), 5.80 (dt, 1H, *J* = 15.8, 5.2 Hz, $H_{2'}$), 5.75-5.62 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.60 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz, O-CH_{2POC}), 5.57 (d, 2H, *J* = 1.3 Hz, O-CH_{2POC}), 4.88 (hept, 2H, *J* = 6.3 Hz, 2 x OCH_{POC}), 4.78 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, $H_{1'}$), 4.23 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, C-CH_2), 3.55 (s, 2H, C-H_2), 2.81-2.69 (m, 2H, $H_{4'}$), 1.29 (d, 12H, *J* = 6.3 Hz, 4 x CH_{3POC}).

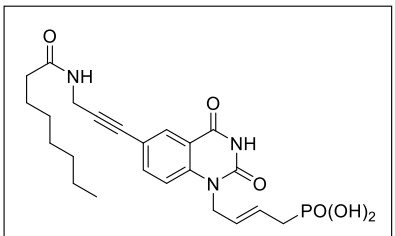
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 170.7 (NH-**CO**), 163.2 (**C**=O), 154.0 (2 x **C**=O), 150.7 (**C**=O), 138.3 (**C**$_{arom}$), 137.0 (**C**$_{quat}$), 135.9 (**C**$_{quat}$), 131.6 (**C**$_{arom}$), 130.6 (d, J^3_{C-P} = 14.9 Hz, **CH**=CH), 130.0 (2 x **C**$_{arom}$), 129.1 (2 x **C**$_{arom}$), 127.4 (**C**$_{arom}$), 122.4 (d, J^2_{C-P} = 11.8 Hz, CH=**CH**), 118.0 (**C**$_{quat}$), 117.4 (**C**$_{quat}$), 116.5 (**C**$_{arom}$), 87.6 (CH_2-**C**), 84.9 (d, J^2_{C-P} = 6.3 Hz, 2 x O-**CH_2**-O), 81.3 (C≡**C**-C), 73.7 (2 x O-**CH_{POC}**), 44.8 (N-**CH_2**), 43.5 (CO-**CH_2**), 33.1 (d, J^1_{C-P} = 139.9 Hz, **CH_2**-P), 30.4 (NH-**CH_2-C**), 21.8 (4 x **C_{CH3POC}**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.49.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{33}H_{39}N_3O_{12}P$: 700.2253, found: 700.2254.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

(4-(6-(3-Octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (142a)



Chemical Formula: $C_{23}H_{30}N_3O_6P$
Exact Mass: 475,1872

Following the general procedure 12, from N^1-buthylphosphonate-C^6-alkynyl-quinazolindione (0.15 g, 1 eq., 0.21 mmol) in aqueous NaOH (10 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after lyophilisation as a beige foam (0.085 g, 86%).

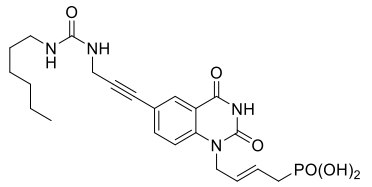
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.72 (bs, 1H, NH), 8.43-8.25 (m, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, H_5), 7.70 (dd, 1H, *J* = 12.1, 6.0 Hz, H_8), 7.39 (t, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_7), 5.89-.65 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.53 (s, 1H, $H_{3'}$), 4.62 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.10 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, H_{11}), 2.38-2.24 (m, 2H, $H_{4'}$), 2.09 (d, 2H, *J* = 9.5 Hz, CH_2), 1.51 (q, 2H, *J* = 7.7, 6.5 Hz, CH_2), 1.23 (bs, 8H, 4 x CH_{21}), 0.84 (q, 3H, *J* = 6.2 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.9 (NH-**CO**), 160.9 (**C**=O), 149.7 (**C**=O), 140.5, ($\mathbf{C}_{quat}$) 137.3 ($\mathbf{C}_{arrom}$), 130.1 ($\mathbf{C}_{arrom}$), 128.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 127.4 (**CH**=CH), 126.0 (CH=**CH**), 116.2 ($\mathbf{C}_{arrom}$), 115.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 87.6 (CH_2-**C**), 80.0 (C≡**C**-C), 43.7 (N-$\mathbf{CH_2}$), 33.9 (CO-$\mathbf{CH_2}$), 33.2 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.8 Hz, $\mathbf{CH_2}$-P), 31.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 28.5 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 28.4 (NH-$\mathbf{CH_2}$), 28.5 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 25.2 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 21.9 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 13.9 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 18.91.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{23}H_{29}N_3O_6P$: 474.1799, found: 474.1804.

(4-(6-(3-(3-Hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (142b)



Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_4O_6P$
Exact Mass: 476,1825

The title compound was prepared according to the general procedure 12, affording after lyophilisation the desired product as a beige foam (50%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.71 (bs, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, H_5), 7.68 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H_8), 7.37 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_7), 5.86-5.64 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.51 (d, 1H, *J* = 15.1 Hz, $H_{3'}$), 4.62 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.04 (d, 2H, *J* = 4.6 Hz, H_{11}), 2.99 (q, 2H, *J* = 6.1, 5.6 Hz, H_{15}), 2.39-2.19 (m, 1H, $H_{4'}$), 1.35 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH_2), 1.23 (bs, 6H, 3 x CH_2), 0.90-0.73 (m, 3H, CH_2-CH_3).

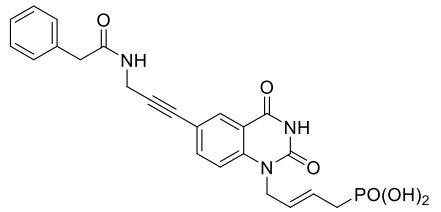
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.9 (NH-**CO**-NH), 157.4 (**C**=O), 149.7 (**C**=O), 140.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 137.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 129.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 128.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 126.7 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 12.6 Hz, **CH**=CH), 125.9 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.3 H,

CH=**CH**), 116.4 (**C**$_{arom}$), 115.9 (**C**$_{quat}$), 89.8 (CH_2-**C**), 79.8 (C≡**C**-C), 43.7 (N-**CH$_2$**), 39.8 (NH-**CH$_2$**), 33.2 (d, J^1_{C-P} = 139.8 Hz, **CH$_2$**-P), 31.0 (CH_2-**CH$_2$**), 29.9 (CH_2-**CH$_2$**), 29.6 (NH-**CH$_2$**), 26.0 (CH_2-**CH$_2$**), 22.0 (CH_2-**CH$_2$**), 13.8 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 20.95.

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{22}H_{28}N_4O_6P$: 475.11738, found 475.1744.

(4-(2,4-Dioxo-6-(3-(2-phenylacetamido)prop-1-yn-1-yl)-3,4-dihydroquinazolin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (142c)



Chemical Formula: $C_{23}H_{22}N_3O_6P$
Molecular Weight: 467,4178

The title compound was prepared according to the general procedure 12, affording after lyophilisation the desired product as a beige solid (92%)

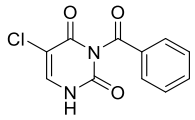
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 11.75 (bs, 1H, NH), 8.62 (d, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH), 7.94 (s, 1H, H_5), 7.77-7.64 (m, 1H, H_9), 7.49-7.06 (m, 6H, H_8, 4 x H_{arom}), 5.63 (dt, 2H, *J* = 9.9, 6.3 Hz, $H_{2',3'}$), 4.65 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz, $H_{1'}$), 4.13 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, CH_2), 3.47 (s, 2H, CH_2), 2.39-2.29 (m, 2H, $H_{4'}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 169.8 (NH-**CO**), 161.0 (**C**=O), 149.8 (**C**=O), 140.5 (**C**$_{quat}$), 137.4 (**C**$_{arom}$), 136.0 (**C**$_{quat}$), 130.1 (**C**$_{arom}$), 128.9 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 126.6 (d, J^3_{C-P} = 15.3 Hz, **CH**=CH), 126.4 (**C**$_{arom}$), 125.4 (d, J^2_{C-P} = 9.3 Hz, CH=**CH**), 116.2 (**C**$_{arom}$), 115.96 (**C**$_{quat}$), 87.4 (CH_2-**C**), 80.2 (C≡**C**-C), 43.5 (N-**CH$_2$**), 42.0 (NH-**CH$_2$**), 32.1 (d, J^1_{C-P} = 131.6 Hz, **CH$_2$**-P), 28.9 (CO-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 21.08.

HRMS-ESI (*m/z*) [M-H]$^-$ calcd for $C_{23}H_{21}N_3O_6P$: 466.4178, found: 466.1172.

3-Benzoyl-5-chloropyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (148b)



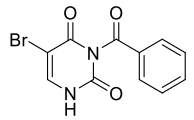
Chemical Formula: $C_{11}H_7ClN_2O_3$
Molecular Weight: 250,6380

Following the general procedure 13, from 5-clhoro-uracil (2.5 g, 1 eq., 17 mmol), BzCl (5.94 ml, 3 eq., 51 mmol) in ACN (30 ml)/pyridine (20 mL). Following by aqueous potassium carbonate (3.5 g in 50 ml of water, 0.5 mol/L)/ dioxane (100 ml). The title compound was obtained after filtration as a white solid (2.56 g, 60%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 11.99 (bs, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, H_6), 8.03 (dd, 2H, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 2 x H_{arom}), 7.80 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 7.61 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, 2 x H_{arom}).

CAS : 214687-03-3.

3-Benzoyl-5-bromopyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (148c)



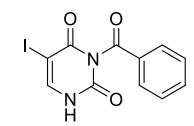
Chemical Formula: $C_{11}H_7BrN_2O_3$
Molecular Weight: 295,0920

The title compound was prepared according to the general procedure 13, affording after filtration the desired product as a white solid (70%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.05 (bs, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, H_6), 7.95 (dd, 2H, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 2 x H_{arom}), 7.77 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 7.59 (t, 2H, *J* =7.8 Hz, 2 x H_{arom}).

CAS : 206762-91-6.

3-Benzoyl-5-iodopyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (148d)



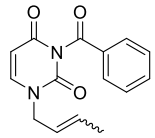
Chemical Formula: $C_{11}H_7IN_2O_3$
Molecular Weight: 342,0925

The title compound was prepared according to the general procedure 13, affording after filtration the desired product as a white solid (83%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.01 (bs, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H_6), 8.98 (dd, 2H, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 2 x H_{arom}), 7.79 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 7.60 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, 2 x H_{arom}).

CAS : 161263-60-1.

3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149a)



Chemical Formula: $C_{15}H_{14}N_2O_3$
Molecular Weight: 270,2880

Following the general procedure 14, from N^3-benzoyl uracil (0.5 g, 1 eq., 2.31 mmol), with bromo crotyl 85% (0.27 ml, 1.05 eq., 2.43 mmol) and K_2CO_3 (0.35 g, 1.05 eq., 2.43 mmol) in DMF (6 ml, 0.28 M). The title compound was obtained after purification as a white solid (0.48 g, *E/Z ratio = 85/15*, 78%).

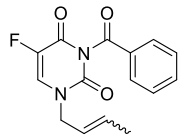
^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 7.97 (d, 2H, *J* = 1.4 Hz, 2 x H_{arom}), 7.79-7.69 (m, 2H, H_6 ,H_{arom}), 7.64-7.53 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.94-5.80 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.77 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_5), 5.69-5.53 (m, 1H,

$H_{3'}$), 4.52-4.48 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.39-4.33 (m, 2H, $H_{1'\text{-major}}$), 1.78-1.74 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 4.72 (dq, 3H, J = 6.4, 1.2 HZ, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1067228-36-7.

Rf : 0.7 (EDP/AcOEt 1:1).

3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-5-fluoropyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149b)



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}FN_2O_3$
Molecular Weight: 288,2784

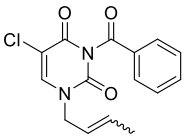
The title compound was prepared according to the general procedure 14, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 92%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-d_6) δ 8.09-8.01 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.99 (d, 1H, J_{H-F} = 6.5 Hz, H_6), 7.82-7.73 (m, 1H, H_{arom}), 7.64-7.56 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.97-5.78 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.69-5.54 (m, 1H, $H_{3'}$) 4,50-4.47 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.35 (dt, 2H, J = 6.3, 1.2 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.78-1.76 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.73 (ddd, 3H, J = 6.5, 2.8, 1.2 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1260072-56-7.

Rf : 0.7 (EDP/AcOEt 1:1).

3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-5-chloropyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149c)



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}ClN_2O_3$
Molecular Weight: 304,7300

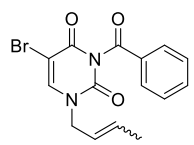
The title compound was prepared according to the general procedure 14, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 95%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-d_6) δ 8.00-7.95 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 7.78-7.70 (m, 1H, H_{arom}), 7.59-7.54 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.91-5.74 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.66-5.53 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.48-4.43 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.33 (dt, 2H, J = 6.2, 1.2 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.77-1.75 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.75-1.68 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1023339-53-8.

Rf : 0.7 (EDP/AcOEt 1:1).

3-Benzoyl-5-bromo-1-(but-2-en-1-yl)pyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149d)



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}BrN_2O_3$
Molecular Weight: 349,1840

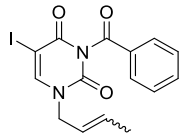
The title compound was prepared according to the general procedure 14, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 80%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78-7.75 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.62 (s, 1H, H_6), 7.63-7.52 (m, 1H, H_{arom}). 7.50-7.44 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.96-5.74 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.52-5.42 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.44 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.30 (d, 2H, *J* = 6.9Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.80-1.78 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.77 (dd, 3H, *J* = 1.2, 6.8 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1023339-58-3.

Rf : 0.7 (EDP/AcOEt 1:1).

3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-5-iodopyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149e)



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}IN_2O_3$
Molecular Weight: 396,1845

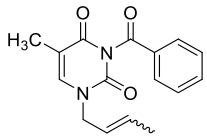
The title compound was prepared according to the general procedure 14, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 90%).

^{1}H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz 2 x H_{arom}), 7.71 (s, 1H, H_6), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_{arom}), 7.48 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, 2 x H_{arom}), 8.94-5.77 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.56-5.41 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.46-4.42 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.29 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.75-1.73 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.76-1.69 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1314531-31-1.

Rf : 0.7 (EDP/AcOEt 1:1).

3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(*1H,3H*)-dione (149f)



Chemical Formula: $C_{16}H_{16}N_2O_3$
Molecular Weight: 284,3150

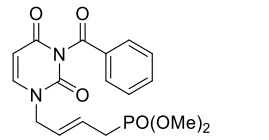
The title compound was prepared according to the general procedure 14, affording after purification the desired product as a white solid (*E/Z ratio = 85/15*, 81%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.06-7.29 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 7.78-7.70 (m, 1H, H_{arom}), 7.62-7.49 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.95-5.74 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.67-5.54 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.53-4.49 (m, 2H, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.37 (dp, 2H, *J* = 6.3, 1.2 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.75-1.75 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.72-1.61 (m, 3H, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 882669-57-6.

Rf : 0.5 (EDP/AcOEt 1:1).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150a)



Chemical Formula: $C_{17}H_{19}N_2O_6P$
Molecular Weight: 378,3208

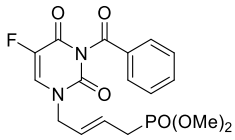
Following the general procedure 15, from *N*^{1}-crotyl-*N*^{3}-benzoyl-uracile (0.39 g, 1 eq., 1.44 mmol), with dimethylallyl phosphonate (0.61 g, 4 eq., 5.78 mmol) and G-II (0.062 g, 0.05 eq., 0.72 mmol) in DCM (14.4 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after purification as an oil (0.33 g, 61%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 7.95-7.93 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.64-7.59 (m, 1H, H_{arom}) 7.53-7.48 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H_6), 5.83 (d, 1H, *J* = 8.2. Hz, H_5), 5.80-5.74 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.44 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz, $H_{1'}$), 3.70 (s, 3H, H_{POMe}), 3.65 (s, 3H, H_{POMe}), 2.68 (dd, 2H, *J* = 19.6, 7.2 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023339-27-6.

Rf : 0.30 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150b)



Chemical Formula: $C_{17}H_{18}FN_2O_6P$
Molecular Weight: 396,3112

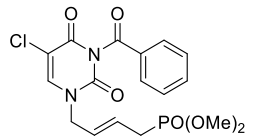
The title compound was prepared according to the general procedure 15, affording after purification the desired product as an oil (38%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.09-8.00 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 7.84-7.71 (m, 1H, H_{arom}), 7.65-7.56 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.88-5.82 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.43 (t, 2H, *J* = 4.1 Hz, $H_{1'}$), 3.70 (s, 3H, H_{POMe}), 3.66 (s, 3H, H_{POMe}), 2.69 (dd, 2H, *J* = 22.4, 5.5 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-58-9.

Rf : 0.25 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-5-chloro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150c)



Chemical Formula: $C_{17}H_{18}ClN_2O_6P$
Molecular Weight: 412,7628

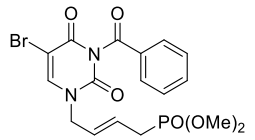
The title compound was prepared according to the general procedure 15, affording after purification the desired product as an oil (83%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.11 (s, 1H, H_6), 8.07-8.02 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.81-7.71 (m, 1H, H_{arom}), 7.64-7.55 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.90-5.82 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.48 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, $H_{1'}$), 3.71 (s, 3H, H_{POMe}), 3.66 (s, 3H, H_{POMe}), 2.69 (dd, 2H, *J* = 21.9, 6.0 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023339-83-4.

Rf : 0.25 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-5-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150d)



Chemical Formula: $C_{17}H_{18}BrN_2O_6P$
Molecular Weight: 457,2168

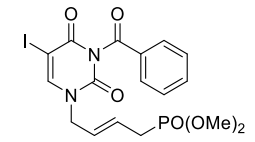
The title compound was prepared according to the general procedure 15, affording after purification the desired product as an oil (51%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.20 (s, 1H, H_6), 8.04 (dd, 2H, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 2 x H_{arom}), 7.85-7.70 (m, 1H, H_{arom}), 7.68-7.52 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 5.93-5.80 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.49 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, $H_{1'}$), 3.71 (s, 3H, H_{POMe}), 3.66 (s, 3H, H_{POMe}), 2.69 (dd, 2H, *J* = 21.9, 6.0 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023339-86-7.

Rf : 0.25 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-5-iodo-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150e)



Chemical Formula: $C_{17}H_{18}IN_2O_6P$
Molecular Weight: 504,2172

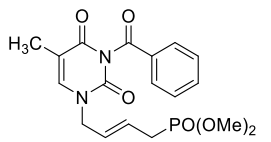
The title compound was prepared according to the general procedure 15, affording after purification the desired product as an oil (73%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.24 (s, 1H, H_6), 8.10-7.96 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.77 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 7.60 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, 2 x H_{arom}), 5.88-5.83 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.48 (t, 2H, *J* = 4.2 Hz, $H_{1'}$), 3.71 (s, 3H, H_{POMe}), 3.67 (s, 3H, H_{POMe}), 2.69 (dd, 2H, *J* = 22.2, 5.4 Hz, $H_{4'}$).

Thèse Ugo Pradère.

Rf : 0.25 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(3-benzoyl-5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (150f)



Chemical Formula: $C_{18}H_{21}N_2O_6P$
Molecular Weight: 392,3478

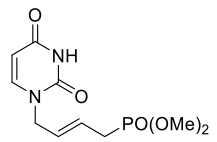
The title compound was prepared according to the general procedure 15, affording after purification the desired product as an oil (50%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.03-7.91 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.82-7.67 (m, 1H, H_{arom}), 7.67-7.51 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 5.84-5.79 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.45-4.34 (m, 2H, $H_{1'}$), 3.70 (s, 3H, H_{POMe}), 3.70 (s, 3H, H_{POMe}), 2.67 (dd, 1H, *J* = 21.5, 6.5 Hz, $H_{4'}$), 1.89 (s, 3H, CH_3).

CAS : 1260072-59-0.

Rf : 0.27 (AcOEt).

(*E*)-Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151a)



Chemical Formula: $C_{10}H_{15}N_2O_5P$
Molecular Weight: 274,2128

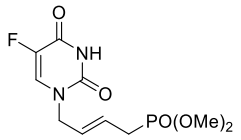
Following the general procedure 16, from *N*^{1}-butylphosphonate-*N*^{3}-Benzoyl-uracile (0.43 g, 1 eq., 1.14 mmol), in NH_3/MeOH (16.5 mL, 100 eq., 114 mmol). The title compound was obtained after purification as a white/green solid (0.23 g, 82%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 9.94 (bs, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H_6), 5.81-5.70 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.64-5.58 (m, 1H, $H_{3'}$), 5.56 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H_5), 4.35 (t, 2H, *J* = 4.4 Hz, $H_{1'}$), 3.69 (s, 3H, H_{POMe}), 3.66 (s, 3H, H_{POMe}), 2.65 (dd, 2H, *J* = 21.8, 6.2 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-67-0.

Rf : 0.28 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-Dimethyl (4-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151b)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}FN_2O_5P$
Molecular Weight: 292,2032

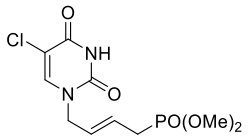
The title compound was prepared according to the general procedure 16, affording after purification the desired product as an oil (79%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-d_6) δ 10.28 (bs, 1H, NH), 7.77 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz, H_6), 5.82-5.73 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.34 (t, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'}$), 3.71 (s, 3H, H_{POMe}), 3.66 (s, 3H, H_{POMe}), 2.67 (dd, 2H, *J* = 22.2, 5.7 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-68-1.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-Dimethyl (4-(5-chloro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151c)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}ClN_2O_5P$
Molecular Weight: 308,6548

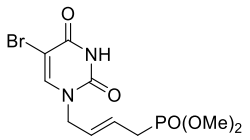
The title compound was prepared according to the general procedure 16, affording after purification the desired product as an oil (57%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) δ 10.39 (bs, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, H_6), 5.86-5.75 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.39 (t, 3H, *J* = 4.3 Hz, $H_{1'}$), 3.70 (s, 3H, H_{POMe}), 3.67 (s, 3H, H_{POMe}), 2.67 (dd, 3H, *J* = 22.3, 5.4 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-69-2.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-Dimethyl (4-(5-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151d)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}BrN_2O_5P$
Molecular Weight: 353,1088

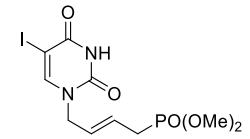
The title compound was prepared according to the general procedure 16, affording after purification the desired product as an oil (55%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.42 (bs, 1H, NH), 7.97 (s, 1H, H_6), 5.85-5.70 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.40 (t, 2H, *J* = 4.2 Hz, $H_{1'}$), 3.72 (s, 3H, H_{POMe}), 3.67 (s, 3H, H_{POMe}), 2.73-2.59 (m, 2H, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-70-5.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-Dimethyl (4-(5-iodo-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151e)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}IN_2O_5P$
Molecular Weight: 400,1092

The title compound was prepared according to the general procedure 16, affording after purification the desired product as an oil (66%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.44 (bs, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, H_6), 5.85- 5.75 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.41 (t, 2H, *J* = 4.4 Hz, $H_{1'}$), 3.73 (s, 3H, H_{POMe}), 3.68 (s, 3H, H_{POMe}), 2.69 (dd, 2H, *J* = 22.4, 5.5 Hz, $H_{4'}$).

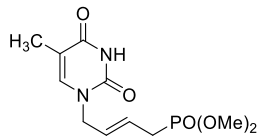
^{13}C NMR (63 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 161.2 (**C**=O), 151.4 (**C**=O), 150.0 (C=**CH**), 129.6 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.3 Hz, **CH**=CH), 126.3 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 10.8 Hz, CH=**CH**), 67.7 (**C**$_{quat}$), 53.0 (O-**CH$_3$**), 52.9 (O-**CH$_3$**), 49.7 (N-**CH$_2$**), 29.5 (d, *J* = 138.4 Hz, CH-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 28.34.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{10}H_{15}IN_2O_5P$: 401.11, found: 401.1965.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-Dimethyl (4-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate (151f)



Chemical Formula: $C_{11}H_{17}N_2O_5P$
Molecular Weight: 288,2398

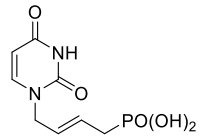
The title compound was prepared according to the general procedure 16, affording after purification the desired product as an oil (77%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 9.88 (bs, 1H, H NH), 7.35 (s, 1H, H_6), 5.82-5.65 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.32 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, $H_{1'}$), 3.69 (s, 3H, H_{POMe}), 3.65 (s, 3H, H_{POMe}), 2.65 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, $H_{4'}$), 1.81 (s, 3H, C-CH_3).

CAS : 1260072-71-6.

Rf : 0.34 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-(4-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (152a)



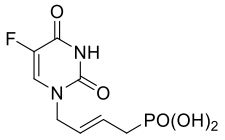
Chemical Formula: $C_8H_{11}N_2O_5P$
Molecular Weight: 246,1588

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (94%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.25 (bs, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H_6), 5.69-5.61 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 5.56 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H_5), 4.24 (t, 2H, *J* = 4.3 Hz, $H_{1'}$), 2.44 (dd, 2H, *J* = 21.9, 6.3 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023339-32-3.

(*E*)- (4-(5-Fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (152b)



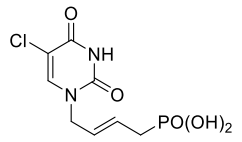
Chemical Formula: $C_8H_{10}FN_2O_5P$
Molecular Weight: 264,1492

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (95%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.77 (bs, 1H, NH), 7.97 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz, H_6), 5.72-5.49 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.20 (t, 2H, *J* = 4.1 Hz, $H_{1'}$), 2.41 (dd, 2H, *J* = 21.3, 6.0 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1260072-84-1.

(*E*)-(4-(5-Chloro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (152c)



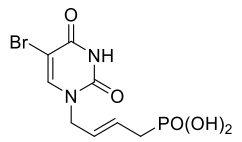
Chemical Formula: $C_8H_{10}ClN_2O_5P$
Molecular Weight: 280,6008

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (97%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.81 (bs, 1H, NH), 8.06 (s, 1H, H_6), 5.79-5.58 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.25 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, $H_{1'}$), 2.45 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023340-06-8.

(*E*)- (4-(5-Bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (152d)



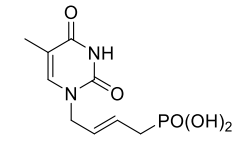
Chemical Formula: $C_8H_{10}BrN_2O_5P$
Molecular Weight: 325,0548

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a white solid (97%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.65 (bs, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H_6), 5.83-5.69 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.40-4.35 (m, 2H, $H_{1'}$), 2.63 (dd, 2H, *J* = 21.0, 6.3 Hz, $H_{4'}$).

CAS : 1023340-07-9.

(*E*)-(4-(5-Methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (152f)



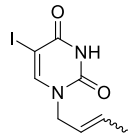
Chemical Formula: $C_9H_{13}N_2O_5P$
Molecular Weight: 260,1858

The title compound was prepared according to the general procedure 9, affording after lyophilisation the desired product as a solid (98%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11.23 (s, 1H, H_3), 7.45 (s, 1H, H_6), 5.70-5.54 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.20 (d, 2H, J = 7.8 Hz, $H_{1'}$), 2.45 (d, 2H, J = 4.4 Hz, $H_{4'}$), 1.74 (s, 3H, CH_3).

CAS : 1260072-54-5.

7-Iodo-1-(but-2-en-1-yl)quinazoline-2,4(*1H,3H*)-dione (153)



Chemical Formula: $C_8H_9IN_2O_2$
Molecular Weight: 292,0765

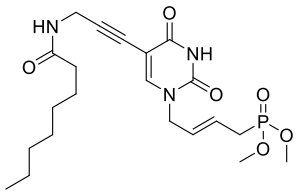
The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 85/15*, 90%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) δ 10.27 (bs, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, $H_{6\text{-minor}}$), 8.00 (s, 1H, $H_{6\text{-major}}$), 5.89-5.77 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.64-5.53 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.47 (d, 2H, J = 7.4 Hz, $H_{1'\text{-minor}}$), 4.33 (dt, 2H, J = 6.4, 1.1 Hz, $H_{1'\text{-major}}$), 1.79-1.73 (m, 3H, $H_{4'\text{-minor}}$), 1.70 (dd, 3H, J = 6.5, 1.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$).

CAS : 1314531-32-2.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-*N*-[3-[1-[(*E*)-4-Dimethoxyphosphorylbut-2-enyl]-2,4-dioxo-pyrimidin-5-yl]prop-2-ynyl]octanamide (154a)



Chemical Formula: $C_{21}H_{32}N_3O_6P$
Molecular Weight: 453,4758

Following the general procedure 10B, from N^1-crotyl-6-brromo quinazolindione (0.12 g, 1 eq., 0.3 mmol), with CuI (0.011 g, 0.2 eq., 0.06 mmol), Et_3N (0.13 ml, 3 eq., 0.9 mmol), C7 alkyn chain (0.217g, 4 eq., 1.2 mmol) and $Pd(P\Phi_3)_4$ (0.021g, 0.1 eq., 0.03 mmol) in DMF (1.7 ml, 0.18 M). The title compound was obtained after short purification as a light orange solid (0.077 g, 56%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 7.87 (s, 1H, H_6), 5.89-5.70 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.39 (t, 2H, J = 4.8 Hz, $H_{1'}$), 4.17 (s, 2H, C-CH_2), 3.83 (s, 3H, $H_{POMe\text{-minor}}$), 3.80 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.78 (s, 3H, $H_{POMe\text{-major}}$), 3.02-2.88 (m, 2H, $H_{4'\text{-minor}}$), 2.78 (dd, 2H, J = 21.9, 6.4 Hz, $H_{4'\text{-major}}$), 2.23 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH_2), 1.64 (p, 2H, J = 7.1 Hz, CH_2), 1.40-1.26 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.93 (t, 3H, J = 6.7 Hz, CH_3).

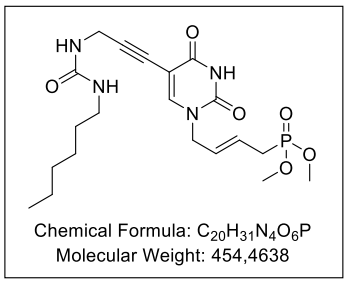
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-d_4) δ 175.8 (NH-**CO**), 164.9 (**C**=O), 151.5 (**C**=O), 149.4 (C=**CH**), 130.4 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.4 Hz, **CH**=CH), 125.6 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.3 Hz, CH=**CH**), 99.8 (CH_2-**C**), 90.3 (C≡**C**-C), 74.7 (**C_{quat}**), 53.6 (O-**CH_3**), 53.6 (O-**CH_3**), 47.9 (N-**CH_2**), 36.9 (CO-**CH_2**), 32.8 (CH_2-**CH_2**), 30.2 (CH_2-**CH_2**), 30.2 (NH-**CH_2**), 30.1 (CH_2-**CH_2**), 29.2 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.4 Hz, CH-**CH_2-P**), 26.8 (CH_2-**CH_2**), 23.6 (CH_2-**CH_2**), 14.4 (CH_2-**CH_3**).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl3) δ 30.29.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{33}N_3O_6P$: 454.2101, found: 454.2102.

Rf : 0.22 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-1-[3-[1-[(*E*)-4-Dimethoxyphosphorylbut-2-enyl]-2,4-dioxo-pyrimidin-5-yl]prop-2-ynyl]-3-hexyl-urea (154b)



The title compound was prepared according to the general procedure 10B, affording after purification the desired product as a light orange solid (56%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 7.87 (s, 1H, H_6), 5.87-5.70 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.40 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, $H_{1'}$), 4.12 (s, 2H, C-CH_2), 3.84 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}minor}$), 3.81 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.78 (s, 3H, $H_{POMe\text{-}major}$), 3.15 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, NH-CH_2), 2.79 (dd, 2H, *J* = 21.9, 6.4 Hz, $H_{4'}$), 1.51 (q, 2H, *J* = 7.2, 6.8 Hz, CH_2), 1.43-1.31 (m, 6H, 3 x CH_2), 0.98-0.91 (m, 3H, CH_3).

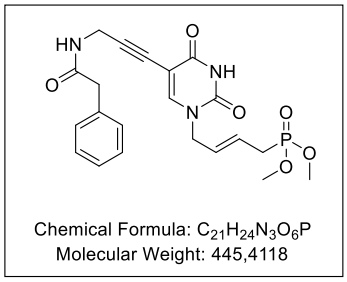
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 164.8 (**C**=O), 160.5 (NH-**CO**-NH), 151.5 (**C**=O), 149.3 (C=**CH**), 130.4 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 14.6 Hz, **CH**=CH), 125.6 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.3 Hz, CH=**CH**), 100.0 (CH_2-**C**), 91.8 (C≡**C**-C), 74.3 (**C**$_{quat}$), 53.7 (O-**CH$_3$**), 53.6 (O-**CH$_3$**), 47.9 (N-**CH$_2$**), 41.1 (NH-**CH$_2$**), 32.7 (CH_2-**CH$_2$**), 31.2 (NH-**CH$_2$**-C), 31.1 (CH_2-**CH$_2$**), 29.2 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.2 Hz, CH-**CH$_2$-P**), 27.6 (CH_2-**CH$_2$**), 23.6 (CH_2-**CH$_2$**), 14.3 (CH_2-**CH$_3$**), 9.2 (CH_2-**CH$_2$**).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl3) δ 30.29.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{20}H_{32}N_4O_6P$: 455.2053, found: 455.2052.

Rf : 0.20 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-*N*-[3-[1-[(*E*)-4-Dimethoxyphosphorylbut-2-enyl]-2,4-dioxo-pyrimidin-5-yl]prop-2-ynyl]-2-phenyl-acetamide (154c)



The title compound was prepared according to the general procedure 10B, affording after purification the desired product as a light orange solid (57%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 7.84 (s, 1H, H_6), 7.33 (d, 4H, *J* = 3.1 Hz, 4 x H_{arom}), 7.27 (ddt, 1H, *J* = 7.3, 3.8, 2.1 Hz, H_{arom}), 5.89-5.69 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 4.38 (t, 2H, *J* = 4.7 Hz, $H_{1'}$), 4.19 (s, 2H, C-CH_2), 3.82 (s, 3H, $H_{POMe-minor}$), 3.80 (s, 3H, $H_{POMe-major}$), 3.77 (s, 3H, $H_{POMe-major}$), 3.56 (s, 2H, C-CH_2), 3.02-2.89 (m, 2H, $H_{4'-minor}$), 2.78 (dd, 2H, *J* = 21.9, 6.4 Hz, $H_{4'-major}$).

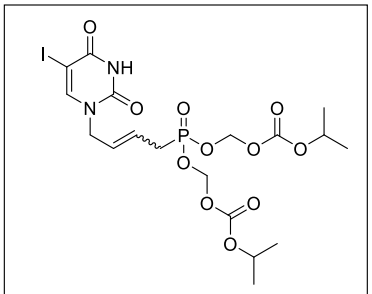
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 173.5 (NH-**CO**), 164.8 (**C**=O), 151.5 (**C**=O), 149.4 (C=**CH**), 136.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.4 (d, J^3_{C-P} = 14.5 Hz, **CH**=CH), 130.1 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.5 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 127.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.6 (d, J^2_{C-P} = 11.3 Hz, CH=**CH**), 99.7 (CH_2-**C**), 90.2 (C≡**C**-C), 74.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 53.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 50.4 (N-$\mathbf{CH_2}$), 43.6 (CO-$\mathbf{CH_2}$), 30.5 (NH-$\mathbf{CH_2}$-C), 29.2 (d, *J* = 139.3 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-}major}}$-P), 25.1 (d, J^1_{C-P} = 139.5 Hz CH-$\mathbf{CH_{2\text{-}minor}}$-P).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl3) δ 30.30.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{25}N_3O_6P$: 446.1475, found: 446.1476.

Rf : 0.22 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-*Bis*({[(propan-2-yloxy)carbonyl]oxy}methyl)-4-(3-iodo-4,6-dioxocyclohex-2-en-1-yl)but-2-ene-1-phosphonate (159)



The title compound was prepared according to the general procedure 11B, affording after purification the desired product as an oil (*E/Z ratio = 95/5*, 45%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 10.54 (bs, 1H, NH), 8.17 (s, 1H, $H_{6-minor}$), 8.03 (s, 1H, $H_{6-major}$), 5.58-5.72 (m, 2H, $H_{2',3}$), 5.71-5.58 (m, 4H, 2 x O-CH_{2POC}), 4.89 (p, 2H, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.56-4.52 (m, 2H, $H_{1'-minor}$), 4.41 (t, 2H, *J* = 4.9 Hz, $H_{1'-major}$), 2.91 (dd, 2H, *J* = 23.2, 7.7 Hz, $H_{4'-minor}$), 2.81 (dd, 2H, *J* = 22.6, 6.4 Hz, $H_{4'-major}$), 1.29 (d, 12H, *J* = 6.2 Hz, 4 x CH_{3POC}).

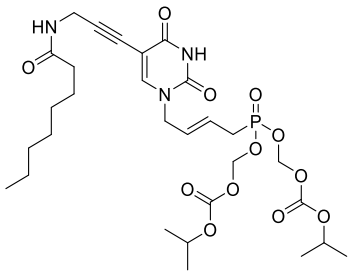
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 160.5 (**C**=O), 153.1 (2 x **C**=O_{POC}), 150.6 (**C**=O), 149.3 (C=**CH**), 130.1 (d, J^3_{C-P} = 15.1 Hz, **CH**=CH), 123.5 (d, J^2_{C-P} = 11.6 Hz, CH=**CH**), 84.3 (O-$\mathbf{CH_{2POC}}$), 84.2 (O-$\mathbf{CH_{2POC}}$), 72.9 (2 x O-$\mathbf{CH_{POC}}$), 67.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 49.0 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}major}}$), 44.7 (N-$\mathbf{CH_{2\text{-}minor}}$), 30.2 (d, *J* = 138.6 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-}major}}$), 26.2 (d, J^1_{C-P} = 140.3 Hz, CH-$\mathbf{CH_{2\text{-}minor}}$), 20.9 (4 x CH-$\mathbf{CH_{3POC}}$).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.87 (P_E), 25.89 (P_Z).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{27}IN_2O_{11}P$: 605.0383, found: 605.0383.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

(E)-Diisopropyl ((((4-(5-(3-octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)*bis*(oxy))*bis*(methylene)) *bis*(carbonate) (160a)



Chemical Formula: $C_{29}H_{44}N_3O_{12}P$
Exact Mass: 657,2663

The title compound was prepared according to the general procedure 10B, affording after purification the desired product as a light orange solid (37%).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 9.99 (bs, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, H_6), 7.44 (bs, 1H, NH), 5.90-5.71 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 5.66 (dq, 4H, *J* = 10.7, 5.5 Hz, 2 x O-CH_{2POC}), 4.90 (hept, 2H, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.41 (t, 2H, *J* = 4.9 Hz, $H_{1'}$), 4.14 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, C-CH_2), 2.81 (dd, 2H, *J* = 22.6, 6.3 Hz, $H_{4'}$), 2.19 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, C-CH_2), 1.59 (dd, 2H, *J* = 9.2, 5.2 Hz, CH_2), 1.30 (bd, 20H, *J* = 6.3 Hz, 4 x CH_2, 4 x CH_{3POC}), 0.92-0.83 (m, 3H, CH_3).

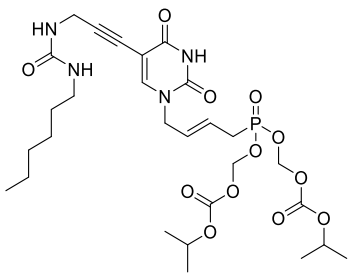
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 172.8 (NH-**CO**), 162.5 (**C**=O), 154.0 (2 x **C**=O), 150.7 (**C**=O), 148.5 (C=**CH**), 130.7 (d, $J^3_{C\text{-}P}$ = 15.1 Hz, **CH**=CH), 124.7 (d, $J^2_{C\text{-}P}$ = 11.5 Hz, CH=**CH**), 99.4 (CH_2-**C**), 90.2 (C≡**C**-C), 85.1 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 x O-**CH_2**-O), 74.8 (**C_{quat}**), 73.7 (2 x O-**CH**), 49.9 (N-**CH_2**), 36.4 (CO-**CH_2**), 32.4 (CH_2-**CH_2**), 31.1 (d, $J^1_{C\text{-}P}$ = 139.3 Hz, CH-**CH_2**-P), 30.4 (CH_2-**CH_2**), 29.9 (NH-**CH_2**), 29.7 (CH_2-**CH_2**), 26.3 (CH_2-**CH_2**), 23.2 (CH_2-**CH_2**), 21.8 (4 x C-**CH_{3POC}**), 14.3 (CH_2-**CH_3**).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 26.64.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{45}N_3O_{12}P$: 658.2735, found: 658.2723.

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 95:5).

(E)-(((4-(5-(3-(3-Hexylureido)prop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))*bis*(methylene) diisopropyl *bis*(carbonate) (160b)



Chemical Formula: $C_{28}H_{43}N_4O_{12}P$
Exact Mass: 658,2615

The title compound was prepared according to the general procedure 10B, affording after purification the desired product as a light orange solid (21%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 7.86 (s, 1H, H_6), 5.90-5.74 (m, 2H, $H_{2',3'}$), 5.72-5.63 (m, 4H, 2 x O-CH_{2POC}), 4.95 (p, 2H, *J* = 6.3 Hz, 2 x O-CH_{POC}), 4.40 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, $H_{1'}$), 4.12 (s, 2H, C-CH_2), 3.14 (td, 2H, *J* = 7.3, 3.1 Hz, NH-CH_2), 2.88 (dd, 2H, *J* = 22.7, 6.9 Hz, $H_{4'}$), 1.51 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH_2), 1.36 (t, 18H, *J* = 7.1 Hz, 3 x CH_2, 4 x CH_{3POC}), 0.98-0.91 (m, 3H, CH_3).

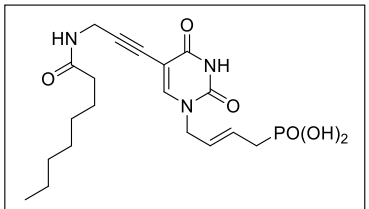
^{13}C NMR (101 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 164.9 (**C**=O), 160.5 (NH-**CO**-NH), 154.6 (2 x **C**=O), 151.5 (**C**=O), 149.3 (C=**CH**), 131.4 (d, J^3_{C-P} = 15.2 Hz, **CH**=CH), 124.2 (d, J^2_{C-P} = 12.0 Hz, CH=**CH**), 100.1 (CH_2-**C**), 91.7 (C≡**C**-C), 85.7 (d, *J* = 6.6 Hz, 2 x O-**CH_2**-O), 74.5 (2 x O-**CH**), 74.4 (**C_{quat}**), 50.5 (N-**CH_2**), 41.1 (NH-**CH_2**), 32.7 (CH_2-**CH_2**), 31.82 (NH-**CH_2**-C), 31.2 (CH_2-**CH_2**), 30.4 (d, J^1_{C-P} = 139.8 Hz, CH-**CH_2**-P), 27.6 (CH_2-**CH_2**), 23.6 (CH_2-**CH_2**), 21.8 (4x**C_{CH3POC}**), 14.3 (CH_2-**CH_3**).

^{31}P NMR (162 MHz, Methanol-*d*$_4$) δ 27.51.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{44}N_4O_{12}P$: 659.2676, found: 659.2678.

Rf: 0.27 (DCM/MeOH 95:5).

(*E*)-4-(5-(3-Octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (156a)



Chemical Formula: $C_{19}H_{28}N_3O_6P$
Exact Mass: 425,1716

The title compound was prepared according to the general procedure 12, affording after lyophilisation the desired product as a beige foam (92%).

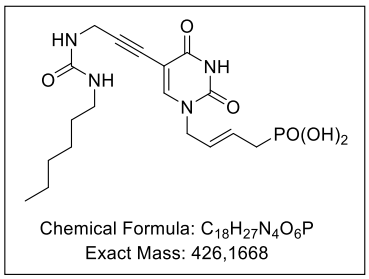
^{1}H NMR (400 MHz, *DMSO-d*$_6$) δ 11.42 (bs, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, H_6), 5.80-5.65 (m, 1H, $H_{2'}$), 5.54-5.43 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.23 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.04 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, H_9), 2.27 (dd, 2H, *J* = 20.7, 8.0 Hz, $H_{4'}$), 2.08 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H_{12}), 1.55-1.43 (m, 2H, CH_2), 1.23 (bs, 8H, 4 x CH_2), 0.85 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.9 (NH-**CO**), 162.0 (**C**=O), 149.6 (**C**=O), 148.3 (C=**CH**), 129.2 (**CH**=CH), 125.5 (CH=**CH**), 97.3 (**C_{quat}**), 89.7 (CH_2-**C**), 74.2 (C≡**C**-C), 49.1 (N-**CH_2**), 35.0 (CO-**CH_2**), 33.2 (d, J^1_{C-P} = 131.0 Hz, **CH_2**-P), 31.1 (CH_2-**CH_2**), 28.6 (CH_2-**CH_2**), 28.4 (NH-**CH_2**), 28.4 (CH_2-**CH_2**), 25.1 (CH_2-**CH_2**), 22.1 (CH_2-**CH_2**), 13.9 (CH_2-**CH_3**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 19.15.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{19}H_{27}N_3O_6P$: 424.1173, found: 424.1172.

(*E*)-4-(5-(3-Octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid (156b)



The title compound was prepared according to the general procedure 12, affording after lyophilisation the desired product as a beige foam (92%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 11.56 (bs, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H_6), 5.72 (dq, 1H, *J* = 13.5, 7.8, 6.4 Hz, $H_{2'}$), 5.61-5.43 (m, 1H, $H_{3'}$), 4.24 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.05-3.93 (m, 2H, H_9), 2.97 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, H_{13}), 2.33 (dd, 2H, *J* = 21.0, 7.2 Hz, $H_{4'}$), 1.41-1.29 (m, 2H, CH_2), 1.24 (bs, 6H, 3 x CH_2), 0.93-0.72 (m, 3H, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.1 (**C**=O), 157.49 (NH-**CO**-NH), 149.8 (**C**=O), 148.2 (C=**CH**), 130.0 (**CH**=CH), 126.2 (CH=**CH**), 97.6 (**C**$_{quat}$), 91.0 (CH_2-**C**), 73.8 (C≡**C**-C), 49.0 (N-**CH$_2$**), 41.4 (NH-**CH$_2$**), 32.1 (d, J^1_{C-P} = 134.1 Hz, **CH$_2$**-P), 31.2 (NH-**CH$_2$**), 29.8 (CH_2-**CH$_2$**), 29.5 (CH_2-**CH$_2$**), 26.0 (CH_2-**CH$_2$**), 22.0 (CH_2-**CH$_2$**), 14.0 (CH_2-**CH$_3$**).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 19.20.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M-H]^-$ calcd for $C_{19}H_{26}N_3O_6P$: 425.1780, found: 425.1783.

****

Chapitre 3 : Derives polycycliques azotes

1. Criblage biologique d'une chimiothèque

La littérature reporte à ce jour seulement cinq molécules possédant des activités inhibitrices de la *FDTS*. Parmi ces structures, trois sont des hétérocycles **40**, **41** et **45** polyazotés et une possède des capacités ox/red importante **43**. La dernière structure est un dérivé nucléotidique du dUMP (**46**). Ces structures mettent en évidence les caractéristiques essentielles que doivent présenter un candidat à l'inhibition de la *FDTS* : une capacité à former des liaisons hydrogène et de type π-stacking, mais aussi une certaine flexibilité afin de pouvoir se placer dans la poche du site actif (Schéma 55).

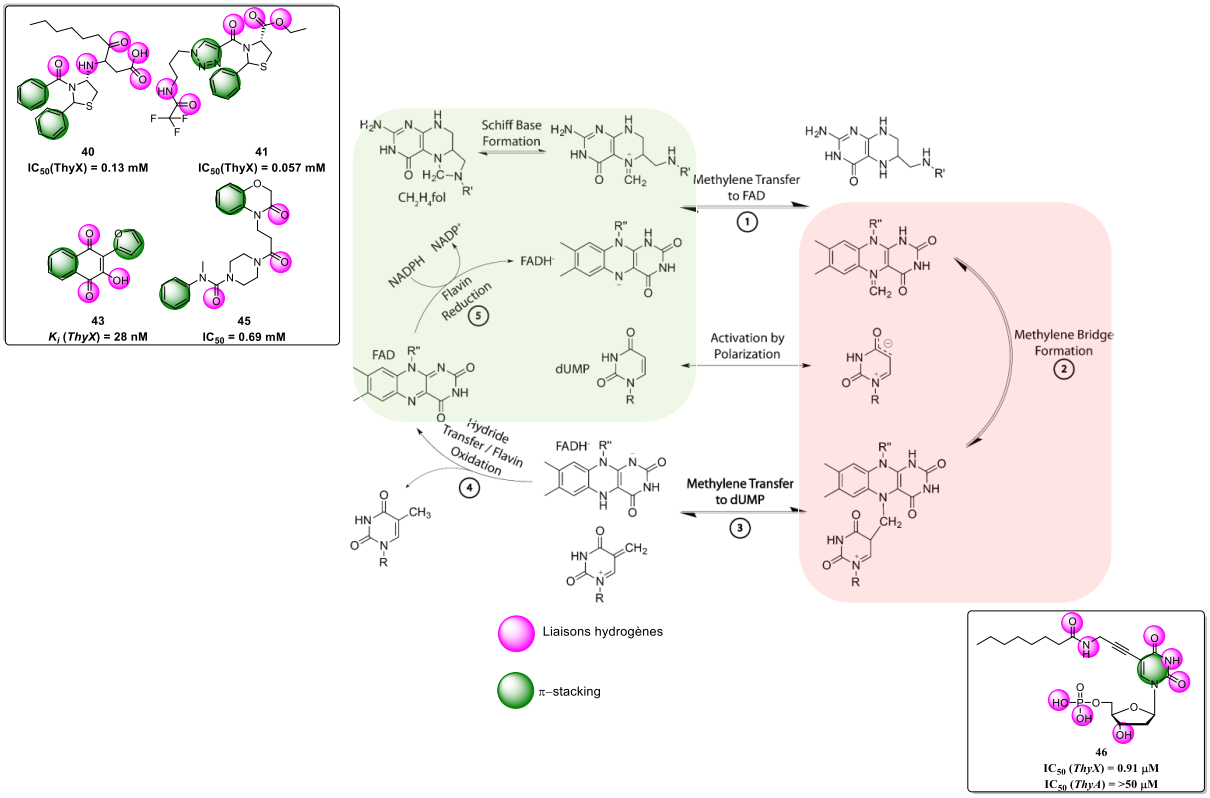


Schéma 55 *: Inhibiteurs connus de la FDTS.*

A la suite des résultats sur les ANPs nous avons décidé d'effectuer un criblage de différentes séries de molécules synthétisées par notre équipe. Nous avons choisi des composés hétérocycliques présentant des groupements et structures capables de créer des liaisons hydrogène, interactions de type π-stacking et de l'encombrement stérique afin d'identifier un nouveau « Hit ». Les tests biologiques ont été réalisés sur la première étape de la biosynthèse (Schéma 55, partie verte) *via* le NADPH oxidase assay, permettant ainsi d'obtenir rapidement une réponse sur la capacité inhibitrice d'une molécule sur l'enzyme à 200 µM.

Nous avons donc évalué en collaboration avec l'équipe du Pr. Myllykallio des hétérocycliques décrits dans la littérature (Thèse Dr. Ozkan Sari). La première série testée est composée de petits hétérocycliques dérivés d'une base pyrimidique pour les six premières **162-167** et d'indoles pour les deux dernières **168-169**. De par leurs structures relativement planes, ils pourraient avoir la capacité de s'intercaler entre les substrats naturels, mais aussi se lier dans le site actif *via* des liaisons hydrogène (Figure 68).

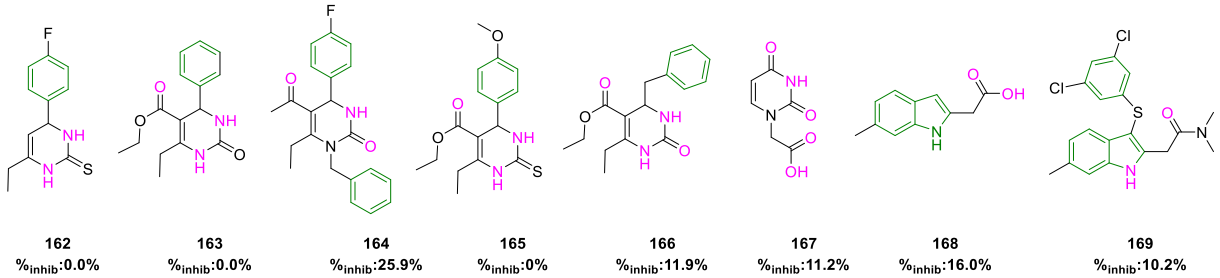


Figure 68 *: Evaluation de notre bibliothèque d'hétérocycles sur la FDTS.*

Les faibles inhibitions de ces structures nous ont contraint à nous tourner vers d'autres structures hétérocycliques dérivés dihydropyrimidines **170** et **171**, de triazines **172** et **173** et de pyrdopurine **174-179** possédant une capacité plus faible à former des liaisons hydrogène et plus importante pour faire des interactions de type π-stacking (Figure 69).

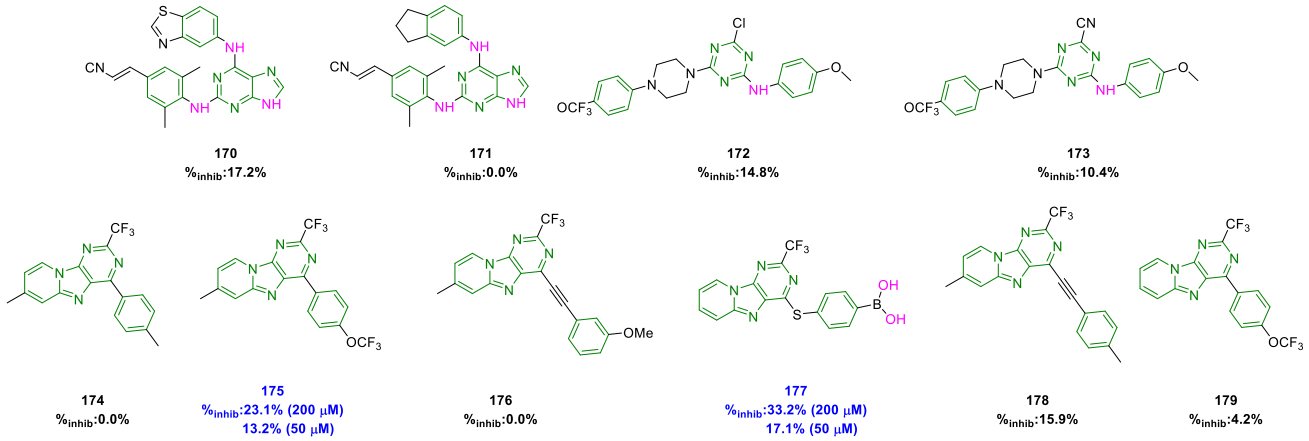


Figure 69 *: Evaluation de polycycles azotés sur la FDTS.*

Dans cette série deux hétérocycles possèdent à la fois une inhibition intéressante à 200 µM mais aussi à 50 µM. Ces structures **175** et **177**[145] inhibent respectivement 13.2 et 17.1 % à 50 µM. Ces structures dérivées de pyridopurines décorées par de nombreux groupements aromatiques, permettent la création d'interactions de type π-stacking. La présence de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène ont certainement joué un rôle sur les inhibitions obtenues. C'est donc sur la base de ces deux squelettes que nous avons décidé d'articuler les pharmacomodulations pour le développement de polycyles à visée inhibitrice de la *FDTS*.

[145] Tber, Z.; Biteau, N. G.; Agrofoglio, L. A.; Cros, J.; Goffinont, S.; Castaing, B.; Nicolas, C.; Roy, V., Microwave-assisted Suzuki–Miyaura and Sonogashira coupling of 4-chloro-2-(trifluoromethyl)pyrido[1,2-e]purine derivatives. *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**.

Grâce aux données structurales obtenues par modélisations, nous avons décidé de conserver l'agencement des cycles et de substituer la partie pyrimidine par une pyrimidin-2,4-dione permettant des interactions hydrogène entre les azotes et les oxygènes du cycle tout en gardant un caractère pseudo aromatique. Avec cette structure plane, nous avons pu développer une structure pouvant s'intercaler entre les 3 substrats naturels de l'enzyme (Folate/FAD ou FAD/dUMP). Ces derniers sont maintenus ensemble dans le site actif grâce au π-stacking à une distance de 3.5 et 3.3 Å (Figure 70). [146]

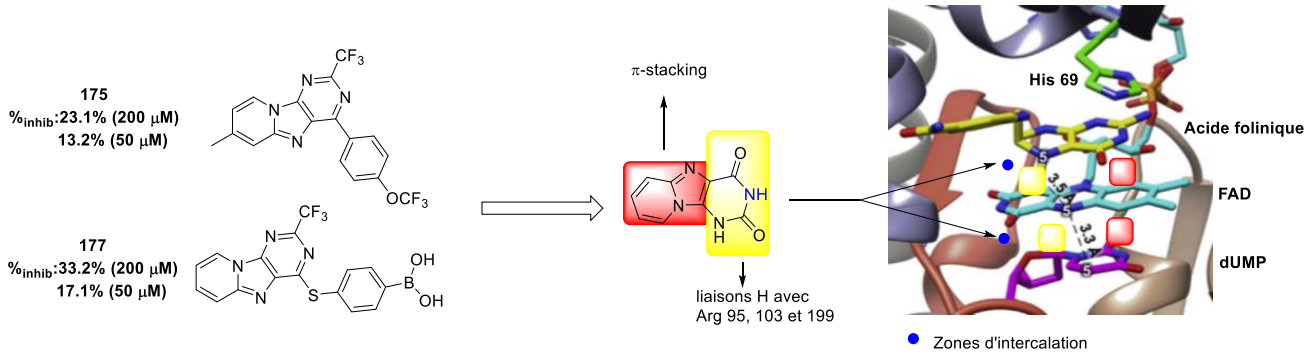


Figure 70 : Modification des hétérocycles cibles.

2. Description et généralités sur les pyridopurined-2,4-ione

Il existe deux grandes structures dérivant des pyridopurine-2,4-diones : les pyrido[2,1-*f*]purine-2,4(*1H,3H*)-diones et les pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-diones. La différence vient de l'orientation du noyau pyrimidine et donc de l'angle de l'hétérocycle. La synthèse de ces structures est relativement peu décrite dans la littérature et aucune de ces deux familles n'ont été testées sur des cibles visant une activité antibactériennes (Figure 71).

Figure 71 *: Deux familles de pyridopurinediones.*

1.1. Les pyrido[2,1-*f*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione

Ces dérivés polycycliques sont les plus représentés dans la littérature, ils présentent une inversion de l'angle structural par rapport à notre squelette de référence. Ils sont largement reportés comme antagonistes des récepteurs de l'adénosine A_3 humaine,[147] en se couplant aux protéines G (famille de récepteur *trans*membranaire). Ces récepteurs sont impliqués dans la relaxation des muscles cardiaques, la contraction des muscles lisses (ceux autour de la vessie), cardioprotecteur pour les ischémies cardiaques (diminution de l'apport sanguin, donc en oxygène) et inhibiteur de la dégranulation

[146] Karunaratne, K.; Luedtke, N.; Quinn, D. M.; Kohen, A., Flavin-dependent thymidylate synthase: N5 of flavin as a methylene carrier, *Arch.Biochem. Biophys*., **2017**, 632, 11-19.
[147] Baraldi, P. G.; Borea, P. A., New potent and selective human adenosine A_3 receptor antagonists, *Current Awarness*, **2000**, *21*, 456-459.

(processus de libération de molécules cytotoxiques antimicrobiennes) et des neutrophiles[148] (cellules sanguines ayant un rôle dans le système immunitaire). Ces récepteurs inhibent aussi la croissance des cellules mélanomes et donc sont une cible intéressante dans les thérapies anticancéreuses (Figure 72).[149a,b,c]

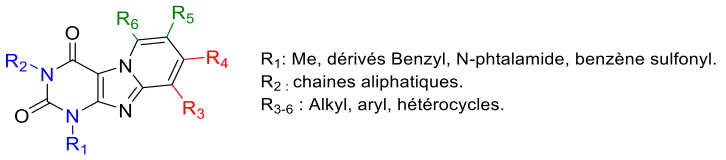


***Figure 72** : Structure générale et fonctionnalisations des pyrido[2,1-f]purine-2,4(1H,3H)-dione.*

Dans la littérature, on retrouve deux voies de synthèses de ces dérivés polycycliques azotés.

- La première reportée par *Peng et al.*[150a,b] en 2012 par une double activation CH *via* un catalyseur au rhodium en présence de cuivre dans le toluène (Schéma 56).

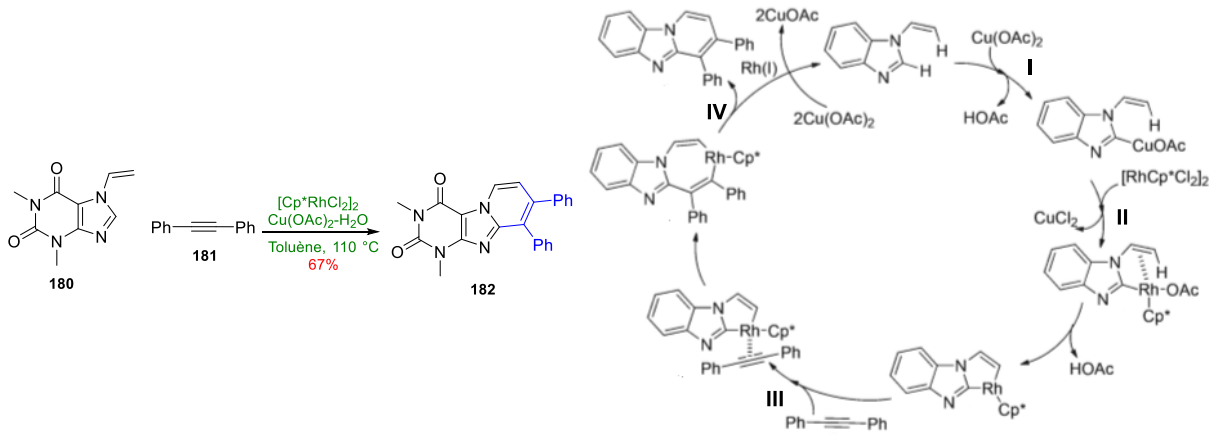


***Schéma 56 :** Voie de synthèses à partir d'un motif tétrahydropurine et mécanisme proposé[147a,b].*

Dans un premier temps, le cuprate va substituer en agissant comme un acide de lewis un des deux hydrogènes (**I**) ; il y aura ensuite une transmétalation durant laquelle le rhodium va échanger ses ligands chlorure avec un acétate du cuivre afin de former le NHC(**II**). Le rhodium est stabilisé par la présence de l'insaturation (interaction π). L'approche de la triple liaison se fait par les mêmes

[148] Bouma, M. G.; Jeunhomme, T. M.; Boyle, D. L.; Dentener, M. A.; Voitenok, N. N.; van den Wildenberg, F. A.; Buurman, W. A., Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J. Immunol.*, **1997**, *158*, 5400-5408.

[149] a) Cheong, S. L.; Federico, S.; Venkatesan, G.; Mandel, A. L.; Shao, Y.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G., The A_3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches. *Med. Res. Rev.*, **2013**, *33*, 235-335. b) Priego, E.; Pérez-Pérez, M.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; de Vries, H.; Ijzerman, A.; Camarasa, M.; Martín-Santamaría, S., Selective human adenosine A_3 antagonists based on pyrido[2,1-*f*]purine-2,4-diones: novel features of hA_3 antagonist binding. *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 111-119. c) Priego, E.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; IJzerman, A.; Camarasa, M.; Pérez-Pérez, M., Pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as a novel class of highly potent human A3 adenosine receptor antagonists, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3337-3344.

[150] a) Huang, J.; Dong, L.; Han, B.; Peng, C.; Chen, Y., Synthesis of aza-fused polycyclic quinolines *via* Double C-H Bond activation. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 8896-8900. b) Dong, L.; Huang, J.; Qu, C.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Hanb, B.; Peng, C., Rhodium(III)-catalyzed vinylic sp2 C–H bond functionalization: efficient synthesis of pyrido[1,2-α]benzimidazoles and imidazo[1,2-α]pyridines, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 6142-6149.

interactions (**III**). La formation du cycle se fait par une insertion CH *ortho*vinylique. Le cycle final est obtenu par une élimination réductrice (**IV**) et le catalyseur est régénéré par oxydation du Rh(I).

- La seconde approche fait intervenir une synthèse multi-étapes mentionnée par de nombreux groupes.[151a,b,c] La différence vient de la construction du noyau pyrimidine vers le noyau aromatique en intégrant ainsi de nombreux substituants sur chacune des positions (Schéma 57).

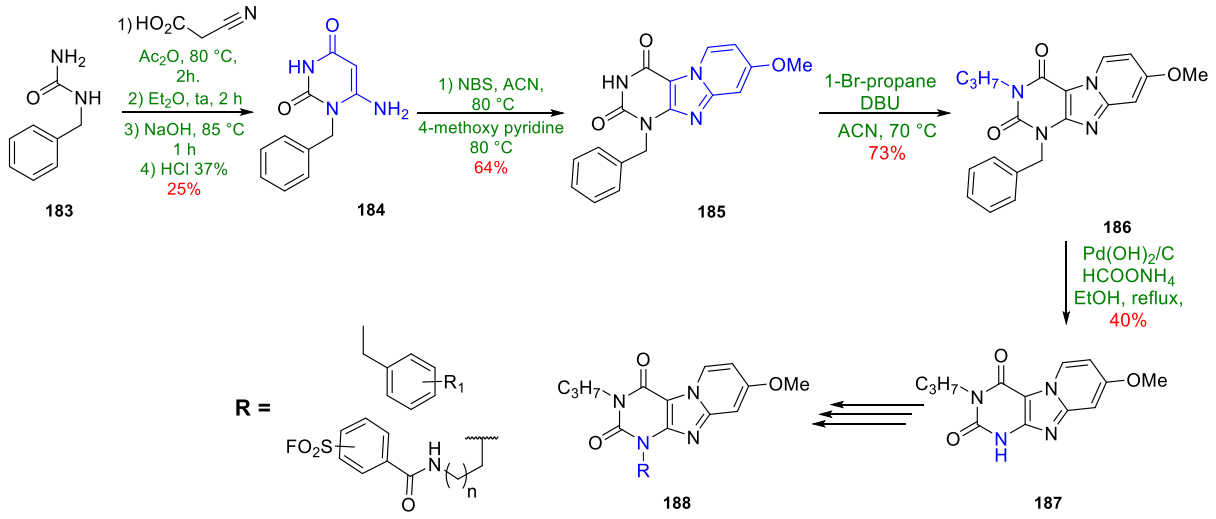


Schéma 57 *: Deuxième voie de synthèse des Pyrido[2,1-f]purine-2,4(1H,3H)-dione.*

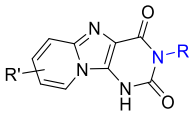
La première étape est l'obtention du produit de cyclisation **184** à partir de **183** et l'acide cyano acétique en présence d'anhydride acétique. Dans un second temps ce composé est mis en présence de NBS afin d'introduire un halogène en position 5 permettant à la méthoxypyridine de réagir et ainsi former le squelette du tricycle final. Les deux dernières étapes conduisant à la formation de **194** étant des étapes d'alkylation avec du DBU et un dérivé halogéné et de déprotection avec un catalyseur au Pd et du formiate d'ammonium. La molécule **188** représentant le squelette des produits pouvant être obtenues suite à diverses pharmacofonctionnalisations en une étape pour l'insertion d'un dérivé benzyle et trois étapes pour les dérivés fluorosulfoxides.

1.2. Les pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione

Cette structure, proche des pyrido[2,1-*f*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (Figure 73) est peu discutée dans la littérature. Ces molécules ont été reportées comme possédant des activités anticancéreuses sur des lignées cellulaire HEK 293T (rein).[152] Aujourd'hui, trois approches synthétiques ont été reportées.

[151] a) Priego, E.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; IJzerman, A.; Camarasa, M.; Pérez-Pérez, M., Pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as a novel class of highly potent human A3 adenosine receptor antagonist., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3337-3344 b) Yang, X.; van Veldhoven, J. P. D.; Offringa, J.; Kuiper, B. J.; Lenselink, E. B.; Heitman, L. H.; van der Es, D.; IJzerman. A. P., Development of covalent ligands for G protein-coupled receptors: A case for the human adenosine A3 receptor, *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 3539-3552. c) Xia, L.; Burger, W. A. C.; van Veldhoven, J. P. D.; Kuiper, B. J.; van Duijl,T T.; Lenselink, E. B.; Paasman, E.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. J., Structure–affinity relationships and structure–kinetics relationships of pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as human adenosine A3 receptor antagonists, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 77555-7568 .

[152] Chaudhary, V.; Das, S.; Nayak, A.; Guchhait, S. K.; Kundub, C. N., Scaffold-hopping and hybridization based design and building block strategic synthesis of pyridine-annulated purines: discovery of novel apoptotic anticancer agents, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 26051-26060.



R = dérivés benzyliques, dérivés phénylliques
R' = hallogènes, alcanes, acides, phenyles

Figure 73 *: Structure générale et fonctionnalisations des pyrido[2,1-f]purine-2,4(1H,3H) connues.*

- La première approche de *Maes et al.*[153] en 2013 s'appuie sur une annulation C-H à partir d'un dérivé pyrimidique *per*-protégé substitué sur sa position C^5 par une anilopyridine-2,4-dione catalysée par du fer et de l'oxygène (Schéma 58).

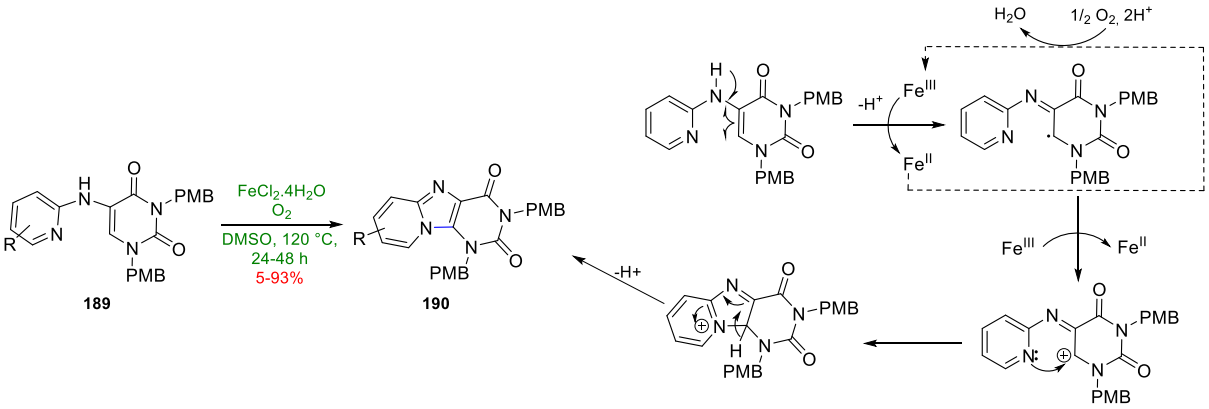


Schéma 58 *: Première voie de synthèse et potentiel mécanisme.*

C'est une réaction radicalaire, la réduction du fer va permettre d'initier la formation du radical sur **189** en C^6. La présence d'oxygène dans le milieu permet l'oxydation du fer afin d'entretenir le cycle catalytique. Deux moles de fer sont nécessaires pour former une mole de produit final. La position 5 est substituée par l'anion délocalisé par résonnance sur la pyridine lors de la deuxième réduction. L'aromatisation du tricycle intervient par élimination d'un hydrogène afin de former **190**.

- La seconde par *Chaudhary et al.*[154] en 2015 passe par deux cyclisations sous activation micro-onde, la première suivant une réaction de Strecker-Ugi *via* du TMSCN, DABCO et de l'éthyle glyoxolate et la seconde *via* un isocyanate en présence d'éthanolate de sodium (Schéma 59).

[153] Maes, J.; Rauws, T. R. M.; Meas, B. U W., Synthesis of C8-N9 annulated purines by iron-catalyzed C-H aination, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 9137-9141.
[154] Guchhait, S. K.; Chaundhary, V., Desilylative activation of TMSCN in chemoselective Strecker-Ugi type reaction : functional fused imidazoles as building blocks as an entry route too annulated purines, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 6694-6705.

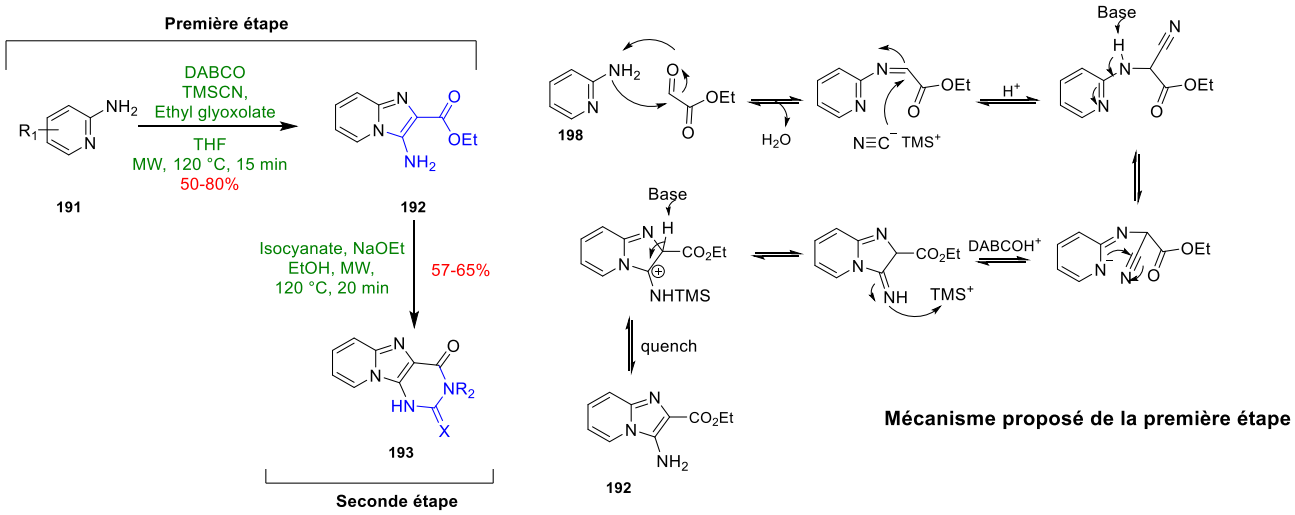


Schéma 59 *: Seconde voie de synthèse et mécanisme proposé de formation de l'intermédiaire* ***192****.*

La première étape est une réaction de Strecker-Ugi permettant la formation de l'imine à partir de l'amine libre **191** et de l'éthyle glyoxalate. Par ajout de TMSCN, et de DABCO comme activateur, le groupe cyano est additionné en α de l'ester. La cyclisation a été induite par l'arrachement du proton de l'amine libre. La nouvelle imine formée peut capter le TMS dans le milieu et le proton acide en α de l'ester est éliminé afin d'aromatiser la structure. Le lavage par une solution basique permet de former l'amine libre **192**. La seconde étape est une cyclisation avec le dérivé isocyanate correspondant par substitution de ce dernier par l'amine libre déprotonnée. Le nouvel anion ainsi formé vient s'insérer sur le carbonyle et par libération éthanol, la cyclisation et l'aromatisation sont effectuées afin de former **193**.

- Une dernière méthode a été publiée par *Mahalanobish et al.*[155] en 2017. Elle passe par une cyclisation intermoléculaire entre un dérivé uracile diamine et un dérivé benzaldéhyde substitué en α par une chaîne alcyne *via* une catalyse au cuivre (Schéma 60).

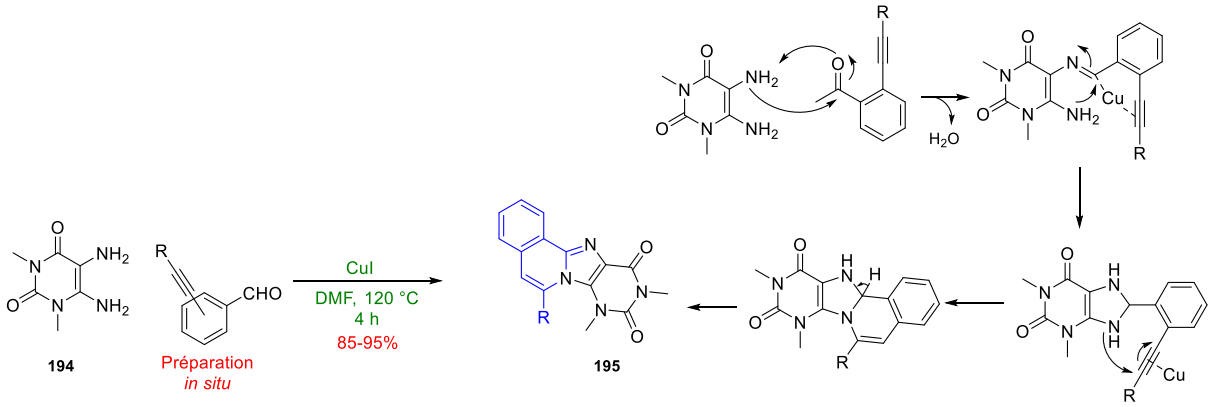


Schéma 60 *: Dernière voie de synthèse et mécanisme de cyclisation.*

Dans cette voie de synthèse, le précurseur de cyclisation est obtenu *in situ* par une réaction de Sonogashira. Dans un second temps, l'ajout du composé diaminé **194** a permis la formation de l'imine. En présence de cuivre, une chélation avec la triple liaison est obtenue par des interactions π.

[155] Kumar, P.; Mahalanobish, M.; Mahalanobish, A., Copper accelerated one-pot sequential tandem synthesis of tetrahydropurinoisoquinoline derivatives, *Heterocycles*, **2017**, *94*, 1847-1855.

L'addition sur la triple liaison activée conduisant au cycle à 5 est réalisée en présence de la base, augmentant le caractère nucléophile de l'amine. Par la même réaction le cycle à 6 est formé **195**.

La suite de notre travail s'est articulé autour de ce squelette, nous avons décidé de nous appuyer sur la voie de synthèse développée par *Chaudhary et al.* afin d'obtenir notre squelette hétérocyclique. De cette manière, il nous a été possible de moduler la structure de manière convergente avec un grand nombre de substrats sur la partie pyrimidine-2,4-dione et aromatique.

3. Synthèse de dérivés polycycliques azotés

3.1. Rétrosynthèse envisagée

Sur la base des deux squelettes **175** et **177** nous avons décidé de modifier une partie de la molécule afin d'avoir un mime plus affin du substrat naturel (dans ce cas-ci, le FAD). Notre structure de base étant un polycycle azoté nous avons supposé qu'il pourrait interagir de la même manière que la partie isoalloxazine du FAD (interactions de type π-stacking avec la ptérine du dihydrofolate et une histidine ainsi que les interactions hydrogène de l'azote N^3 et O^2). De par sa structure plane il peut s'intercaler entre le FAD et le CH_2THF ou entre le FAD et le dUMP afin de bloquer les transferts de méthylène entre les différents substrats, en bloquant ainsi la formation du pont méthylénique (Figure 74).

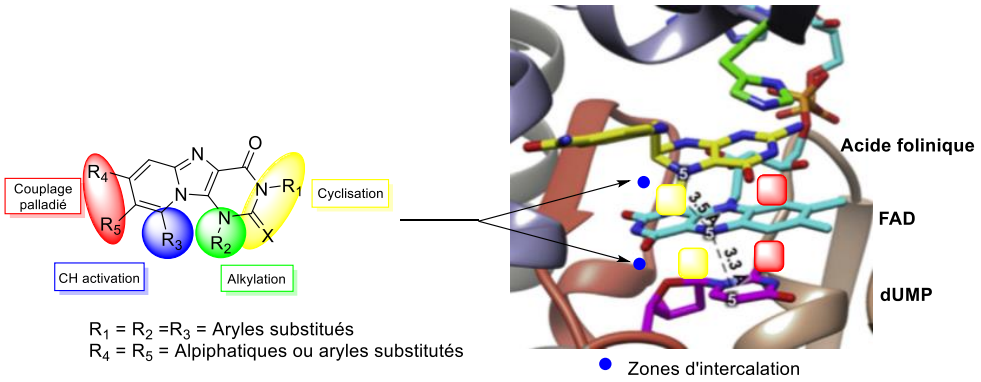


Figure 74 *: Structure générale de l'inhibiteur et fonctionnalisations potentielles.*

Avec cette structure de base nous avons effectué diverses modifications chimiques sur les positions N^3 et C^2 par cyclisation d'isocyantes, en N^1 par alkylation *via* des dérivés halogénés, en C^7 et C^8 *via* des couplages organoorganopalladés et en C^9 *via* une activation CH en présence d'un groupement directeur bidentate. Afin d'obtenir le « Hit » le plus actif sur notre cible, une synthèse a été développée afin d'étudier la relation structure/activité de manière convergente (Schéma 61).

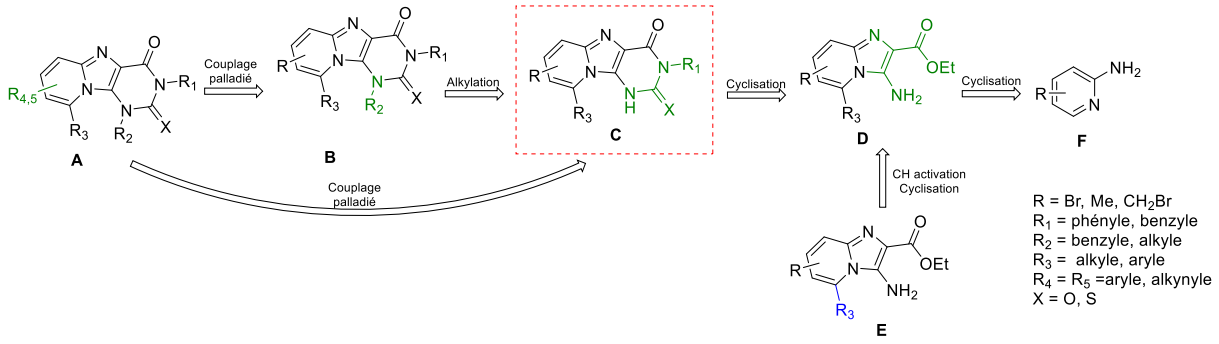


Schéma 61 *: Rétrosynthèse envisagée.*

Dans cette synthèse notre squelette de base **C** a été obtenu d'après la voie de synthèse décrite par *Chaudhary et al* à partir des dérivés aminopyridines correspondants. Cette structure sera la première criblée biologiquement sur *ThyX Mtb*. Nous avons substitué dans un second temps la position N^1 **B**. La troisième phase a été réalisée à partir du composé **D** qui a été substitué par un auxiliaire bidentate afin de pouvoir atteindre la position C^9 par une activation CH, elle a ensuite été déprotégée et cyclisée avec le meilleur groupement R_1 **C**. La dernière phase étant l'insertion des différentes chaînes aliphatiques et groupements aryles *via* des couplages de Sonogashira et Suzuki-Miyaura. Ils ont été réalisés sur les dérivés N^1-alkylés **B** ou non **C**. Les différents substituants insérés sur la structure ont pour but de mieux comprendre les interactions avec le site actif. Ils présentaient des capacités à former des liaisons spécifiques différentes (hydrogènes, hydrophobes, π-stacking) pour ainsi déterminer les interactions primordiales pouvant augmenter l'inhibition.

L'ensemble des composés a été évalués biologiquement sur la *ThyX Mtb via* le NADPH oxidase assay, mais aussi avec le tritium release assay. Les meilleurs hétérocycles ont été modélisés dans l'enzyme (*ThyX Mtb* 3GWC avec et sans FAD) afin d'observer leurs conformations spatiales et leur environnement proche pour orienter de manière réfléchie la synthèse des différents dérivés.

3.2. Préparation des dérivés N^3

3.2.1. Synthèse

Les premières modulations ont été réalisées afin de fonctionnaliser les positions N^3 et O^2, *via* l'utilisation de différents isocyanates et thioisocyantes. Nous avons ainsi étudié l'influence de deux types de groupement : benzyle et phényle (différence de degré de liberté) ainsi que leurs substitutions.

Le composé **196** a été obtenu à partir de la 2-aminopyridine **197** suivant la procédure décrite par *Chaudhary et al.* à 120 °C dans le THF en présence d'éthylglyoxolate et de cyanotriméthylsilyl (TMSCN) (Schéma 62).

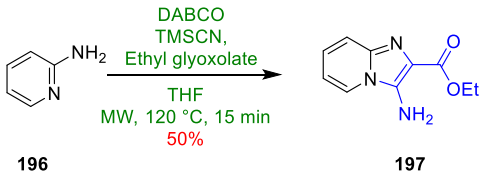
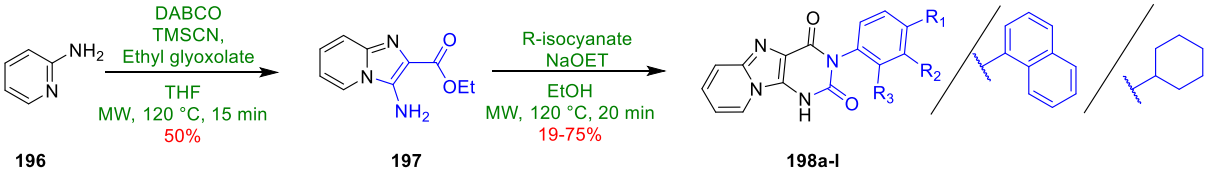


Schéma 62 *: Cyclisation selon Strecker-Ugi.*

Le dérivé aminoester **197** a été obtenu avec un rendement de 50%. Il a été par la suite engagé dans diverses cyclisations avec des dérivés phénylisocyanates en présence d'éthanolate de sodium (NaOEt) dans l'éthanol afin de conduire aux tricycles substitués souhaités **198a-l** (Tableau 31). Les différents isocyanates utilisés sont commerciaux et permettent la création d'interactions hydrogène ou hydrophobe.



Entrées	R_1	R_2	R_3	Produits finaux	Rendements
1	**F**	**H**	**H**	**198a**	75%
2	**Cl**	**H**	**H**	**198b**	39%
3	**Br**	**H**	**H**	**198c**	23%
4	**H**	**F**	**H**	**198d**	19%
5	**F**	**F**	**H**	**198e**	38%
6	**F**	**H**	**F**	**198f**	64%
7	**CF_3**	**H**	**H**	**198g**	58%
8	**Me**	**H**	**H**	**198h**	24%
9	**Me**	**Me**	**H**	**198i**	48%
10	**OMe**	**H**	**H**	**198j**	34%
11	**Naphtyle**			**198k**	56%
12	**Cyclohéxyle**			**198l**	X

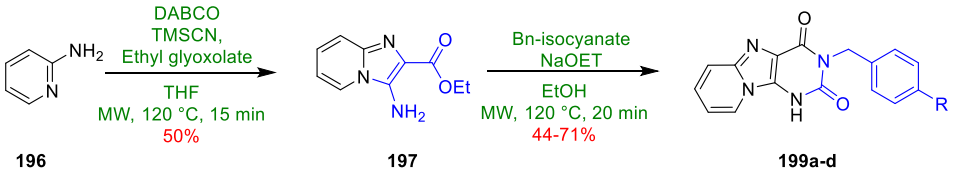
Tableau 31 *: Résultats de cyclisations avec des dérivés phénylisocyanates.*

La cyclisation avec les différents dérivés phénylisocyanates a permis d'isoler douze hétérocycles différents présentant des substituants polaires et apolaires. Les rendements des dérivés phényliques vont de 19% à 75%, cela est principalement lié à plusieurs facteurs :

- La qualité du NaOEt utilisée. Il a été nécessaire d'utiliser du NaOEt commercial potentiellement moins réactif que le *in situ*. Sa préparation est plus complexe car il est nécessaire de doser la solution afin de s'assurer de la concentration, l'hydrolyse de cette solution est plus rapide que le solide conditionné sous Ar.
- La stabilité des différents isocyanates dans les conditions d'activations.
- Les polarités importantes de ces molécules.

Le composé **198l** n'a pas pu être obtenu, le cyclohéxyle isocyanate étant instable dans les conditions utilisées, aucune conversion n'a été observée.

Ces conditions ont été utilisées avec des dérivés benzylisocyantes afin d'augmenter le degré de liberté des substituants sur la position N^3, **199a-d** (Tableau 32).

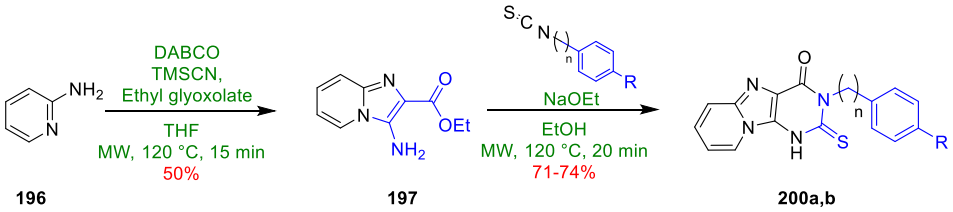


Entrées	R	Produits finaux	Rendements
1	**H**	**199a**	71%
2	**F**	**199b**	52%
3	**CF_3**	**199c**	46%
4	**Me**	**199d**	44%

Tableau 32 *: Résultats de cyclisations avec des dérivés benzylisocyanates.*

Les dérivés benzyliques ont été obtenus avec des rendements supérieurs à leurs analogues phényliques allant de 44% à 71%. La présence du groupement CH_2 a permis de diminuer la polarité de ces structures.

Afin d'étudier l'influence de l'hétéroatome sur la position C^2 dans le site actif, nous avons réalisé les cyclisations avec des dérivés thioisocyanate dans les mêmes conditions (Tableau 33).

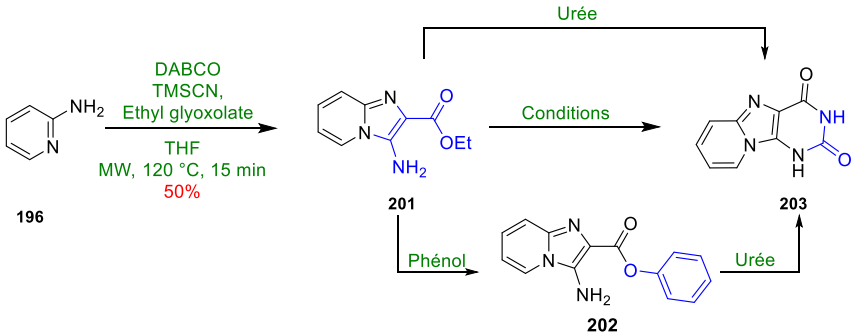


Entrées	R	n	Produits finaux	Rendements
1	**F**	0	**207a**	74%
2	**H**	1	**207b**	71%

Tableau 33 *: Résultats de cyclisations avec des dérivés (thio)isocyanate.*

Le passage d'un isocyanate à un thioisocyanate ne semble pas avoir d'influence sur la réactivité et les rendements. Malgré la moindre stabilité générale des C=S (présence d'une orbitale d dans laquelle les électrons de la liaison π peuvent aller) par rapport à C=O, les hétérocycles C=O et C=S sont obtenus avec de bons rendements.

Différents essais ont été menés afin d'obtenir le composé cyclisé avec l'urée pour former l'hétérocycle dont les positions N^3 et N^1 sont libres **203** sans succès (Tableau 34).



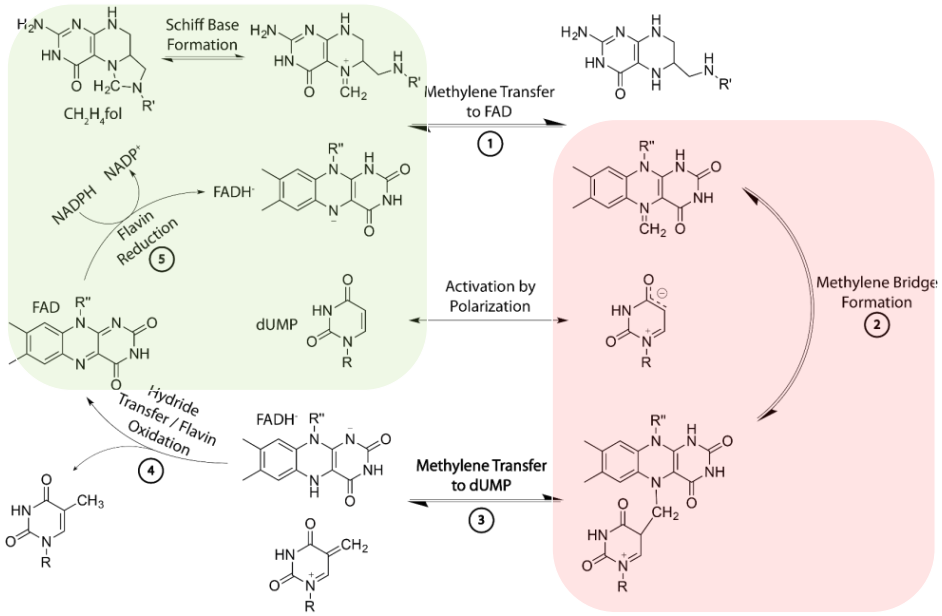
Entrées	Conditions	Observations	Rendements
1	Urée, 150 °C, 12 h	Aucune conversion **201**	X
2	Urée, phénol, 150 °C, 24 h	Mélange complexe	X

Tableau 34 *: Essais de cyclisation à l'urée.*

Les premières conditions (Entrée 1) mises en place, reportées pour la formation des quinazolindiones[156] n'ont pas permis de convertir le produit de départ. Dans le cas de l'ajout du phénol, celui-ci devait aider à la cyclisation comme groupement activateur (Entrée 2), par un produit de transestérification **202** à partir du réactif de départ **201**, l'urée venant cycliser par la suite. Cette cyclisation a conduit à un mélange qui n'a pas pu être séparé, que ce soit par précipitation ou purification sur silice ou alumine.

3.2.2. Résultats biologiques

Les dix-sept molécules ainsi synthétisées avec des rendements allant de 19-75% ont été évaluées sur la première étape de la biosynthèse *Thyx Mtb via* le NADPH oxidase assay en présence de FAD (Figure 75). Cette série de molécule est la partie centrale de nos futurs composés, *via* ces tests, nous avons cherché à mettre en évidence le synthon présentant les meilleures interactions (stacking, hydrogène, hydrophobe), avec le site actif.



[156] Prabhakar, V.; Sudhakar, B. K.; Ravindranath, L. K.; Latha, J.; Venkateswarlu, B., Synthesis, characterisation and biological evaluation of quinazoline derivatives as novel anti-microbial agents, *Organic Chem. Curr. Res.*, **2016**, *5*, 4.

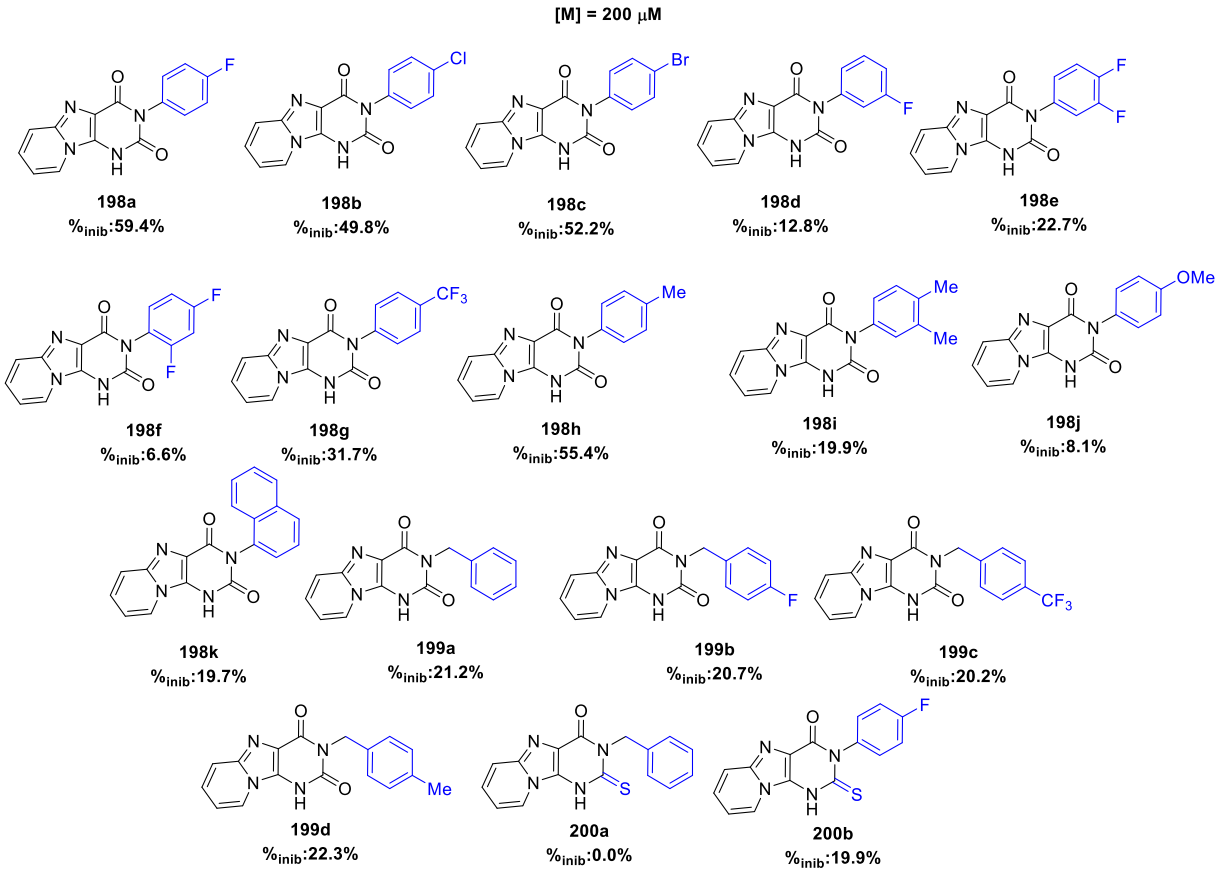


Figure 75 *: Résultat du NADPH oxidase assay pour la première étape de la biosynthèse.*

Une des premières observations qui peut être faite est la différence entre une substitution par un groupe benzyle ou phényle. Les différents groupements benzyliques montrent une inhibition plus faible en comparaison des groupements phényliques. Cela doit être dû à la présence du groupement méthylène conférant à la molécule un degré de liberté et donc une difficulté à se fixer dans le site actif (perte de 37% entre **198a** et **199b** comme pour **198c** et **199d**). La seconde observation est l'importance du O^2, lorsque celui-ci est substitué par S^2, on observe une perte de plus de 40% d'inhibition (**198a** et **200b**) voir totale (**199a** et **200a**), surement causé par une perte d'interaction(s) dans le site actif par la taille de l'atome (couche électronique supplémentaire, d(O) : 0.48 Å / d(S) : 0.88 Å). La dernière observation vient des différents groupements sur le phényle, les fonctionnalisations capables de faire des interactions hydrogène (F, Br, Cl) et hydrophobe (Me, CF_3) possèdent une meilleure inhibition alors que des groupements naphtyle, ou méthoxy la diminuent. Les positions *para* présentent aussi de meilleurs inhibitions que *méta* (**198a** > **198j**). Les poly-substitutions tendent à diminuer l'inhibition des molécules.

Nous avons testé les sept meilleurs hétérocycles sans ajout de FAD afin de voir si nos molécules peuvent entrer en concurrence avec ce dernier (Figure 76).

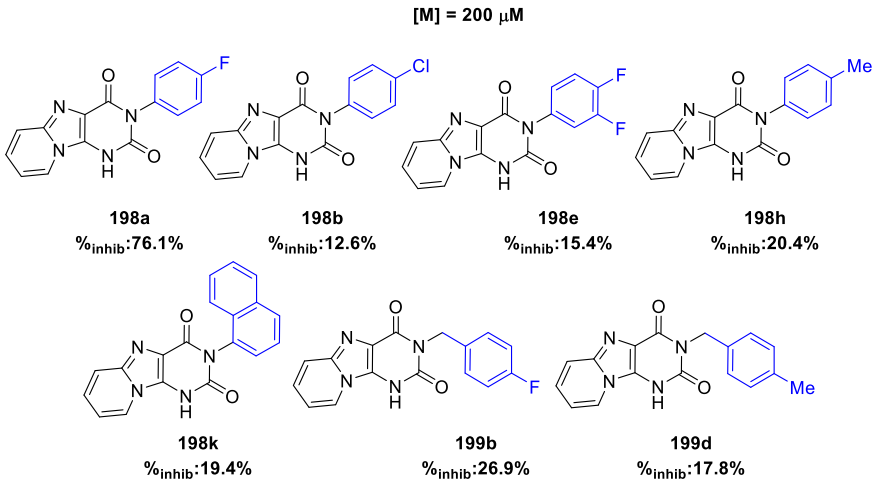


Figure 76 *: Tests NADPH oxidase assay sans ajout de FAD.*

En diminuant la concentration en FAD un seul des composés voit son inhibition augmenter **198a**, les autres voient leurs inhibitions diminuer (**198b**, **198e**, **198k**) ou stabiliser (**199b**, **199d**). On peut en déduire que le composé **198a** rentre en compétition avec le FAD et une diminution de la concentration de ce dernier lui permet de mieux inhiber l'enzyme. Pour les autres, ils doivent se maintenir dans le site par de possibles interactions de type π-stacking et l'absence de FAD diminue donc logiquement leurs capacités à se maintenir à l'intérieur.

Les deux tests suivants ont porté sur l'inhibition avec une concentration en molécule plus faible (50 µM) pour le premier et dans un second avec une concentration plus faible (50 µM) en dUMP qui est un inhibiteur à excès de substrat sur l'enzyme (dans ce cas-ci la concentration est suffisamment basse pour ne pas être dans ce cas-là) (Figure 77).

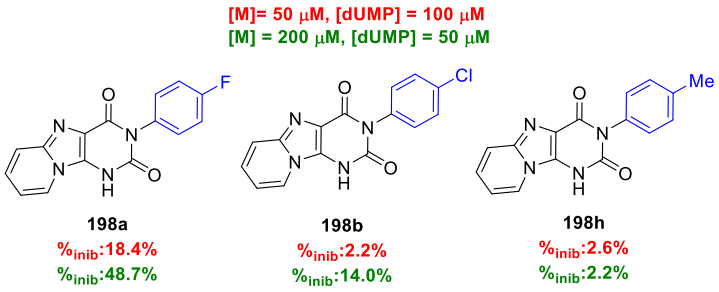


Figure 77 *: Tests NADPH oxidase assay à 50 µM en [M] et (50 µM) en [dUMP].*

A une concentration de 50 µM en composés **198a-c** ce test nous a permis de voir une perte totale d'inhibition pour tous sauf **198a** qui se maintient au niveau des 20%, on peut en déduire que comme les ANPs précédents ils ne sont pas de forts inhibiteurs (tight) de la *FDTS*. Mais les résultats d'inhibitions prouvent que cette piste est pour le moment la plus prometteuse.

En diminuant la concentration de dUMP qui est relativement élevée, nous avons essayé d'observer si les inhibiteurs se fixaient mieux dans le site actif dans cas d'une compétition dUMP/inhibiteur. On remarque que pour chacun les inhibitions diminuent d'environ 40%, sauf pour le **198a** dont la perte d'inhibition est d'environ 10%. Confirmant la non compétition de ces molécules dans le site actif.

Les trois meilleures molécules ont été testées sur la seconde partie du mécanisme *via* le tritium release assay (Figure 78).

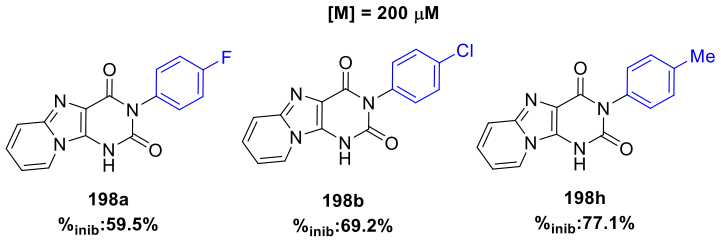


Figure 78 *: Tests sur la seconde partie du mécanisme via tritium release assay.*

Pour compléter les séries de tests sur l'enzyme, nous avons regardé la capacité de chacune de ces trois molécules à inhiber la seconde partie du mécanisme. La molécule **198a** conserve la même inhibition que sur la première partie, tandis que les molécules **198b** et **198h** montrent des inhibitions supérieures à cette dernière. Ces deux dernières molécules peuvent être considérées comme de faibles inhibiteurs de la seconde partie du mécanisme de la *FDTS.*

A travers ces différents résultats biologiques une carte générale du squelette a été générée, mettant en évidence les interactions nécessaires afin d'obtenir une inhibition de l'enzyme (Figure 79).

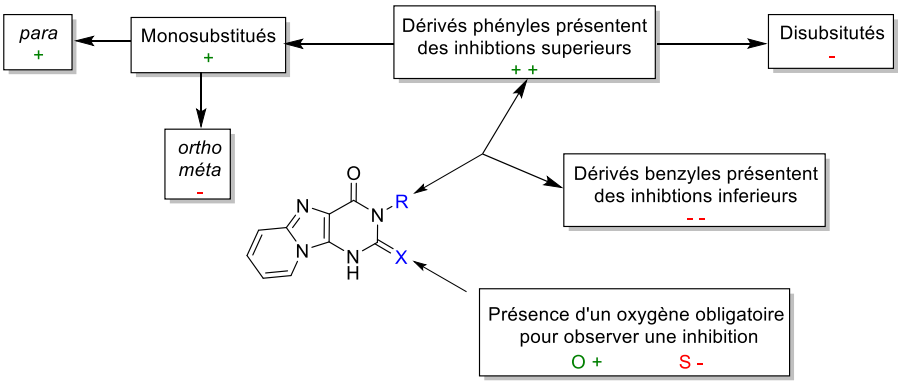


Figure 79 *: Substitutions générales produisant une inhibition.*

3.2.3. Relation structure activité

Au vu des différents résultats, nous avons décidé de sélectionner le squelette **198a** afin de poursuivre nos pharmacomodulations. Ce dernier présente les résultats les plus reproductibles et les meilleures inhibitions dans les différents tests réalisés. **198h** est le plus actif sur le test au tritium, mais nous n'utilisons pas ce test comme référence afin de déterminer un potentiel « Hit », de plus il montre des inhibitions plus faible dans les autres tests. Nous avons décidé de modéliser **198a** dans le site actif de *ThyX Mtb* afin de mieux comprendre les interactions qu'il peut potentiellement créer pour sélectionner les meilleures substitutions par la suite (Figure 80).

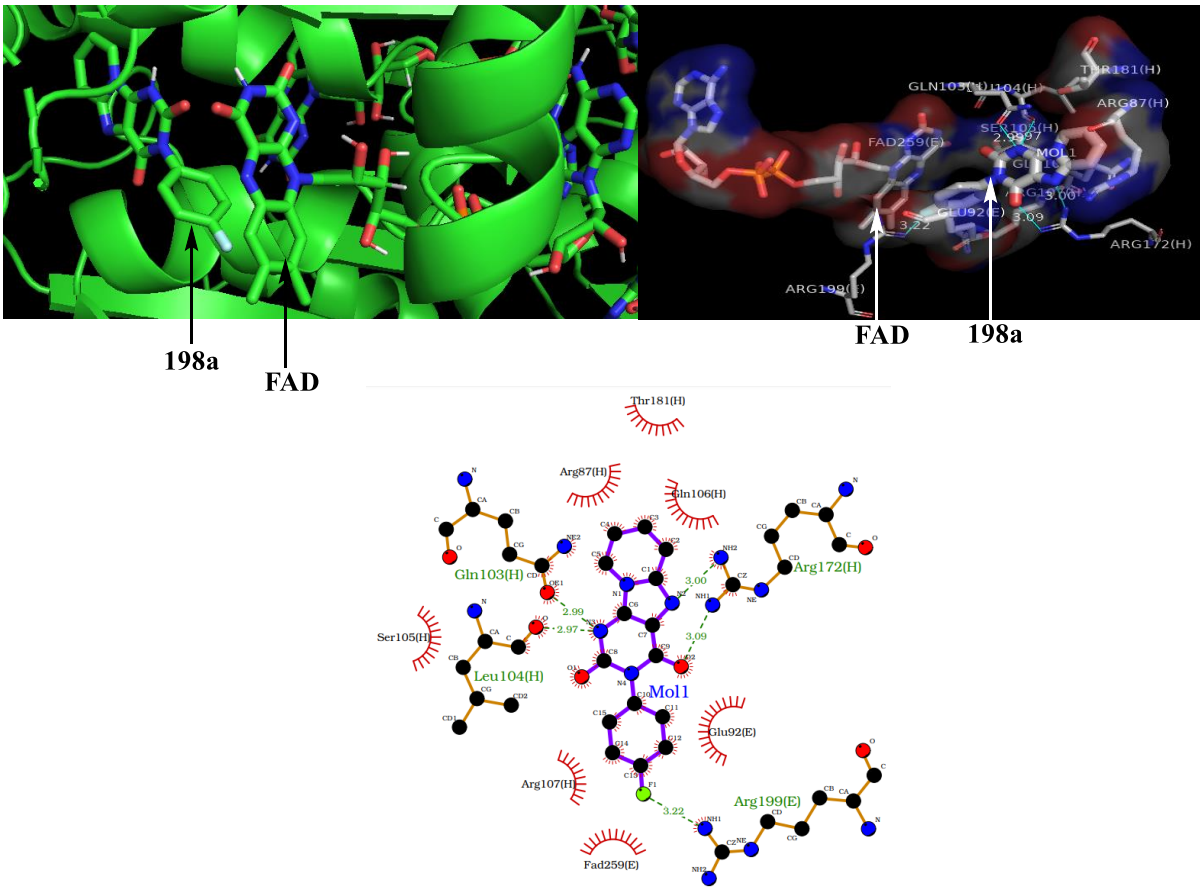


Figure 80 *: Modélisation* ***198a*** *3D et 2D (via LigPlot) dans ThyX Mtb (PDB 3GWC avec FAD) avec 5-FdUMP comme référence.*

Lorsque l'on regarde le placement de notre composé dans le site actif, ce dernier n'est pas collé au FAD comme on aurait pu le supposer. Il semble prendre la place du dUMP. Il ne partage aucune interaction commune avec les acides aminés du FAD par contre il en partage cinq avec trois acides aminés (*Arg 199*, *Leu 104*, *Gln 103* et *Arg 172*) avec lesquels interagit le dUMP. Notre composé semble bien ancré dans le site actif de par les différentes interactions hydrogènes avec N^5 et O^4 mais aussi avec N^1 et le fluor porté par le phényle. La raison de la disparition de l'inhibition lors de la substitution de l'oxygène par le soufre pourrait s'expliquer par l'effet gros atome du soufre en comparaison de celui d'oxygène. L'atome de soufre est 1.6 fois plus gros que celui d'oxygène et possède une couche électronique en plus, ces différentes caractéristiques peuvent donc changer son positionnement dans la poche et donc diminuer sa capacité à créer des interactions avec les acides aminés résiduels.

Afin de confirmer le positionnement de notre molécule avec ce modèle, nous avons effectué dans un second temps la substitution de la position N^1, une diminution de l'inhibition nous confirmerait la nécessité de laisser libre cette position, dans le cas contraire nous réaliserons une nouvelle modélisation afin de visualiser le positionnement de ce groupement et d'envisager par la suite des modulations possibles sur l'aromatique (couplage organopalladé).

3.3. Synthèse des structures N^1-alkylées

3.3.1. *Synthèse*

Maintenant que nous avons sélectionné le squelette complet de la molécule la seconde fonctionnalisation qui a été apportée se trouve sur la position N^1. Lorsque l'on regarde les différents résultats biologiques et les modélisations, substituer cette position semblerait en contradiction du fait qu'elle permet deux interactions hydrogènes avec le site actif de l'enzyme. Lors de la fonctionnalisation précédente nous avions modélisé le tricycle substitué *m,p*-diF-phényle **198e** (Figure 81) ce dernier présentait un positionnement différent dans le site actif et de meilleurs interactions que le dérivé mono fluoré (*Gln 103*, *Leu 104*, *Arg 199* et *Arg172*).

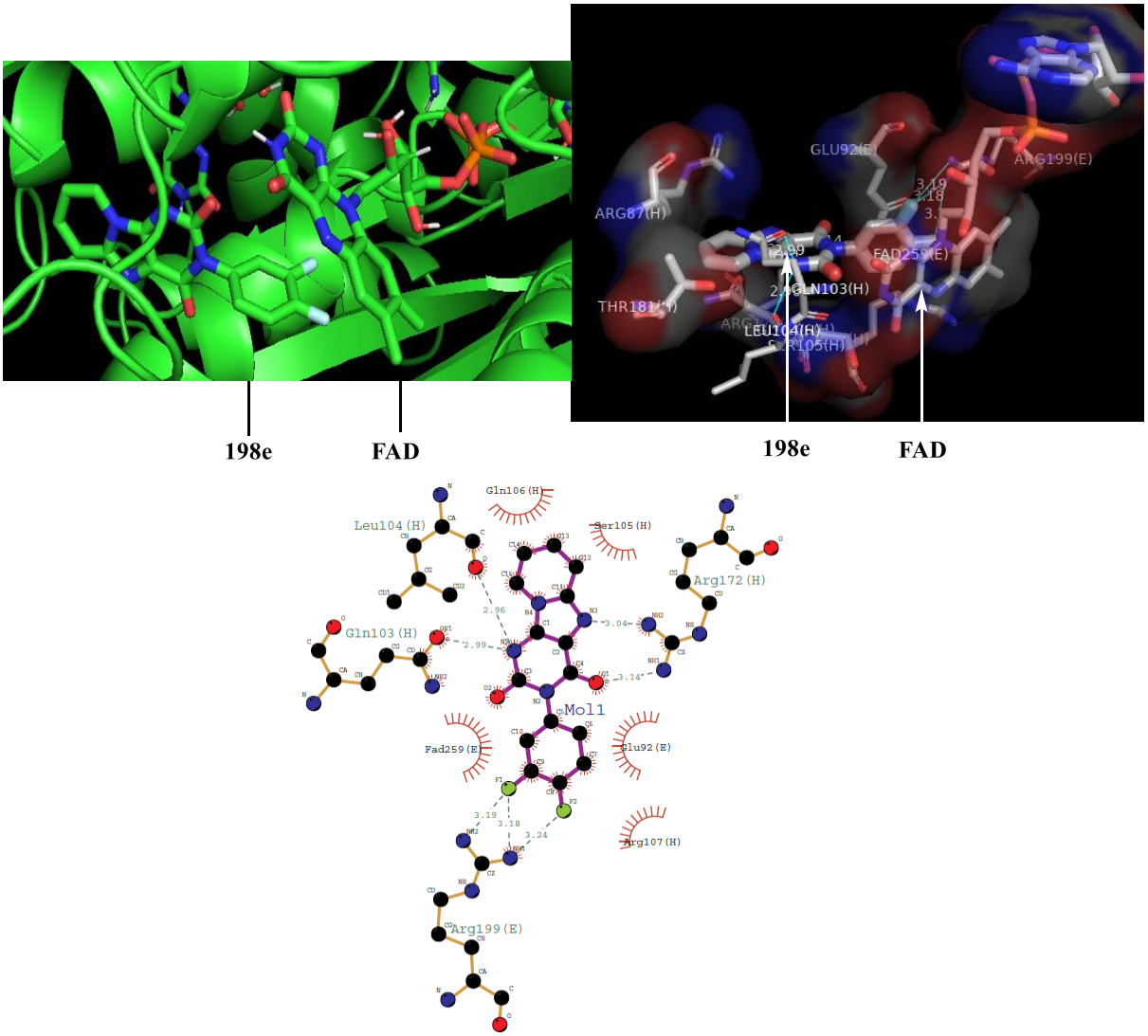


Figure 81 *: Modélisation composé* ***198e*** *en 3D et 2D dans ThyX Mtb.*

Parfois les résultats biologiques et la modélisation présentent des résultats divergents. Afin de s'assurer de ces résultats, nous allons substituer cette position sur le dérivé **198a** avec diverses chaînes aliphatiques et benzyliques et ainsi voir l'influence de cette fonctionnalisation sur l'inhibition.

Les différentes chaînes que nous avons insérées présentent des propriétés différentes : interactions hydrogène, hydrophobe et de type π-stacking. La plupart de ces substituants étant commerciaux, nous n'avons eu besoin que de synthétiser 1-(bromométhyle)-*o*, *m* ou *p*-(diméthoxyphosphorylméthyle)benzène **210a-c** (Schéma 63).[157]

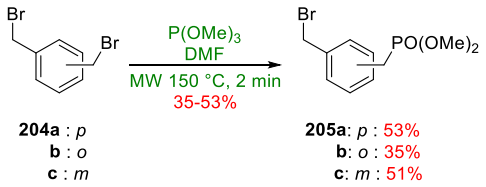


Schéma 63 *: Synthèse des aryles phosphonates.*

Les composés **205a-c** ont été obtenus par une réaction d'Arbuzov sur les composés di-bromé **204a-c** en présence de triméthylphosphite sous activation microondes en 2 min avec des rendements modérés de 35-53%.

Sur les systèmes de type pyrimidine une *N*- et *O*-alkylation peuvent être observées. Plusieurs facteurs peuvent influencer : les formes de résonnances de la structure,[158a,b] la constante diélectrique du solvant,[159a,b] la présence ou non de molécule capable de capter les contres ions (éther couronne, TMEDA) ou l'activation.[160]

Le couple solvant/contre ion peut lui aussi être mis en cause, ce dernier pouvant influer sur de la *N*- vs *O*-alkylation :

- Les solvants aprotiques dipolaires solvatent fortement les cations et peu les anions. De plus ils dissocient fortement les ions. Dans un solvant aprotique dipolaire, plus le cation est petit, plus il est solvaté (plus il est petit, plus on favorise la *O*-alkylation).
- Les solvants aprotiques apolaires solvatent fortement les anions et les cations par des liaisons hydrogène et dissocient fortement les ions. Dans un solvant aprotique apolaire, plus le cation est petit, plus il reste proche de l'oxygène (plus il est gros, plus on favorise la *O*-alkylation.

Dès les premiers essais d'alkylation nous avons remarqué grâce à la RMN du ^{19}F la présence de deux composés et nous en avons déduit une compétition entre de la *N*- et *O*-alkylation. Les deux formes de résonnances peuvent justifier de cette compétition (Schéma 64).

[157] Chong, L. S.; Desai, M. C.; Gallagher, B.; Graupe, M.; Halcomb, R. L.; Yang, H.; Zhang, J. R. Preparation of purine and thiadeazapurine phosphonate derivatives as modulators of toll-like receptor 7. WO2008005555A1, 2008.

[158] a) Torhan, M. C.; Peet, N. P.; Williams, J. D., A comparison of N- versus O-alkylation of substituted 2-pyridones under Mitsunobu conditions, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 3926–3928. b) Paramaguru, G.; Solomon, R. V.; Jagadeeswari, S.; Venuvanalingam, P.; Renganathan, R., Tuning the photophysical properties of 2-quinolinone-based donor–acceptor molecules through N- versus O-Alkylation: Insights from experimental and theoretical investigations. *Eur. J. Org. Chem.*, **2014,** *2014*, 753-76.

[159] a) Bookser, B. C.; Weinhouse, M. L.; Burns, A. C.; Valiere, A. N.; Valdez, L. J.; Stanczak, P.; Na, J.; Rheingold, A. L.; Moore, C. E.; Dyck, D., Solvent-controlled, site-selective N-alkylation reactions of azolo fused ring heterocycles at N1-, N2-, and N3-positions, including pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, purines, [1,2,3]Triazolo[4,5]pyridines, and related deaza-compounds, : *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 6334−6353. b) Hartung,R. E.; Wall, M. C.; Lebreton, S.; Smrcina, M.; Patek, M., selectivity of N-versus O-alkylation in Mitsuobu reactions with various quinazolinols and isoquinolinols, *Heterocyles*, **2017**, *94*, 1305-13.14.

[160]Zhao, S., Kang, J., Du, Y., Kang, J., Zhao, X., Xu, Y., Chen, R., Wang, Q. and Shi, X., An efficient ultrasound-assisted synthesis of N-alkyl derivatives of carbazole, indole, and phenothiazine, J. *Het. Chem*, **2014**, *51*, 683-690.

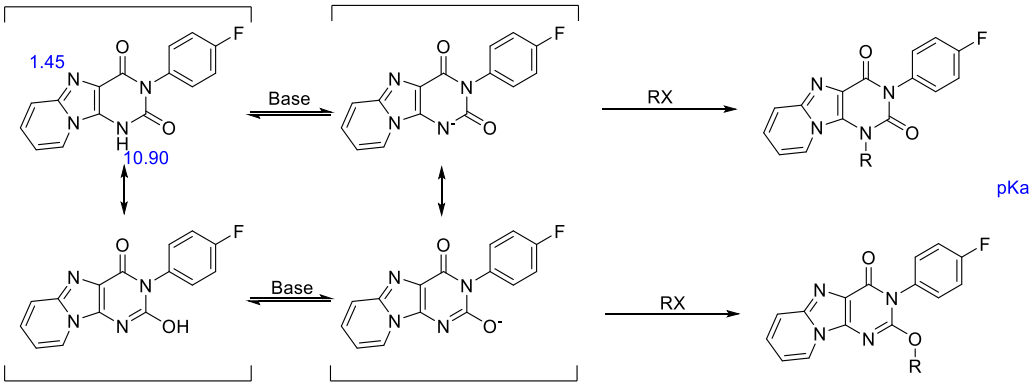


Schéma 64 *: Forme de résonnance et mécanisme pour la N/O alkylation.*

Les effets mésomères permettent de comprendre la réactivité (O > N). Le carbanion formé sur l'azote étant plus stabilisé par effet mésomère que celui sur l'oxygène il est donc moins réactif (Schéma 65).

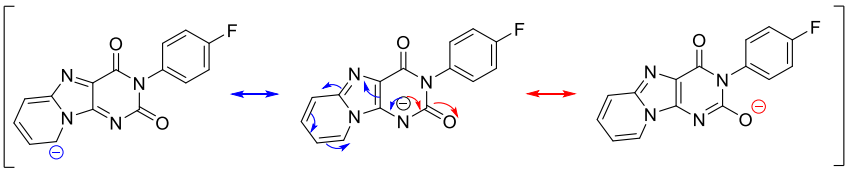
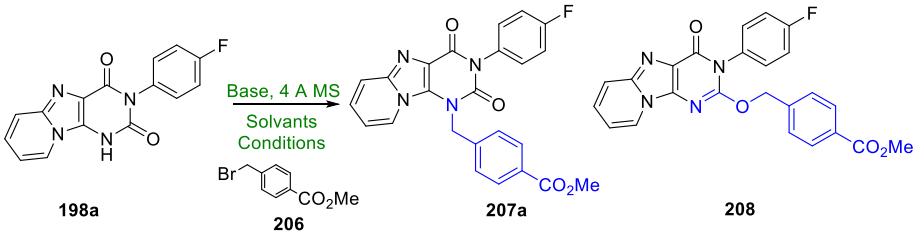


Schéma 65 *: Effets mésomères.*

Nous avons décidé, afin d'optimiser cette réaction d'alkylation entre les dérivés d'halogénures d'aryles et aliphatiques sur la position N^1 **198a**, en faisant varier la température, la base, le mode d'activation et le solvant. La détermination des ratios *N-/O*-alkylation a été réalisée par la RMN du fluor ^{19}F sans détermination des rendements (Tableau 35).



Entrées	Bases	Solvants	Conditions	Mélanges N/O
1	K_2CO_3	DMF	ta, 12 h	16/84
2	K_2CO_3	DMF	40 °C, 3 h	18/82
3	Cs_2CO_3	DMF	40 °C, 3 h	0/100
4	NaH	THF	6 h à ta puis 12 h 60°C	X
5	LiH	THF	8 h à ta puis 12 h à 60 °C	68/42
6	KHMDS	THF	-78 °C, puis 6 h à ta et enfin 12 h à 60 °C	X
7	K_2CO_3	DMF	))) 80 kHz, 55 °C, 8 h	43/67
8	K_2CO_3	DMF	MW, 120 °C, 20 min	100/0
9	/	ACN	BSA, TMSCL, NaI, MW 80 °C 30 min	X

Tableau 35 *: Optimisation de la N^1 alkylation.*

Les premières conditions mises en place (Entrée 1) ont conduit à l'obtention majoritaire du produit de *O*-alkylation (16/84). Nous avons pensé que le temps trop long de la réaction favorisait la formation du produit de *O*-alkylation. Nous avons donc réalisé la réaction à une température de 40 °C afin

d'augmenter sa vitesse (Entrée 2), mais le ratio est identique au précédent (18/82). En changeant le contre ion K^+ par du Cs^+ nous avons essayé de favoriser la *N* plutôt que la *O*- alkylation, mais seulement le produit de *O*-alkylation a été formé (0/100). Il semblerait que sur cette structure les caractéristiques d'un solvant aprotique polaire (favorisant la *O*-alkylation) prennent le dessus sur le contre ion (Entrée 3). Les trois entrées suivantes (Entrées 4-6) correspondent à l'étude du contre ion dans un solvant aprotique apolaire. Dans ces conditions, plus il est petit, plus il doit favoriser la *N*-alkylation. Avec le NaH et le KHMDS aucune conversion du produit de départ n'est observée (Entrée 4 et 6), avec le LiH nous avons réussi à inverser le ratio des deux régioisomères (68/42). Les deux conditions suivantes portent sur le mode d'activation. Sous ultrasons, nous avons obtenu un ratio supérieur à celui de l'entrée 2 (43/67). Les meilleurs résultats sont obtenus sous activation micro-onde (Entrée 8) et une conversion du produit **198a** uniquement en **207a (0/100)**.

Afin de déterminer de s'assurer de la bonne alkylation, trois méthodes sont possibles en RMN. La première pour déterminer les ratios est le fluor. Afin de confirmer la position de l'alkylation deux méthodes existent, l'HMBC décrite précédemment, et la ROESY.[161] Cette dernière est une expérience ^{1}H-^{1}H dérivée de la TOECSY. L'objectif des expériences de corrélations dipolaires à deux dimensions est de mettre en valeur la proximité de certains noyaux dans l'espace. Le résultat de ce type d'expériences est une carte 2D dont les signaux hors diagonales proviennent de l'effet Overhauser (couplage spin-spin à travers l'espace entre deux noyaux proches dans l'espace et non pas à travers des liaisons). Cette méthode permet de déterminer la structure de petite molécule et de leurs atomes proches. Dans notre cas nous continuerons d'utiliser l'HMBC pour vérifier de l'état des couplages (Figure 82).

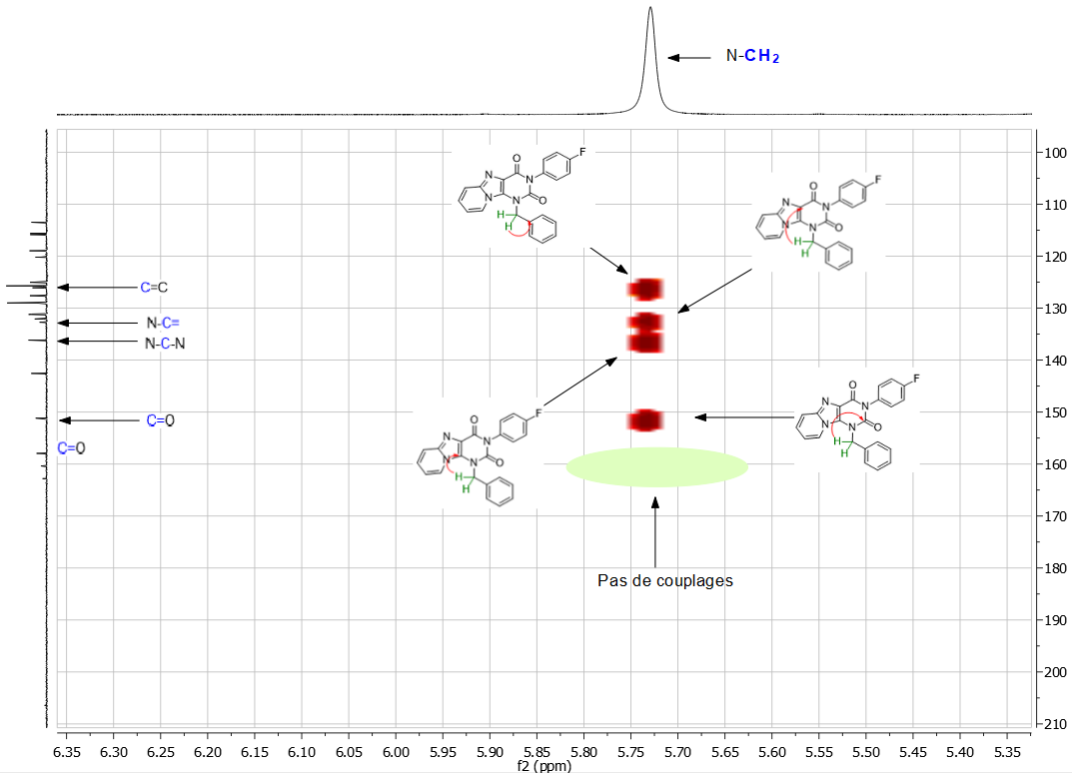
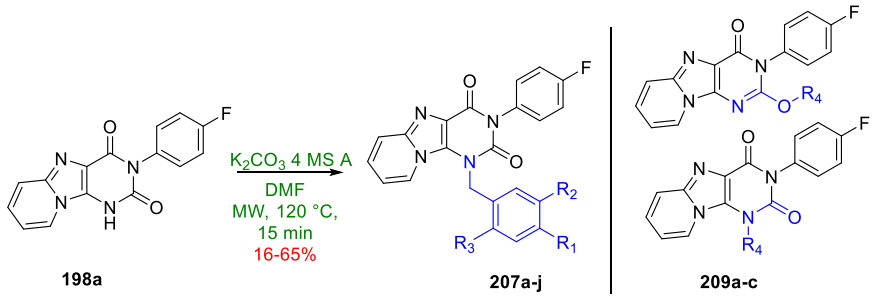


***Figure 82** : Analyse HMBC de la N[1] alkylation dans le DMSO-d6.*

[161] LaPlante, S. R.; Bilodeau, F.; Aubry, N.; Gillard, J. R.; O'Meara, J.; Coulombe, R., N- versus O-alkylation: Utilizing NMR methods to establish reliable primary structure determinations for drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4663-4668,

L'analyse montre bien la présence du couplage longue distance CH_2-N--C=O. Ce dernier est le plus important car il prouve la présence de la fonction carbonyle et donc de la *N*-alkylation. Le déplacement chimique du $^{13}C(CH_2)$ compris entre 47 et 40 ppm, nous confirme aussi la formation d'une liaison C-N, le déplacement chimique d'une liaison C-O étant vers les 70 ppm.

Par la suite ces conditions ont été utilisées afin de réaliser les diverses fonctionnalisations sur la position N^1 avec diverses chaînes aliphatiques et benzyliques (Tableau 36).



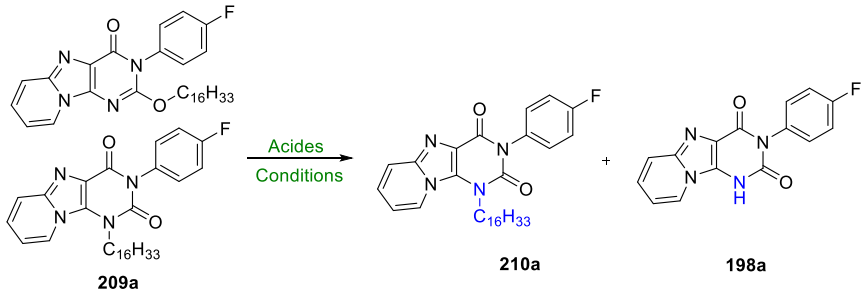
Entrées	R_1	R_2	R_3	Produits finaux	Rendements (N/O)
N-Benzyle R					
1	**CO_2Me**	**H**	**H**	**207a**	65%
2	**CN**	**H**	**H**	**207b**	30%
3	**H**	**NO_2**	**H**	**207c**	31%
4	**NO_2**	**H**	**H**	**207d**	28%
5	**H**	**H**	**H**	**207e**	36%
6	**$CH_2PO(OMe)_2$**	**H**	**H**	**207f**	16%
7	**H**	**H**	**$CH_2PO(OMe)_2$**	**207g**	X
8	**H**	**$CH_2PO(OMe)_2$**	**H**	**207h**	X
9	**H**	**Me**	**H**	**207i**	27%
10	**Me**	**H**	**H**	**207j**	20%
N/OAliphatique					
11	**$C_{16}H_{33}$**			**209a**	41% (9/91)
12	**C_9H_{19}**			**209b**	50% (31/69)
13	**$CH_2C(CH_2)_2$**			**209c**	50% (46/54)

Tableau 36 *: Optimisation de la N^1 alkylation.*

L'ensemble des groupements benzyliques a été inséré sur la position voulue sans mélange alors que les chaînes aliphatiques sont obtenues en mélanges **209a-c**. Le ratio *N/O* sur ces chaînes est guidé par leurs longueurs. Les chaînes courtes conduisant à un mélange 50/50, alors que les chaînes plus longues conduisent à une quasi totale insertion sur l'oxygène. La gêne stérique ne peut être considérée comme une raison évidente car les groupements benzyles sont relativement gros. Nous supposons que la réactivité de la chaîne peut être mise en cause. Plus les chaînes sont réactives, plus l'alkylation de l'oxygène est importante. Les chaînes aliphatiques (halogènes primaires) réagissent *via* une S_N2. Dans le cas des groupements benzyliques, la formation d'un carbocation stabilisé par effet mésomère diminue leurs réactivités. Le rendement des différentes chaînes benzyliques **207a-j** est relativement faible pour une alkylation. Plusieurs points peuvent le justifier, comme la conversion non totale du produit de départ, mais aussi et la plus importante la formation d'un produit non éluable. Ce dernier a pu être isolé en très faible quantité à partir de **207e** et son analyse a permis de déterminer qu'il s'agissait de l'hétérocycle attendu sous forme d'un sel contenant des impuretés. Les diverses tentatives (lavages, ajustement du pH) n'ont jamais pu conduire au composé attendu. Dans le cas du composé **207f**, la chute de rendement s'explique par la difficulté de séparation du produit de ces impuretés. Dans les conditions mises au point cette réaction (Entrée 6) conduit à la formation de plusieurs

produits de Rf proches, ces derniers sont dus à la présence d'un H acide en α du phosphore conduisant à la formation de plusieurs composés.

Afin d'essayer de n'avoir qu'un seul des deux régioisomèresde **209a**, nous avons réalisé des tests en conditions acides afin de réaliser le clivage d'un éther d'énol[162] et ainsi obtenir après purification uniquement le produit de *N*-alkylation, la chaîne sous forme alcène et le produit de départ **198a** (Tableau 37).



Entrées	Acides	Conditions	Rendement
1	HCOOH, eau	ta, 24 h	X
2	TFA	ta, 12 h	X
3	HCl 37%, eau	ta, 24 h	X

Tableau 37 *: Essais de ruptures de liaisons C-O en conditions acide.*

Par protonation il est possible de cliver la liaison C-O et par élimination d'un hydrogène de former l'alcène sur la chaîne aliphatique. L'utilisation de différents acides à température ambiante durant 24 h et 12 h n'ont pas permis de rompre la liaison et seul le réactif de départ a été isolé. Nous avons décidé de tester les trois composés sous cette forme de mélange. Dans le cas où l'un d'entre eux aurait présentés une inhibition, des conditions HPLC seraient mises au point afin de séparer les deux régioisomères.

Le dernier essai qui a été effectué afin de favoriser la *N*-alkylation a été de changer l'atome d'halogène de la chaîne aliphatique par un iode, plus polarisable et donc plus facilement substituable par l'anion (Schéma 66).

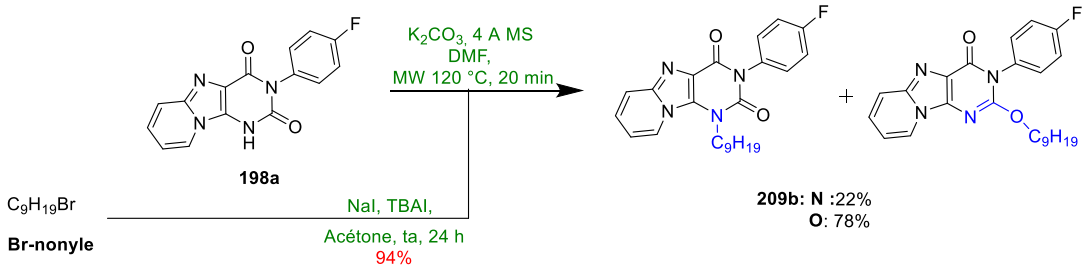


Schéma 66 *: Réaction d'iodation et d'alkylation.*

L'échange Br/I a pu être effectué avec de bon rendement. La confirmation de l'échange vient du déplacement chimique du groupement méthylène en α de l'halogène. Il a par la suite été engagé dans la réaction d'alkylation mise au point précédemment. Nous obtenons ainsi un mélange dont le ratio est légèrement déplacé vers la *O*-alkylation (22/78) qu'avec la chaîne bromée (31/69). Nous pouvons en

[162] Ghizzoni, M.; Wu, J.; Gao, T.; Haismaa, H. J.; Dekker, F. J.; Zheng, Y. G., 6-alkylsalicylates are selective Tip60 inhibitors and target the acetyl-CoA binding site, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *47*, 337-344.

conclure que le mécanisme est de type S_N2. Plus la chaîne est réactive, plus l'alkylation ira vers de la *O*. Dans le cas de dérivés benzyliques, le carbocation est stabilisé par effet mésomère, le rendant plus stable et donc moins réactif favorisant la *N*-alkylation et une S_N1 (Schéma 67).

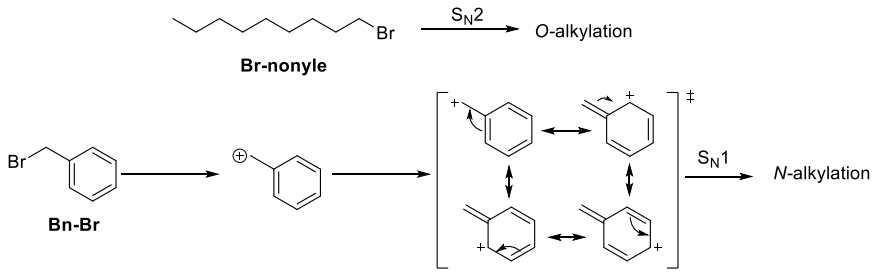
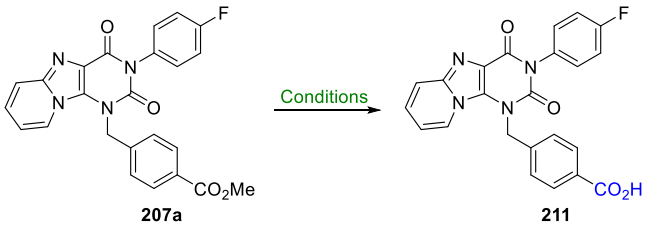


Schéma 67 *: Formes de résonnances influençant l'alkylation.*

Les interactions hydrogène étant les plus marquées dans le site actif de l'enzyme, nous avons donc supposé que la présence d'un acide carboxylique pourrait grandement contribuer à la fixation d'un potentiel inhibiteur et ainsi induire une augmentation significative de l'inhibition. Dans cette optique nous avons essayé de saponifier[163] le composé **207a** dans diverses conditions, afin de former l'acide carboxylique **211** (Tableau 38).



Entrées	Bases	Conditions	Rendement
1	NaOH 1M/MeOH	ta, 16 h puis 6 h à reflux	X
2	NaOH 1M THF/MeOH	ta, 24 h	X

Tableau 38 *: Essais de saponifications.*

Dans ces deux cas, peu importe les conditions utilisées nous n'avons pas obtenu le produit de saponification **211**, mais un produit de masse molaire de 404 g/mol pour $C_{22}H_{17}FN_4O_3$ (perte de 1C, 1O et 2H soit une perte de 30 et non pas 26). De plus le méthylène intègre toujours pour deux, mais relaxe sous forme de doublet et non plus de singlet en RMN ^{1}H (ce dernier couplant avec un triplet pour 1H vers 6,2 ppm). Nous avons d'abord pensé à une décarboxylation suivie de l'addition d'un hydroxy, mais la masse molaire serait de 402 g/mol et n'expliquerait pas la multiplicité du méthylène. Par interprétation de la COSY nous pouvons affirmer que l'aromatique est toujours disubstitué et par la RMN ^{13}C, que l'azote porte toujours le méthylène. Nos différentes investigations n'ont pas permis de déterminer la structure du composé ainsi formé.

[163] Asano, Y.; Kitamura, S.; Ohra, T.; Aso, K.; Igata, H.; Tamura, T.; Kawamoto, T.; Tanaka, T.; Sogabe, S.; Matsumoto, S.; Yamaguchi, M.; Kimura, H.; Itoh, F., Discovery, synthesis and biological evaluation of isoquinolones as novel and highly selective JNK inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 4715-4732.

3.3.2. *Résultats biologiques*

Les douze composés N^1-alkylés ont été testés sur *ThyX Mtb* afin de confirmer ou d'infirmer l'importance de la substitution en N^1 (forme NH) afin de pouvoir inhiber plus efficacement l'enzyme. Sur ces molécules, nous avons réalisé dans un premier temps les tests de NADPH oxidase (Figure 83).

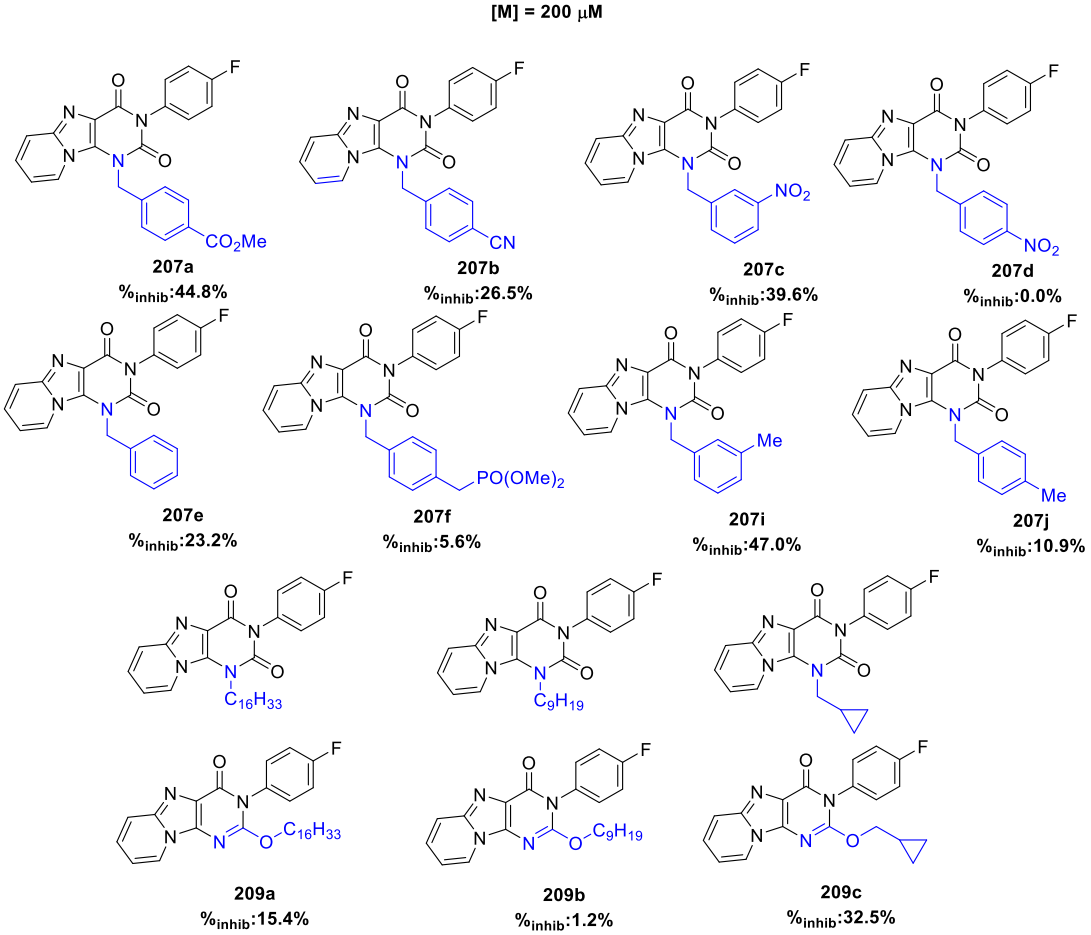


Figure 83 *: Chimiothèque de tricycles* ***198a*** *N^1alkylés pour la première étape de la biosynthèse.*

La plupart des substitutions réalisées nous ont permis de conserver une inhibition sauf pour **207d**, **207f** et **207a**. La substitution du benzyle par un groupement *p*-NO_2 ou un groupement phosphonate semble empêcher l'inhibition. Pour le groupement nitro cela peut être dû à la charge portée par les oxygènes. Dans le cas du groupement phosphonate la raison peut être due à sa forme, sous forme acide son activité aurait été sûrement supérieure (permettant la création de liaison hydrogène supplémentaire). Dans le cas de **209a** voire même **209b**, la perte d'inhibition est due à la présence majoritaire d'une longue chaîne sur l'oxygène pouvant gêner les interactions du phényle sur N^3. Dans le cas de **209c** il est difficile de savoir de quelle substitution *N*- ou *O*-, influence l'activité de par son ratio 1/1 et l'impossibilité de le purifier sur un système HPLC. Les interactions permettant de maintenir une inhibition sont de types hydrophobe ou hydrogène sur la position *méta* du benzyle **207c** et **207i**. En position *para* les substituants capables de former des interactions hydrogène montrent les meilleures inhibitions de toute la série **207a** et **207b**.

Les trois composés présentent les meilleurs inhibitions de la série, ont été testés par la suite sans ajout de FAD à une concentration en inhibiteur de 200 µM (Figure 84).

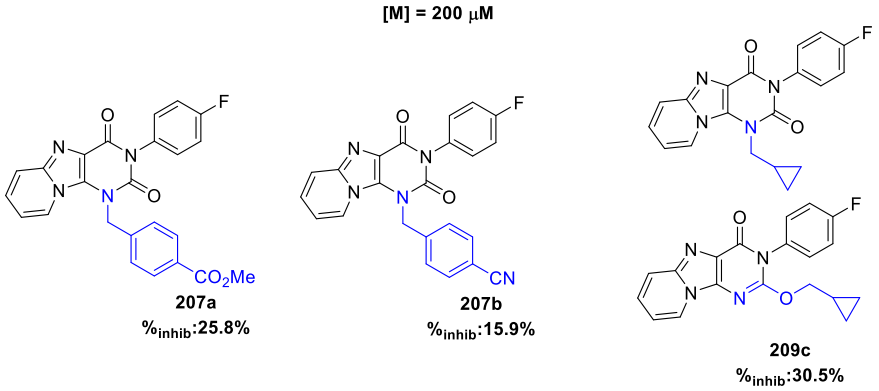


Figure 84 *: Tests NADPH oxidase assay sans ajout du FAD.*

Les deux composés benzyles substitués perdent près de la moitié de leurs inhibitions sans ajout de FAD. Dans le cas de **209c** son inhibition se maintient. On peut donc en déduire qu'il ne rentre pas en concurrence avec le FAD dans le site actif. Au vue de l'activité de l'enzyme l'inhibition chute, elle devrait se maintenir au minimum malgré le retrait du FAD de 3 des poches. Une diminution aussi brutale signifie que **207a,b** ont besoin de la présence du FAD dans chaque site actif pour se maintenir et ainsi produire leurs inhibitions.

Les deux tests suivants ont porté sur l'inhibition avec une concentration en molécule plus faible pour les deux plus actives (50 µM) pour le premier, et dans un second avec une concentration plus faible (50 µM) en dUMP (Figure 85).

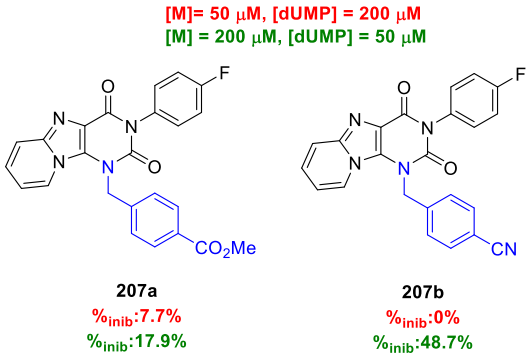


Figure 85 *: Tests NADPH oxidase assay à 50 µM en [M] et (50 µM) en [dUMP].*

Cette expérience nous a permis de montrer comme précédemment que nos inhibiteurs ne sont pas assez affins du site actif pour se maintenir et ainsi l'inhiber. Leurs inhibitions chutent totalement lorsqu'ils sont utilisés à faible concentration.

Nous avons pu confirmer l'inhibition du composé le plus actif **207a** chute de près de 30% en diminuant la concentration du substrat naturel tout en maintenant l'activité de l'enzyme. Il est donc possible que ce dernier ne se fixe pas sur le même site que le dUMP. Dans le cas du composé **198a** cette dernière n'avait diminué que de 10%. Pour ce qui est du composé **207b**, son inhibition augmente de près de 25% lorsque l'on diminue la concentration en dUMP, pouvant possiblement confirmer une compétition avec le dUMP. D'autres tests seront nécessaires pour le confirmer.

Lors du test sur la seconde partie du mécanisme, la molécule la plus prometteuse de la série n'a montré aucune inhibition contrairement au produit **198a** (Figure 86).

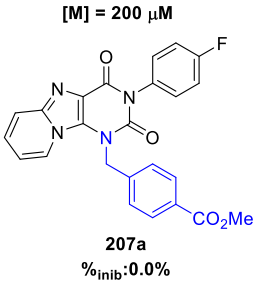


Figure 86 *: Test au tritium release assay pour la seconde partie du mécanisme.*

L'ensemble de ces résultats nous a permis de confirmer ce qui avait été observé par la modélisation. Même si une grande majorité des composés synthétisés ont montré une inhibition, cette dernière reste faible à une telle concentration. De plus, elle reste inférieure à l'inhibition du composé **198a** (59.4% à 200 µM). Nous avons mis en évidence une possible compétition en **207b** avec le dUMP, mais au vu des autres inhibitions de ce composé, il ne présente pas un fort potentiel.

Nous avons donc décidé pour la suite de la synthèse de conserver le squelette initial **198a** avec la position N^1 libre, afin de réaliser dans un premier temps la diversification sur la position C^9 de l'aromatique.

3.4. Synthèses de dérivés substitués en C^9

3.4.1. Rappels activation CH

L'activation CH[164a,b] est un domaine bien trop large pour être exhaustif ; nous nous concentrerons dans ce court rappel sur un type précis d'activation CH. Les alkylations et arylations de liaisons CH inactivées *via* l'utilisation de groupements directeurs bidentates et de Pd (Schéma 68).

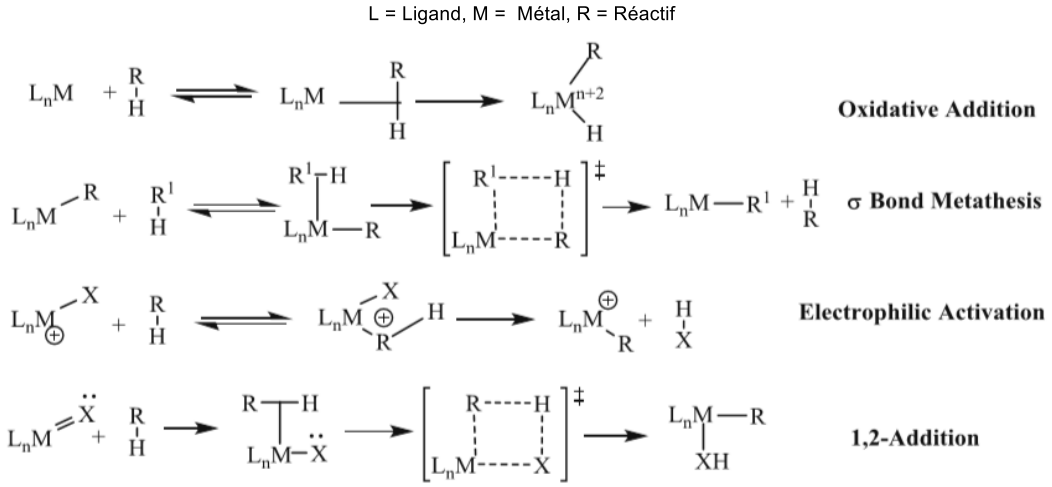


Schéma 68 *: Mécanismes générale des activations CH.*[165]

[164] a) Crabtree, R. H.; Lei, A., Introduction: CH activation, *Chem. Rev.*, **2017**,*117*, 8481-8482 b) Roudesly, F.; Oble, J.; Poli, G., Metal-catalyzed CH activation/functionalization: The fundamentals, J. Mol. Cat. A: Chemical, **2017**, *426*, 275-296.

L'activation CH regroupe l'ensemble des réactions permettant l'activation d'une liaison C-H non réactive afin de la rompre et de créer une liaison C-C. Elle fait intervenir des complexes organométalliques permettant la coordination d'alcanes ou d'aryles dans la sphère interne du métal en passant par un intermédiaire M-C. Plusieurs formes de cette réaction existent, suivant le catalyseur (Pd, Ru, Cu, Ni,…), sans groupements directeurs,[166] mais aussi avec des groupements directeurs monodentates[167] (amine, ester, amide, pyridine…). La première activation CH a été reportée en 1965 par *Davidson et al*,[168] avec l'insertion d'un ruthénium portant un ligand dmpe dans une des liaisons CH du naphtalène (Schéma 69).

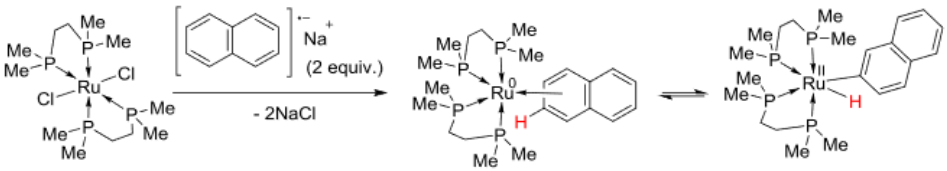


Schéma 69 *: Première CH activation.*[164]

En 2005, *Daugulis et al.*[169] ont été les premiers à publier un nouveau type d'activation CH, en utilisant un groupement directeur bidentate aminoquinoline et un couple de Pd(II)/Pd(IV) (Schéma 70).

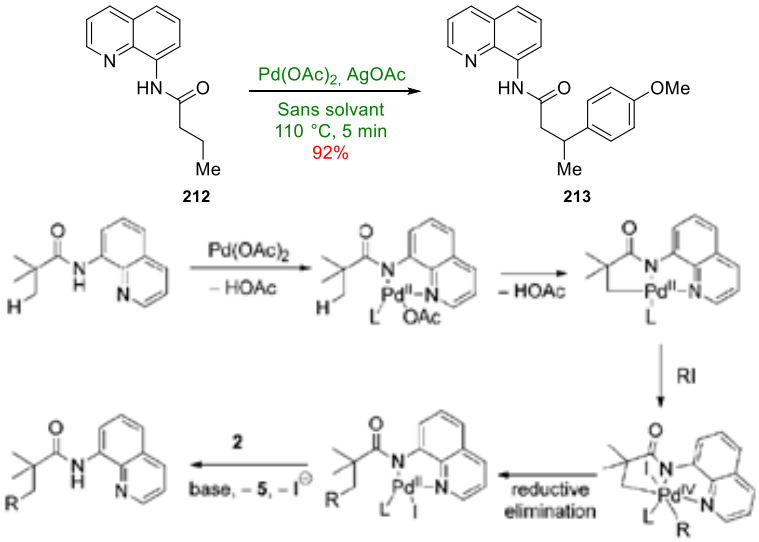


Schéma 70 *: Premier couplage avec un groupement directeur bidentate et mécanisme associé.*

Ici la présence de l'auxiliaire aminoquinoline permet une réaction de *β*-arylation hautement régiosélective. Dans un premier temps le Pd(II) va se chélater entre les deux azotes (molécule et auxiliaire), dans un second temps la liaison CH est rompue par protonation et par un échange de ligand

---

[165] Debjit, B.; Sarvesh, K.; Sai, S. V.; Rakeshwar, B., Transition metal catalyzed C-H activation for the synthesis of medicinally relevant molecules: A Review, *J. Chem. Sci*., **2018**, *71*.

[166] Roudesly, F.; Oble, J.; Poli, G., Metal-catalyzed CH activation/functionalization: The fundamentals, *J. Mol. Cat.*, **2017**, *426*, 275-296.

[167] Zhang, M.; Zhang, Y.; Jie, X.; Zhao, H.; Li, G.; Su, W., Recent advances in directed C–H functionalizations using monodentate nitrogen-based directing groups, *Org. Chem. Front*., **2014**, *1*, 843-895.

[168] Chatt, J. ; Davidson, J. M., The tautomerism of arene and ditertiary phosphine complexes of ruthenium(0), and the preparation of new types of hydrido-complexes of ruthenium(II), *J. Chem. Soc.*, **1965**, 843-855.

[169] Zaistsev, V, G.; Shabashov, D.; Daugulis, O., Highly arylation of sp^3 C-H bonds catalyzed by palladium acetate, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13154-13155.

un métalocycle est formé. Le dérivé halogéné est additionné sur le métal suivant une addition oxydante et par la suite inséré sur l'ancienne liaison CH *via* une élimination réductrice. La dernière étape est un échange de ligand afin de former le composé final et réduire le catalyseur de départ.

Les conditions types d'une activation CH impliquent un catalyseur métallique, une base inorganique, un solvant polaire (eau, *ter*-butanol…) ou sans solvant et suivant la réaction un dérivé halogéné, azoté, oxygéné ou soufré (effet inductif –I). Aujourd'hui le développement de catalyseurs fait l'objet d'une littérature abondante. Il existe 4 métaux principaux : le palladium, le ruthénium, le nickel et le cuivre.[170]

De nombreuses activations CH peuvent être catalysées par ces différents catalyseurs :

- Addition d'aryle et d'alcène : avec des catalyseurs au Pd, Ru, Ni (seulement pour les alcènes) et Cu (seulement pour les aryles).[171a,b,c,d]
- Addition d'alcane : avec des catalyseurs au Pd, Ru et Ni.[172a,b,c]
- Addition d'alcyne : seulement les catalyseurs au Pd.[173]
- Déhydrogénation : seulement les catalyseurs au Pd.[174]
- Création de liaison CO, CN ou CI : seulement les catalyseurs au Pd.[175]
- Addition de carbonyle : seulement les catalyseurs au Ru.[176]
- Addition de groupement soufré : seulement les catalyseurs au Cu.[177]

L'ensemble de ces réactions peut être résumé par la figure générale ci-dessous (Schéma 71):

[170] Rouquet, G.; Chatani, N., Catalytic functionalization of C(sp^2)-H and C(sp^3)-H bonds by using bidentate directing groups, *Angew. Chem. Ed*., **2013**, *52*, 11726-117743.

[171] a) Huang, L.; Li, Q.; Wang, C.; Qi, C., Palladium(II)-catalyzed regioselective arylation of naphthylamides with aryl iodides utilizing a quinolinamide bidentate system, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78* , 3030-3038. b) Aihara, Y.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed direct arylation of C–H bonds in aromatic amides containing a bidentate directing group: significant electronic effects on arylation, *Chem. Sci*., **2013**, *4*, 664-670. c) Rouquet, G.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed ortho-C–H bond alkylation of aromatic amides with α,β-unsaturated ketones *via* bidentate-chelation assistance , *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2201-2208. d) Nishino, M.; Hirano, K.; Satoh, T.; Miura, M., Copper-mediated biaryl coupling of benzoic acid derivatives and 1,3-azoles. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2013**, *52*, 4457-4461.

[172] a) Shabashov, D. Daugulis, O., Auxiliary-assisted palladium-catalyzed arylation and alkylation of sp2 and sp3 carbon−hydrogen bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3965-3972. b) Rouquet, G.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed ortho-C–H bond alkylation of aromatic amides with α,β-unsaturated ketones *via* bidentate-chelation assistance, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2201-2208. c) Eckermann, L.; Lygin, A. V.; Hofmann, N., Ruthenium-catalyzed oxidative annulation by cleavage of CH/NH bonds. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2013**, *50*, 6379-6382.

[173] Ano, Y.; Tobisu, M.; Chatani, N., Palladium-catalyzed direct ortho-alkynylation of aromatic carboxylic acid derivatives, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 354-357.

[174] Giri, R.; Maugel, N.; Foxman, B. M.; Yu, J., Dehydrogenation of inert alkyl groups *via* remote C−H activation: Converting a propyl group into a π-allylic complex, *Organometallics*, **2008**, *27*, 1667-1670.

[175] a) Reddy, B. V. S; Reddy, L. R.; Corey, E. J., Novel acetoxylation and C−C coupling reactions at unactivated positions in α-amino acid derivatives, *Org. Lett*., **2006**, *8*, 3391-3394.

[176] Inoue, S.; Shiota, H.; Fukumoto, Y.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed carbonylation at ortho C−H bonds in aromatic amides leading to phthalimides: C−H bond activation utilizing a bidentate system, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6898-6899.

[177] Dieu, L.; Popov, T.; Daugulis, O., Copper-promoted sulfenylation of sp2 C–H bonds, *J. Am. Chem. Soc*., **2012**, *134*, 18237-18240.

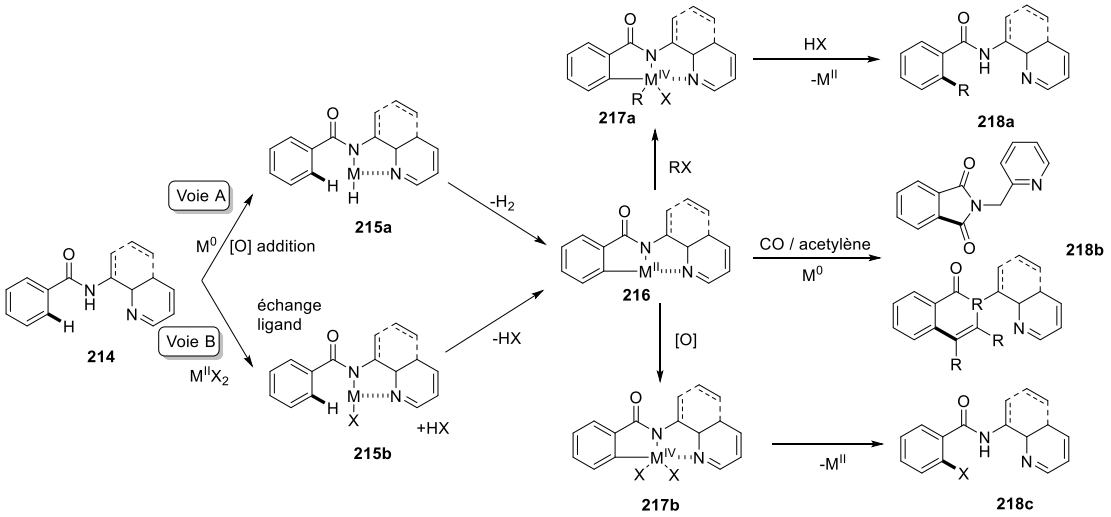


Schéma 71 *: Mécanisme général d'activation CH via un groupement directeur bidentate.*

A partir d'une structure substituée par l'auxiliaire bidentate, deux chemins sont possibles pour atteindre le composé métalocycle M (II) **216** : soit *via* une addition oxydante 2**15a**, soit *via* un échange de ligand **215b**. Par la suite suivant le type d'activations CH réalisées, deux intermédiaires peuvent être mis en évidence : **217a** *via* une addition oxydante et **217b** *via* une oxydation conduisant dans les deux cas à un métalocycle M(IV). La dernière étape correspondant aux types de réactions effectuées : les dérivés **218a** ont subi des éliminations réductrices suivies d'une protonation pour des additions d'alcynes, d'aryles, d'alcanes. Les composés **218b** sont obtenus par des éliminations réductrices résultant d'une cyclisation et de l'introduction d'oxygène, d'azote ou de soufre. Finalement les hétérocycles **218c** sont isolés après une élimination réductrice à partir de **217b** dans le cas de l'introduction de fonctions amines, hydroxy ou éthers.

L'intérêt de ces groupements picoliniques ou aminoquinolines provient de la fonctionnalisation et de la déprotection aisées de fonctions OH, NH (Schéma 72).[178]

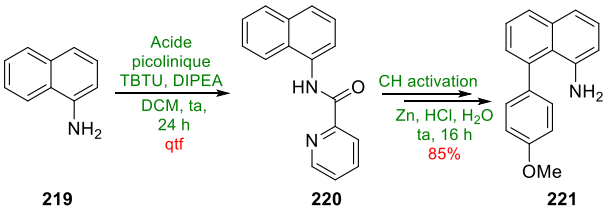


Schéma 72 *: Protection et déprotection avec l'auxiliaire bidandate.*

3.4.2. Synthèse

Afin de diversifier la position C^9, nous avons décidé de substituer cette position par une activation CH *via* un groupement directeur bidentate à partir de **197**.

Une fois réalisé, les composés ainsi formés pourront être cyclisés avec le 4-F-phénylisocyanate et évalués biologiquement (Schéma 73).

[178] Song, J.; Chen, W.; Zhao, Y.; Li, C.; Liang, G.; Huang, L., Palladium-catalyzed ortho-C-H bond alkylation of benzylamides with alpha-bromo ketones, RSC. Adv., **2016**, 6, 54984-84992.

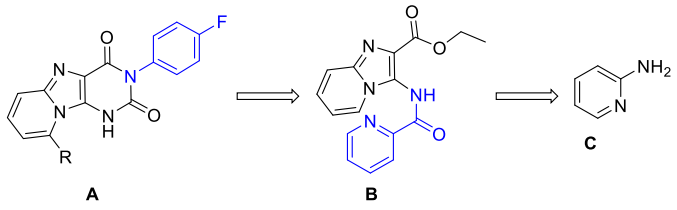


Schéma 73 *: Rétrosynthèse envisagée pour la fonctionnalisation en C.*[9]

Avec ce type de fonctionnalisation, deux cas sont possibles suivant la formation du dérivé picolinamide. Le premier si le picolinamide est formé sur une amine libre. Dans cette configuration l'activation CH se produira en position γ-C(sp^2)-H de l'amine. Dans le cas où le picolinamide est formé sur un acide, un ester ou une amide, l'activation CH se fera en position β-C(sp^2)-H du carbonyle (Schéma 74).

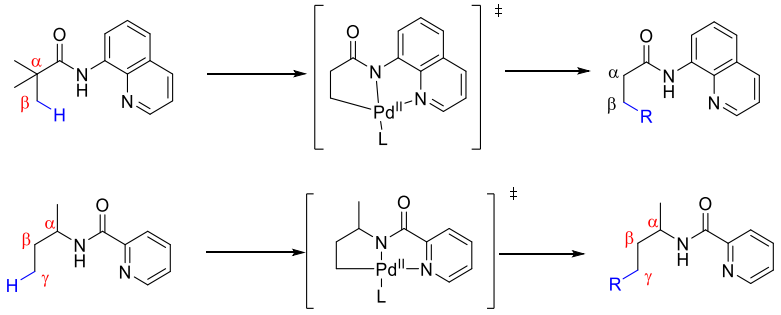


Schéma 74 *: Différents types d'activations CH via un groupement directeur bidentate.*

Dans notre structure la position se trouvant en γ de l'amine, nous nous sommes retrouvés dans la situation de l'exemple 2 (Schéma 69). Dans ce type de couplage deux groupements directeurs peuvent être utilisés : le groupement picolinamde ou 8-aminoquinilline. Nous sommes partis du premier afin de réaliser la protection de l'amine libre de **197a** en **222** (Schéma 75).

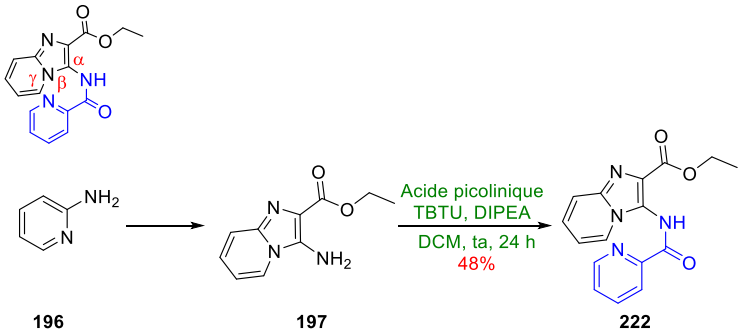
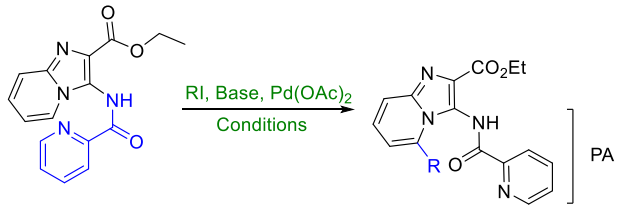


Schéma 75 *: Préparation du précurseur CH.*

A partir de ce précurseur picolinamide **222**, nous avons commencé par appliquer des conditions publiées par *Qi et al.*[179] et *Guillaumet et al.*[180] avec du $Pd(OAc)_2$ comme source de palladium (Tableau 39).

[179] Huang, L.; Sun, X.; Li, Q.; Qi, C., Palladium-catalyzed C8 alkylation of 1-naphthylamides with alkyl halides *via* bidentate-chelation assistance, *J. Org. Chem.*, 2014, *79*, 6720-6725.
[180] Grosse, S.; Pillard, C.; Massip, S.; Marchivie, M.; Jarry, C.; Bernard, P.; Guillaumet, G., Ligandless Palladium-catalyzed regioselective direct C–H arylation of imidazo[1,2-a]imidazole derivatives, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 8539-8551.



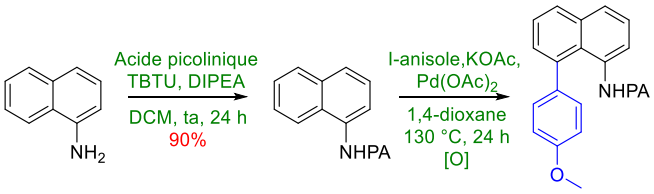
222 223a-c

Entrées	Bases	RI	Conditions	Rendements
1	KOAc	Me-I	1,4-dioxane, 130 °C, 24 h	polyalkylation
2	KOAc	But-I	1,4-dioxane, 130 °C, 24 h	X
3	KOAc	p-I-anisole	1,4-dioxane, 130 °C, 24 h	X
4	K_2CO_3	p-I-anisole	1,4-dioxane, 150 °C, 12 h	X
5	Cs_2CO_3	p-I-anisole	1,4-dioxane, Xamphos, 130 °C, 24 h	X

Tableau 39 *: Premiers essais de CH activation.*

Le premier essai dans ces conditions n'a pas été concluant (Entrée 1), l'utilisation de iodométhyle a conduit à une polyméthylation de la structure (sur les azotes NH et N^3) conduisant à l'obtention du produit désiré. Nous avons donc changé l'halogénure en chaîne iodobutyle (Entrée 2). Dans ce cas aucune conversation n'a été observée. L'utilisation d'un halogénure d'alkyle plus réactif comme l'iodoanisole dans les mêmes conditions n'a pas permis la conversation du substrat de départ (Entrée 3). Un changement de la base inorganique (Entrée 4 et 5) nécessaire à la transformation du système, mais aussi *via* l'addition de Xamphos comme ligand afin de réaliser le couplage. Ces différentes conditions n'ont pas permis d'obtenir le composé souhaité.

A partir d'un substrat type **219** substitué avec 90% de rendement par le PA **220**, nous avons essayé de comprendre quels paramètres conduisaient aux conversions de substrats observés. La première étape de ce couplage étant une oxydation, nous avons criblé divers oxydants afin d'observer dans quelles conditions les meilleurs rendements en **221** étaient observés (Tableau 40).



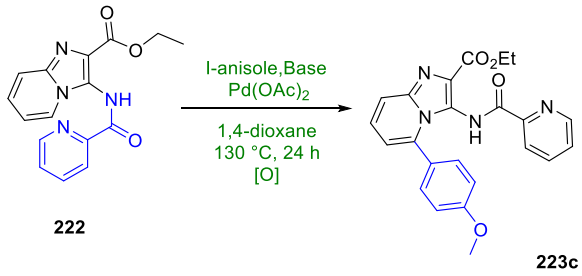
219 220 221

Entrées	Oxydants [O]	Rendements
1	O_2 pure	61%
2	Benzoquinone	71%
3	Air (tube ouvert)	67%

Tableau 40 *: Essais sur un substrat test et modifications.*

Les différents essais réalisés ont permis d'obtenir le composés souhaité **221** avec un rendement compris entre 61-71%. Les premières conditions utilisées ont été avec une purge du solvant et du volume mort avec de l'oxygène pur qui ont conduit à un rendement de 61% (Entrée 1). Avec la benzoquinone (Entrée 2), l'ajout d'un équivalent d'oxydant a permis d'isoler le produit final avec 71% de rendement. Dans les dernières conditions nous avons réalisé la réaction en tube ouvert, ces dernières (Entrée 3) ont permis d'isoler le composé attendu avec 67% de rendement.

Nous avons donc décidé d'appliquer ces différentes conditions à notre réaction de départ et de voir l'influence de ces derniers sur le rendement (Tableau 41).



Entrées	Oxydants [O]	Rendements
1	O_2 pure	X
2	Benzoquinone	X
3	Air (tube ouvert)	X

Tableau 41 *: Applications sur notre substrat.*

Peu importe le type d'oxydant utilisé dans cette réaction aucune conversion de **222** en **223c** n'a été observée malgré l'ajout d'oxydant dans le milieu. Si le problème ne provient pas du solvant, de la base, du catalyseur ou de l'oxydant, l'unique possibilité restante doit se trouver dans le mécanisme et plus précisément dans un des intermédiaires réactionnels (Schéma 76).

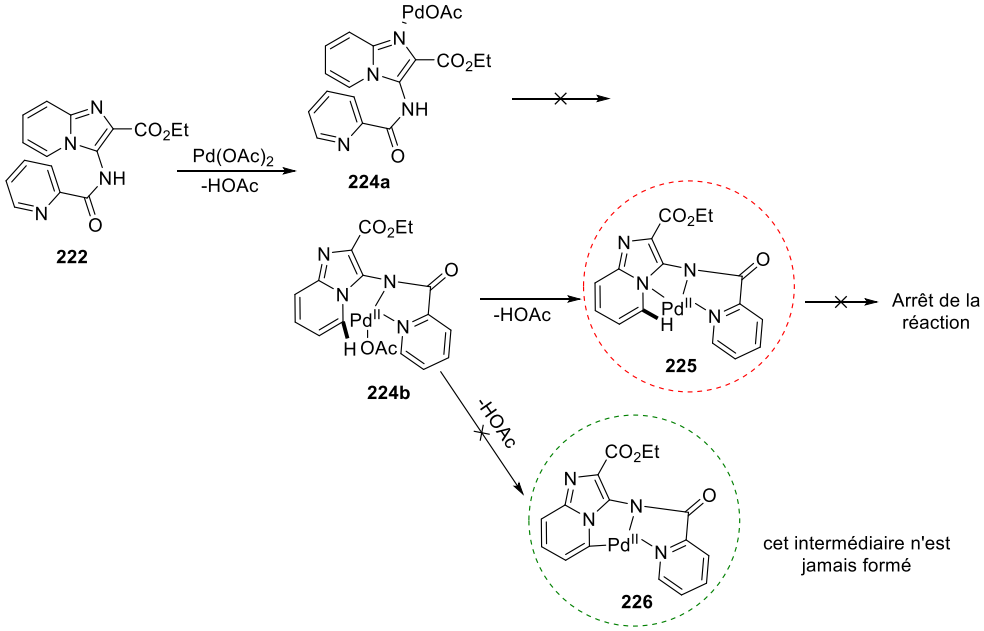


Schéma 76 *: Hypothèses au non conversion de la structure.*

La première chélation du Pd(II) dans la structure avec l'élimination d'un de ces ligands est l'un des premiers problèmes qui peut être rencontré, car cette dernière intervient entre les deux azotes du groupement directeur bidentate **224b**, mais aussi avec N^3 **224a** ce dernier étant nucléophile. Lors de la formation de la liaison γ-C(sp^2)-Pd un second problème peut apparaitre. Au lieu de former cette liaison avec γ-C(sp^2) **226**, il doit se produire une chélation avec l'azote N^{7a} **225**, conduisant à la formation de la mauvaise chélation. L'insertion oxydante RX conduisant au Pd(IV) se produira, mais lors de l'élimination réductrice, le composé éliminé sera donc le produit de départ.

Au vu des résultats obtenus par cette synthèse, nous avons décidé de ne pas continuer sur la substitution de la positon C^9 et de nous tourner vers les fonctionnalisations des positions C^7 et C^8.

3.5. Synthèses des structures C^7 et C^8 substituées

3.5.1. *Synthèses des dérivés méthylés et bromés*

Les dérivés C^7 et C^8 méthylés ont eu deux rôles pour la suite : dans un premier temps ils ont permis de commencer la diversification moléculaire sur les deux positions aromatiques et dans un second temps ils ont été mis en jeu dans une réaction radicalaire afin d'insérer le brome sur la position benzylique et ainsi pouvoir accéder à une diversité de chaînes par des réactions de substitutions nucléophiles (Schéma 77).

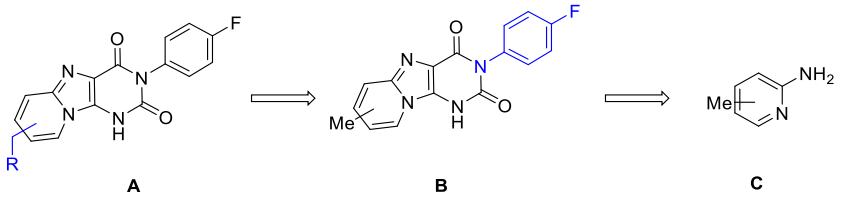


***Schéma 77** : Rétrosynthèse envisagé.*

Dans les conditions classiques de formation des produits de double cyclisation développées précédemment à partir de l'aminopyridine **227a,b**, nous avons ainsi pu synthétiser les deux dérivés intermédiaires **228a,b** et finaux **229a,b** avec de bons rendements (Schéma 78).

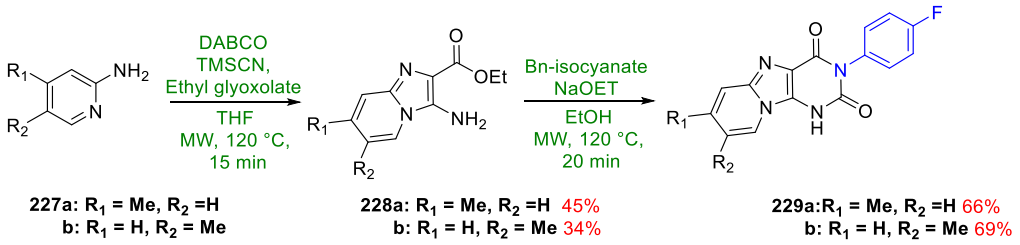


***Schéma 78** : Synthèses des intermédiaires et produits finaux méthylés.*

Les deux dérivés **229a,b** ont été évalués biologiquement et ont servi d'intermédiaire pour l'obtention des composés bromés sur la position benzylique *via* un mécanisme radicalaire[181] (Schéma 79). Les bromations radicalaires des positions benzyliques sur des dérivés de pyridine ne font pas l'objet d'une littérature très abondante. De plus la sélectivité de ces composés n'est pas forcément respectée, la bromation pouvant avoir lieu sur l'hétérocycle et non pas le groupement méthyle.[182]

[181] Pingali, S. R. K.; Upadhyay, S. K.; Jursic, B. S., Microwave assisted benzyl mono- and dibromination in diethyl carbonate as environmentaly friendly alternative to radical bromination in carbon tetrachloride, *Green. Chem.*, **2011**, *13*, 928-933.
[182] Chu, G.; Saeui, C. T.; Worm, K.; Weaver, D. G.; Goodman, A. J.; Broadrup, R. L.; Cassel, J. A.; DeHaven, R. N.; LaBuda, C. J.; Koblish, M.; Brogdon, B.; Smith, S.; Le Bourdonnec, B.; Dolle, R. E.,Novel pyridine derivatives as potent and selective CB2 cannabinoid receptor agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5931-5935,

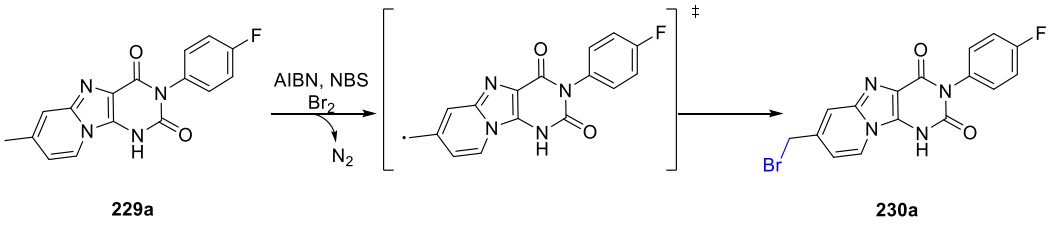
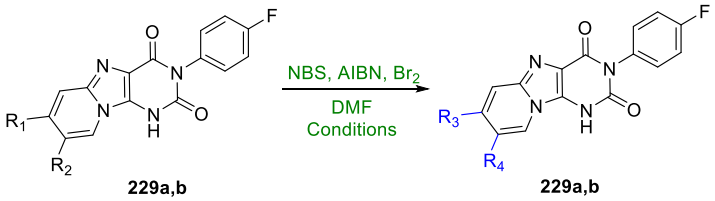


Schéma 79 *: Voie de synthèse radicalaire.*

Sur les dérivés **229a,b**, deux types de conditions ont été mises en place afin d'insérer un brome en position benzylique (Tableau 42).



Entrées	R_1	R_2	Conditions	R_3	R_4	Rendements
1	**Me**	**H**	80 °C, 20 h	CH_2-Br	H	X
2	**H**	**Me**	ta 12 h, 80 °C 12 h	H	CH_2-Br	X

Tableau 42 *: Premiers essais de bromation radicalaire.*

Avec un chauffage sur une longue durée une dégradation du produit a été observée. Dans les secondes conditions, nous avons essayé d'apporter moins d'énergie à la réaction, mais lors de la mise en place du chauffage, les mêmes observations ont été faites (Entrées 2). Nous supposons que la forte présence d'azotes (N^1et N^5) peut conduire à la formation de coproduits, ne permettant pas d'observer une conversion de par la complexité des bruts réactionnels.

Afin de contourner ce problème, nous sommes donc repartis des substrats de départ **227a** et **228a** afin de réaliser les bromations radicalaires sur des composés protégés **231** et **232** par des groupements pivalates (Schéma 80).

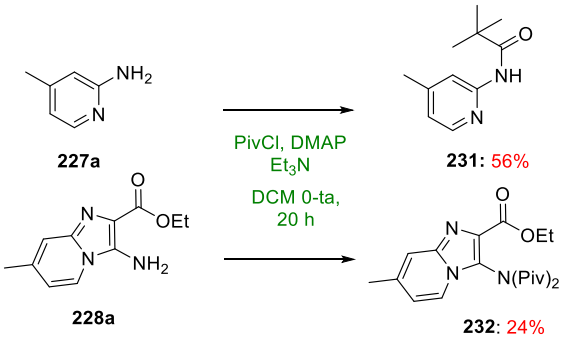


Schéma 80 *: Protection via des groupements pivalates*

Par la suite, sur la base des travaux de *Taylor et al.*[183] les deux dérivés ainsi protégés **231** et **232** ont été engagés dans une réaction de bromation radicalaire dans un solvant vert le diméthylcarbonate (Tableau 43).

Entrées	Produits de départs	Conditions	Rendements
1	**231**	AIBN, Br_2 DiMe carbonate, MW, 100 °C, 15 min	35% (**233**)
2	**232**	AIBN, Br_2 DiMe carbonate, MW, 100 °C, 15 min	10% (**234**)

Tableau 43 *: Nouveaux essais de bromations radicalaires.*

Deux produits de la bromation radicalaire ont pu être isolés avec de faibles rendements. Lors de l'analyse RMN de ces derniers, nous avons repéré des incohérences dans la multiplicité des signaux et leurs intégrations nous ayant permis de mettre en évidence la mauvaise régoisosélectivée des bromations radicalaires. La position bromée n'était pas la position benzylique mais *ortho* du groupement méthyle **233** et **234**. On observe seulement la présence de deux singulets dans la partie aromatique pour un proton chacun (Schéma 81).

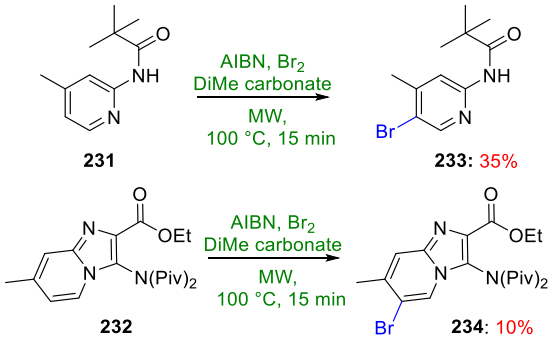


Schéma 81 *: Coproduits de bromation radicalaire.*

Afin de comprendre cette régiosélectivité qui n'est pas décrite dans la littérature, nous nous sommes intéressés aux formes de résonnances et aux effets des différents substituants (Schéma 82).

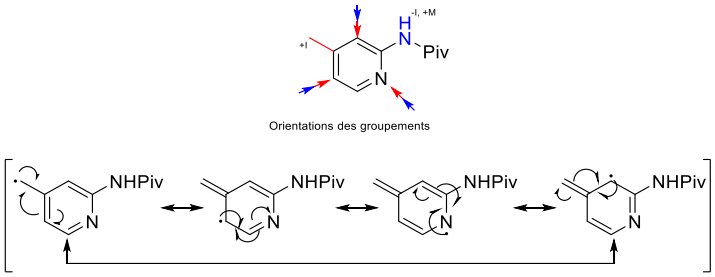


Schéma 82 *: Influence des effets de résonnances et des groupements orienteurs.*

Les radicaux primaires benzyliques sont plus instables et donc plus réactifs. De manière générale plus la force de liaison à rompre est faible, plus le radical est facile à former. Par la suite plus un radical est substitué plus il est stable et donc moins il est réactif. Avec ces règles, l'addition radicalaire du brome aurait dû se faire sur la position benzylique du dérivé aminopyridine, mais ici elle se réalise sur la position 4 du dérivé. Les effets mésomères des substituants (*ortho-para* directeur) sur la pyridine vont orienter la réaction sur cette position (formes de résonnances et effet +M). Nous supposons que l'addition sur la position 3 pourrait être moins favorable à cause de l'encombrement

[183] Thapa, R.; Brown, J.; Balestri, T.; Taylor, R. T., Regioselectivity in free radical bromination of unsymmetrical dimethylated pyridines, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 6743-6746.

stérique et la taille de l'atome de brome. Les travaux de *Chu et al.* ont montré que si la bromation radicalaire est effectuée sur un dérivé pyridine dont la position α du méthyle est bromée, la bromation radicalaire s'effectue sélectivement sur la position benzylique (Schéma 83).

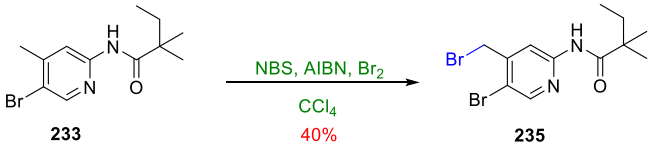


Schéma 83 *: Bromation radicalaire sur le dérivé α-bromé.*

Dans l'incapacité de contourner ce problème, nous avons décidé de continuer dans la synthèse de dérivé bromé, mais cette fois-ci directement lié à l'aromatique. Ces derniers pourront être substitués par la suite *via* des couplages organopalladés de types Sonogashira ou Suzuki-Miyaura (Schéma 84).

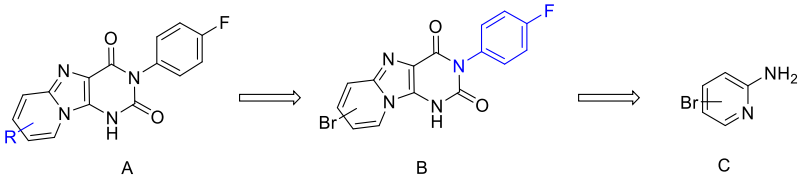


Schéma 84 *: Nouvelle rétrosynthèse envisagée.*

Les composés **A** ont pu être à l'instar des différents hétérocycles précédents, être synthétisés à partir des dérivés C suivant une double cyclisation (Schéma 85).

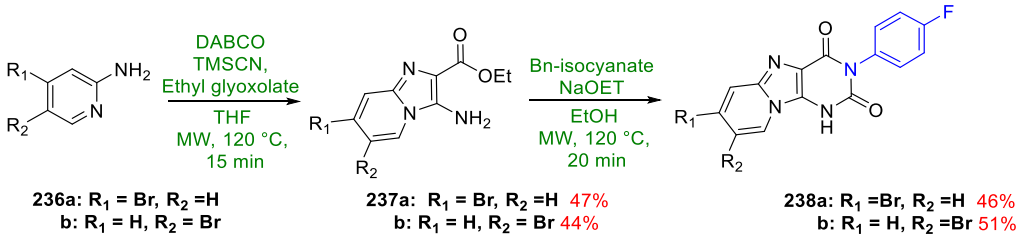


Schéma 85 *: Synthèses des dérivés bromés.*

3.5.2. Résultats biologiques

Les deux composés finaux **229a** et **229b** ainsi que les deux intermédiaires bromés **238a** et **238b** ont été évalués sur *ThyX Mtb via* le NADPH oxidase assay (Figure 87).

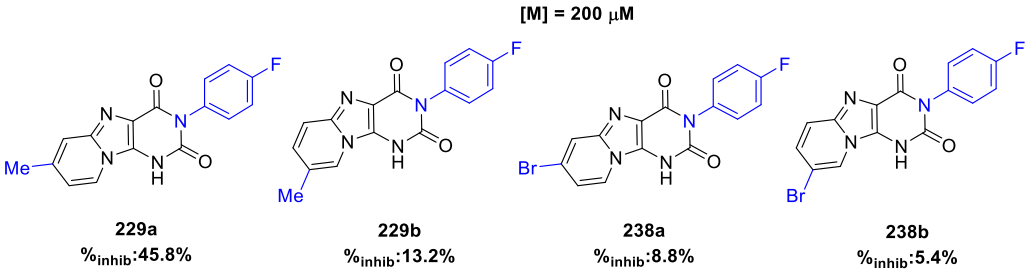


Figure 87 *: Tests via le NADPH oxidase assay.*

Au vu de la concentration en molécule, ces inhibiteurs restent relativement faibles. Mais une tendance semble quand même se dégager, la position C^7 substituée semble présenter une meilleure inhibition que la position C^8. Ces résultats devront être confirmés avec l'évaluation biologique des couplages organopalladés suivants.

1.1.1. Couplage de Sonogashira

A partir des dérivés **B** nous avons étudié l'influence de chaînes alcynes possédant des groupements aryles (substitués par des groupements polaires ou apolaires) ou aliphatiques afin d'étudier l'influence des interactions hydrophobe, liaisons hydrogène et de type π-stacking des différentes positions dans le site actif de l'enzyme. Nous avons inséré la plus grande variété de chaînes et de groupements **A** *via* des modes d'activations verts afin de rester dans la lignée des synthèses précédentes (Schéma 86).

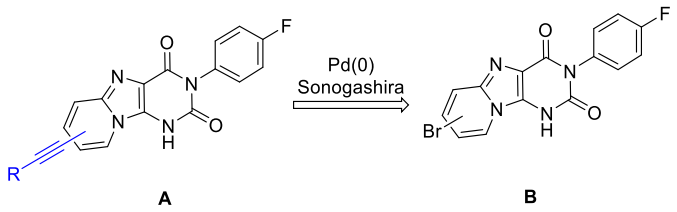


Schéma 86 *: Rétrosynthèse envisagée.*

Nous avons aussi évalué sur quelques exemples **C** l'influence d'une N^1-alkylation et l'utilisation de dérivés *m,p*-difluorés sur l'inhibition potentielle des composés à la suite de ces couplages organopalladés **D** (Schéma 87).

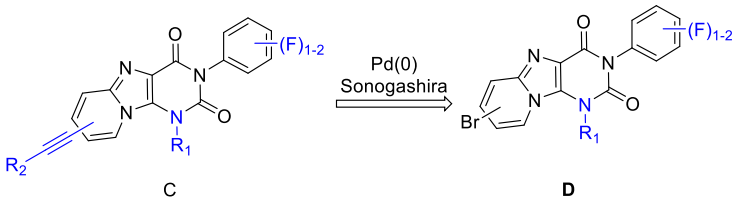
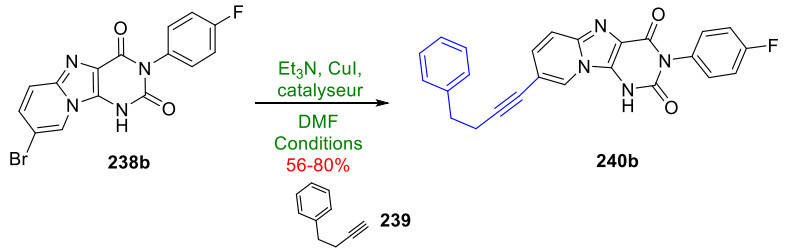


Schéma 87 *: Exemples de polyfonctionnalisations.*

Les premiers essais effectués ont eu pour but de déterminer les conditions optimales de couplage, en essayant divers catalyseurs,[184] et mode d'activations ; qu'ils soient thermique,[185] ambiant, sous ultrasons[186] ou sous micro-ondes.[187] Ces différents tests ont été effectués à partir de **238b** en présence d'une quantité catalytique de cuivre, avec de la triéthylamine et la chaîne **239** dans le DMF afin de conduire au produit **240b** (Tableau 43).

[184] Chinchilla, R.; Nájera, C., Recent advances in Sonogashira reactions, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5084-5121.
[185] Baig, R. B. N.; Varma, R. S., Alternative energy input: mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1559–1584.
[186] Chinchilla, R.; Nájera, C., The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874–922.
[187] Mehtaa, V. P.; Van der Eycken, E. V., Microwave-assisted C–C bond forming cross-coupling reactions: an overview, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 4925-4936.

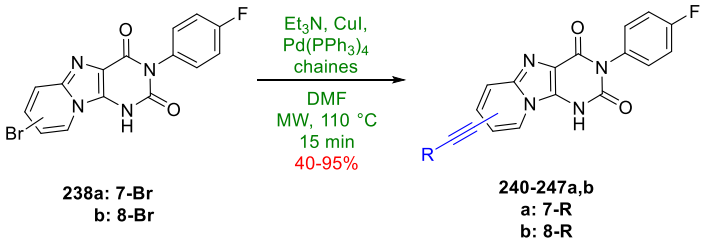


Activations	Microondes		Thermique		Ultrasons	
Conditions	Pd(PΦ3)4, MW, 100 °C, 15 min		Pd(PΦ3)4, Δ, 70 °C, 4 h		Pd(PΦ3)4,))), 32 kHz, 70 °C, 4 h	
Rendements	80%		66%		56%	
Observations	**Positifs**	**Négatifs**	**Positifs**	**Négatifs**	**Positifs**	**Négatifs**
Conversion	+		+			-
Purification	=			-	+	
Rendement	+		=			-
Général	+		=		-	

Tableau 44 *: Optimisation du couplage de Sonogashira.*

Nous avons commencé la mise au point avec un système catalytique classique sous activation micro-onde. Nous avons pu isoler le composé **240b** avec un rendement de 80%. Par la suite nous avons décidé de comparer ce résultat avec différents modes d'activations : thermique et sous ultrasons. Dans le cas du premier, le rendement a diminué de 10% tout en conservant une conversion totale en substrat de départ. Dans le cas du second un plus faible rendement est observé mais dans ce cas-ci il était dû à une conversion plus faible de **238b**. Afin de conserver un mode d'activation vert, nous avons éliminé la possibilité de réaliser le couplage sous chauffage thermique, d'autant plus que la purification était plus compliquée à réaliser. Le problème des conditions sous ultrasons était la conversion non totale faisant chuter les rendements, elle générait en revanche beaucoup moins de coproduits. Nous avons décidé pour la suite d'utiliser la méthode micro-ondes. Cette dernière est rapide (15 min), avec une conversion totale et présentant de bons rendements (80%).

Ces conditions ont été appliquées à huit chaînes alcynes, possédant des groupements aryliques et aliphatiques (Tableau 45).



Entrées	Produits de départs	Chaînes	Produits finaux	Rendements
1	**7-Br**		**240a**	70%
2	**8-Br**		**240b**	80%
3	**7-Br**		**241a**	74%
4	**8-Br**		**241b**	67%
5	**7-Br**		**242a**	X
6	**8-Br**		**242b**	25%
7	**7-Br**		**243a**	91%
8	**8-Br**		**243b**	42%
9	**7-Br**		**244a**	95%

10	**8-Br**		**244b**	50%
11	**7-Br**		**245a**	92%
12	**8-Br**		**245b**	74%
13	**7-Br**		**246a**	95%
14	**8-Br**		**246b**	40%
15	**7-Br**		**247a**	92%
16	**8-Br**		**247b**	92%

Tableau 45 *: Résultats des couplages de Sonogashira.*

Le couplage de Sonogashira des différentes chaînes avec les deux hétérocycles bromés **238a,b** a été réalisé avec des rendements allant de très bons à faibles (25-95%). Un seul des produits de couplage **242a** (Entrée 5) n'a pu être obtenu, les conditions réactionnelles conduisant à un mélange complexe non purifiable. Durant ces couplages un phénomène a été observé de manière aléatoire. La formation d'un sel de triéthylamine (Entrées 1, 4, 8, 10, 14). Il n'y a aucun lien entre les chaînes ou la position sur l'hétérocycle expliquant ce phénomène même si la majorité se forme lors d'un couplage sur la position C^8. Le pKa de la triéthylamine (présente dans le milieu et impliquée dans le mécanisme) est de 10,78, celui de nos composés est d'environ 8,03 il est donc possible que la triéthylamine arrache le proton de la position N^1 et forme ensuite un sel avec ce dernier (Schéma 88). Différents essais de lavages ont été effectués afin de casser ce sel, conduisant à une perte du composé ce dernier devenant soluble en phase aqueuse. La meilleure solution trouvée a été la purification par plaques préparatives, conduisant aux pertes de rendements observées.

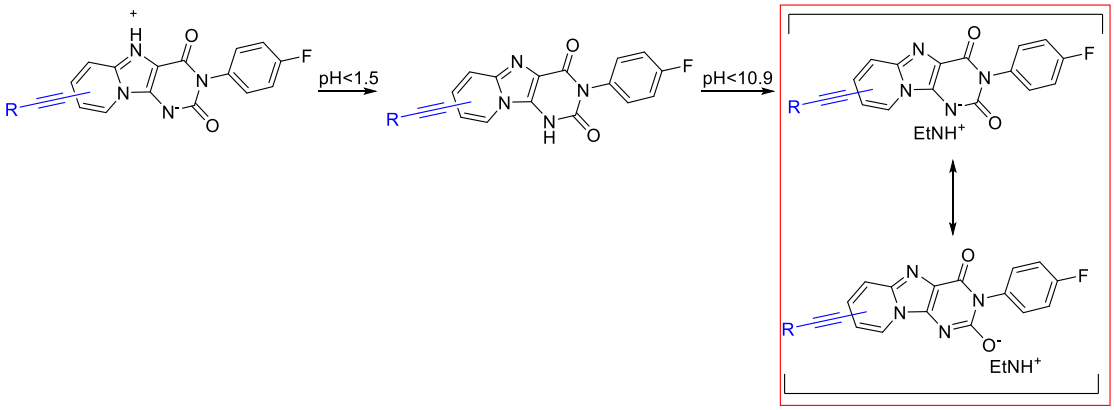


Schéma 88 *: Possible sel formé.*

Certains des composés précédents ont montré des activités inhibitrices proches de notre inhibition de référence **198a**. Nous avons donc décidé de synthétiser cinq substrats substitués possédant des squelettes présentant un intérêt biologique comparable au squelette de référence (N^1 : groupement benzyle **207e** ou benzyle méthyle ester **207a**) et sur le plan de la modélisation (*m,p*-difluorophényle **198e**).

Nous avons donc dans un premier temps préparé les différents intermédiaires **248**, **249a,b** et **250a,b** (Schéma 89), qui ont été engagés par la suite dans une réaction de Sonogashira.

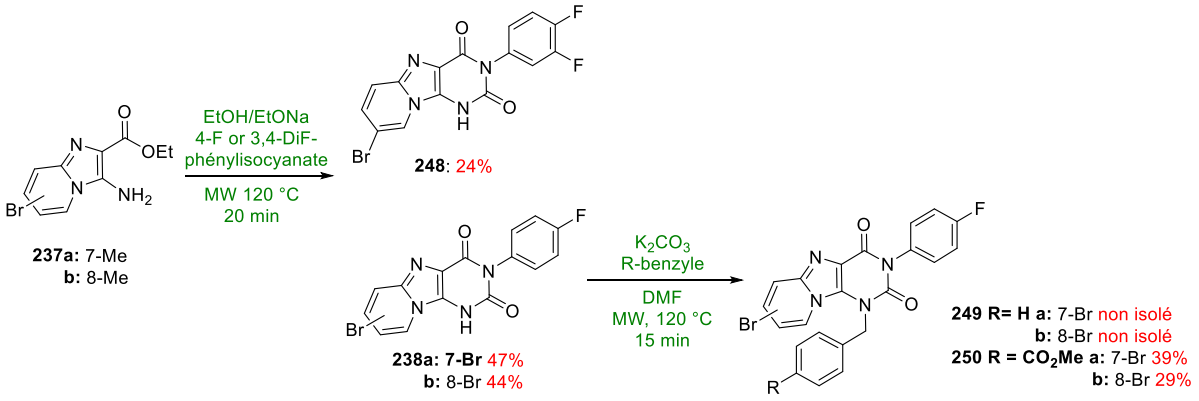
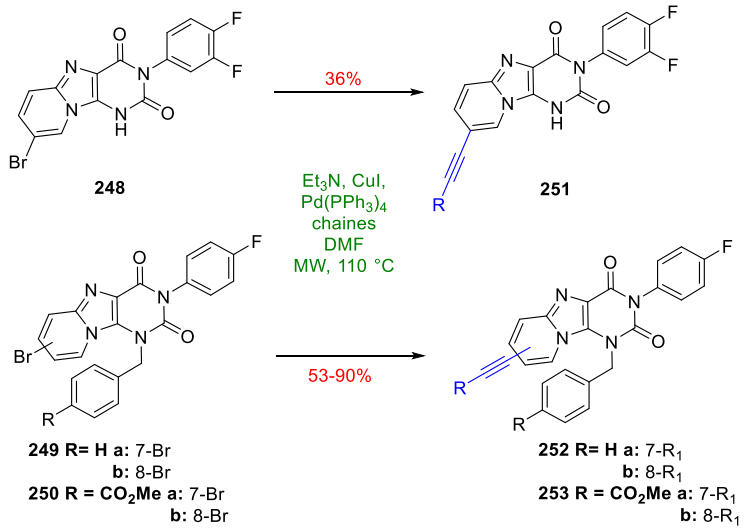


Schéma 89 *: Préparations des divers squelettes pour la réaction de Sonogashira.*

Ces cinq composés, N^1 libres **248**, N^1 substitués par des dérivés benzyles **249a,b**, **250a,b** ont été mis en réaction *via* un couplage de Sonogashira (Tableau 46).



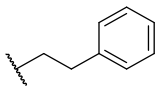
Entrées	Produits de départs	Chaînes	Produits finaux	Rendements
1	**248**		**251**	36%
2	**249a**		**252a**	90%
3	**249b**		**252b**	86%
4	**250a**		**253a**	62%
5	**250b**		**253b**	53%

Tableau 46 *: Divers exemple de polyfonctionnalisations.*

Les cinq hétérocycles issus des couplages organoorganopalladés ont été obtenus avec des rendements allant de modérés à bons. Aucun sel n'a été observé sur ces cinq couplages. Dans le cas du composé difluoré **251** une conversion non totale a été observée conduisant à un rendement plus faible (Entrée 1). Pour les deux composés N^1-benzyles **252a,b** (Entrée 2,3), les produits **253a,b** sont obtenus après deux étapes (alkylation puis couplage) avec de très bons rendements. Pour **253a,b** contenant les fonctions esters, les rendements légèrement plus faibles sont dus à la formation de nombreux coproduits observés mais non isolés.

1.1.2. *Résultats biologiques*

Une vingtaine de molécules a ainsi pu être obtenue avec des rendements allant de 25-95%, et ont été par la suite testées *via* le NADPH oxidase assay afin de tester leurs inhibitions sur la première étape de la biosynthèse (Figure 88). Nous avons essayé par cette série, d'étudier l'influence de la position sur l'aromatique, puis du type de chaîne : plus ou moins longue, rigide, la position de l'aryle ou encore la présence de liaisons hydrogène, hydrophobe.

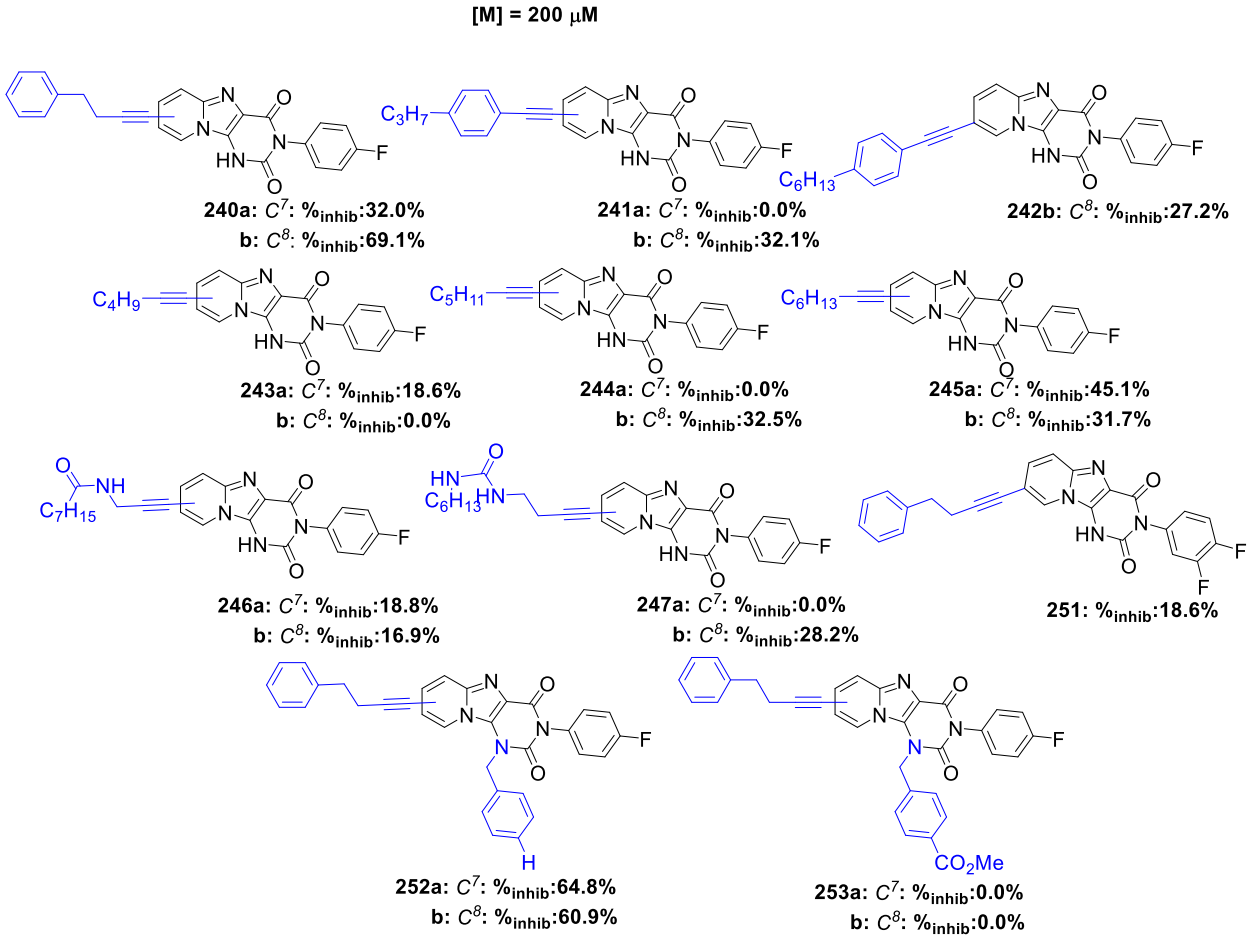


Figure 88 *: Tests NADPH oxdase assay pour la première étape de la biosynthèse.*

Par ce premier test, nous avons pu mettre en évidence trois structures présentant des inhibitions égales **252b** (avec 60.9% à 200 µM) ou supérieures **240b** et **252a** (respectivement 69.1 et 64.8% à 200 µM) à notre composé de référence **198a** (59.4% à 200 µM). Un des points communs dans ces trois structures est la présence d'une chaîne 3-butyn-1-ylbenzène sur la position aromatique C^7 ou C^8. Cette dernière, de par sa flexibilité, doit permettre au groupement phényle de se retrouver dans la position la plus propice à la formation de liaisons de type π-stacking avec les substrats naturels. Il semble très difficile de dégager un lien précis entre le type de chaînes et leurs positions sur l'inhibition de l'enzyme. Par exemple une chaîne à 6C **243a,b** et 8C **245a,b** aliphatique sont plus actives sur la position C^7 alors qu'une à 7C **244a,b** le sera plus sur la position C^8. Dans le cas de dérivés d'éthyn-1-yl benzène **241a,b** et **242b**, l'augmentation de la longueur de la chaîne permet de meilleure inhibition en C^8 qu'en C^7. Dans le cas des deux chaînes aliphatiques présentant des groupements amides **246a,b**

et urées **247a,b**, l'augmentation du nombre de groupement capable de créer des liaisons hydrogène a permis l'inhibition d'augmenter préférentiellement en C^8. La série substituée en N^1 par un benzyle ester **253a,b** ne présente aucune inhibition. Dans le cas du composé difluoré **251** (18.8%) son inhibition ne semble pas prometteuse malgré la modélisation réalisée mettant en évidence plus d'interactions dans le site actif.

Les trois meilleurs composés de la série ont par la suite été testés en supprimant l'ajout de FAD. On observe comme dans les cas précédent (N^1-alkylation), une chute brutale de l'inhibition. Cela nous indique que nos substrats ne rentrent pas en compétition avec le FAD, mais nous interpelle sur leurs capacités à se maintenir dans le site actif de l'enzyme. Le seul composé n'ayant pas montré ces problèmes étant le **198a** (Figure 89).

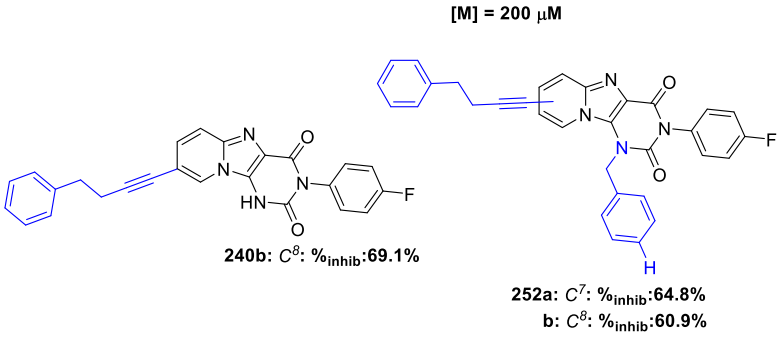


Figure 89 *: Tests NADPH oxidase assay sans ajout de FAD.*

En diminuant la concentration de nos inhibiteurs, le constat reste le même, leurs inhibitions **240b** et **252a,b** disparaissent complétement. Ils restent donc de faibles inhibiteurs de l'enzyme. Le composé **257a** montre une inhibition relativement proche de celle de **198a** à 50 µM. La diminution de la concentration en dUMP faisant chuter l'inhibition permet de mettre en évidence la non compétition avec ce dernier, mais nous interpelle sur la fixation de nos composés dans le site actif. Aucun de ces composés ne semble donc posséder les capacités inhibitrices du composé **198a** (**48.7%** et **18.4%)** (Figure 90).

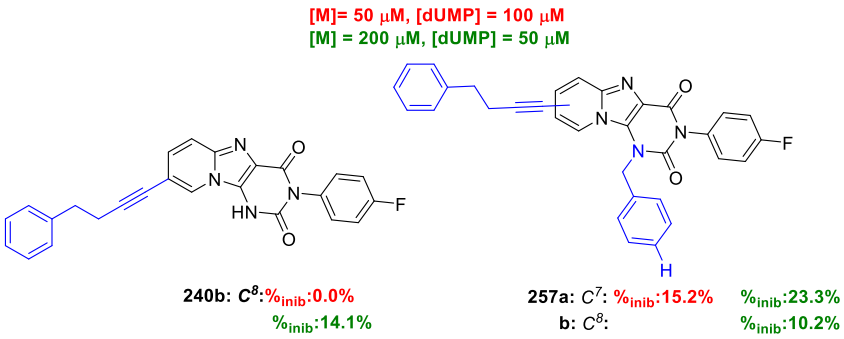


Figure 90 *: Tests NADPH oxidase assay à 50 µM en [M] et (50 µM) en [dUMP].*

Ces derniers résultats obtenus en diminuant la concentration en dUMP et en molécules inhibitrices restent en adéquation avec ceux obtenus sur la seconde partie du mécanisme et confirme la faiblesse de nos inhibiteurs en comparaison de **198a** (59.5% à 200 µM) (Figure 91).

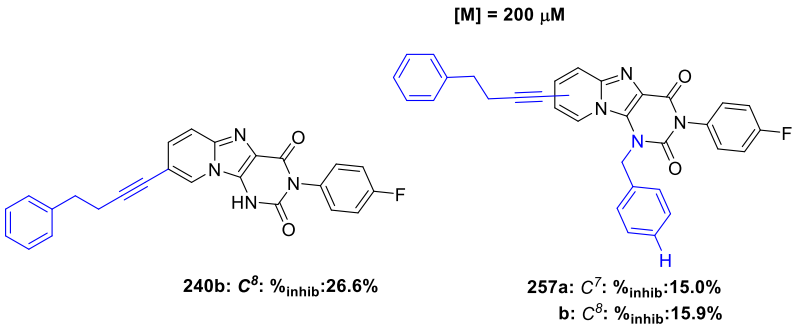


Figure 91 *: Tests avec le tritium release assay sur la seconde partie du mécanisme.*

Ces synthèses avaient pour but d'étudier la relation structure/activité de chaînes pouvant présenter des interactions hydrophobes ou de type π-stacking (avec les substrats naturels ou les acides aminés résiduels). Au vu des différents résultats biologiques, les inhibiteurs obtenus montrent de faibles activités. La reproductibilité des expériences permet néanmoins de confirmer le positionnement à l'intérieur du site actif. Un début de SAR est résumé dans la figure suivante (Figure 92).

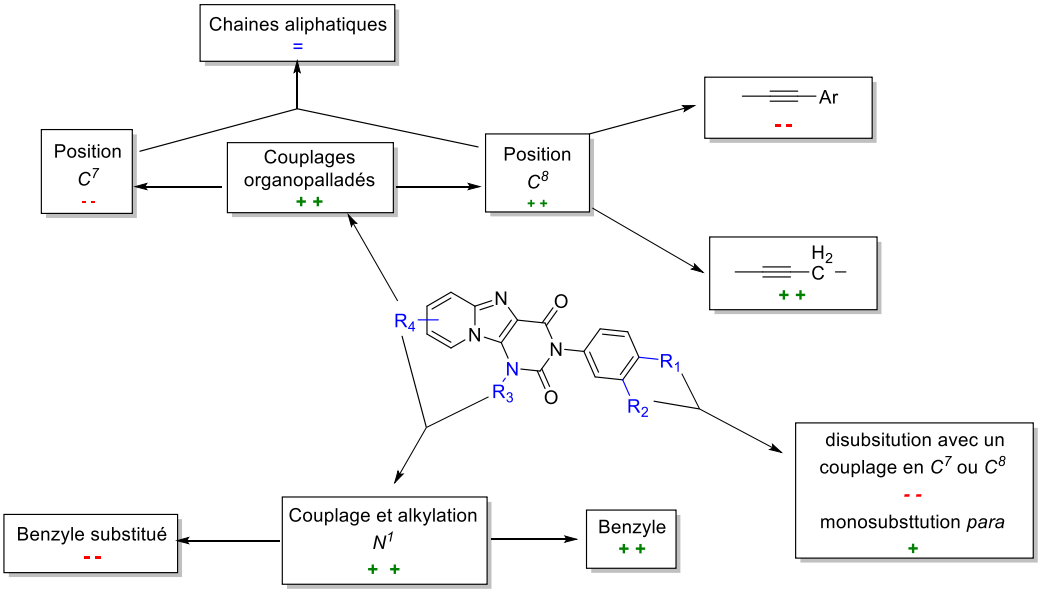


Figure 92 *: Substitutions générales produisant une inhibition.*

Afin de compléter la synthèse de produits de réaction de couplages organopalladés, les squelettes bromés **238a,b** ont été engagés dans des réactions de Suzuki-Miyaura afin d'étudier de nouvelles interactions avec l'enzyme.

1.2. Réaction de Suzuki-Miyaura

Publiée en 1979 par *Suzuki*[188] (prix Nobel en 2000 avec Heck et Neigishi), la réaction de Suzuki-Miyaura est une réaction de couplage entre un acide ou un ester boronique en présence d'une base, d'un dérivé halogénoaryle ou halogénovinyle et d'un catalyseur au Pd(0) (Schéma 90).

[188] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides". *Tetrahedron Lett.*, **1979** , *20*, 3437–3440.

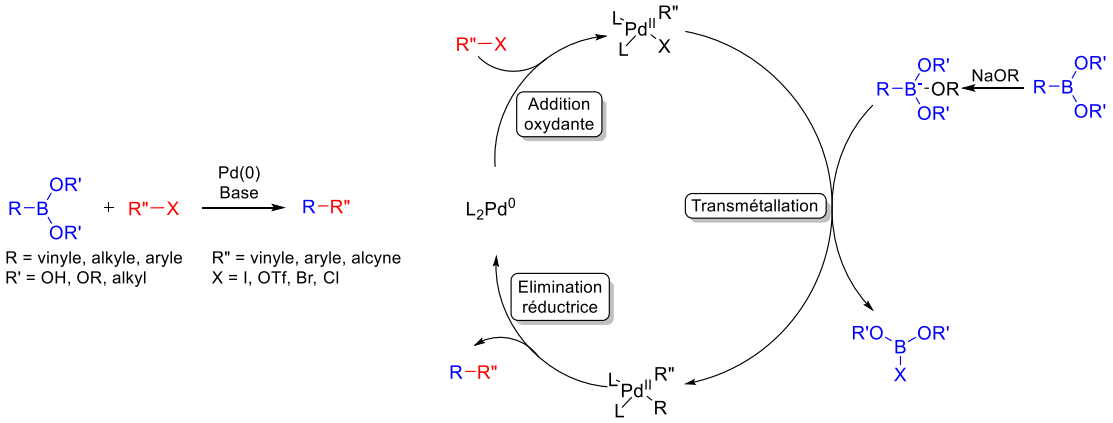


***Schéma 90** : Réaction générale et mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura.*[135]

La première étape est une addition oxydante du dérivé halogéné sur le catalyseur au palladium permettant son passage au degré d'oxydation (II). Durant l'étape de transmétallation la présence d'une base est nécessaire afin d'activer l'acide borique en formant le borate rendant ainsi le carbone directement lié plus réactif. On forme aussi dans le même temps un complexe R-Pd^{II}-OR, ou OR est l'anion de la base facilitant la réaction de transmétallation.[189] La dernière étape est l'élimination du substrat de couplage et la réduction du palladium au degré (0) afin de recommencer le cycle catalytique. Il existe une étape limitante suivant le type d'halogène : avec un iode c'est la transmétallation, alors qu'avec un brome c'est l'addition oxydante.[190]

Aujourd'hui le couplage de Suzuki-Miyaura est largement utilisé pour la synthèse car il est facile à mettre en œuvre, de par la large gamme de catalyseurs et de dérivés boroniques existants. Il est possible de réaliser ces couplages dans des milieux homogènes et hétérogènes,[191] en synthèse totale,[192] en synthèse nucléosidique,[193] mais aussi pour des couplages en milieu aqueux.[194]

1.2.1. Couplage de Suzuki-Miyaura

A partir des dérivés **238a,b** nous avons étudié l'influence de groupements phényles *p*-substitués avec des fonctions chimiques permettant la création d'interactions hydrogène ou hydrophobe. Ces structures ne présentent pas de degrés de libertés à la différence des substitutions effectuées lors des couplages de Sonogashira. Dans ce cas-ci, nous cherchons à avoir la structure la plus plane possible, afin de s'assurer de la bonne intercalation entre les substrats naturels. Ce sont des

[189] Miyaura, N.; Ishiyama, T.; Sasaki, H.; Ishikawa, M.; Satoh, M.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed inter- and intramolecular cross-coupling reactions of R-alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane derivatives with 1-halo-1-alkenes or haloarenes. Syntheses of functionalized alkenes, arenes, and cycloalkenes *via* a hydroboration-coupling sequence, *J. Am. Chem. Soc*. **1989**, *111*, 314-321.
[190] Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Hughes, D. L.; King, A. O.; Verhoeven, T. R., Mechanistic studies of the Suzuki cross-coupling reaction, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 8151-8156.
[191] Phan, N. T. S.; Van Der Sluys, M.; Jones, J., On the nature of the active species in palladium catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura couplings – Homogeneousor heterogeneous catalysis, A critical review, *Adv. Synth. Catal*., **2006**, *348*, 609–679.
[192] Taheri, A.; Koshvandi, K.; Heravi, M. M.; Momeni, T., Current applications of Suzuki–Miyaura coupling reaction in the total synthesis of natural products: An update, *Appl Organometal Chem.*, **2018**, *32*, e4210.
[193] Biteau, N. G.; Hervin, V.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., Suzuki-Miyaura cross-coupling as a synthetic tool for nucleoside and nucleotide modifications Chap. 3, in "Palladium-catalyzed modification of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides" Eds AR Kapdi, D Maiti & YS Sanghvi, *Elsevier* **2018**, 37-75.
[194] Polshettiwar, V.; Decottignies, A.; Len, C.; Fihri, A., Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions in aqueous media: Green and sustainable syntheses of biaryls, *ChemSusChem*, **2000**, *3*, 502-522.

structures planes rigides dont les interactions de type π-stacking seront prédominantes. Nous supposons que ces molécules pourraient s'intercaler entre les différents substrats naturels (dUMP-FAD ou FAD-CH_2folate) et ainsi inhiber le mécanisme enzymatique (Schéma 91).

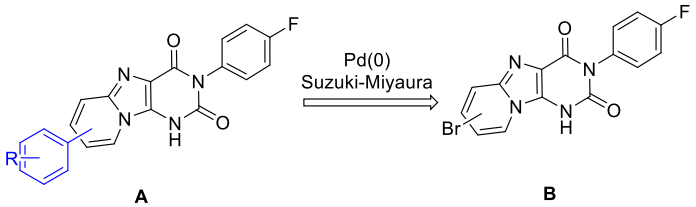


Schéma 91 *: Rétrosynthèse envisagée.*

Tout comme pour le couplage de Sonogashira, nous avons continué l'utilisation des modes d'activations « verts » afin de réaliser les différentes synthèses. A la différence du couplage de Sonogashira nous nous sommes tournés vers un système catalytique plus vert celui du Pd(0)/C.[195] Publié pour la première fois par *Buchecker et al.*[196] le mécanisme du couple Pd(0)/Pd(II) n'est pas complétement établi. Ce dernier étant hétérogène, le catalyseur pourra être retiré *via* une filtration évitant ainsi la contamination du produit final à tester par des métaux de transition. Il est recyclable et ne générera pas la libération de ligand dans le milieu par sa dégradation.[197] De plus il est vendu sous deux degrés d'oxydations possibles Pd(0) et Pd(II) : dans le cas du moins réduit le boronique du milieu sera responsable de sa première réduction en Pd(0) nécessitant donc un excès de ce dernier et donc produisant plus de produit de dimérisation. Ce type de catalyseur existe sous plusieurs formes, suivant sa distribution et l'imprégnation du palladium sur le charbon (Figure 93).[198]

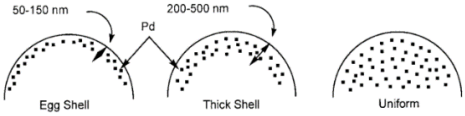
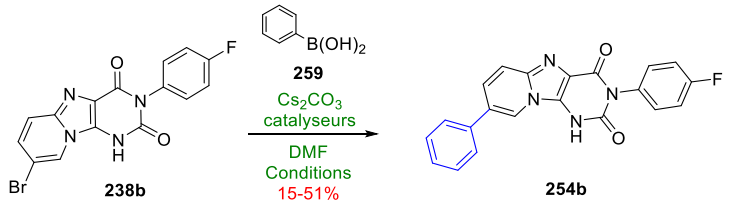


Figure 93 *: Les trois différentes formes de distributions du Pd/C.*

Une étape d'optimisations des conditions par un criblage des différents catalyseurs, solvants et modes d'activations a donc été mise en place afin de déterminer les meilleures conditions pour la réaction de Suzuki-Miyaura sur **238b (**Tableau 46).

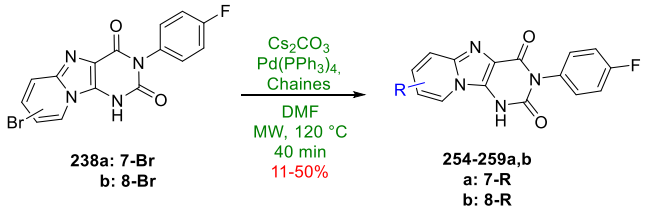
[195] Felpin, F., Practical and efficient Suzuki-Miyaura cross-coupling of 2-iodocycloenones with arylboronic acids catalyzed by recyclable Pd(0)/C, *J. Org. Chem*., **2005**, *70*, 8575-8578.
[196] Marck, G.; Villiger, A.; Buchecker, R., Aryl couplings with heterogeneous palladium catalysts, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3277-3280.
[197] Hattori, T.; Tsubone, A.; Sawama, Y.; Monguchi, Y.; Sajiki, H., Palladium on carbon-catalyzed Suzuki-Miyaura coupling reaction using an eficient and continuous flow system, *Catalysts*, **2015**, *5*, 18-26.
[198] Felpin, F.; Ayad, T.; Mitra, S., Pd/C: An old catalyst for new applications – Its use for the Suzuki–Miyaura reaction. *Eur. J. Org. Chem*., **2006**, *2006*, 2679-2690.



Entrées	Catalyseurs	Solvants	Conditions	Rendements
1	$Pd(P\Phi_3)_2Cl_2$/Xanphos	DMF	MW, 120 °C, 30 min	15%
2	$Pd(P\Phi_3)_4$	DMF	Δ, 130 °C, 7 h 30	51%
3	$Pd(P\Phi_3)_4$	DMF	MW, 120 °C, 40 min	50%
4	$Pd(P\Phi_3)_4$	DMF	)))), 32 kHz, 80 °C, 7 h 30	33%
5	Pd(0)/C	DMPU	MW, 120 °C, 40 min	X

Tableau 47 : *Optimisation de la réaction de coupage de Suzuki-Miyaura.*

Les premières conditions utilisées (Entrée 1) proviennent des travaux reportés notre équipe (*Tber et al.*), publiés sur des structures analogues. Dans ces conditions le produit d'intérêt **254b** a pu être isolé avec 15% de rendement. En repartant d'un système catalytique plus classique (Entrée 2), nous avons pu isoler par chauffage thermique en présence de $Pd(P\Phi_3)_4$ le composé désiré avec 51% de rendement. Afin d'étudier les différents modes d'activations, nous l'avons comparé à une activation sous micro-onde (Entrée 3) et sous ultrason (Entrée 4). Dans ces conditions, nous avons obtenu des rendements (50%) par une activation micro-onde en seulement 40 minutes du même ordre que celui par une activation thermique (7h30), avec moins de produits secondaires. Avec les ultrasons, les rendements sont plus faibles à cause de la conversion moindre de **238b,** en contrepartie, le brut final est plus simple à purifier. Nous avons essayé de mettre en place des conditions plus vertes de réactions avec un catalyseur au Pd(0)/C sous micro-ondes dans un solvant vert le DMPU (N, N'-diméthylpropylène-urée). Aucune conversion du réactif de départ n'a été observée dans ces conditions. Une des causes pouvant expliquées la mauvaise réactivée, est la formation d'agrégat augmentant la forme cristalline du catalyseur et cassant la distribution et donc sa réactivité. Nous avons donc décidé de réaliser l'ensemble des couplages suivant les conditions obtenues avec l'entrée 3 sous microondes, sur les différents squelettes bromés **238a,b** (Tableau 48).



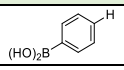
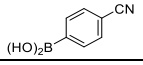
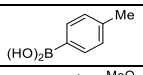
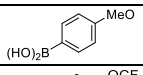
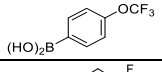
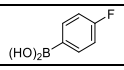
Entrées	Produits de départs	Boroniques	Produits finaux	Rendements
1	**7-Br**		**254a**	45%
2	**8-Br**		**254b**	50%
3	**7-Br**		**255a**	X
4	**8-Br**		**255b**	X
5	**7-Br**		**256a**	44%
6	**8-Br**		**256b**	31%
7	**7-Br**		**257a**	15%
8	**8-Br**		**257b**	31%
9	**7-Br**		**258a**	15%
10	**8-Br**		**258b**	43%
11	**7-Br**		**259a**	45%
12	**8-Br**		**259b**	11%

Tableau 48 *: Résultats des couplages de Suzuki-Miyaura.*

L'ensemble des molécules issues du couplage de Suzuki-Miyaura **254-259a,b** ont pu être obtenues avec des rendements allant de modérés à corrects. La position du brome sur l'hétérocycle ne semble pas influencer le couplage avec le dérivé boronique. Un des principaux problèmes est la stabilité des boroniques dans ces conditions de couplage, conduisant à une dégradation partielle (nécessité de mettre plus d'équivalents). Dans le cas des dérivés cyanés **255a,b**, ils n'ont jamais été isolés à cause de la difficulté de séparation et des faibles conversions lors des couplages. Ils peuvent s'expliquer par les effets –I et –M du groupement cyano diminuant la réactivité du boronique.

1.2.2. Résultats biologiques

Une dizaine de molécules ont ainsi pu être obtenues avec des rendements allant de 11-50%, elles ont été ensuite évaluées sur l'enzyme, avec le test de NADPH oxidase assay, pour leurs inhibitions sur la première étape de la biosynthèse (Figure 94). Nous avons cherché à évaluer l'importance d'une structure plane et rigide, permettant à la fois des interactions de π-stacking, hydrophobe ou hydrogène.

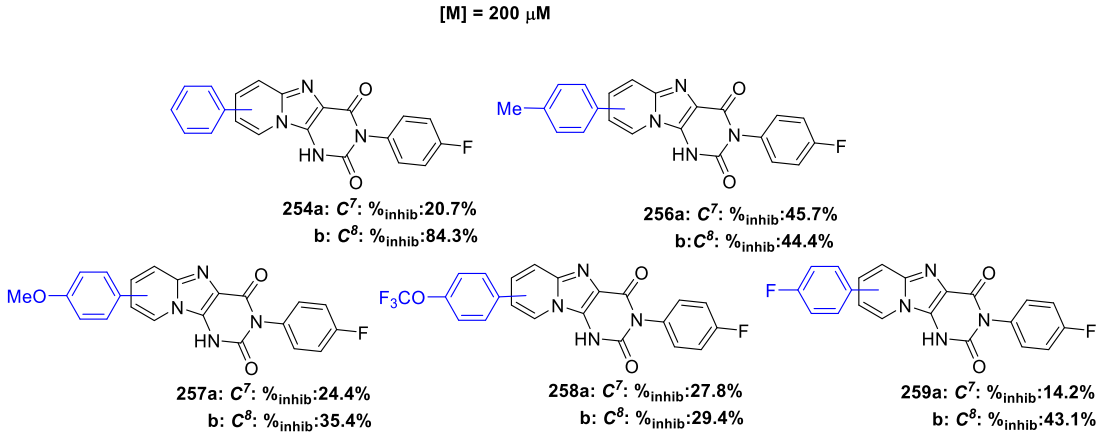


Figure 94 *: Tests NADPH oxdase assay pour la première étape de la biosynthèse.*

Une des premières informations que l'on peut tirer de ces résultats est la faible inhibition de la plupart des dérivés synthétisés confirmant leurs faibles potentiels sur cette cible. Dans l'ensemble, les groupements en position C^8 semblent générer de meilleurs interactions de type π-stacking, hydrophobe (**256b**, **257b** et **258b**), ou hydrogène (**265b**) avec le site actif de l'enzyme ou les différents substrats naturels. Les meilleures interactions sur ces dérivés étant obtenues par les molécules portant les groupements méthyles **256a,b** et fluor **265b**. Néanmoins, une des molécules présente une inhibition jamais observée jusque-là. Le dérivé **254b** portant un groupement phényle en C^8 inhibe la formation du NAD^+ et donc du dTMP à plus de 80% à 200 µM.

La perte d'inhibition en ne rajoutant pas de FAD nous laisse à penser que ce dérivé n'entre pas en compétition avec ce dernier contrairement à **198a** qui voyait son inhibition augmentée. (Figure 95).

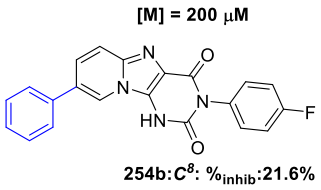


Figure 95 *: Test NADPH oxidase assay sans ajout de FAD.*

En divisant par quatre la concentration de notre inhibiteur, son activité dans l'enzyme chute drastiquement, confirmant le caractère faible comme inhibiteur de *ThyX Mtb*. La perte d'inhibition lors de la diminution de la concentration en dUMP met en évidence une non compétition avec le substrat naturel. Cette chute d'inhibition ne fait que confirmer les inquiétudes la fixation de la molécule **254b** dans le site actif de l'enzyme (Figure 96).

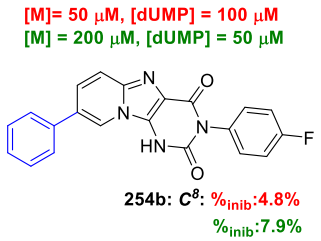


Figure 96 *: Tests NADPH oxidase assay à 50 µM en [M] et (50 µM) en [dUMP].*

Comparée aux différents composés avec des chaînes aliphatiques, la molécule **254b** substituée par un phényle présente de moins bonnes inhibitions sur la seconde partie du mécanisme que les différents composés hétérocycliques testés précédemment : **198a** (59.5%), **198b** (69.2%), **198h** (77.1%) (Figure 97).

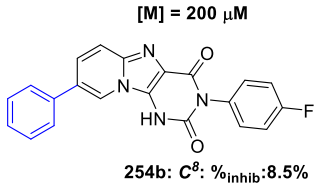


Figure 97 *: Tests avec le tritium release assay sur la seconde partie du mécanisme.*

Ces synthèses avaient pour but d'étudier la relation structure-activité de groupements aryliques afin d'augmenter les interactions de type π-stacking, mais aussi hydrogène et hydrophobe. Au vu des différents résultats biologiques, les différentes molécules obtenues montrent de faibles inhibitions et sont donc de faibles inhibiteurs du site actif, sauf pour **254b**. L'influence de la substitution est résumée dans la figure suivante (Figure 98).

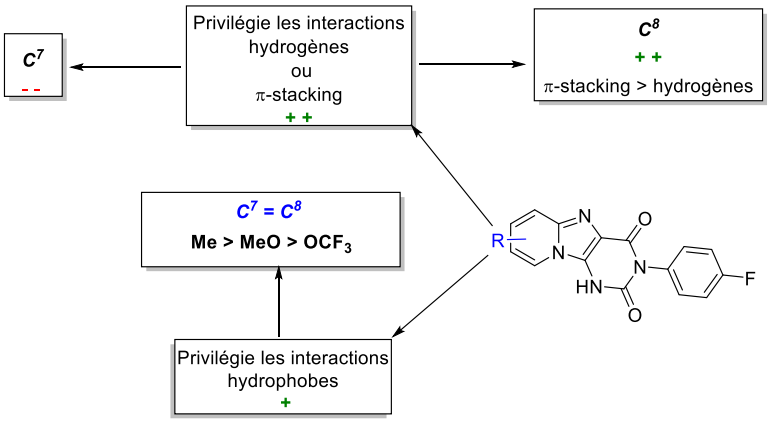


Figure 98 *: Substitutions générales produisant une inhibition.*

2. Conclusions et perspectives

Sur la base d'une évaluation de plusieurs familles de molécules et d'une première modification d'un inhibiteur, nous avons mis en place une voie synthétique afin d'étudier l'influence de diverses modifications structurales (position N^1, N^3 et aromatique) sur l'inhibition d'une petite bibliothèque de 63 polycycles azotés sur l'enzyme *ThyX Mtb* (Figure 99).

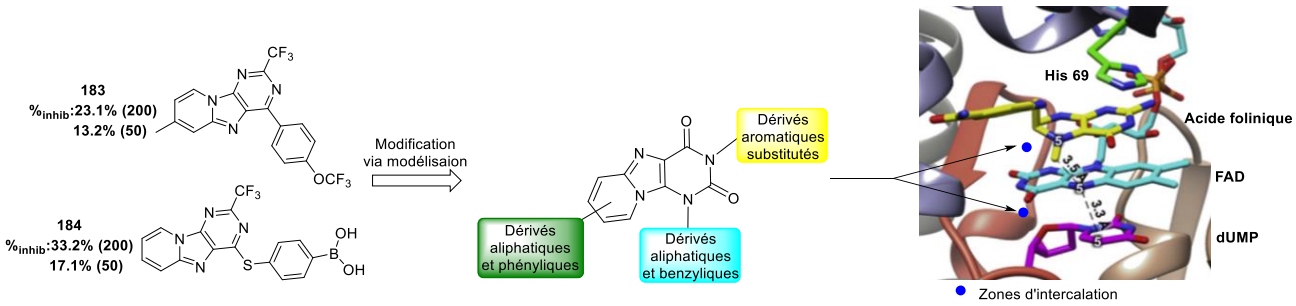


Figure 99 *: Modifications réalisées sur les hétérocycles.*

Afin d'étudier ces relations dans le site actif de l'enzyme, nous avons développé une synthèse sous activation micro-onde dirigée par une étude structure/activité dans le but de développer une modulation de manière convergente sur chacune des positions diversifiables *via* des alkylations, activations CH et couplages organopalladés (Schéma 92).

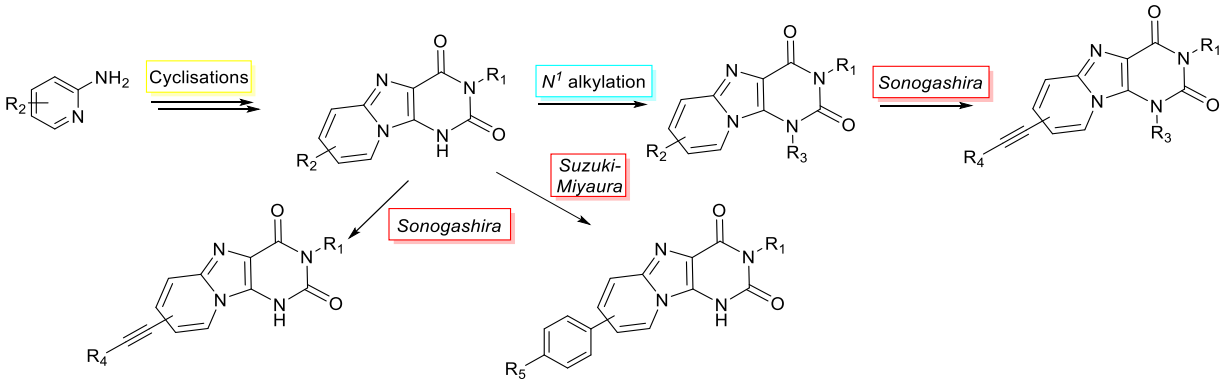


Schéma 92 *: Voies générales d'obtentions des différents hétérocycles*

Les premiers composés possédaient une position N^3-substituée. Nous avons pu mettre ainsi en évidence le composé **198a** contenant le groupement fluorophényle. Ce dernier a ainsi servi de squelette de référence pour la suite des synthèses. La fonctionnalisation de la position N^1 et O^2 par des groupements benzyles et des chaînes aliphatiques a conduit à une perte d'inhibition. Lors des couplages *via* la réaction de Sonogashira, nous avons maintenu l'inhibition grâce à la chaîne 4-phénylbut-1-ynyl sur la position C^8 et à la double substitution N^1-benzyle-C^8-4-phénylbut-1-ynyl. Dans le cas des réactions de Suzuki-Miyaura, nous avons augmenté cette d'inhibition à 84.3%, en substituant la position C^8 par un groupement phényle (Figure 100). De futurs tests devront être réalisés afin de confirmer les résultats obtenus.

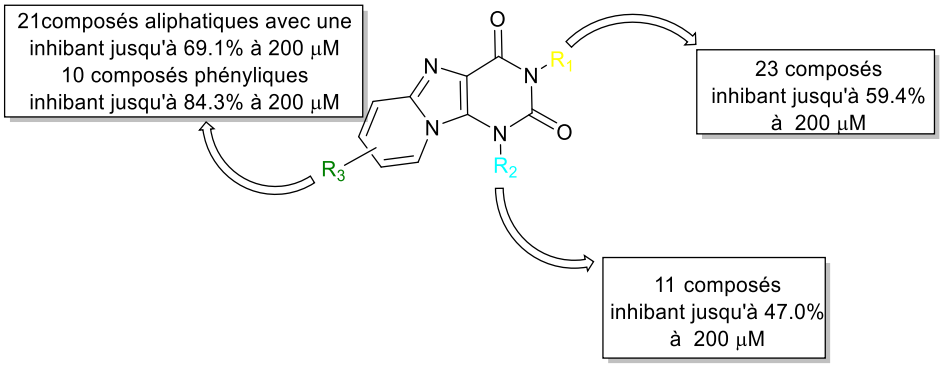
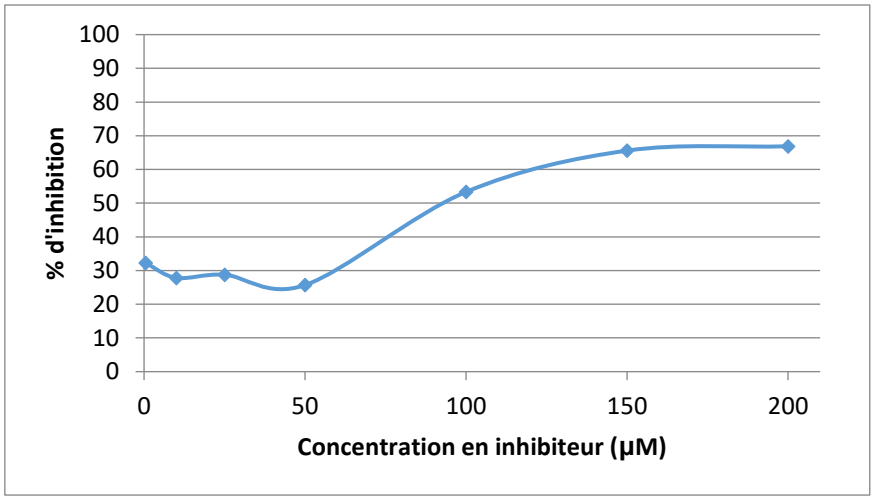


Figure 100 *: Relations structures activité.*

A partir des deux structures obtenues lors du criblage (**175** et **177**) nous avons tout de même réussi à développer une structure innovante **198a** présentant une inhibition 2 fois supérieure à 200 µM et comparable à 50 µM sur l'enzyme. Ces diverses modifications sur ce squelette **198a** ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats biologiques plus intéressants. Les pertes d'inhibitions des différentes structures lors de la diminution des cofacteurs comme le dUMP et le FAD, ajoutées à l'absence d'activité à basse concentration n'ont fait que confirmer le caractère faible de ces inhibiteurs.

Nous avons donc décidé de déterminer l'IC_{50} de la molécule **198a** le NADPH oxidase assay. La seule concentration en dUMP qui nous a permis d'obtenir une courbe exploitable afin de déterminer l'IC_{50} à une concentration de 100 µM en dUMP (Graphique 5).



Graphique 5 *: Calcul de l'IC$_{50}$: %inhibtion=log($C_{inhibiteur}$).*

Nous avons pu déterminer que l'IC$_{50}$ de **198a à** 95 µM. Les différentes inhibitions observées en dessous de 60 µM sont non spécifiques, il n'y a rien qui nous laisse à penser qu'elles sont dues à notre composé. Le mode d'inhibition de notre molécule pourrait être obtenu à partir de courbe exploitable à différentes concentrations en dUMP. Nous savons grâce aux tests sans ajout de FAD, que le composé **198a** pourrait rentrer en compétition avec ce dernier.

Au vu des différents résultats biologiques il serait nécessaire d'explorer des dérivés alkylés sur la position N^1 et substitués par un phényle en C^8, ou encore de voir l'influence d'une fonction acide sur le phényle de la position N^3 (Figure 101).

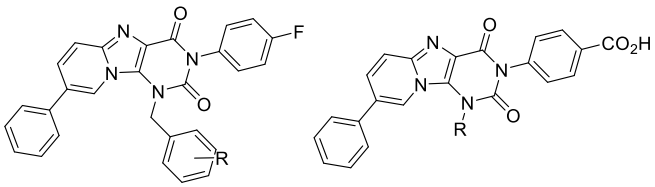


Figure 101 *: Potentielle molécules à étudier.*

Une des autres perspectives, serait de porter notre attention sur des dérivés de l'acide folinique.[199] Le Pr. Myllykallio et le Dr. Becker nous ont transmis récemment une structure provenant d'une modélisation présentant un intérêt non négligeable sur la *FDTS*.[200] Il sera donc nécessaire dans un premier temps de synthétiser ce dérivé d'après les conditions reportées par *Aldrich et al.*[201] Par la suite, diverses modifications pourraient être apportées (Schéma 93) :

- Sur la partie ptérine en la substituant par d'autres dérivés hétérocycliques ou en faisant varier les hétéroatomes.
- La longueur de la chaîne diacide.

[199] Webster, L. A.; Thomas, M.; Urbaniak, M.; Wyllie, S.; Ong, H.; Tinti, M.; Fairlamb, M. H.; Boesche, M.; Ghidelli-Disse, S.; Drewes, G.; Gilbert, I. H., Development of chemical proteomics for the folateome and analysis of the kinetoplastid folateome, *ACS Infect. Dis*., **2018**, *4*, 1475-1486.
[200] Hajian, B.; Scocchera, E.; Shoen, C.; Krucinska, J.; Viswanathan, K.; G-Dayanandan, N.; Erlandsen, H.; Estrada, A.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Cynamon, M.; Wright, D., Drugging the folate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The role of multi-targeting agents, *Cell Chem. Biol*., **2019,** *26*, 781-791.
[201] Dawadi, S.; Kordus, S. L.; Baughn, A. D.; Aldrich, C. C., Synthesis and analysis of bacterial folate metabolism intermediates and antifolates, *Org. Lett*., **2017**, *19*, 5220-5223.

- En changeant ces deux fonctions acides par des amides, alcool.
- La substitution de l'aromatique centrale et sa taille afin d'induire de nouvelles interactions.

De l'azote qui lui est lié en le substituant ou en le remplaçant par un autre hétéroatome.

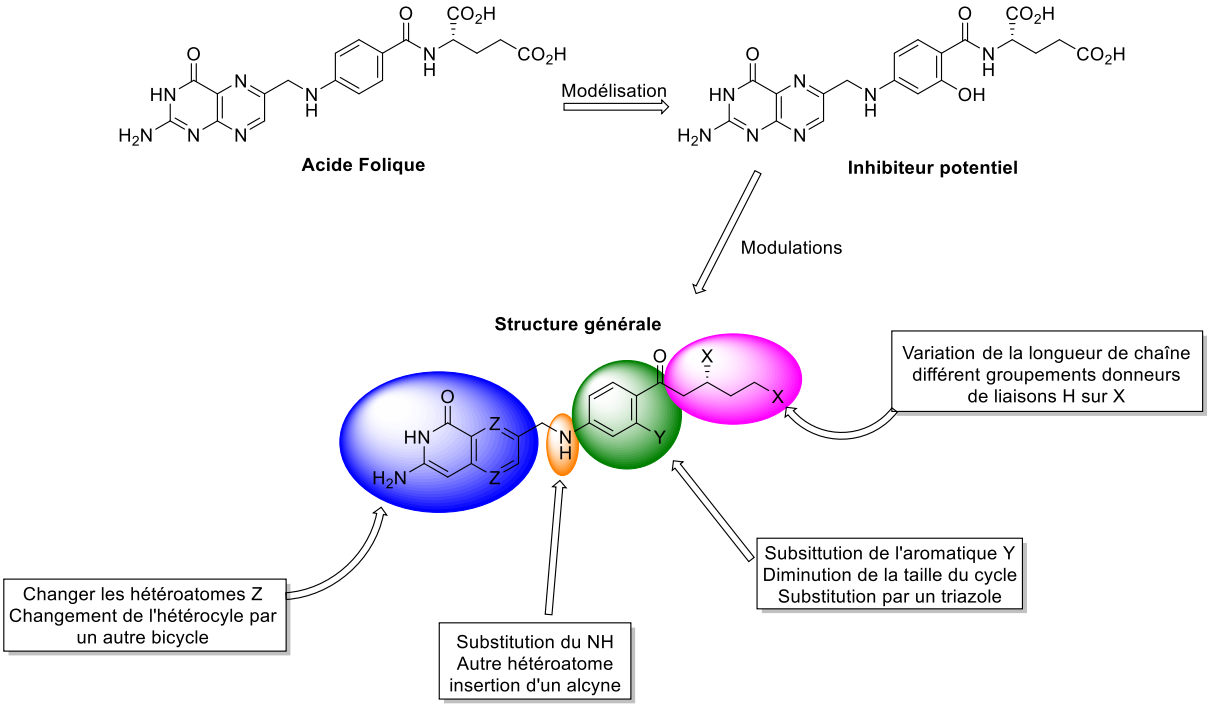


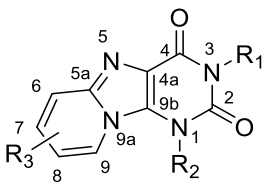
Schéma 93 *: Potentiel inhibiteur obtenu par Docking sur Mtb ThyX.*

Experimental part Chapter 2

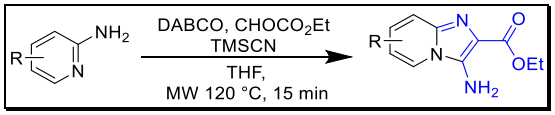
GENERAL

Commercially available chemicals were of reagent grade and used as received. All reactions requiring anhydrous conditions were carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry Ar or N_2. Microwave reactions were carried out in a Biotage Initiator apparatus. The reactions under ultrasound were carried out with Elmasonic P30H apparatus with a frequency of 80 kHz and effective power of 100 W. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with phosphomolybdic acid (PMA) stain, potassium permanganate solution or ninhydrin stain, followed by charring at around 150°C. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040-0.063 mm, E. Merck). Solid were not recrystalized. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 or Bruker Avance 400 Spectrometers. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. 1H and 13C signals were attributed on the basis of H–H and H–C correlations. High Resolution Mass spectra were performed on a Bruker Q-TOF MaXis spectrometer by the "Fédération de Recherche" ICOA/CBM (FR2708) platform.

<u>Numérotation des hétérocyles:</u>

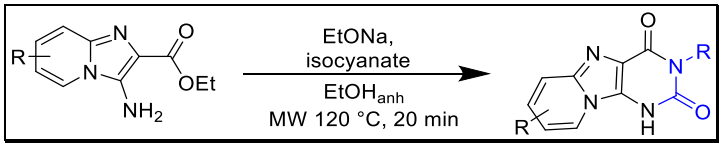


GENERAL PROCEDURE 1: Strecker-Ugi cyclisation.



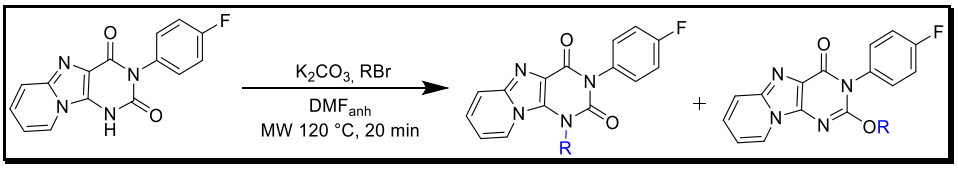
A mixture of amino pyridine derivatives (200 mg) and ethyl glyoxalate solution (50% solution in toluene) (1 eq.) was stirred at 25 °C for 2 min. THF (4.5 mL) and 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (1 eq.) were subsequently added. The reaction mixture was cooled to 0–5 °C and cyanotrimethylsilane (1 eq.) was added. The mixture was heated under microwave irradiation at 120 °C for 15 min). The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved with EtOAc, washed with K_2CO_3, dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with EtOAc as eluent.

GENERAL PROCEDURE 2: Isocyanate cyclisation.



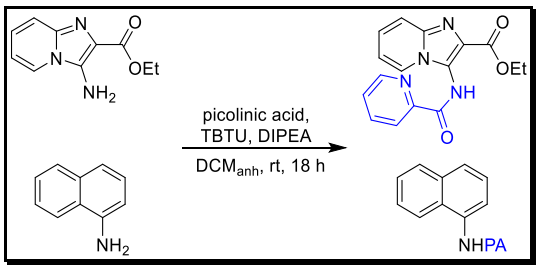
To a solution of amino ester compound (350 mg) in anhydrous ethanol (4.5 mL), were added subsequently isocyanate (2 eq.) and sodium ethoxide (2 eq.) under inert atmosphere. The reaction mixture was heated at 120 °C under microwave irradiation for 20 min. The solvent was evaporated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (92:8) as eluent to afford desired compounds.

GENERAL PROCEDURE 3: N1 alkylation condition.



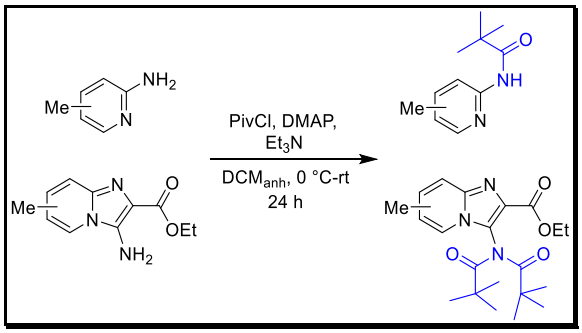
To a solution of fluorobenryl compound (**X**) (150 mg) in anhydrous DMF (4 mL), were added subsequently potassium carbonate (1.5 eq.) and bromide derivatives (1.5 eq.) under inert atmosphere. The reaction mixture was heated at 120 °C under microwave irradiation for 20 min. The mixture was dissolved with EtOAc, washed twice with saturated NH_4Cl, dried over MgSO4, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography using an elution gradient of DCM/MeOH (from 98:2 to 95:5) to afford desired compounds.

GENERAL PROCEDURE 4: Picolinic protection.



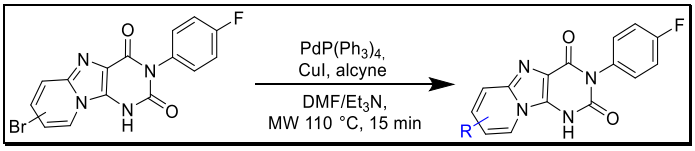
To a solution of amino ester compound (1 eq.) in freshly distilled DCM (0.2M) under inert atmosphere, were added subsequently picolinic acid (1 eq.), 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate (1 eq.) and diisopropylethylamnine (2.08 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 16 hours. The mixture was diluted with DCM, washed twice with saturated NH_4Cl, dried over MgSO4, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH (98:2) as eluent to afford desired compounds.

GENERAL PROCEDURE 5: Pivalic protection.



A mixture of methylated compound (1 eq.), dimethylaminopyridine (0.1 eq.) and triethylamine (1.5 eq.) in freshly distilled DCM was stirred at 0°C under inert atmosphere. pivaloyl chloride (1.2 eq.) was added drop wise and the reaction was allowed to warm up to room temperature. After 20 hours the mixture was diluted with DCM, washed twice with brine, dried over MgSO4, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with PE/AcOEt (3:7) as eluent to afford desired compounds.

GENERAL PROCEDURE 6: Sonogashira coupling.



Procedure A:

Under inert atmosphere, to a solution of deprotected Br-compound (1 eq.) in dry DMF (0.082 M) were successively added copper iodide (0.2 eq.), triethylamine (3 eq.), alkynyl group (3 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%). The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 110 °C for 15 min. The

reaction was quenched with EtOAc and co-evaporated with heptane. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

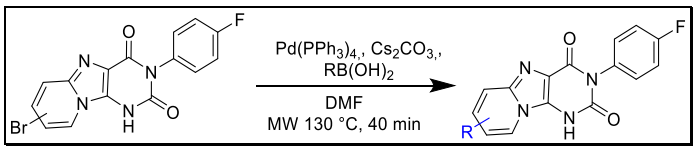
Procedure B:

Under inert atmosphere, to a solution of deprotected Br-compound (1 eq.) in dry DMF (0.082 M) were successively added copper iodide (0.2 eq.), triethylamine (3 eq.), alkynyl group (3 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%). The reaction mixture was heated under at 70 °C for 4 hours. The reaction was quenched with EtOAc and co-evaporated with heptane. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

Procedure C:

Under inert atmosphere, to a solution of deprotected Br-compound (1 eq.) in dry DMF (0.082 M) were successively added copper iodide (0.2 eq.), triethylamine (3 eq.), alkynyl group (3 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%). The reaction mixture was sonicated at 32 kHz and 55 °C for 4 hours. The reaction was quenched with EtOAc and co-evaporated with heptane. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

GENERAL PROCEDURE 7: Suzuki-miyaua coupling.



Procedure A:

A mixture of Br-compound (1 eq.), boronic acid (1.5 eq.), cesium carbonate (2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (0.1 eq.) in anhydrous DMF (0.1 M) under inert atmosphere was heated under microwave irradiation at 120 °C for 40 min. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

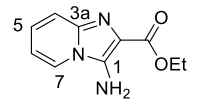
Procedure B:

A mixture of Br-compound (1 eq.), boronic acid (1.5 eq.), cesium carbonate (2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (0.1 eq.) in anhydrous DMF (0.1 M) under inert atmosphere was heated at 130 °C for 7 hours. The reaction was quenched with NH_4Cl solution and extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO4, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

Procedure C:

A mixture of Br-compound (1 eq.), boronic acid (1.5 eq.), cesium carbonate (2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (0.1 eq.) in anhydrous DMF (0.1 M) under inert atmosphere was sonicated at 32 kHz and 80 °C for 7 hours. The reaction was quenched with NH_4Cl solution and extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO4, filtrated and concentrated under reduced pressure. Pure compounds were obtained after purification on silica gel column chromatography with DCM/MeOH as eluent.

Ethyl 3-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (197)



Chemical Formula: $C_{10}H_{11}N_3O_2$
Exact Mass: 205,0851

Following the general procedure 1, from amino pryridine (0.2 g, 1 eq., 3.13 mmol) with TMSCN (0.26 ml, 1 eq., 3.13 mmol) DABCO (0.24g, 1 eq., 3.13 mmol) and ethyl glyoxolate 50% in toluene (0.42 ml, 1 eq. 3.13 mmol) in THF (4.5 ml, 0.7 M). The title compound was obtained after purification as a green/yellow solid (50%).

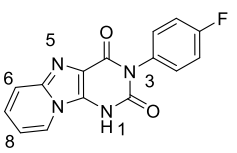
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.17 (dt, 1H, *J* = 7.1, 1,1 Hz, H_4), 7.31 (dt, 1H, *J* = 9.3, 1,1 Hz, H_7), 7.05 (ddd, 1H, *J* = 9.3, 6.5, 1.1 Hz, H_6), 6.79 (ddd, 1H, *J* = 7.1, 6.5, 1.1 Hz, H_5), 6.35 (bs, 2H, NH_2), 4.27 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, O-CH_2), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz CH_2-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{10}H_{12}N_3O_2$: 206.0923, found: 206.0922.

Rf : 0.31 (AcOEt).

CAS : 1487454-00-1.

3-(4-Fluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198a)



Chemical Formula: $C_{15}H_9FN_4O_2$
Exact Mass: 296,0710

Following the general procedure 1, from amino ester (0.1 g, 1 eq., 0.4 mmol) with EtONa (0.067 g, 2 eq., 0.95 mmol) *p*-F-phénylisocyante (0.12 ml, 2 eq., 0.95 mmol) EtOH (1 ml, 0.4 M). The title compound was obtained after purification as a light yellow solid (0.089 g, 75%).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-*d*$_4$) 8.36 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.55 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_9), 7.41-7.37 (m, 1H, H_8), 7.35-7.28 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.26-7.18 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.00 (t, 1H, *J* = 7.0, Hz, H_7).

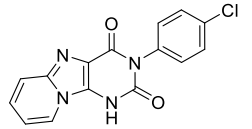
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{10}FN_4O_2$: 2.97.0782, found: 297.0783.

λ_{abs} : 339 nm $\lambda_{ém}$: 495 nm λ_{exc} : 339 nm.

CAS : 1842362-44-0.

Rf : 0.25 (DCM/MeOH 9:1).

3-(4-Chlorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198b)



Chemical Formula: $C_{15}H_9ClN_4O_2$
Molecular Weight: 312,7130

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (39%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.47 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_6), 7.56-7.48 (m, 3H, H_9, 2 x H_{arom}), 7.34-7.23 (m, 3H, H_8, 2 x H_{arom}), 7.00 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_7).

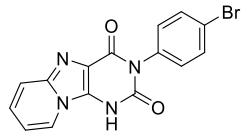
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{10}ClN_4O_2$: 313.0487, found: 313.0486.

CAS : 1842362-41-7.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 494 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.3 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(4-Bromophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198c)



Chemical Formula: $C_{15}H_9BrN_4O_2$
Exact Mass: 355,9909

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white/grey solid (23%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.54 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.70-7.61 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.52 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_9), 7.24 (td, 3H, *J* = 6.2, 2.4 Hz, H_8, 2 x H_{arom}), 6.96 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_7).

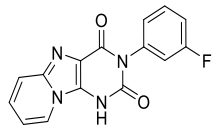
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.0 (**C**=O), 151.8 (**C**=O), 141.5 (**C**$_{quat}$), 136.6 (**C**$_{quat}$), 135.7 (**C**$_{quat}$), 131.6 (4 x **C**$_{arom}$), 126.1 (**C**$_{arom}$), 124.2 (**C**$_{arom}$), 120.0 (**C**$_{quat}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 117.6 (**C**$_{quat}$), 112.38 (**C**$_{arom}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_9BrN_4O_2$: 356.9981 found: 356.9980.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 527nm λ_{exc} : 286 nm.

Rf : 0.43 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(3-Fluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198d)



Chemical Formula: $C_{15}H_9FN_4O_2$
Exact Mass: 296,0710

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow solid (19%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.50 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz, H_6), 7.55-7.49 (m, 2H, H_9, H_{arom}), 7.33-7.24 (m, 3H, H_8, 2 x H_{arom}), 7.20 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_{arom}), 7.14 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_{arom}), 6.97 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz, H_7).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.3 (**C**=O), 158.9 (**C**$_{quat}$), 158.9 (d, *J* = 11.1 Hz, **C**$_{quat}$), 151.7 (**C**=O), 141.6 (**C**$_{quat}$), 139.0-138.1 (m, **C**$_{quat}$), 130.0 (d, J_{C-F} = 9.3 Hz, **C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 125.7 (d, J_{C-F} = 3.03 Hz, **C**$_{arom}$), 124.1 (**C**$_{arom}$), 118.32 (**C**$_{arom}$), 117.6 (**C**$_{quat}$), 116.75 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, **C**$_{arom}$), 114.5 (d, J_{C-F} = 20.2 Hz, **C**$_{arom}$), 112.4 (**C**$_{arom}$).

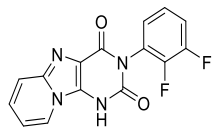
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.60.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_9FN_4O_2$: 297.0782, found: 297.079.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 498 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.29 (DCM/MeOH 9:1).

3-(3,4-Difluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198e)



Chemical Formula: $C_{15}H_8F_2N_4O_2$
Exact Mass: 314,0615

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white/yellow solid (38%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.44 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz, H_6), 7.55-7.47 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.44 (dd, 1H, *J* = 7.4, 2.3 Hz, H_{arom}), 7.25 (d, 1H *J* = 9.4 Hz, , H_8), 7.14 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{arom}), 6.93 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz, H_7).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.2 (**C**=O), 152.5 (**C**=O), 150.1 (dd, *J* = 38.2, 12.9 Hz, **C**$_{quat}$), 147.7 (dd, J_{C-F} = 38.4, 12.8 Hz, **C**$_{quat}$), 141.5 (**C**$_{quat}$), 137.1 (**C**$_{quat}$), 134.3 (dd, J_{C-F} = 8.6, 3.5 Hz, **C**$_{quat}$), 126.6 (dd, J_{C-F} = 6.6, 3.4 Hz, **C**$_{arom}$), 126.0 (**C**$_{arom}$), 124.0 (**C**$_{arom}$), 118.9 (d, J_{C-F} = 18.2 Hz, **C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 117.5 (**C**$_{quat}$), 117.0 (d, J_{C-F} = 17.9 Hz, **C**$_{arom}$), 112.1 (**C**$_{arom}$).

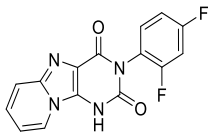
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -140.24,-138.54.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_9F_2N_4O_2$: 315.0688, found: 315.0687.

λ_{abs} : 261 nm $\lambda_{ém}$: 49 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.27 (DCM/MeOH 9:1).

3-(2,4-Difluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198f)



Chemical Formula: $C_{15}H_8F_2N_4O_2$
Exact Mass: 314,0615

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow solid (64%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.45 (d, 1H, J = 6.9 Hz, H_6), 7.58-7.36 (m, 3H, H_9, 2 x H_{arom}), 7.28 (t, 1H, J = 6.8 Hz, H_8), 7.20 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H_{arom}), 6.95 (t, 1H, J = 6.9 Hz, H_7).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 162.8 (dd, J = 46.5, 11.7 Hz, **C**=O), 158.5 (**C**$_{quat}$), 159.6-156.3 (dd, J = 251.49, 13.2 Hz, **C**$_{quat}$), 151.7 (**C**=O), 141.7 (**C**$_{quat}$), 136.7 (**C**$_{quat}$), 132.7 (dd, J_{C-F} = 10.3, 2.4 Hz, **C**$_{arom}$), 126.3 (**C**$_{arom}$), 124.1 (**C**$_{arom}$), 121.3 (dd, J_{C-F} = 13.6, 4.0 Hz, **C**$_{quat}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 117.2 (**C**$_{quat}$), 112.3 (**C**$_{arom}$), 111.6 (dd, J_{C-F} = 22.4, 3.6 Hz, **C**$_{arom}$), 104.4 (dd, J_{C-F} = 26.9, 24.6 Hz, **C**$_{arom}$).

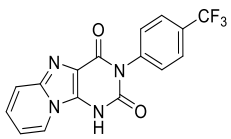
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -110.21, -117.12.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_9F_2N_4O_2$: 315.0687, found: 315.0688.

λ_{abs} : 264 nm $\lambda_{ém}$: 490 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 9:1).

3-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198g)



Chemical Formula: $C_{16}H_9F_3N_4O_2$
Exact Mass: 346,0678

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow solid (58%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.40 (d, 1H, J = 6.9 Hz, H_6), 7.84 (d, 2H, J = 8.2 Hz, 2 x H_{arom}), 7.49-7.39 (m, 3H, H_9, 2 x H_{arom}), 7.23-7.14 (m, 1H, H_8), 6.85 (t, 1H, J = 6.9 Hz, H_7),

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.1 (**C**=O), 154.5 (**C**=O), 143.0 (**C**$_{quat}$), 141.7 (**C**$_{quat}$), 131.0 (**C**$_{arom}$), 127.9 (d, J_{C-F} = 31.6 Hz, **C**$_{quat}$), 126.2 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, **C**$_{arom}$), 126.1 (**C**$_{quat}$), 125.9 (d, J_{C-F} = 3.7 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 124.5 (**C**$_{arom}$), 123.4 (**C**$_{quat}$), 118.6 (2 x **C**$_{arom}$), 117.6 (**C**$_{quat}$), 111.8 (**C**$_{arom}$).

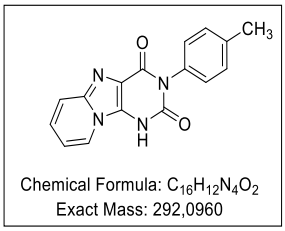
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -60.86.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_9F_3N_4O_2$: 347.0750 found: 347.0751.

λ_{abs} : 264 nm $\lambda_{ém}$: 486 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.49 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(*p*-Tolyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione(198h)



The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (24%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.52 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.55 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_9), 7.33-7.22 (m, 3H, H_8, 2 x H_{arom}), 7.14 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2 x H_{arom}), 6.99 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_7), 2.36 (s, 3H, C-CH_3).

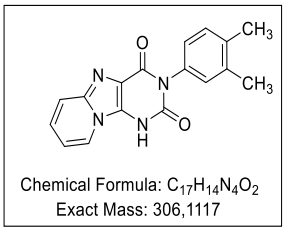
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}N_4O_2$: 293.1030, found: 293.1033.

CAS : 1842362-40-6**.**

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 494 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.3 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(3,4-Dimethylphenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198i)



The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (56%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.46 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_6), 7.54 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.28 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{arom}), 7.21 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_8), 7.00-6.92 (m, 3H, H_7, 2 x H_{arom}), 2.24 (s, 3H, C-CH_3), 2.24 (s, 3H, C-CH_3).

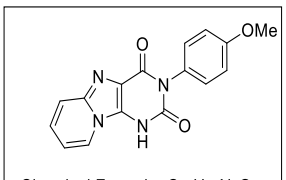
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.0 (C=O), 151.7 (C=O), 141.5 (C_{quat}), 136.5 (C_{quat}), 135.6 (C_{quat}), 134.4 (C_{quat}), 129.9 (C_{arom}), 129.6 (C_{arom}), 129.3 (C_{arom}), 126.1 (C_{arom}), 124.0 (C_{arom}). 118.3 (C_{arom}), 117.8 (C_{quat}), 112.5 (C_{arom}), 19.2 (C-CH_3), 19.0 (C-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd. for $C_{17}H_{15}N_4O_2$: 307.1189, found: 307.1190..

λ_{abs} : 263 nm λ_{em} : 496 nm λ_{exc} : 266 nm

Rf : 0.68 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(*p*-Methoxyphenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198j)



Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_4O_3$
Exact Mass: 308,0909

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a beige solid (34%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.53 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H_6), 7.55 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.33-7.25 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_8), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2 x H_{arom}), 7.06-6.96 (m, 3H, H_7, 2 x H_{arom}), 3.81 (s, 3H, O-CH_3).

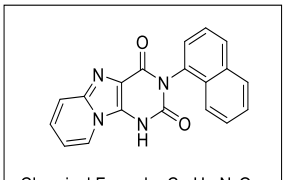
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}N_4O_3$: 309.0982, found: 309.0882.

CAS : 1842362-42-8.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 494 nm λ_{exc} : 267 nm.

Rf : 0.47 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(Naphthalen-1-yl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (198k)



Chemical Formula: $C_{19}H_{12}N_4O_2$
Exact Mass: 328,0960

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (56%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.52 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H_6), 8.01 (dd, 2H, *J* = 10.7, 8.6 Hz 2 x H_{arom}) 7.62 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, 2 x H_{arom}), 7.54 (t, 2H, *J* = 8.6 Hz, H_9, H_{arom}), 7.45 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x H_{arom}), 7.30-7.23 (m, 1H, H_8), 6.94 (t, 1H, *J* = 6.73 Hz, H_7).

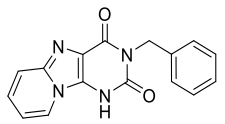
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.7 (**C**=O), 153.3 (**C**=O), 141.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 138.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 134.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 133.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 130.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 128.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 127.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 127.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.4 ($\mathbf{C}_{arom}$). 126.04 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.7 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 122.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 117.5($\mathbf{C}_{quat}$), 111.9 ($\mathbf{C}_{arom}$).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{13}N_4O_2$: 329.1033, found: 329.1034.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 493 nm λ_{exc} : 265 nm.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(Benzyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (199a)



Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_4O_2$
Exact Mass: 292,0960

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (71%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.29 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.3, 5.5 Hz, H_{arom}), 7.41 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.35 (dd, 2H, *J* = 8.3, 5.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.24 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H_{arom}), 7.16 (dd, 1H, *J* = 9.3, 6.75 Hz, H_8), 7.08 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x H_{arom}), 6.81 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, H_7), 5.09 (s, 2H, N-CH_2).

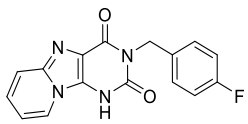
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}N_4O_2$: 292.1033, found: 293.1033.

λ_{abs} : 265 nm $\lambda_{ém}$: 501 nm λ_{exc} : 265 nm.

CAS : 1842362-47-3.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(*p*-Fluorobenzyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (199b)



Chemical Formula: $C_{16}H_{11}FN_4O_2$
Exact Mass: 310,0866

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (52%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.30 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.48 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, 2 x H_{arom}), 7.44-7.34 (m, 1H, H_9), 7.26 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, 2 x H_{arom}), 7.21-7.12 (m, 1H, H_8), 6.81 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_7), 5.12 (s, 2H, N-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) δ 159.7 (**C**=O), 154.6 (**C**=O), 141.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 139.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 134.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.5 ($\mathbf{C}_{quat}$),128.6 (d, J_{C-F} = 27.0 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 128.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 127.6 (d, J_{C-F} = 62.6 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 126.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 123.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 117.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 111.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 42.7 (d, J_{C-F} = 91.0 Hz, N-$\mathbf{CH_2}$).

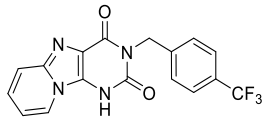
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -116.00.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}FN_4O_2$: 311.0938, found: 311.0939.

λ_{abs} : 259 nm $\lambda_{ém}$: 501 nm λ_{exc} : 268 nm.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(*p*-(Trifluoromethyl)benzyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (**199c**)



Chemical Formula: $C_{17}H_{11}F_3N_4O_2$
Exact Mass: 360,0834

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white/yellow solid (46%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.54 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_6), 7.66 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x H_{arom}), 7.53 (dd, 3H, *J* = 14.5, 8.8 Hz, H_9, 2 x H_{arom}), 7.31-7.26 (m, 1H, H_8), 6.98 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_7), 5.20 (s, 2H, N-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 158.6 (**C**=O), 150.9 (**C**=O), 142.7 (**C**$_{quat}$), 141.7 (**C**$_{quat}$), 127.9 (2 x **C**$_{arom}$), 127.6 (**C**$_{quat}$), 126.4 (**C**$_{quat}$), 126.4 (**C**$_{arom}$), 125.1 (t, J_{C-F} = 3.7 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 124.2 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 117.4 (m, **C**$_{quat}$), 113.5 (**C**$_{quat}$), 112.6 (**C**$_{arom}$), 43.1 (N-**CH$_2$**).

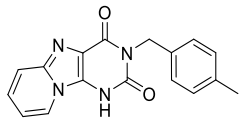
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -60.72.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{12}F_3N_4O_2$: 361.0906, found: 361.0906.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 495 nm λ_{exc} : 265 nm.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(*p*-Methylbenzyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (199d)



Chemical Formula: $C_{17}H_{14}N_4O_2$
Exact Mass: 306,1117

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (44%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.49 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.54 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H_9), 7.28 (dd, 1H, *J* = 9.5, 6.5 Hz, H_8), 7.21 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, 2 x H_{arom}), 7.15-7.04 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 6.97 (dd, 1H, *J* = 7.0, 6.5 Hz, H_7), 5.07 (s, 2H, N-CH_2), 2.25 (s, 3H, C-CH_3).

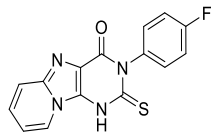
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.7 (**C**=O), 158.7 (**C**$_{quat}$), 154.5 (**C**=O), 141.6 (**C**$_{quat}$), 135.9 (**C**$_{quat}$), 135.0 (**C**$_{quat}$), 128.6 (2 x **C**$_{arom}$), 127.4 (2 x **C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 124.2 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 117.6 (**C**$_{quat}$), 112.5 (**C**$_{arom}$), 43.0 (N-**CH$_2$**), 20.6 (C-**CH$_3$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{15}N_4O_2$: 307.1189, found: 307.1191.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 496 nm λ_{exc} : 265 nm.

Rf : 0.46 (DCM/MeOH, 9:1).

3-(4-Fluorophenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrido[1,2-*e*]purin-4(*1H*)-one (200a)



Chemical Formula: $C_{15}H_9FN_4OS$
Exact Mass: 312,0481

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (74%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.43 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H$_6$), 7.46 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, H$_9$), 7.30-7.23 (m, 1H, H$_8$), 7.35-7.28 (m, 2H, 2 x H$_{arom}$), 7.26-7.18 (m, 2H, 2 x H$_{arom}$), 7.00 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, H$_7$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 175 (**C**=S), 161.9 (**C**=O), 159.5 (d, *J* = 10.9 Hz, **C**$_{quat}$), 142.3 (**C**$_{quat}$), 142.1 (**C**$_{quat}$), 139.0 (**C**$_{quat}$), 131.42 (d, J_{C-F} = 8.6 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 126.8 (**C**$_{arom}$), 124.2 (**C**$_{arom}$), 121.0(**C**$_{quat}$), 118.08 (**C**$_{arom}$), 115.0 (d, J_{C-F} = 22.5 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 111.4 (**C**$_{arom}$).

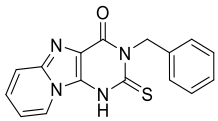
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -116.93.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{10}FN_4OS$: 313.0553, found: 313.0553.

λ_{abs} : 340 nm $\lambda_{ém}$: 492 nm λ_{exc} : 341 nm.

Rf : 0.11 (DCM/MeOH 9:1).

3-Benzyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrido[1,2-*e*]purin-4(*1H*)-one (200b)



Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_4OS$
Exact Mass: 308,0732

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light yellow solid (71%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.69 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H$_6$), 7.58 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H$_9$), 7.41-7.15 (m, 6H, H$_8$, 5 x H$_{arom}$), 7.01 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, H$_7$), 5.79 (s, 2H, N-CH$_2$).

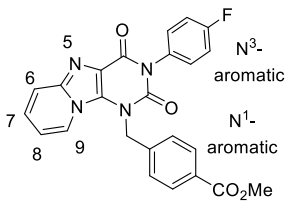
HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}N_4OS$: 309.0804, found: 308.0805.

CAS : 1842362-47-3.

λ_{abs} : 281 nm $\lambda_{ém}$: 376 nm λ_{exc} : 280 nm

Rf: 0.37 (DCM/MeOH, 9:1).

Methyl 4-[[3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-purino[9,8-*a*]pyridin-1-l]methyl]benzoate (207a)



Chemical Formula: $C_{24}H_{17}FN_4O_4$
Exact Mass: 444,1234

Following the general procedure 3, F-phényl purinopyridine (0.15 g, 1 eq., 0.51 mmol), with bromo benzyl methyl ester (0.18 g, 1.5 eq., 0.76 mmol) and K_2CO_3 (0.1 g, 1.5 eq., 0.76 mmol) in DMF (4 ml, 0.12 M), affording after purification the desired product as a white solid (65%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.14 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 7.95 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.61 (d, 3H, *J* = 7.9 Hz, H_9, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.45 (dd, 2H, *J* = 8.6, 5.3 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.35 (t, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.28-7.20 (m, 1H, H_8), 6.82 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.80 (s, 2H, N-CH_2), 3.83 (s, 3H, O-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 165.8 (**C**=O), 157.9 (**C**=O), 151.1 (**C**=O), 142.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 141.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 132.6 (d, J_{C-F} = 3.2 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.9 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 129.7 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$) , 128.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 126.2 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$), 126.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 125.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 124.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 119.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 113.6 ($\mathbf{C}_{arom}$) , 52.16 (O-$\mathbf{CH_2}$), 47.01 (N-$\mathbf{CH_3}$).

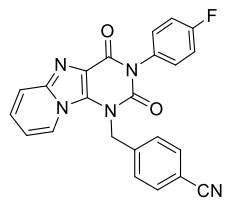
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.03.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{18}FN_4O_4$: 445.1306 found: 445.1305.

λ_{abs} : 259 nm $\lambda_{ém}$: 492 nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

4-[[3-(*p*-Fluorophenyl)-2,4-dioxo-purino[9,8-*a*]pyridin-1-yl]methyl]benzonitrile (207b)



Chemical Formula: $C_{23}H_{14}FN_5O_2$
Exact Mass: 411,1132

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a light yellow solid (30%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.13 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 7.86 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.69 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.62 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.45 (dd, 2H, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.34 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.29-7.21 (m, 1H, H_8), 6.83 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.80 (s, 2H, N-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.3 (**C**=O), 157.9 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 142.5 (**C**$_{quat}$), 142.0 (**C**$_{quat}$), 132.8 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 132.6 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, **C**$_{quat}$), 131.8 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 126.9 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 126.1 (**C**$_{arom}$), 124.7 (**C**$_{arom}$), 120.3 (**C**$_{quat}$), 119.0 (**C**$_{arom}$), 118.5 (**C**$_{quat}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.7 (**C**$_{arom}$), 110.4 (**C**$_{quat}$), 47.0 (N-**CH$_2$**).

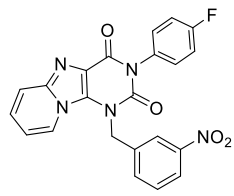
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.00.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{15}FN_5O_2$: 412.1203, found: 412.1204.

λ_{abs} : 259 nm $\lambda_{ém}$: 418 nm λ_{exc} : 259 nm.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-1-[(*m*-nitrophenyl)methyl]purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207c)



Chemical Formula: $C_{22}H_{14}FN_5O_4$
Exact Mass: 431,1030

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow solid (31%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.41 (s, 1H, $H_{arom-N1}$), 8.21 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, $H_{arom-N1}$), 7.90 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, $H_{arom-N1}$), 7.69-7.58 (m, 2H, $H_{arom-N1}$, H_9), 7.45 (dd, 2H, *J* = 8.1, 5.2 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.35 (t, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.28-7.23 (m, 1H, H_8), 6.85 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.83 (s, 2H, N-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.3 (**C**=O), 158.0 (**C**$_{quat}$), 151.2 (**C**=O), 148.2 (**C**$_{quat}$), 142.5 (**C**$_{quat}$), 138.6 (**C**$_{quat}$), 132.6 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, **C**$_{quat}$), 132.3 (**C**$_{arom-N1}$), 131.9 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 130.4 (**C**$_{arom}$), 126.1 (**C**$_{arom}$), 124.8 (**C**$_{arom}$), 122.5 (**C**$_{arom-N1}$), 121.6 (**C**$_{arom-N1}$), 120.3 (**C**$_{quat}$), 119.0 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.8 (**C**$_{arom}$), 46.8 (N-**CH$_2$**).

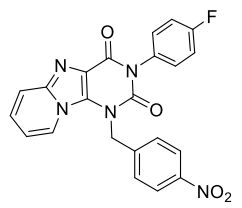
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.00.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{15}FN_5O_2$: 432.1102, found: 432.1104.

λ_{abs} : 262 nm $\lambda_{ém}$: 415 nm λ_{exc} : 263 nm.

Rf : 0.65 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-1-[(*p*-nitrophenyl)methyl]purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207d)



Chemical Formula: $C_{22}H_{14}FN_5O_4$
Exact Mass: 431,1030

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow solid (28%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.22 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x H$_{arom-N1}$), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H$_6$), 7.77 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x H$_{arom-N1}$), 7.63 (d, 1H,*J* = 9.3 Hz, H$_9$), 7.50-7.20 (m, 5H, H$_8$, 4 x H$_{arom-N3}$), 6.84 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H$_7$), 5.85 (s, 2H, N-CH$_2$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.5 (**C**=O), 157.9 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 147.0 (**C**$_{quat}$), 144.0 (**C**$_{quat}$), 142.5 (**C**$_{quat}$), 132.5 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 131.8 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 127.2 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 126.1 (**C**$_{arom}$), 124.7 (**C**$_{arom}$), 123.9 (2x**C**$_{arom-N1}$), 120.3 (**C**$_{quat}$), 119.06 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 23.3 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.7 (**C**$_{arom}$), 46.9 (N-**CH$_2$**).

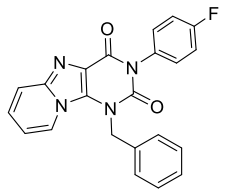
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.96.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{15}FN_5O_4$: 432.1002, found: 432.1100.

λ_{abs} : 269.5 nm $\lambda_{ém}$: 551 nm λ_{exc} : 275 nm.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

1-Benzyl-3-(4-fluorophenyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207e)



Chemical Formula: $C_{22}H_{15}FN_4O_2$
Exact Mass: 386,1179

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a light orange solid (0.071 g, 36%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.23 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.60 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.50-7.27 (m, 9H, 5 x $H_{arom-N1}$, 4 x $H_{arom-N3}$), 7.26-7.20 (m, 1H, H_8), 6.82 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_7), 5.73 (s, 2H, N-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.3 (**C**=O), 157.9 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 142.5 (**C**$_{quat}$), 136.1 (**C**$_{quat}$), 132.6 (d, J_{C-F} = 3.03 Hz, **C**$_{quat}$), 132.08 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.0 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 127.6 (**C**$_{arom}$), 126.0 (**C**$_{arom}$), 125.7 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 125.0 (**C**$_{arom}$), 120.1 (**C**$_{quat}$), 118.9 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.4 (**C**$_{arom}$), 46.9 (N-**CH$_2$**).

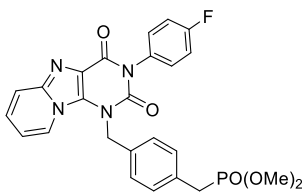
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.07.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{16}FN_4O_4$: 387.1251, found: 387.1249.

λ_{abs} : 261 nm $\lambda_{ém}$: 418 nm λ_{exc} : 267 nm.

Rf : 0.65 (DCM/MeOH 95:5).

1-[[*p*-(Dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methyl]-3-(4-fluorophenyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207f)



Chemical Formula: $C_{25}H_{22}FN_4O_5P$
Exact Mass: 508,1312

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow foam (16%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.22 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 7.60 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.46 (dd, 2H, *J* = 7.8, 5.3 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.41-7.31 (m, 4H, 2 x $H_{arom-N1}$, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.31-7.20 (m, 3H, H_8, 2 x $H_{arom-N1}$), 6.81 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.71 (s, 2H, N-CH_2), 3.55 (s, 3H, O-CH_3), 3.53 (s, 3H, O-CH_3), 3.33 (s, 2H, C-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) δ 160.8 (**C**=O), 158.4 (**C**$_{quat}$), 151.6 (**C**=O), 143.0 (**C**$_{quat}$), 134.9 (d, *J* = 3.7 Hz, **C**$_{quat}$), 133.1 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, **C**$_{quat}$), 132.5 (**C**$_{quat}$), 131.9 (d, J_{C-F} = 9.1 Hz, **C**$_{quat}$), 131.6 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 130.8 (d, J_{C-P} = 6.5 Hz, 2 x **C**$_{arom-N1}$), 126.5 (**C**$_{arom}$), 126.2 (d, J_{C-P} = 3.0 Hz, 2 x **C**$_{arom-N1}$), 125.5 (**C**$_{arom}$), 120.6 (**C**$_{quat}$), 119.4 (**C**$_{arom}$), 116.2 (d, J_{C-F} = 22.9 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.9 (**C**$_{arom}$), 52.8 (O-**CH$_3$**), 52.7 (O-**CH$_3$**), 47.2 (N-**CH$_2$**), 29.52 (d, J^1_{C-P} = 108.5 Hz, P-**CH$_2$**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -114.07.

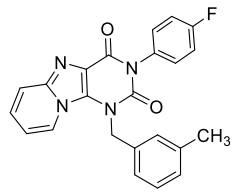
^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 28.89.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{21}FN_4O_5P$: 509.1384, found: 509.1380.

λ_{abs} : 264 nm $\lambda_{ém}$: 415 nm λ_{exc} : 265 nm.

Rf : 0.2 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-1-[(*m*-methylphenyl)methyl]purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207g)



Chemical Formula: $C_{23}H_{17}FN_4O_2$
Exact Mass: 400,1336

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow solid (27%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 8.21 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 7.61 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.46 (dd, 2H, *J* = 8.1, 5.2 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.34 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.23 (dd, 4H, *J* = 16.8, 8.1 Hz, H_8, 3 x $H_{arom-N1}$), 7.10 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, $H_{arom-N1}$), 6.83 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.68 (s, 2H, N-CH_2), 2.28 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 160.8 (**C**=O), 158.4 (**C**$_{quat}$), 151.6 (**C**=O), 143.0 (**C**$_{quat}$), 138.8 (**C**$_{quat}$), 136.6 (**C**$_{quat}$), 133.1 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, **C**$_{quat}$), 132.6 (**C**$_{quat}$), 131.6 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.3 (**C**$_{arom}$), 128.7 (**C**$_{arom}$), 126.6-126.5 (m, 2 x **C**$_{arom-N1}$), 125.5 (**C**$_{arom}$), 123.1 (**C**$_{arom}$), 120.6 (**C**$_{quat}$), 119.4 (**C**$_{arom}$), 116.2 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.9 (**C**$_{arom}$), 47.4 (N-**CH$_2$**), 21.4 (C-**CH$_3$**).

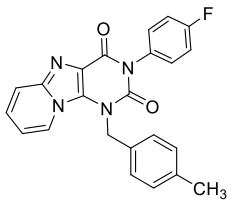
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -114.07.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{18}FN_4O_2$: 401.1408, found: 401.1407.

λ_{abs} : 259 nm $\lambda_{ém}$: 417 nm λ_{exc} : 258 nm.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-1-[(*p*-methylphenyl)methyl]purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (207h)



Chemical Formula: $C_{23}H_{17}FN_4O_2$
Exact Mass: 400,1336

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a light yellow solid (20%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.20 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_6), 7.56 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H_9), 7.41 (dd, 2H, *J* = 9.0, 5.2 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.38-7.25 (m, 4H, 2 x $H_{arom-N1}$, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.24-7.09 (m, 3H, H_8, 2 x $H_{arom-N1}$), 6.79 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_7), 5.64 (s, 2H, N-CH_2), 2.23 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.5 (**C**=O), 157.9 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 142.5 (**C**$_{quat}$), 136.7 (**C**$_{quat}$), 133.0 (**C**$_{quat}$), 132.7 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 132.0 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.5 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 126.0 (**C**$_{arom}$), 125.5 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 125.1 (**C**$_{arom}$), 120.1 (**C**$_{quat}$), 118.9 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 23.3 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.4 (**C**$_{arom}$), 46.7 (N-**CH$_2$**), 20.6 (C-**CH$_3$**).

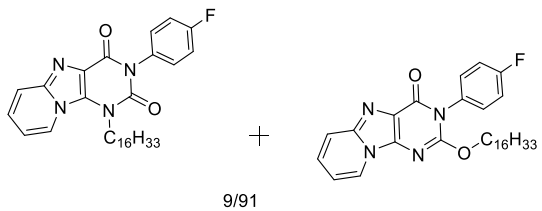
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.08.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{18}FN_4O_2$: 401.1708, found: 401.1405.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 418 nm λ_{exc} : 261 nm.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-1-hexadecyl-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (209a)



Chemical Formula: $C_{31}H_{41}FN_4O_2$
Exact Mass: 520,3214

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow solid (50%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.93 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H_{6-O2}), 8.70 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H_{6-N1}), 8.17-8.04 (m, 1H, H_{9-O2}), 7.95 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, H_{9-N1}), 7.76 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H_{8-O2}), 7.68-7.49 (m, 2H, H_{8-N1}), 7.43-7.29 (dtd, 11H, *J* = 13.7, 7.8, 6.6, 3.4 Hz, H_{7-O2}, H_{7-N1}, 4 x $H_{arom-O2}$, 4 x $H_{arom-N1}$), 4.53-4.34 (m, 3H, N/O-CH_2), 1.23-1.09 (m, $H_{aliph-O2/N1}$), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, -$CH_{3-terminal-vO2/N1}$).

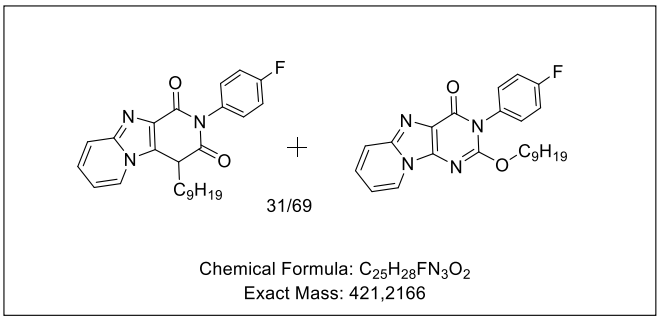
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -75.99 (N_{min}), -76.01 (O_{maj})

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{31}H_{42}FN_4O_2$: 520.3286, found: 520.3283.

λ_{abs} : 259 nm $\lambda_{ém}$: 418 nm λ_{exc} : 257 nm.

Rf : 0.62 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-fluorophenyl)-1-nonyl-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4- (209b)



The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a yellow solid (50%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.61-8.45 (m, 1H, $H_{6\text{-}O2}$, $H_{6\text{-}N1}$), 7.65 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, $H_{9\text{-}O2}$, $H_{9\text{-}N1}$), 7.53-7.25 (m, 5H, $H_{arom\text{-}O2}$, $H_{arom\text{-}N1}$), 7.05 (td, 1H, *J* = 6.9, 4.0 Hz, $H_{7\text{-}O2}$, $H_{7\text{-}N1}$), 4.40 (q, 2H, *J* = 4.9, 3.3 Hz, N/O-$CH_{2\text{-}O2}$, N/O-$CH_{2\text{-}N1}$), 1.76-1.16 (m, 16H, $H_{aliph\text{-}N1/O2}$), 0.87-0.71 (m, 3H, -$CH_{3\text{-}O/N\ terminal}$).

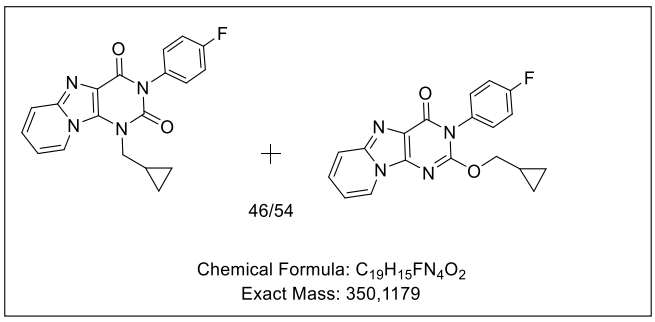
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.72 (N_{min}), -114.17 (O_{maj}).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{27}FN_4O_2$: 422.2189, found: 422.2190.

λ_{abs} : 258 nm $\lambda_{ém}$: 421 nm λ_{exc} : 250 nm.

Rf : 0.45 (DCM/MeOH 95:5).

1-(Cyclopropylmethyl)-3-(*p*-fluorophenyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (209c)



The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a light yellow solid (41%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.73 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, $H_{6\text{-}O2}$), 8.59-8.48 (m, 1H, $H_{6\text{-}N1}$), 7.95 (s, 1H), 7.65 (dd, 2H, *J* = 9.3, 4.4 Hz, $H_{9\text{-}O2}$, $H_{9\text{-}N1}$), 7.53-7.24 (m, 8H, 4 x $H_{arom\text{-}N1}$, 4 x $H_{arom\text{-}O2}$), 7.13-6.98 (m, 2H, $H_{7\text{-}O2}$, $H_{7\text{-}N1}$), 4.41 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, N/O-$CH_{2\text{-}O2}$), 4.31 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, N/O-$CH_{2\text{-}N1}$),

1.29-1.10 (m, 2H, CH_2-CH_{O2}, CH_2-CH_{N1}), 0.50 (ddd, 5H, J = 18.3, 10.1, 4.6 Hz, CH-CH_2-$_{O2}$, CH-CH_{2-N1}), 0.32-0.18 (m, 3H, CH-CH_2-$_{O2}$, CH-CH_{2-N1}).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.8 (**C**=O), 159.6 (**C**$_{quat}$), 157.8 (**C**$_{quat}$), 157.6 (**C**$_{quat}$), 153.3 (**C**=O), 151.1 (**C**$_{quat}$), 143.5 (**C**$_{quat}$), 142.7 (**C**$_{quat}$), 132.7 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 132.0 (**C**$_{quat}$), 131.7 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 131.0 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 130.7 (d, J = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 127.9 (**C**$_{arom}$), 126.0 (**C**$_{arom}$), 125.5 (**C**$_{arom}$), 123.9 (**C**$_{arom}$), 121.5 (**C**$_{quat}$), 119.8 (**C**$_{quat}$), 119.0 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 115.9 (d, J_{C-F} = 23.3 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 115.5 (d, J_{C-F} = 23.3 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 113.8 (**C**$_{arom}$), 112.7 (**C**$_{arom}$), 73.2 (O-**CH$_2$**), 47.3 (N-**CH$_2$**), 10.8 (CH-**CH$_2$**), 9.3 (CH-**CH$_2$**), 3.5 (CH-**CH$_2$**), 2.9 (CH-**CH$_2$**).

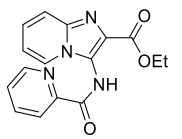
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.65 (N_{min}), -114.14 (O_{maj}).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{16}FN_4O_2$: 351.1251, found: 351.1251.

λ_{abs} : 262 nm $\lambda_{ém}$: 421 nm $\lambda_{ex\ c}$: 287 nm.

Rf : 0.47 (DCM/MeOH 95:5).

Ethyl 3-(picolinamido)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (222)



Chemical Formula: $C_{16}H_{14}N_4O_3$
Exact Mass: 310,1066

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a white solid (48%).

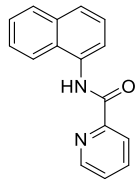
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 10.91 (bs, 1H, NH), 8.81 (dd, 1H, J = 5.7, 1.5 Hz, $H_{arom-\pi}$), 8.14 (dtd, 3H, J = 9.5, 7.9, 1.4 Hz, H_4, 2 x $H_{arom-\pi}$), 7.78-7.71 (m, 1H, $H_{arom-\pi}$), 7.66 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H_9), 7.41 (ddd, 1H, J = 9.2, 6.7, 1.4 Hz, H_6), 7.02 (td, 1H, J = 6.7, 1.2 Hz, H_5), 4.22 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH_2), 1.16 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.7 (**C**=O), 162.2 (**C**=O), 148.7 (**C**$_{arom-\pi}$), 148.6 (**C**$_{quat}$), 141.2 (**C**$_{quat}$), 138.0 (**C**$_{arom}$), 128.0 (**C**$_{quat}$), 127.5 (**C**$_{arom-\pi}$), 126.4 (**C**$_{arom}$), 124.8 (**C**$_{arom-\pi}$), 123.5 (**C**$_{quat}$), 122.58 (**C**$_{arom-\pi}$), 117.9 (**C**$_{arom}$), 113.2 (**C**$_{arom}$), 60.1 (O-**CH$_2$**), 13.7 (CH_2-**CH$_3$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{15}N_4O_3$: 311.1138, found: 311.1139.

Rf : 0.8 (DCM/MeOH 95:5).

***N*-(naphthalen-1-yl)picolinamide (220)**



Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_2O$
Exact Mass: 248,0950

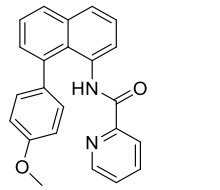
The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a pink solid (90%).

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 9.82 (bs, 1H, NH), 8.80 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, $H_{arom-\pi}$),, 8.40 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, $H_{arom-\pi}$), 7.85 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, $H_{arom-\pi}$),8.16-8.07 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, $H_{arom-\pi}$), 7.81-7.52 (m, 5H, 5 x H_{arom}).

CAS : 75358-95-1.

Rf : 0.83 (DCM/MeOH 95:5).

_N_-(8-(_p_-methoxyphenyl)naphthalen-1-yl)picolinamide (221)



Chemical Formula: $C_{23}H_{18}N_2O_2$
Exact Mass: 354,1368

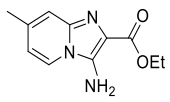
A sealed tube was equipped with a magnetic stir bar and charged with picolinamide compound (0.062 g), KOAc (2 eq.), iodo anisole (4 eq.), $Pd(OAc)_2$ (15 mol %), and 1,4-dioxane (2.5 mL). The resulting mixture was heated at 130 °C for 24 hours. Upon completion, DCM was added to the reaction system, and the resulting mixture was filtered through a pad of celite. The filtrate was concentrate under reduced pressure. Pure compound was obtained after purification on silica gel column chromatography with EP/AcOEt (1:1) as eluent with 70 % yield as orange solid.

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 9.83 (bs, 1H, NH), 8.38 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H_{arom}), 8.28 (d, 1H, *J* = 4.7 Hz, H_{arom}), 8.08-7.82 (m, 4H, 4xH_{arom}), 7.64-7.46 (m, 3H, 3 x H_{arom}), 7.37-7.26 (m, 3H, 3 x H_{arom}), 6.83 (d, 2H, *J* =8.8 Hz, 2 x H_{arom}).

CAS : 1423074-15-0.

Rf : 0.7 (DCM/MeOH 95:5).

Ethyl 3-amino-7-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (228a)



Chemical Formula: $C_{11}H_{13}N_3O_2$
Exact Mass: 219,1008

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as an orange solid (45%).

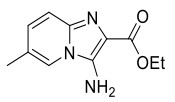
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 7.98 (s, 1H, H_4), 7.24 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_7), 6.93 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_6), 6.35 (bs, 2H, NH_2), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.0, Hz, O-CH_2), 2.22 (s, 3H, C-CH_3), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.0, Hz CH_2-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{14}N_3O_2$: 220.1080, found: 220.1077.

Rf : 0.35 (AcOEt).

CAS : 82193-30-4.

Ethyl 3-amino-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (228b)



Chemical Formula: $C_{11}H_{13}N_3O_2$
Exact Mass: 219,1008

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as an orange solid (34%).

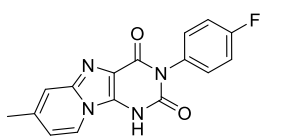
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 7.62 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H_4), 6.62 (s, 1H, H_7), 6.19 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H_5), 5.82 (bs, 2H, NH_2), 3.80 (q, 2H, *J* = 7.0, Hz, O-CH_2),1.82 (s, 3H, C-CH_3), 0.85 (t, 3H, *J* = 7.0, Hz CH_2-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{14}N_3O_2$: 220.1080, found: 220.1077.

Rf : 0.35 (AcOEt).

CAS : 1498691-03-4.

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-methylpyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (229a)



Chemical Formula: $C_{16}H_{11}FN_4O_2$
Exact Mass: 310,0866

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow solid (66%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.17 (s, 1H, H_6), 7.41 (d, 1H, *J* = 9.4, Hz, H_9), 7.26 (d, 4H, *J* = 6.5, Hz, 4 x H_{arom}), 7.11 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_8), 2.28 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.8 (**C**=O), 159.2 (**C**$_{quat}$), 152.8 (**C**$_{quat}$), 152.9 (**C**=O), 141.8 (**C**$_{quat}$), 136.5 (**C**$_{quat}$), 133.7 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 18.6 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 123.2 (**C**$_{arom}$), 117.3 (**C**$_{quat}$), 115.8 (**C**$_{arom}$), 115.6 (**C**$_{arom}$), 114.7 (d, J_{C-F} = 29.4 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 21.0 (C-**CH$_3$**).

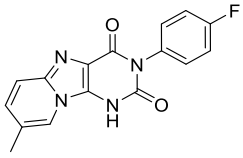
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.61.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}FN_4O_2$: 311.0937, found: 311.0938.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 497 nm λ_{exc} : 265 nm.

Rf : 0.28 (DCM/MeOH 9:1).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-methylpyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (229b)



Chemical Formula: $C_{16}H_{11}FN_4O_2$
Exact Mass: 310,0866

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow solid (69%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.31 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_6), 7.31-7.24 (m, 5H, H_9, 4 x H_{arom}), 6.81 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_7), 2.35 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.4 (**C**=O), 159.3 (d, *J* = 121.2 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 151.4 (**C**=O), 140.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 133.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 133.0 (d, *J* = 3.0 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 121.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 120.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 117.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 117.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 115.5 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 17.8 (C-$\mathbf{CH_3}$).

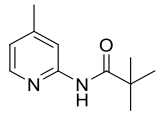
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.29.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}FN_4O_2$: 311.0938, found: 311.0938.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 465 nm λ_{exc} : 269 nm.

Rf : 0.28 (DCM/MeOH 9:1).

***N*-(*p*-methylpyridin-2-yl)pivalamide (231)**



Chemical Formula: $C_{11}H_{16}N_2O$
Exact Mass: 192,1263

The title compound was prepared according to the general procedure 5, affording after purification the desired product as a white solid (56%).

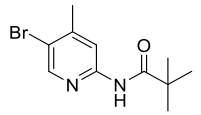
^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.47 (bs, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, H_6), 8.05 (s, 1H, H_3), 6.90 (ddd, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_5), 2.34 (s, 3H, CH_3), 1.82 (s, 9H, 9 x H_{Boc}).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{17}N_2O$: 193.1335, found: 193.1331.

CAS : 86847-77-0.

Rf : 0.75 (EP/AcOEt 1:1).

N-(5-bromo-4-methylpyridin-2-yl)pivalamide (233)



Chemical Formula: $C_{11}H_{15}BrN_2O$
Exact Mass: 270,0368

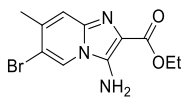
In a dry microwave flask under inert atmosphere were placed, pivalate compound (0.25 g) in dimethylcarbonate (0.4M). N-bromo succinimide (1.8 eq.) and AIBN (0.34 eq.) were successively added. The reaction mixture was heated at 100 °C under microwave irradiation for 13 min. The solvent was evaporated under reduced pressure. Pure compound was obtained after purification on silica gel column chromatography with EP/AcOEt (1:1) as eluent with 35% yield as an orange solid.

^{1}H NMR (250 MHz, Acetone-*d*$_6$) δ 8.67 (bs, 1H, NH), 8.29 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, H_6), 8.19 (s, 1H, H_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.34 (s, 9H, 9 x H_{Boc}).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{16}BrN_2O$: 272.0440, found: 272.0438.

CAS : 1374575-31-1.

Ethyl 3-amino-6-bromo-7-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (234)



Chemical Formula: $C_{11}H_{12}BrN_3O_2$
Exact Mass: 297,0113

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as yellow solid (36%).

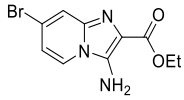
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.60 (s, 1H, H_4), 7.31 (s, 1H, H_7), 6.28 (bs, 2H, NH_2), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.0, Hz, O-CH_2), 2.32 (s, 3H, C-CH_3), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 164.1 (**C**=O), 137.8 (**C**$_{quat}$), 136.5 (**C**$_{quat}$), 132.8 (**C**$_{quat}$), 123.1 (**C**$_{arom}$), 116.8 (**C**$_{arom}$), 112.7 (**C**$_{quat}$), 109.9 (**C**$_{quat}$), 59.2 (O-**CH$_2$**), 21.9 (C-**CH$_3$**), 14.4 (CH_2-**CH$_3$**).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{13}BrN_3O_2$: 298.0185, found: 298.0182.

Rf : 0.5 (AcOEt).

Ethyl 3-amino-7-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (237a)



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}BrN_3O_2$
Exact Mass: 282,9956

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as a yellow solid (47%).

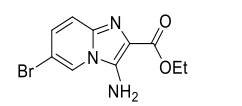
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.16 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_4), 7.86-7.71 (m, 2H, H_7), 6.96 (dd, 1H, *J* = 7.4, 2.1 Hz, H_6), 6.47 (bs, 2H, NH_2), 4.27 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, O-CH_2), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH_2-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}BrN_3O_2$: 284.0029, found: 284.0027.

CAS : 1536009-01-4.

Rf : 0.58 (AcOEt).

Ethyl 3-amino-6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (237b)



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}BrN_3O_2$
Exact Mass: 282,9956

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as a yellow solid (44%).

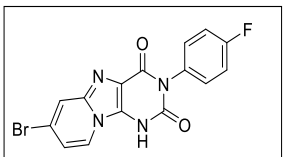
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.55 (s, 1H, *J* = 1.8, 0.9 Hz, H_7), 7.32 (dd, 1H, *J* = 9.7, 0.9 Hz, H_4), 7.13 (dd, 1H, *J* = 9.7, 1.8 Hz, H_5), 6.47 (bs, 2H, NH_2), 4.27 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, O-CH_2), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH_2-CH_3).

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}BrN_3O_2$: 284.0027, found: 284.0029.

CAS : 82193-31-5.

Rf : 0.58 (AcOEt).

7-Bromo-3-(*p*-fluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (238a)



Chemical Formula: $C_{15}H_8BrFN_4O_2$
Exact Mass: 373,9815

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow/orange solid (46%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.36 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_9), 7.85-7.77 (m, 1H, H_6), 7.34-7.20 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.05 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.9 Hz, H_8).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.0 (**C**=O), 159.4 (d, *J* = 17.2 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 153.7 (**C**=O), 141.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 139.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 134.0 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 125.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 117.8 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 115.2 ($\mathbf{C}_{arom}$).

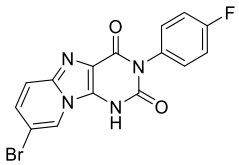
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.56.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_9BrFN_4O_2$ 374.9887, found: 374.9887.

λ_{abs} : 267 nm $\lambda_{ém}$: 492 nm λ_{exc} : 269 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 9:1).

8-Bromo-3-(*p*-fluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (238b)



Chemical Formula: $C_{15}H_8BrFN_4O_2$
Exact Mass: 373,9815

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a yellow/green light solid (51%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.74 (s, 1H, H_9), 7.49 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_6), 7.32 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_7), 7.30-7.21 (m, 4H, 4 x H_{arom}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.8 (**C**=O), 159.7 (d, *J* = 70.7 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 153.5 (**C**=O), 140.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 138.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 134.1 (d, J_{C-F} = 2.0 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.7 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 129.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 124.6 ($\mathbf{C}_{arom}$), 119.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.9 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 106.3 ($\mathbf{C}_{quat}$).

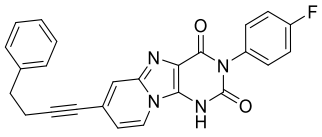
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.29.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_9BrFNaN_4O_2$ 396.9706, found: 396.9693.

λ_{abs} : 262 nm $\lambda_{ém}$: 496 nm λ_{exc} : 267 nm.

Rf : 0.30 (DCM/MeOH 9:1).

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-(4-phenylbut-1-ynyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (240a)



Chemical Formula: $C_{25}H_{17}FN_4O_2$
Exact Mass: 424,1336

Following the general procedure 6, from *N*^{1}-crotyl-6-brromo quinazolindione (0.05 g, 1 eq., 0.13 mmol), with CuI (0.005 g, 0.2 eq., 0.026 mmol), Et_3N (0.0534 ml, 3 eq., 0.39 mmol), C7 alkyn chain (0.072 g, 3 eq., 0.39 mmol) and $Pd(P\Phi_3)_4$ (0.015 g, 0.1 eq., 0.013 mmol) in DMF (1.7 ml, 0.082 M). The title compound was obtained after purification as an orange/yellow solid (70%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.35 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H_9), 7.45 (s, 1H, H_6), 7.33 (d, 4H, *J* = 4.2 Hz, 4 x H_{arom}), 7.29-7.22 (m, 5H, 4 x $H_{arom-N3}$, H_{arom}), 6.77 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.8 Hz, H_8), 2.88 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, C-CH_2), 2.76 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.3 (**C**=O), 159.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 159.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 153.2 (**C**=O), 140.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 140.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 134.0-133.6 (m, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 128.5 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 128.2 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 126.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 123.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 119.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 118.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2x$\mathbf{C}_{arom-N3}$), 114.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 93.9 (CH_2-**C**), 80.0 (C≡**C**), 34.0 (**CH_2**-C), 21.0 (C-**CH_2**).

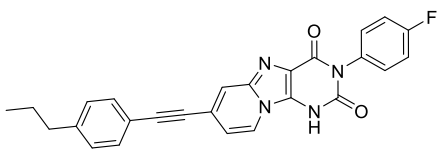
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.39.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{18}FN_4O_2$: 425.1408, found: 425.1409.

Rf : 0.34 (DCM/MeOH 95:5).

λ_{abs} : 266 nm $\lambda_{ém}$: 513 nm λ_{exc} : 278 nm.

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-[2-(4-propylphenyl)ethynyl]-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (241a)



Chemical Formula: $C_{26}H_{19}FN_4O_2$
Exact Mass: 438,1492

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (74%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 9.57 (s, 1H, H_1), 8.39 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_9), 7.71 (s, 1H, H_6), 7.52 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, 2 x H_{arom}), 7.28 (dd, 6H, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 4 x $H_{arom-N3}$, 2 x H_{arom}), 6.99 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_8), 2.60 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, C-CH_2), 1.61 (h, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH_2-CH_2), 0.90 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.3 (**C**=O), 159.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 159.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 154.3 (**C**=O), 143.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 140.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 133.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.4 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 128.8 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 123.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.9 ($\mathbf{C}_{arom}$), 119.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 118.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.3 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 113.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 92.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 90.1 (CH_2-**C**), 87.6 (C≡**C**), 37.0 (C-**CH_2**), 23.7 (CH_2-**CH_2**), 13.5 (CH_2-**CH_3**).

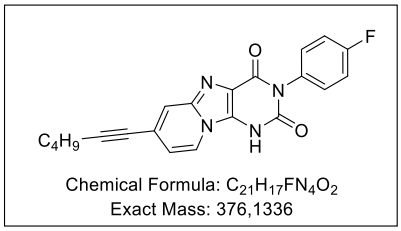
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.43.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{20}FN_4O_2$: 439.1564, found: 439.1563.

λ_{abs} : 300 nm $\lambda_{ém}$: 528 nm λ_{exc} : 307 nm.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-hex-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (243a)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow/orange solid (91%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.95 (bs, 1H, H_1), 8.40 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H_9), 7.61 (s, 1H, H_6), 7.39-7.25 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 6.95 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.6 Hz, H_8), 1.59-1.52 (m, 2H, C-CH_2), 1.50-1.39 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.6 (**C**=O), 159.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 150.4 (**C**=O), 141.1 ($\mathbf{C}_{quat}$), 132.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 123.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 120.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 119.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.6 (d, J_{C-F} = 23.2 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 115.3 ($\mathbf{C}_{arom}$), 113.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 95.0 (CH_2-**C**), 79.1 (C≡**C**), 30.0 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 21.4 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 18.4 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 13.4 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

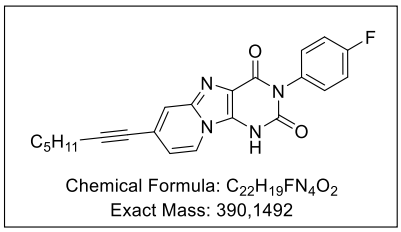
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.41.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{18}FN_4O_2$: 377.1408, found: 377.1406.

λ_{abs} : 263 nm $\lambda_{ém}$: 513nm λ_{exc} : 278 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-hept-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (244a)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (95%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.95 (s, 1H, H_1), 8.43 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_9), 7.58 (s, 1H, H_5), 7.42-7.24 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 6.97 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.6 Hz, H_8), 2.45 (s, 2H, C-CH_2), 1.57 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-CH_2), 1.46-1.28 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.4 (**C**=O), 158.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 150.3 (**C**=O), 141.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 132.3 (d, J_{C-F} = 3.7 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 128.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 123.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.8 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.5 ($\mathbf{C}_{quat}$), 119.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 115.8 (2 x $\mathbf{C}_{arom}$), 115.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 95.1 (CH_2-**C**), 79.1 (C≡**C**), 30.5 (C-$\mathbf{CH_2}$), 27.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 21.6 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 18.7 (CH_2-$\mathbf{CH_2}$), 13.8 (CH_2-$\mathbf{CH_3}$).

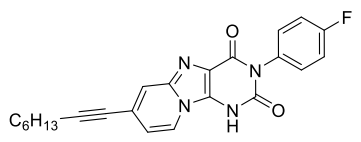
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.36.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{20}FN_4O_2$: 391.1564, found: 391.1563.

λ_{abs} : 267 nm $\lambda_{ém}$: 517 nm λ_{exc} : 277 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-oct-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (245a)



Chemical Formula: $C_{23}H_{21}FN_4O_2$
Molecular Weight: 404,4454

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (92%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.41 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H_9), 7.61 (s, 1H, H_6), 7.39-7.27 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 6.96 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.5 Hz, H_8), 1.57 (p, 2H, *J* = 7.0 Hz, C-CH_2), 1.43 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-CH_2), 1.30 (dt, 6H, *J* = 7.0, 3.8 Hz, 3 x CH_2), 0.89 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.7 (**C**=O), 158.4 (**C**$_{quat}$), 150.3 (**C**=O), 141.2 (**C**$_{quat}$), 132.4 (**C**$_{quat}$), 132.3 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 123.8 (**C**$_{arom}$), 120.8 (**C**$_{quat}$), 120.5 (**C**$_{arom}$), 118.9 (**C**$_{quat}$), 115.6 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 115.4 (**C**$_{arom}$), 95.1 (CH_2-**C**), 79.1 (C≡**C**), 30.7 (C-**CH$_2$**), 27.9 (CH_2-**CH$_2$**), 27.8 (CH_2-**CH$_2$**), 21.9 (CH_2-**CH$_2$**), 18.7 (CH_2-**CH$_2$**), 13.9 (CH_2-**CH$_3$**).

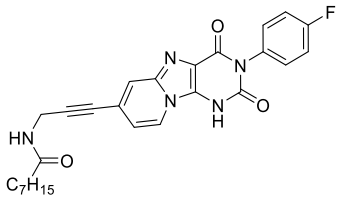
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.38.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{22}FN_4O_2$: 405.1721, found: 405.1718.

λ_{abs} : 268 nm $\lambda_{ém}$: 512 nm λ_{exc} : 276 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

***N*-[3-[3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridin-7-yl]prop-2-ynyl]octanamide (246a)**



Chemical Formula: $C_{26}H_{26}FN_5O_3$
Molecular Weight: 475,5244

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product (0.059 g, 95%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.43-8.31 (m, 1H, H_9), 7.52 (s, 1H, H_6), 7.26 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz, 4 x H_{arom}), 6.82 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_8), 4.23 (d, 2H, *J* = 11.3 Hz, C-CH_2), 2.10 (q, 2H, *J* = 12.5, 9.9 Hz,

CO-CH_2), 1.65 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH_2-CH_2),, 1.24 (q, 8H, *J* = 9.6, 7.1 Hz, 4 x CH_2), 0.85 (tq, 3H, *J* = 11.1, 6.5, 5.6 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 167.0 (**C**=O), 162.7 (**C**=O), 159.3 (**C**$_{quat}$), 152.03 (**C**=O), 136.1 (**C**$_{quat}$), 134.0 (**C**$_{quat}$), 133.8 (d, J_{C-F} = 3.2 Hz, **C**$_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 11.6 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 124.1 (**C**$_{arom}$), 120.9 (**C**$_{arom}$), 119.0 (**C**$_{quat}$), 118.8 (**C**$_{quat}$), 115.2 (2 x **C**$_{arom}$), 113.7 (**C**$_{arom}$), 90.9 (CH_2-**C**), 79.6 (C≡**C**), 45.3 (N-**CH_2**), 34.6 (CO-**CH_2**), 31.0 (CH_2-**CH_2**), 28.5 (CH_2-**CH_2**), 28.2 (CH_2-**CH_2**), 24.9 (CH_2-**CH_2**), 22.1 (CH_2-**CH_2**), 13.7 (CH_2-**CH_3**).

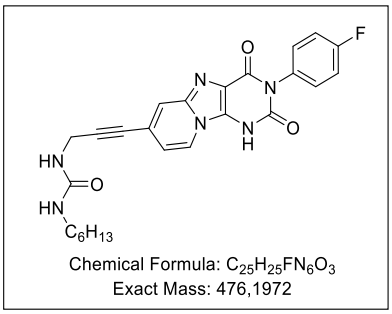
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.58.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{27}FN_5O_2$: 476.2092, found: 476.2089.

λ_{abs} : 271 nm $\lambda_{ém}$: 510 nm λ_{exc} : 279 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

1-[3-[3-(*p*-Fluorophenyl)-2,4-dioxo-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridin-7-yl]prop-2-ynyl]-3-hexyl-urea (247a)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (92%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.39 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H_9), 7.52 (s, 1H, H_6), 7.41-7.11 (m, 4H, 4 x $H_{arom-N3}$), 6.73 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, H_8), 4.09 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, NH-CH_2), 1.52-0.99 (m, 10H, 5 x CH_2), 0.85 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.3 (**C**=O), 158.0 (**C**=O), 151.4 (**C**=O), 140.7 (**C**$_{quat}$), 136.9 (**C**$_{quat}$), 135.3 (**C**$_{quat}$), 131.6 (d, J_{C-F} = 9.9 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 124.3 (**C**$_{arom}$), 121.2 (**C**$_{arom}$), 118.9 (**C**$_{quat}$), 115.7 (**C**$_{quat}$), 115.2 (2 x **C**$_{arom}$), 113.3 (**C**$_{arom}$), 96.3 (**C**$_{quat}$), 92.1 (CH_2-**C**), 80.6 (C≡**C**), 39.7 (N-**CH_2**), 31.4 (CH_2-**CH_2**), 30.4 (CH_2-**CH_2**), 30.0 (CH_2-**CH_2**), 26.4 (CH_2-**CH_2**), 22.4 (CH_2-**CH_2**), 14.2 (CH_2-**CH_3**).

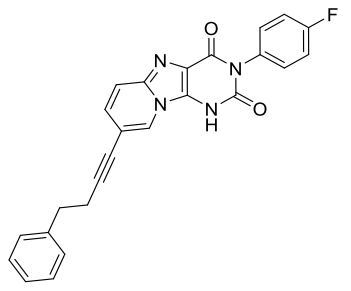
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -116.27.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{26}FN_6O_3$: 477.2044, found: 477.2042.

λ_{abs} : 279 nm $\lambda_{ém}$: 515 nm λ_{exc} : 278 nm.

Rf : 0.30 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-(4-phenylbut-1-ynyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (240b) (242b)



Chemical Formula: $C_{25}H_{17}FN_4O_2$
Exact Mass: 424,1336

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (80%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.44 (s, 1H, H_9), 7.45 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H_6), 7.33 (d, 4H, *J* = 4.3 Hz, 4 x H_{arom}), 7.25 (h, 5H, *J* = 4.0 Hz, 4 x $H_{arom-N3}$, H_{arom}), 7.07 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H_7), 2.89 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, C-CH_2), 2.75 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.4 (**C**=O), 159.1 (**C**$_{quat}$), 153.7 (**C**=O), 151.2 (**C**$_{quat}$), 140.3 (**C**$_{quat}$), 139.8 (**C**$_{quat}$), 133.9 (**C**$_{quat}$), 131.2 (2 x **C**$_{arom}$), 128.5 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 127.9 (**C**$_{arom}$), 126.3 (**C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 118.0 (**C**$_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.3 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 107.8 (**C**$_{quat}$), 91.7 (CH_2-**C**), 77.4 (C≡**C**), 20.8 (**CH_2**-C), 34.0 (C-**CH_2**).

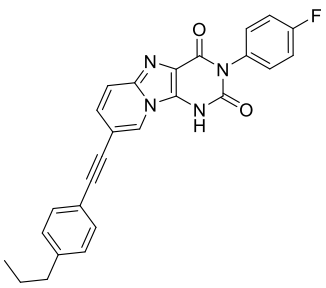
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.57.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{18}FN_4O_2$: 425.1408, found: 425.1406.

λ_{abs} : 272 nm $\lambda_{ém}$: 443 nm λ_{exc} : 286 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-[2-(4-propylphenyl)ethynyl]-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (241b)



Chemical Formula: $C_{26}H_{19}FN_4O_2$
Exact Mass: 438,1492

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a beige solid (67%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.80 (s, 1H, H_9), 7.86-7.72 (m, 1H, H_6), 7.68-7.61 (m, 3H, H_7, 2 x H_{arom}), 7.55-7.48 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.44-7.23 (m, 4H, 4 x $H_{arom-N3}$), 2.61 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, C-CH_2), 1.59 (ddt, 2H, *J* = 12.8, 10.0, 6.7 Hz, CH_2-CH_2), 0.98-0.80 (m, 3H, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.4 (**C**=O), 159.6 (**C**$_{quat}$), 150.0 (**C**=O), 143.6 (**C**$_{quat}$), 140.4 (**C**$_{quat}$), 133.7 (**C**$_{quat}$), 132.2 (**C**$_{quat}$), 131.4 (2 x **C**$_{arom}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 10.3 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.8 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (**C**$_{arom}$), 126.9 (**C**$_{arom}$), 118.7 (**C**$_{arom}$), 118.5 (**C**$_{quat}$), 118.5 (**C**$_{quat}$), 115.5 (d, J_{C-F} = 24.9 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 108.5 (**C**$_{quat}$), 91.2 (CH_2-**C**), 84.7 (C≡**C**), 37.0 (CH_2-**CH_2**), 23.6 (CH_2-**CH_2**), 13.4 (CH_2-**CH_3**).

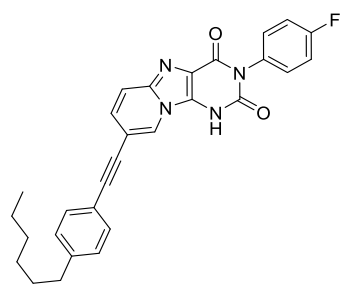
^{19}F NMR (235 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.29.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{20}FN_4O_2$: 439.1564, found: 439.1562.

λ_{abs} : 302 nm $\lambda_{ém}$: 454 nm λ_{exc} : 288 nm.

Rf : 0.35 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-[2-(4-hexylphenyl)ethynyl]-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (242b)



Chemical Formula: $C_{29}H_{25}FN_4O_2$
Exact Mass: 480,1962

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a beige/yellowsolid (25%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.86 (bs, 1H, H_1), 8.77 (s, 1H, H_9), 8.48 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H_6), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H_7), 7.50 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, 2 x H_{arom}), 7.45-7.22 (m, 6H, 4 x $H_{arom-N3}$, 2 x H_{arom}), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, C-CH_2), 1.58 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH_2-CH_2), 1.28 (bs, 6H, 3 x CH_2), 0.91-0.77 (m, 3H, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 161.8 (**C**=O), 159.5 (**C**$_{quat}$), 158.5 (**C**$_{quat}$), 150.4 (**C**=O), 143.9 (**C**$_{quat}$), 140.3 (**C**$_{quat}$), 132.9 (**C**$_{quat}$), 132.4 (d, J_{C-F} = 3.3 Hz, **C**$_{quat}$), 131.3 (2 x **C**$_{arom}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 10.1 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.8 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (**C**$_{arom}$), 126.9 (**C**$_{arom}$), 118.8 (**C**$_{quat}$), 118.5 (**C**$_{arom}$), 115.5 (d, J_{C-F} = 21.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 108.4 (**C**$_{quat}$), 91.3 (CH_2-**C**), 84.6 (C≡**C**), 35.0 (CH_2-**CH_2**), 31.1 (CH_2-**CH_2**), 30.6 (CH_2-**CH_2**), 28.3 (CH_2-**CH_2**), 21.8 (CH_2-**CH_2**), 13.8 (CH_2-**CH_3**).

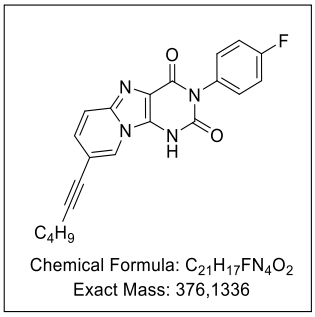
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.42.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{26}FN_4O_2$: 481.2034, found: 481.2033.

λ_{abs} : 302 nm $\lambda_{ém}$: 538 nm λ_{exc} : 315 nm.

Rf : 0.37 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-hex-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (243b)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a beige solid (42%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.80 (s, 1H, H_1), 8.64 (s, 1H, H_9), 7.56 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H_6), 7.38-7.27 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.23 (dd, 1H, *J* = 9.5, 1.6 Hz, H_8), 2.48 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, C-CH_2), 1.61-1.51 (m, 2H, CH_2-CH_2), 1.51-1.41 (m, 2H, CH_2-CH_2), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.3 (**C**=O), 158.4 (**C**$_{quat}$), 150.2 (**C**=O), 140.3 (**C**$_{quat}$), 132.3 (**C**$_{quat}$), 132.2 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 128.7 (**C**$_{arom}$), 126.5 (**C**$_{arom}$), 118.4 (**C**$_{quat}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 115.6 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 109.2 (**C**$_{quat}$), 92.8 (CH_2-**C**), 76.4 (C≡**C**), 30.0 (CH_2-**CH_2**), 21.3 (CH_2-**CH_2**), 18.2(CH_2-**CH_2**), 13.4 (CH_2-**CH_3**).

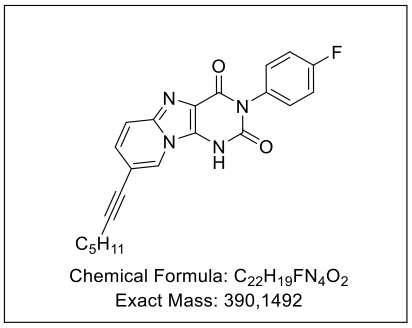
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.37.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{18}FN_4O_2$: 377.1408, found: 377.1404.

λ_{abs} : 273nm $\lambda_{ém}$: 498 nm λ_{exc} : 286 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-hept-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (244b)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (50%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.56 (s, 1H, H_9), 7.93-7.79 (m, 1H, H_6), 7.57-7.41 (m, 1H, H_7), 7.24 (dd, 4H, *J* = 28.7, 8.3 Hz, 4 x H_{arom}), 2.60-2.45 (m, 2H, C-CH_2), 1.58 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH_2-CH_2), 1.52-1.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.88 (dt, 3H, *J* = 13.5, 6.5 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.4 (**C**=O), 158.8 (**C**$_{quat}$), 151.7 (**C**=O), 146.8 (**C**$_{quat}$), 140.0 (**C**$_{quat}$), 133.1 (d, J_{C-F} = 3.2 Hz, **C**$_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 11.7 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 128.4 (**C**$_{arom}$), 126.26 (**C**$_{arom}$),

118.2 (**C**$_{arom}$), 118.1 (**C**$_{quat}$), 115.5 (d, J_{C-F} = 24.3 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 108.3 (**C**$_{quat}$), 92.31 (CH_2-**C**), 76.7 (C≡**C**), 30.4 (CH_2-**CH_2**), 27.6 (CH_2-**CH_2**), 21.5 (CH_2-**CH_2**), 18.6 (CH_2-**CH_2**), 13.8 (CH_2-**CH_3**).

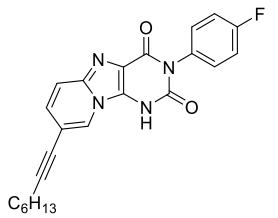
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.97.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{20}FN_4O_2$: 391.1564, found: 391.1563.

λ_{abs} : 271nm $\lambda_{ém}$: 515 nm λ_{exc} : 284 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-oct-1-ynyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (245b)



Chemical Formula: $C_{23}H_{21}FN_4O_2$
Exact Mass: 404,1649

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (74%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 12.79 (s, 1H, H_1), 8.63 (s, 1H, H_9), 7.57 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H_6), 7.41-7.28 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.23 (dd, 1H, *J* = 9.6, 1.6 Hz, C-CH_2), 2.48-2.42 (m, 2H, CH_2-CH_2), 1.62-1.52 (m, 2H, CH_2-CH_2), 1.48-1.38 (m, 2H, CH_2-CH_2), 1.32 (dq, 4H, *J* = 7.1, 3.3 Hz, 2 x CH_2), 0.95-0.79 (m, 3H, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.7 (**C**=O), 160.3 (**C**$_{quat}$), 158.4 (**C**$_{quat}$), 150.2 (**C**=O), 140.3 (**C**$_{quat}$), 132.3 (d, *J* = 4.3 Hz, **C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 9.9 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 128.7 (**C**$_{arom}$), 126.4 (**C**$_{arom}$), 118.5 (**C**$_{quat}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 115.6 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 109.2 (**C**$_{quat}$), 92.9 (CH_2-**C**), 76.4 (C≡**C**), 30.7 (CH_2-**CH_2**), 27.9 (CH_2-**CH_2**), 27.9 (CH_2-**CH_2**), 21.9 (CH_2-**CH_2**), 18.5 (CH_2-**CH_2**), 13.9 (CH_2-**CH_3**).

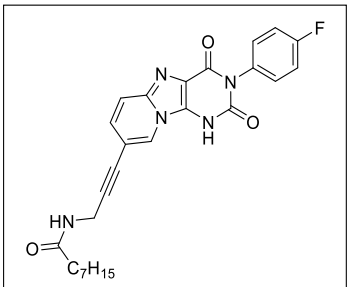
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.34.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{22}FN_4O_2$: 405.1721, found: 405.1720.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

λ_{abs} : 275 nm $\lambda_{ém}$: 503 nm λ_{exc} : 286 nm.

***N*-[3-[3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridin-8-yl]prop-2-ynyl]octanamide (246b)**



Chemical Formula: $C_{26}H_{26}FN_5O_3$
Exact Mass: 475,2020

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (40%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.53 (s, 1H, H_9), 7.43 (d, 1H,*J* = 9.4 Hz, H_6), 7.28-7.17 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.09 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H_7), 4.12 (s, 1H, NH-CH_2), 2.16-2.06 (m, 2H, CO-CH_2), 1.55-1.47 (m, 2H, CH_2-CH_2), 1.24 (bs, 8H, 4 x CH_2), 0.83 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH_2-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.9 (**C**=O), 161.3 (**C**=O), 159.5 (**C**$_{quat}$), 153.2 (**C**=O), 139.6 (**C**$_{quat}$), 134.5 (**C**$_{quat}$), 134.4 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 16.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 127.4 (**C**$_{arom}$), 127.1 (**C**$_{arom}$), 119.8 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{quat}$), 115.2 (d, J_{C-F} = 14.4 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 106.7 (**C**$_{quat}$), 88.5 (CH_2-**C**), 77.9 (C≡**C**), 45.3 (N-**CH$_2$**), 35.0 (C-**CH$_2$**), 31.1 (CH_2-**CH$_2$**), 28.5 (CH_2-**CH$_2$**), 28.2 (CH_2-**CH$_2$**), 25.0 (CH_2-**CH$_2$**), 21.7 (CH_2-**CH$_2$**), 13.8 (CH_2-**CH$_3$**).

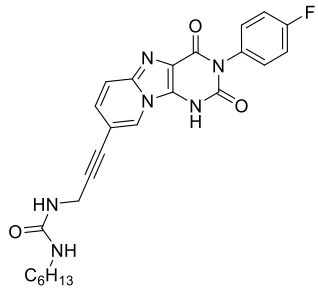
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.90.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{27}FN_5O_2$: 476.2092, found: 476.2091.

λ_{abs} : 273 nm $\lambda_{ém}$: 515 nm λ_{exc} : 284 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

1-[3-[3-(*p*-Fluorophenyl)-2,4-dioxo-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridin-8-yl]prop-2-ynyl]-3-hexyl-urea (247b)



Chemical Formula: $C_{25}H_{25}FN_6O_3$
Exact Mass: 476,1972

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as an orange solid (92%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.49 (s, 1H, H_9), 7.39 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H_6), 7.31-7.16 (m, 4H, 4 x H_{arom}), 7.06 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H_7), 4.07 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, H_{12}), 1.45-1.03 (m, 10H, 5 x CH_2), 0.84 (q, 3H, *J* = 5.7 Hz, H_{21}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.0 (**C**=O), 159.9(**C**$_{quat}$), 157.58 (**C**=O), 150.4 (**C**=O), 139.6 (**C**$_{quat}$), 134.8 (**C**$_{quat}$), 131.3 (**C**$_{quat}$), 131.1 (2 x **C**$_{arom}$), 127.3 (**C**$_{arom}$),126.9 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 117.74 (**C**$_{quat}$), 115.1 (2 x **C**$_{arom}$), 106.4 (**C**$_{quat}$), 89.7 (CH_2-**C**), 77.8 (C≡**C**), 45.4 (N-**CH$_2$**), 31.0 (CH_2-**CH$_2$**), 29.9 (CH_2-**CH$_2$**), 28.5 (CH_2-**CH$_2$**), 26.0 (CH_2-**CH$_2$**), 22.0 (CH_2-**CH$_2$**), 14.2 (CH_2-**CH$_3$**).

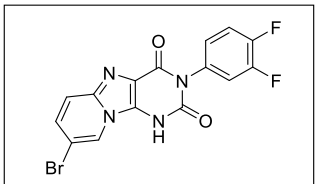
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -116.17.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{26}FN_6O_3$: 477.2045, found: 477.2045.

λ_{abs} : 285 nm $\lambda_{ém}$: 512 nm λ_{exc} : 286 nm.

Rf : 0.30 (DCM/MeOH 95:5).

8-Bromo-3-(*p*-fluorophenyl)pyrido[1,2-*e*]purine-2,4(*1H,3H*)-dione (248)



Chemical Formula: $C_{15}H_7BrF_2N_4O_2$
Exact Mass: 391,9720

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a light solid (24%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.61 (s, 1H, H_9), 7.50 (q, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{arom}), 7.44 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, H_6), 7.36 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{arom}), 7.27 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, H_7), 7.07 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H_{arom}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.9 (**C**=O), 155.0 (**C**=O), 150.7 (dd, *J* = 56.5, 14.1 Hz, **C**$_{quat}$), 148.1 (dd, J_{C-F} = 13.1, 56.5 Hz, **C**$_{quat}$), 141.2 (**C**$_{quat}$), 139.9 (**C**$_{quat}$), 135.5 (d, J_{C-F} = 8.6 Hz, **C**$_{quat}$), 128.8 (**C**$_{arom}$), 127.0-126.9 (m, **C**$_{arom}$), 124.4 (**C**$_{arom}$), 119.9 (**C**$_{arom}$), 119.3 (d, J_{C-F} = 17.9 Hz, **C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{quat}$), 117.3 (d, J_{C-F} = 17.8 Hz, **C**$_{arom}$), 105.8 (**C**$_{quat}$).

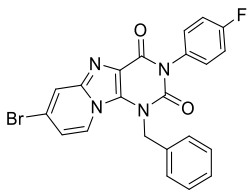
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -140.75, -138.80.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_8BrF2N_4O_2$: 392.9793, found: 392.9791.

λ_{abs} : 272 nm $\lambda_{ém}$: 441 nm λ_{exc} : 288 nm.

Rf : 0.40 (DCM/MeOH 9:1).

1-Benzyl-7-bromo-3-(*p*-fluorophenyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (249a)



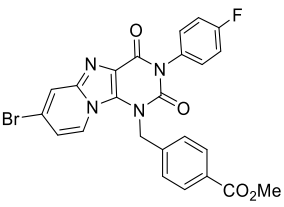
Chemical Formula: $C_{22}H_{14}BrFN_4O_2$
Exact Mass: 464,0284

The title compound was prepared according to the general procedure 8A, affording after short purification fraction send in Sonogashira cross-coupling.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{14}BrN_2O_2$: 465.0356, found: 465.0353.

Rf : 0.60 (DCM/MeOH, 95:5).

Methyl 4-[[7-bromo-3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-purino[9,8-*a*]pyridin-1-yl]methyl]benzoate (250a)



Chemical Formula: $C_{24}H_{16}BrFN_4O_4$
Exact Mass: 522,0339

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a brown solid (39%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.26 (s, 1H, H_6), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.62 (t, 3H, *J* = 8.8 Hz, H_9, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.50-7.43 (m, 2H, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.35 (t, 3H, *J* = 8.0 Hz, H_8, 2 x $H_{arom-N1}$), 5.84 (s, 2H, N-CH_2), 3.84 (s, 3H, O-CH_3).

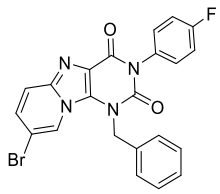
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 166.2 (**C**=O), 162.7 (**C**=O), 160.9 (**C**=O), 158.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 151.6 (**C**=O), 142.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 141.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 133.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 132.4 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.6 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 130.3 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$), 129.5 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.6 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$), 125.0 ($\mathbf{C}_{arom}$), 121.3 ($\mathbf{C}_{quat}$), 120.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.2 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 108.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 52.6 (O-**CH_3**), 47.3 (N-**CH_2**).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.89.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{17}BrFN_4O_4$: 523.0411, found: 523.0408.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

1-Benzyl-8-bromo-3-(*p*-fluorophenyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (249b)



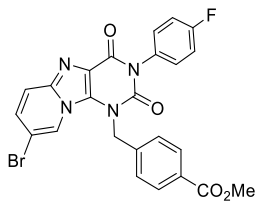
Chemical Formula: $C_{22}H_{14}BrFN_4O_2$
Exact Mass: 464,0284

The title compound was prepared according to the general procedure 8A, affording after short purification as fraction send in Sonogashira cross-coupling.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{14}BrN_2O_2$: 465.0356, found: 465.0354.

Rf : 0.60 (DCM/MeOH, 95:5).

Methyl 4-[[8-bromo-3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-purino[9,8-*a*]pyridin-1-yl]methyl]benzoate (250b)



Chemical Formula: $C_{24}H_{16}BrFN_4O_4$
Exact Mass: 522,0339

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a brown solid (29%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.07 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_6), 7.94 (q, 3H, *J* = 9.5 Hz, H_9, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.60 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.45 (dd, 2H, *J* = 8.6, 5.2 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.34 (t, 2H, *J* = 8.6 Hz, 2 x $H_{arom-N3}$), 6.98 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_7), 5.78 (s, 2H, N-CH_2), 3.83 (s, 3H, O-CH_3).

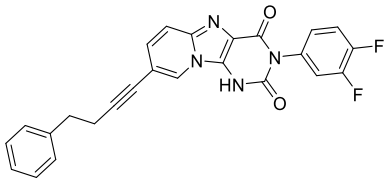
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 166.3 (**C**=O), 160.8 (**C**=O), 158.2 ($\mathbf{C}_{quat}$), 151.5 (**C**=O), 142.9 ($\mathbf{C}_{quat}$), 142.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 132.9 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, $\mathbf{C}_{quat}$), 132.7 ($\mathbf{C}_{quat}$), 131.5 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 130.2 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$), 129.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 126.7 (2 x $\mathbf{C}_{arom-N1}$), 126.1 ($\mathbf{C}_{arom}$), 121.2 ($\mathbf{C}_{arom}$), 120.0 ($\mathbf{C}_{quat}$), 119.6 ($\mathbf{C}_{quat}$), 117.4 ($\mathbf{C}_{arom}$), 116.2 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x $\mathbf{C}_{arom-N3}$), 52.6 (O-$\mathbf{CH_3}$), 47.49(N-$\mathbf{CH_2}$).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.96.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{15}FN_5O_4$: 523.0458, found: 523.0462.

Rf : 0.5 (DCM/MeOH 95:5).

3-(3,4-Difluorophenyl)-7-(4-phenylbut-1-ynyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (251)



Chemical Formula: $C_{25}H_{16}F_2N_4O_2$
Exact Mass: 442,1241

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (36%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.42 (s, 1H, H_9), 7.50 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, $H_{arom-N3}$), 7.45 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, H_6), 7.40-7.36 (m, 1H, $H_{arom-N3}$), 7.35-7.31 (m, 5H, 5 x H_{arom}), 7.24 (h, 1H, *J* = 4.5, 4.0 Hz, $H_{arom-N3}$), 7.07 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, H_7), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, C-CH_2), 2.75 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.4 (**C**=O), 159.2 (**C**$_{quat}$), 153.6 (**C**=O), 147.0 (**C**$_{quat}$), 134.8 (**C**$_{quat}$), 131.4 (d, J_{C-F} = 4.1 Hz, **C**$_{quat}$), 130.4 (d, J_{C-F} = 2.9 Hz, **C**$_{quat}$), 128.5 (2 x **C**$_{arom}$), 128.1 (2 x **C**$_{arom}$), 128.0 (**C**$_{arom}$), 127.14-126.45 (m, **C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 118.8 (d, J_{C-F} = 18.3 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 118.4 (**C**$_{arom}$), 118.0 (**C**$_{quat}$), 116.9 (d, J_{C-F} = 19.4 Hz, **C**$_{arom}$), 107.8 (**C**$_{quat}$), 91.6 (CH_2-**C**), 77.4 (C≡**C**), 34.0 (**CH_2**-C), 20.8 (C-**CH_2**).

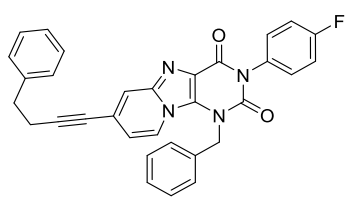
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -138.71, - 140.49.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{17}F_2N_4O_2$: 443.1314, found: 443.1311.

λ_{abs} : 271 nm $\lambda_{ém}$: 517 nm λ_{exc} : 283 nm.

Rf : 0.33 (DCM/MeOH 95:5).

1-Benzyl-3-(*p*-fluorophenyl)-7-(4-phenylbut-1-ynyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (252a)



Chemical Formula: $C_{32}H_{23}FN_4O_2$
Exact Mass: 514,1805

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (90%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.15 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H_9), 7.58 (s, 1H, H_6), 7.50-7.14 (m, 14H, 4 x $H_{arom-N3}$, 5 x $H_{arom-N1}$, 5 x H_{arom}), 6.67 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H_8), 5.69 (s, 2H, N-CH_2), 2.87 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, C-CH_2), 2.73 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.8 (**C**=O), 160.3 (**C**$_{quat}$), 157.7 (**C**$_{quat}$), 151.0 (**C**=O), 140.2 (**C**$_{quat}$), 135.9 (**C**$_{quat}$), 132.5 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.9 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 128.5 (2 x

C$_{arom}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 127.6 (**C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 125.7 (2 x**C**$_{arom-N1}$), 124.9 (**C**$_{arom}$), 121.1 (**C**$_{quat}$), 120.9 (**C**$_{arom}$), 120.2 (**C**$_{quat}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2x**C**$_{arom-N3}$), 115.4 (**C**$_{arom}$), 99.4 (**C**$_{quat}$), 95.01 (CH_2-**C**), 79.1 (C≡**C**), 46.9 (N-**CH$_2$**), 33.8 (**CH$_2$**-C), 20.9 (C-**CH$_2$**).

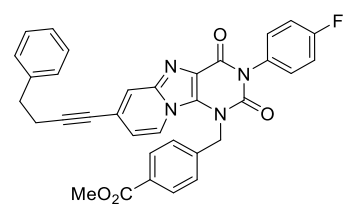
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -113.98.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{24}FN_4O_2$: 515.1875, found: 515.1870.

λ_{abs} : 260 nm $\lambda_{ém}$: 437nm λ_{exc} : 266 nm.

Rf : 0.4 (DCM/MeOH 95:5).

Methyl 4-[[3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-7-(4-phenylbut-1-ynyl)purino[9,8-*a*]pyridin-1-yl]methyl]benzoate (253a)



Chemical Formula: $C_{34}H_{25}FN_4O_4$
Exact Mass: 572,1860

The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (62%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 8.07 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H_9), 7.94 (dd, 2H, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.67-7.54 (m, 3H, H_6, 2 x $H_{arom-N1}$), 7.44 (td, 2H, *J* = 6.2, 5.6, 2.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.44 (td, 2H *J* = 6.2, 5.6, 2.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.37-7.33 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.30 (dd, 4H, *J* = 4.4, 1.3 Hz, 2 x H_{arom}), 7.21 (q, 1H, *J* = 4.3 Hz, H_{arom}), 6.66 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_8), 5.76 (s, 2H, N-CH_2), 3.83 (d, 3H, *J* = 1.4 Hz, O-CH_3), 2.85 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, C-CH_2), 2.74 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ 165.8 (**C**=O), 162.8 (**C**=O), 160.4 (**C**$_{quat}$), 157.7 (**C**$_{quat}$), 151.0 (**C**=O), 141.6 (**C**$_{quat}$), 140.2 (**C**$_{quat}$), 132.5 (**C**$_{quat}$), 132.3 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.7 (2 x **C**$_{arom}$), 128.9 (**C**$_{quat}$), 128.5 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 126.2 (2 x **C**$_{arom}$), 124.7 (**C**$_{arom}$), 121.1 (**C**$_{quat}$), 120.9 (**C**$_{arom}$), 120.2 (**C**$_{quat}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 115.5 (**C**$_{arom}$), 95.0 (CH_2-**C**), 79.1 (C≡**C**), 52.1 (O-**CH$_3$**), 47.0 (N-**CH$_2$**), 33.8 (**CH$_2$**-C), 20.9 (C-**CH$_2$**).

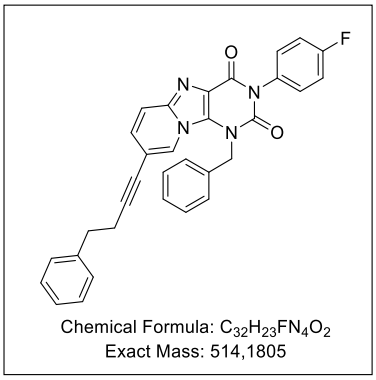
^{19}F NMR (235 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -113.92.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{34}H_{26}FN_4O_4$: 573.1926, found: 573.1925.

λ_{abs} : 273.5 nm $\lambda_{ém}$: 438 nm λ_{exc} : 270 nm.

Rf : 0.39 (DCM/MeOH 95:5).

1-Benzyl-3-(*p*-fluorophenyl)-8-(4-phenylbut-1-ynyl)purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (252b)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow/orange solid (86%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.20 (s, 1H, H_9), 7.57 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_6), 7.51-7.18 (m, 14H, 4 x $H_{arom-N3}$, 5 x $H_{arom-N1}$, 5 x H_{arom}), 7.09 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_7), 5.75 (d, 2H, *J* = 11.8 Hz, N-CH_2), 2.83 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, C-CH_2), 2.69 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.2 (**C**=O), 161.0-160.3 (m, **C**$_{quat}$), 157.7 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 141.0 (**C**$_{quat}$), 140.2 (**C**$_{quat}$), 136.1 (**C**$_{quat}$), 132.2 (**C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 9.0 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.0 (2 x **C**$_{arom-N1}$), 128.4 (2 x **C**$_{arom}$), 128.2 (2 x **C**$_{arom}$), 127.7 (**C**$_{arom}$), 127.3 (**C**$_{arom}$), 126.2 (2 x **C**$_{arom}$), 125.6 (2 x **C**$_{arom}$), 120.7 (**C**$_{quat}$), 118.9 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.9 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 109.6 (**C**$_{quat}$), 92.4 (CH_2-**C**), 76.8 (C≡**C**), 47.0 (N-**CH_2**), 33.9 (**CH_2**-C), 20.7 (C-**CH_2**).

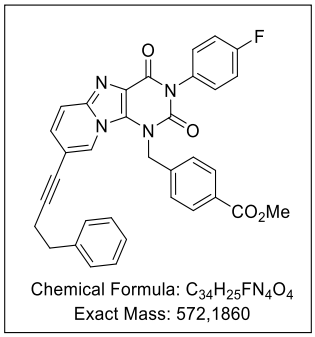
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.98.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{24}FN_4O_2$: 515.1871, found: 515.1873.

λ_{abs} : 274 nm $\lambda_{ém}$: 440 nm λ_{exc} : 271 nm.

Rf : 0.4 (DCM/MeOH 95:5).

Methyl 4-[[3-(*p*-fluorophenyl)-2,4-dioxo-8-(4-phenylbut-1-ynyl)purino[9,8-*a*]pyridin-1-yl]methyl]benzoate (253b)



The title compound was prepared according to the general procedure 6, affording after purification the desired product as a yellow solid (53%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.11 (s, 1H, H_9), 8.01-7.94 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.69-7.52 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 7.45 (ddt, 2H, *J* = 8.3, 5.4, 2.7 Hz, 2 x H_{arom}), 7.41-7.17 (m, 7H, 7 x H_{arom}), 7.10 (dd,

1H, J = 9.6, 1.3 Hz, H_7), 5.82 (s, 2H, N-CH_2), 3.82 (s, 3H, O-CH_3), 2.81 (dd, 2H, J = 7.7, 5.5 Hz, C-CH_2), 2.68 (dd, 2H, J = 7.7, 5.5 Hz, CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 165.8 (**C**=O), 164.0-163.2 (m, **C**=O), 160.2-159.3 (m, **C**$_{quat}$), 157.7 (**C**$_{quat}$), 151.1 (**C**=O), 141.8 (**C**$_{quat}$), 141.1 (**C**$_{quat}$), 140.1 (**C**$_{quat}$), 132.5 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, **C**$_{quat}$), 131.1 (d, J_{C-F} = 9.6 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.8 (2 x **C**$_{arom}$), 129.0 (**C**$_{quat}$), 128.8 (**C**$_{arom}$), 128.6 (**C**$_{arom}$), 128.4 (2 x **C**$_{arom}$), 128.3 (**C**$_{arom}$), 128.1 (2 x **C**$_{arom}$), 127.0 (**C**$_{arom}$), 126.1 (2 x **C**$_{arom}$), 120.7 (**C**$_{quat}$), 118.9 (**C**$_{arom}$), 115.7 (d, J_{C-F} = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 109.7 (**C**$_{quat}$), 92.5 (CH_2-**C**), 76.8 (C≡**C**), 52.1 (O-**CH_2**), 47.0 (N-**CH_2**), 33.9 (**CH_2**-C), 20.7 (C-**CH_2**).

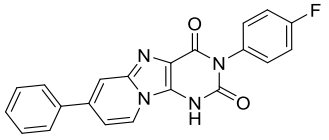
^{19}F NMR (235 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -113.91.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{34}H_{26}FN_4O_4$: 573.1832, found: 573.1928.

λ_{abs} : 269.5 nm $\lambda_{ém}$: 436 nm λ_{exc} : 267 nm.

Rf : 0.39 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-phenyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (254a)



Chemical Formula: $C_{21}H_{13}FN_4O_2$
Exact Mass: 372,1023

Following the general procedure 7A, from *N*^{1}-crotyl-6-brromo quinazolindione (0.1 g, 1 eq., 0.26 mmol), with Cs_2CO_3 (0.17 g, 2 eq., 0.54 mmol), phenyl boronic (0.076 g, 3 eq., 0.39 mmol) and $Pd(P\Phi_3)_4$ (0.031 g, 0.1 eq., 0.027 mmol) in DMF (2.67 ml, 0.1 M). The title compound was obtained after purification as a yellow solid (0.044 g, 45%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.52 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H_9), 7.85 (d, 3H, J = 6.9 Hz, H_6, 2 x H_{aroml}), 7.60-7.34 (m, 4H, H_8, 3 x H_{arom}), 7.30 (d, 4H, J = 7.1 Hz, 4 x $H_{arom-N3}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 163.1 (**C**=O), 159.2 (**C**$_{quat}$), 159.0 (**C**$_{quat}$), 152.1 (**C**=O), 142.0 (**C**$_{quat}$), 137.2 (d, J = 14.2 Hz, **C**$_{quat}$), 135.7 (**C**$_{quat}$), 133.3 (d, J_{C-F} = 9.3 Hz, **C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 9.1 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.9 (2 x **C**$_{arom}$), 128.4 (**C**$_{arom}$), 126.3 (2 x **C**$_{arom}$), 123.9 (**C**$_{arom}$), 118.4 (**C**$_{quat}$), 115.4 (d, J_{C-F} = 24.2 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 114.1 (**C**$_{arom}$), 111.7 (**C**$_{arom}$).

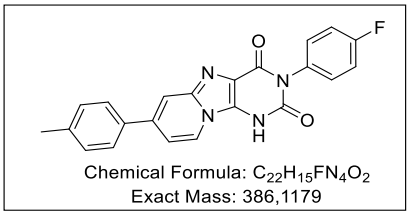
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.15.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{14}FN_4O_2$: 373.1095, found: 373.1099.

λ_{abs} : 264 nm $\lambda_{ém}$: 517 nm λ_{exc} : 285 nm.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-(*p*-tolyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (256a)



The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as an orange solid (44%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.35 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H_9), 7.72 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, 2 x H_{arom}), 7.67 (s, 1H, H_6), 7.33-7.27 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.20 (td, 5H, *J* = 9.2, 8.8, 5.7 Hz, H_8, 4 x $H_{arom-N3}$), 2.36 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.9 (**C**=O), 158.7 (**C**$_{quat}$), 152.3 (**C**=O), 141.5 (**C**$_{quat}$), 138.0 (**C**$_{quat}$), 137.7 (**C**$_{quat}$), 136.3 (**C**$_{quat}$), 135.1 (d, J_{C-F} = 2.5 Hz, **C**$_{quat}$), 134.9 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.6 (2 x **C**$_{arom}$), 126.4 (**C**$_{quat}$), 126.1 (2 x **C**$_{arom}$), 123.8 (**C**$_{arom}$), 115.0 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 113.5 (**C**$_{arom}$), 110.3 (**C**$_{arom}$), 20.7 (C-**CH$_3$**).

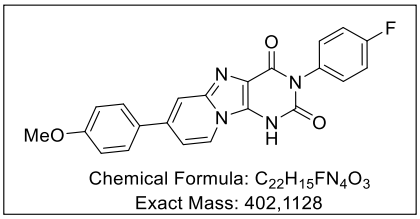
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -116.31.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{16}FN_4O_2$: 387.1251, found: 387.1255..

λ_{abs} : 276 nm $\lambda_{ém}$: 519 nm λ_{exc} : 279 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-7-(*p*-methoxyphenyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (257a)



The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow solid (15%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.46 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H_9), 7.90-7.65 (m, 3H, H_6, 2 x H_{arom}), 7.29 (d, 5H, *J* = 6.9 Hz, H_8, 4 x $H_{arom-N3}$), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 x H_{arom}), 3.83 (s, 3H, O-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 159.6 (**C**=O), 159.1 (**C**$_{quat}$), 152.7 (**C**=O), 142.4 (**C**$_{quat}$), 140.1 (**C**$_{quat}$), 136.0 (**C**$_{quat}$), 133.9 (**C**$_{quat}$), 133.6 (d, J_{C-F} = 4.4 Hz, **C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.19 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.6 (**C**$_{quat}$), 127.7 (2 x **C**$_{arom}$), 123.8 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 114.4 (2 x **C**$_{arom}$), 112.8 (**C**$_{arom}$), 111.59 (**C**$_{arom}$), 55.2 (O-**CH$_3$**).

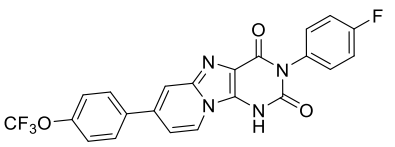
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -115.28.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{16}FN_4O_3$: 403.1200, found: 403.1202.

λ_{abs} : 275 nm $\lambda_{ém}$: 522 nm λ_{exc} : 278 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-fluorophenyl)-7-[*p*-(trifluoromethoxy)phenyl]-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (258a)



Chemical Formula: $C_{22}H_{12}F_4N_4O_3$
Exact Mass: 456,0846

The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as an orange solid (15%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 8.53 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H_9), 7.98 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.88 (s, 1H, H_6), 7.49 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2 x H_{arom}), 7.39 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H_8), 7.30 (d, 4H, J = 7.0 Hz, 4 x $H_{arom-N3}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 163.1 (**C**=O), 159.3 (**C**$_{quat}$), 159.0 (**C**$_{quat}$), 152.2 (**C**=O), 148.4 (**C**$_{quat}$), 141.7 (**C**$_{quat}$), 136.7 (**C**$_{quat}$), 136.1 (**C**$_{quat}$), 135.6 (**C**$_{quat}$), 133.4 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.7 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.5 (2 x **C**$_{arom}$), 124.1 (**C**$_{arom}$), 121.4 (2 x **C**$_{arom}$), 118.6 (**C**$_{quat}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 114.8 (**C**$_{arom}$), 111.6 (**C**$_{arom}$).

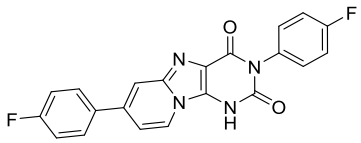
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -56.71 (-OCF_3), -115.18.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{13}F_4N_4O_3$: 457.0918, found: 457.0917.

λ_{abs} : 274 nm $\lambda_{ém}$: 536 nm λ_{exc} : 279 nm.

Rf : 0.3 (DCM/MeOH 95:5).

3,7-*Bis*(*p*-fluorophenyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (259a)



Chemical Formula: $C_{21}H_{12}F_2N_4O_2$
Exact Mass: 390,0928

The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow solid (45%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 8.50 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H_9), 7.97-7.86 (m, 2H, 2 x $H_{arom-N3}$), 7.82 (s, 1H, H_6), 7.44-7.22 (m, 7H, H_8, 2 x $H_{arom-N3}$, 4 x $H_{arom-N3}$).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ 160.3 (**C**=O), 159.1 (**C**$_{quat}$), 159.0 (**C**$_{quat}$), 152.4-152.1 (m, **C**=O, **C**$_{quat}$), 141.8 (**C**$_{quat}$), 136.0 (**C**$_{quat}$), 133.8 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 133.5 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 128.6 (d, J_{C-F} = 8.1 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 124.5 (**C**$_{quat}$), 124.0 (**C**$_{arom}$), 118.4 (**C**$_{quat}$), 115.8 (d, J_{C-F} = 21.4 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 115.3 (d, J_{C-F} = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 114.1 (**C**$_{arom}$), 111.67 (**C**$_{arom}$).

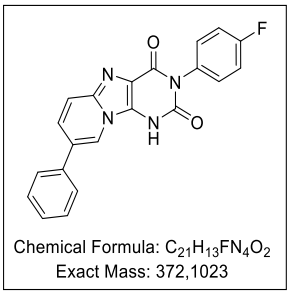
^{19}F NMR (235 MHz, DMSO-d_6) δ -113.66, -115.26.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{13}F_2N_4O_2$: 391.1002, found: 391.1001.

λ_{abs} : 274 nm $\lambda_{ém}$: 539 nm λ_{exc} : 277 nm.

Rf : 0.26 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-phenyl-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (254b)



The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow solid (50%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.86 (s, 1H, H_9), 7.75-7.72 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.67 (qd, 2H, J = 9.7, 1.4 Hz, H_6, H_{arom}), 7.54 (t, 2H, J = 7.7 Hz, 2 x H_{arom}), 7.47-7.41 (m, 1H, H_7), 7.36-7.27 (m, 4H, 4 x $H_{arom-N3}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 162.5 (**C**=O), 160.1 (**C**$_{quat}$), 158.9 (**C**$_{quat}$), 151.5 (**C**=O), 140.8 (**C**$_{quat}$), 136.0 (**C**$_{quat}$), 134.0 (**C**$_{quat}$), 133.1 (d, J_{C-F} = 2.8 Hz, **C**$_{quat}$), 131.3 (d, J_{C-F} = 9.1 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 129.2 (2 x **C**$_{arom}$), 128.1 (**C**$_{arom}$), 126.2 (2 x **C**$_{arom}$), 125.2 (**C**$_{quat}$), 120.9 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 115.4 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$).

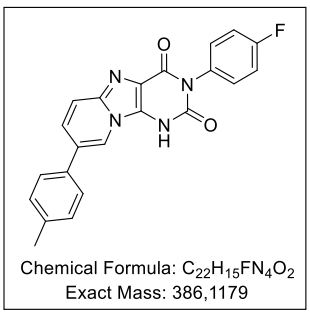
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -114.90.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{14}FN_4O_2$: 373.1095, found: 373.1094.

λ_{abs} : 274 nm $\lambda_{ém}$: 441 nm λ_{exc} : 288 nm.

Rf : 0.31 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-(*p*-tolyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (256b)



The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow/beige solid (31%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.82 (s, 1H, H_9), 7.62 (d, 5H, *J* = 7.9 Hz, $H_{6,}$ 4 x H_{arom}), 7.33 (t, 7H, *J* = 6.7 Hz, H_7, 2 x H_{arom}, 4 x $H_{arom\text{-}N3}$), 2.37 (s, 3H, C-CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 158.9 (**C**=O), 157.0 (**C**$_{quat}$), 151.6 (**C**=O), 150.8 (**C**$_{quat}$), 140.8 (**C**$_{quat}$), 137.5 (**C**$_{quat}$), 135.0 (**C**$_{quat}$), 133.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.7 Hz, **C**$_{quat}$), 133.0 (**C**$_{quat}$), 131.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom\text{-}N3}$), 129.7 (2 x **C**$_{arom}$), 126.2 (**C**$_{arom}$), 126.0 (2 x **C**$_{arom}$), 125.0 (**C**$_{quat}$), 120.4 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 115.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.6 Hz, 2 x **C**$_{arom\text{-}N3}$), 20.6 (C-**CH$_3$**).

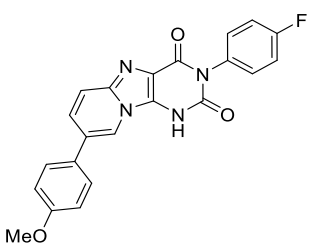
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.93.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{16}FN_4O_2$: 387.1251, found: 387.1253.

λ_{abs} : 244 nm $\lambda_{ém}$: 444 nm λ_{exc} : 274 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-(*p*-methoxyphenyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (257b)



Chemical Formula: $C_{22}H_{15}FN_4O_3$
Exact Mass: 402,1128

The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow/beige solid (31%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.78 (s, 1H, H_9), 7.70-7.57 (m, 4H, H_6, H_7, 2 x H_{arom}), 7.35-7.25 (m, 4H, 4 x $H_{arom\text{-}N3}$), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2 x H_{arom}), 3.82 (s, 3H, O-CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.5 (**C**=O), 160.1 (**C**$_{quat}$), 159.0 (**C**$_{quat}$), 151.6 (**C**=O), 140.7 (**C**$_{quat}$), 140.0 (**C**$_{quat}$), 133.1 (**C**$_{quat}$), 131.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.0 Hz, 2 x **C**$_{arom\text{-}N3}$), 128.2 (**C**$_{quat}$), 127.4 (2 x **C**$_{arom}$), 126.3 (**C**$_{arom}$), 124.9 (**C**$_{quat}$), 119.9 (**C**$_{arom}$), 118.2 (**C**$_{arom}$), 115.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.2 Hz, 2 x **C**$_{arom\text{-}N3}$), 114.6 (2x**C**$_{arom}$), 99.4 (**C**$_{quat}$), 55.2 (O-**CH$_3$**).

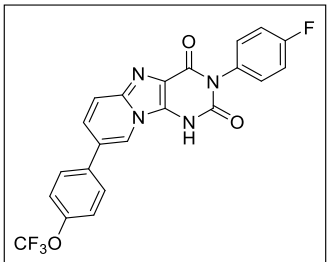
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -114.96.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{16}FN_4O_3$: 403.1200, found: 403.1201.

λ_{abs} : 274nm $\lambda_{ém}$: 438 nm λ_{exc} : 286 nm.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95:5).

3-(*p*-Fluorophenyl)-8-[*p*-(trifluoromethoxy)phenyl]-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (258b)



Chemical Formula: $C_{22}H_{12}F_4N_4O_3$
Exact Mass: 456,0846

The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow/beige solid (43%).

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.72 (s, 1H, H_9), 7.94-7.84 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.52 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H_6), 7.39-7.22 (m, 7H, H_7, 2 x H_{arom}, 4 x $H_{arom\text{-}N3}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 162.7 (C=O), 160.3 (**C**$_{quat}$), 158.4 (**C**$_{quat}$), 150.1 (**C**=O), 147.6 (**C**$_{quat}$), 140.1 (**C**$_{quat}$), 133.3 (**C**$_{quat}$), 132.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.1 Hz, **C**$_{quat}$), 131.9 (**C**$_{quat}$), 131.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 8.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 129.3 (**C**$_{arom}$), 128.2 (**C**$_{arom}$), 124.1 (2 x **C**$_{arom}$), 121.8 (**C**$_{arom}$), 119.5 (2 x **C**$_{arom}$), 118.6 (**C**$_{quat}$), 115.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 106.9 (**C**$_{quat}$).

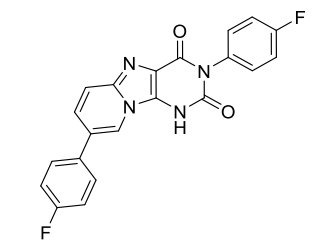
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ -56.72 (-O-CF_3), -114.27.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{13}F_4N_4O_3$: 457.0919, found: 457.0919.

λ_{abs} : 273 nm $\lambda_{ém}$: 510 nm λ_{exc} : 294 nm.

Rf : 0.3 (DCM/MeOH 95:5).

3,8-*Bis*(*p*-Fluorophenyl)-*1H*-purino[9,8-*a*]pyridine-2,4-dione (259b)



Chemical Formula: $C_{21}H_{12}F_2N_4O_2$
Exact Mass: 390,0928

The title compound was prepared according to the general procedure 7A, affording after purification the desired product as a yellow/beige solid (11%).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 8.90 (s, 1H, H_9), 7.82-7.73 (m, 2H, 2 x H_{arom}), 7.69-7.58 (m, 2H, H_6, H_7), 7.38 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x H_{arom}), 7.32-7.22 (m, 4H, 4 x $H_{arom\text{-}N3}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 160.8 (**C**=O), 160.0 (**C**$_{quat}$), 159.1 (**C**$_{quat}$), 151.9 (**C**=O), 140.7 (**C**$_{quat}$), 136.4 (**C**$_{quat}$), 135.9 (**C**$_{quat}$), 132.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.5 Hz, **C**$_{quat}$), 131.5-13.4 (m, **C**$_{quat}$), 131.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ =

8.4 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 128.4 (d, J_{C-F} = 8.3 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$), 126.1 (**C**$_{arom}$), 124.0 (**C**$_{quat}$), 121.0 (**C**$_{arom}$), 118.3 (**C**$_{arom}$), 116.0 (d, J = 21.8 Hz, 2 x **C**$_{arom}$), 115.4 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz, 2 x **C**$_{arom-N3}$).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d$_6$*) δ -114.36, -115.10.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{13}F_2N_4O_2$: 391.1001, found: 391.1006.

λ_{abs} : 274 nm $\lambda_{ém}$: 441 nm λ_{exc} : 273 nm.

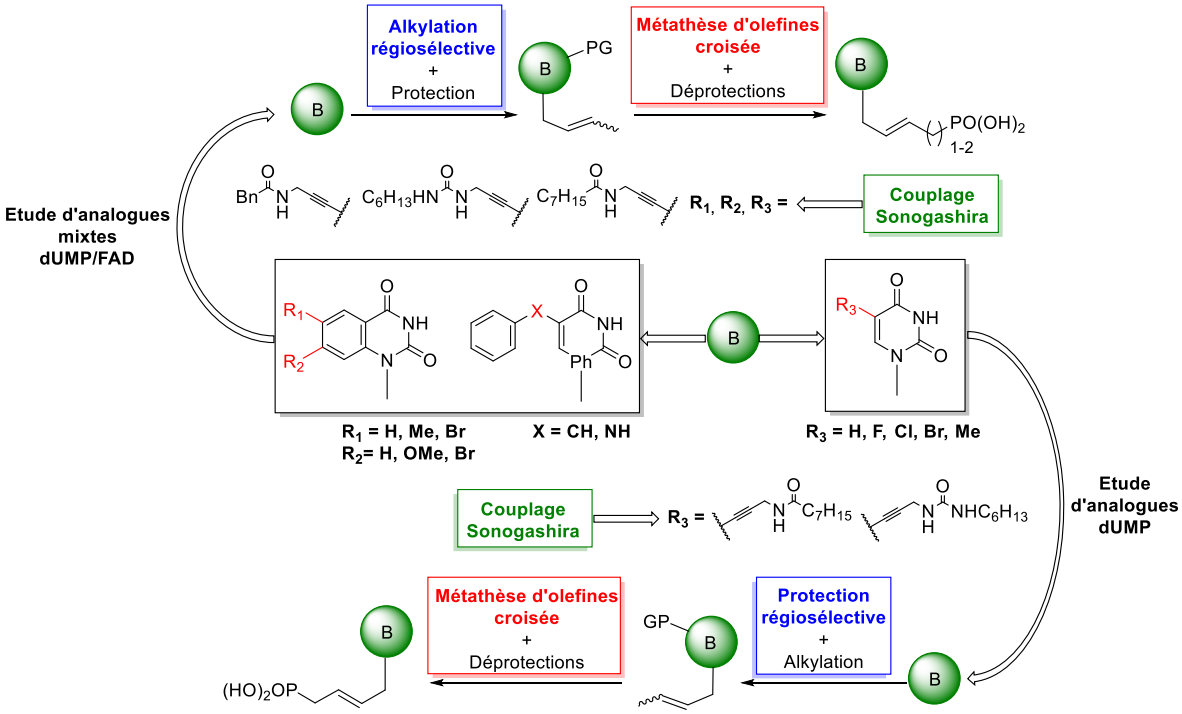
Rf : 0.26 (DCM/MeOH 95:5).

****

CONCLUSION GENERALE

L'apparition de pathogènes multi-résistants à l'échelle mondiale, induit par l'utilisation immodérée d'antibiotiques, à inciter l'ensemble des groupes de recherche à se pencher sur la découverte de nouvelles familles antibactériennes (structures novatrices) et de nouvelles voies biochimiques. En 2002, une nouvelle enzyme a été mise en évidence par l'équipe du Pr. Myllykallio pour la biosynthèse *de novo* du dTMP chez 30% des pathogènes présentant des multi-résistances aux thérapies actuelles. Les nombreuses études reportées dans la littérature ont permis la compréhension de la structure, des substrats naturels et du mécanisme biosynthétique faisant intervenir un cofacteur (le FAD) ainsi que la mise en évidence d'inhibiteurs. Une grande liberté conformationnelle, l'importance du π-stacking et des interactions hydrogène primordiales dans le maintien des substrats naturels ont incité notre équipe à développer de petites molécules acyclonucléotidiques et hétérocycliques afin d'inhiber cette enzyme.

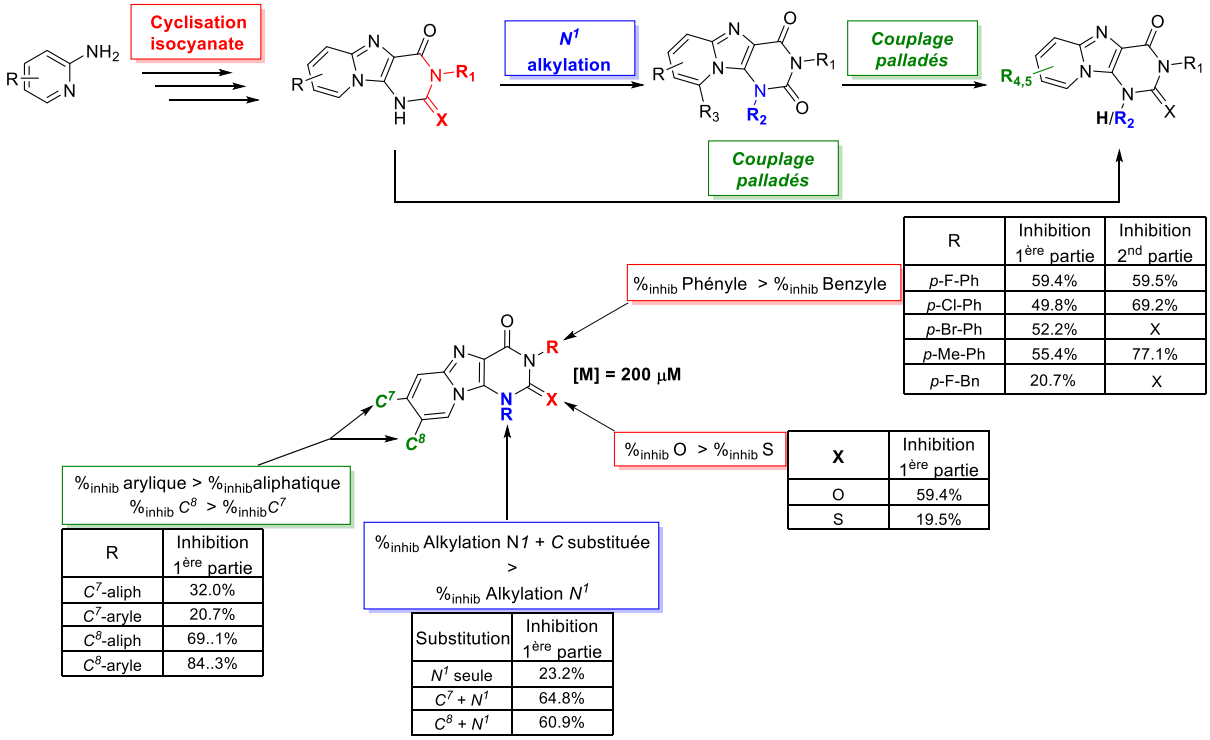
Dans un premier chapitre nous avons décrit la synthèse d'une nouvelles famille d'ANPs *trans*but- et *trans*pent-2'-ènyles phosphonates possédant une base non canonique de type quinazoline C^6 et C^7 substituées. Pour ce faire nous avons exploré une nouvelle voie d'alkylation ayant donné lieu à une publication, afin d'insérer de manière régiosélective une chaîne crotyle sur la position N^1 de nos bases. L'obtention de ces précurseurs a permis la mise en place de l'étape centrale de métathèse croisée, permettant le couplage des différentes chaînes diesters phosphonate et l'accès rapide et convergent après déprotection aux dérivés acycliques désirés sous formes d'acides phosphoniques. Par la suite nous avons synthétisé une série d'ANPs *trans*but-2'-ènyle portant une base C^5-substitué-uracile obtenu par une synthèse précédemment décrite faisant intervenir deux étapes clefs : une protection régiosélective et une métathèse croisée. Ces deux familles ont finalement été modulées par l'insertion de chaînes aliphatiques dans des conditions de Sonogashira.



Nous avons par la suite évalué le potentiel antibactérien *in vitro* de ces 24 composés sur l'enzyme *ThyX Mtb*. Ces derniers ont montré de légère inhibition (0.0-31.8% à 200 µM) sur l'enzyme (10 µM). La chaîne phosphonate n'est donc pas en mesure de mimer l'intégralité du ribosyle et ses interactions. La chaîne ne mimant pas la position *3'-OH*, il semblerait que cette position soit

nécessaire afin d'ancrer le substrat dans le site actif. Le passage de notre chaîne diesters phosphonate sous formes 2'-hydroxyméthyle-*trans*but-2-ènyle ou la substitution par un 2'-deoxyribose-5'-monohposphate, permettrait la compréhension totale de l'influence de la base ou du sucre sur la fixation dans le site actif de l'enzyme et ainsi accroître l'inhibition des composés.

Dans un second chapitre l'intérêt s'est porté sur des composés polyhétérocycliques de type pyrido[2,1-f]purine-2,4(*1H,3H*)-diones dérivés de 2-(trifluoromethyl)pyrido[1,2-e]purine obtenus à partir d'un criblage d'une petite bibliothèque de molécules interne au laboratoire possédant les propriétés nécessaires à la création d'interactions d'intérêts dans le site actif. Ce dérivé tricyclique a subi une première modulation afin d'augmenter ses interactions dans le site actif, puis une pharmaco-fonctionnalisation guidée par les résultats biologiques et les modélisations. Nous avons pu ainsi introduire une large variété de substituants sur chacune des positions souhaitées par une synthèse convergente sous activation verte, afin d'étudier le comportement de ces intercalants dans le site actif de l'enzyme. Par deux réactions de cyclisations, nous avons pu ainsi étudier l'influence de groupements benzyles et phényles mono- et polysubstitués, mais aussi l'effet de l'hétéroatome lié au C^2. Nous avons réalisé l'alkylation de la position N^1 de manière régiosélective par une mise au point afin d'éviter la formation des produits de *O*-alkylation. La dernière modification chimique a porté sur l'insertion de chaînes aliphatiques et de groupements aryliques par des couplages organopalladés de type Sonogashira et Suzuki-Miyaura sur les positions C^7 et C^8.



R	Inhibition 1ère partie	Inhibition 2nd partie
p-F-Ph	59.4%	59.5%
p-Cl-Ph	49.8%	69.2%
p-Br-Ph	52.2%	X
p-Me-Ph	55.4%	77.1%
p-F-Bn	20.7%	X

X	Inhibition 1ère partie
O	59.4%
S	19.5%

R	Inhibition 1ère partie
C^7-aliph	32.0%
C^7-aryle	20.7%
C^8-aliph	69..1%
C^8-aryle	84..3%

Substitution	Inhibition 1ère partie
N^1 seule	23.2%
$C^7 + N^1$	64.8%
$C^8 + N^1$	60.9%

Nous avons par la suite évalué le potentiel antibactérien *in vitro* de ces 63 composés sur l'enzyme *ThyX Mtb*. Ces derniers ont montré des inhibitions supérieures aux composés ANPs, mais aussi par rapport aux deux substrats issu du criblage (0.0-84.3% à 200 µM) sur l'enzyme à forte concentration (10 µM) et (0-18.4% à 50 µM). Nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs facteurs essentiels au maintien et à l'augmentation de l'inhibition de l'enzyme :

- Présence d'un phényle substitué par des groupements donneurs de liaisons hydrogène (-F, -Cl, -Br) ou pouvant créer des interactions hydrophobes (-Me)

- La position N^1 doit rester sous forme libre (NH) afin de pouvoir créer deux interactions hydrogène avec la leucyne 104 et la glutamine 103.
- Dans le cas des substitutions des positions C^7 et C^8 :
    - La position C^8 présente de meilleures inhibitions avec de longues chaînes ou des groupements aryles.
- Dans le cas d'une position N^1-benzylée, la substitution des positions C^7 ou C^8 par une chaîne phénylebut-1-ynyl permet le maintien de l'inhibition.

Afin d'augmenter les inhibitions actuelles de nos composés, deux voies pourraient être explorées :

- L'insertion d'une fonction acide carboxylique sur la substitution du phényle (interactions hydrogène avec l'acide glutamique 87 ou l'arginine 107), mais aussi des positions C^7 ou C^8 (interactions hydrogène avec la glutamine 92 ou l'arginine 87).
- L'insertion de fonction acide phosphonique sur ces mêmes positions afin de créer de nouvelles interactions hydrogène.

Malgré les faibles inhibitions observées sur l'ensemble des composés sur la 1ère partie ou la 2nd partie du mécanisme, la reproductibilité des résultats nous permet d'affirmer de la bonne fixation de ces derniers dans le site actif de l'enzyme ; ils sont considérés pour le moment comme des inhibiteurs faibles de la *FDTS*. De plus nous avons mis en évidence l'IC_{50} du produit de référence **198a** à 95 µM.

De par la complexité de se fixer dans le site actif, et la multitude de produits pouvant présenter les interactions nécessaires à une inhibition de l'enzyme, il serait nécessaire de réaliser un criblage d'une chimiothèque à 50 µM afin de mettre en évidence un ou plusieurs squelette(s) intéressant(s) possédant une activité supérieure aux produits synthétisés précédemment. Par la suite la modulation de ces squelettes permettrait la mise en évidence d'un ou plusieurs composé(s) lead(s).

Références bibliographiques

[1] WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Antimicrobial resistance: global report on surveillance. https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/. (April 2014).

[2] Porter, J. R.; Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 260–269.

[3] Medical Microbiology. 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston (TX), **1996**.

[4] Byrd, A. L.; Belkaid, Y.; Segre, J. A, The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2018**, *16*, 143–155.

[5] Chow, J.; Lee, S. M.; Shen, Y.; Khosravi, A.; Mazmanian, S. K, Host–bacterial symbiosis in health and disease. *Adv. Immunol.*, **2010**, *107*, 243–274.

[6] Xu, J.; Mahowald, M. A.; Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; Hamady M, *et al*, Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol*, **2007,** 5, 1574-1586.

[7] Hooper, L. V, Commensal Host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **2001**, *292*, 1115–1118.

[8] Levy, M.; Kolodziejczyk, A. A.; Thaiss, A. A.; Elinav, E, Dysbiosis and the immune system *Nat. Rev. Immunol.*, **2017**, *17*, 219–232.

[9] Finlay B.B.; Falkow, S, Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1997**, *61*, 136–169.

[10] Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; LeBlanc, C. L.; *et al*, Mechanisms of bacterial pathogenicity, *Postgrad. Med. J.* **2002**, *78*, 216-224.

[11] a) del Solar, G.; Giraldo, R.; Ruiz-Echevarría, M. J.; Espinosa, M.; Díaz-Orejas, R.. Replication and control of circular bacterial plasmids, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., **1998**, *62*, 434-464. b) Robinson, A.; van Oijen, A. M., Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies, *Nat. Rev. Microbiol*., **2013**, *11*, 303-315.

[12] Garavaglia, M.; Rossi, E.; Landini, P., The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in Escherichia coli. *PLoS ONE*, **2002**, 7.

[13] Bassett, E. J.; Keith, M. S.; Armelagos, G. J.; Martin, D. L.; Villanueva, A. R., Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350), *Science*, **1980**, 209, 1532–1534.

[14] Aminov, R. I., A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, *Front. Microbiol.*, **2010**, *1*, 134-141.

[15] Saga, T.; Yamaguchi, K., History of antimicrobial agents and resistant bacteria, *JMAJ*, **2009**, *52*, 103-108.

[16] Durand, G. A.; Raoult, D.; Dubourg. G., Antibiotic discovery: history, methods and perspectives, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2019**, *53*, 371-382.

[17] Silver, L. L., Challenges of antibacterial discovery, *Clin. Microbiol. Rev*., **2011**, *24*, 71-109.

[18] Adzitey F., Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry: A mini review. *World's Vet. J*, **2015**, *5*, 36-41.

[19] a) Ebimieowei, E.; Ibemologi, A., Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*., **2016**, *4*, 90-101. b) Peach, K. C.; Bray, W. M.; Winslow, D.; Linington, P. F.; Linington, R. G., Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis, *Mol. Biosyst.*, **2013**, *9*, 1837–1848.

[20] Bbosa, G. S.; Mwebaza, N.; Odda, J.; Kyegombe, D. B.; Ntale, M., Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, *Health*, **2014**, 6, 410-425.

[21] Rammelkamp, C. H.; Maxon, T, Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin, *Exp. Biol. Med.*, **1942**, *51*, 386–389.

[22] Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. K.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, N*ature*, **2015**, *13*, 42-51

[23] De Kracker, M. E. A.; Stewardson, A. J.; Harbarth, S, Will 10 Million People die a year due to antimicrobial resistance by 2050?, *Plos. Med*, **2016**, *13*, e1002184.

[24] WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*

[25] Powers, J. H., Antimicrobial drug development-The past, the present, the future, *Clin. Microbiol. Infec.*, **2004**, *10*, 23-31.

[26] Woolhouse, M.; Ward, M.; Van Bunnik, B.; Farrar, J., Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment**,** *Phil. Trans. R. Soc. B*, **2015**, *370*.

[27] Khameneh, B.; Diab, R.; Ghazvini, K.; Sedigheh, B.; Bazzaz, B. S. F., Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them, *Microb. Pathogenesis*, **2016**, *95*, 32-42.

[28] a) Yelin, I.; Kishony, R., SnapShot: Antibiotic resistance, *Cell*, **2018**, *18*, 1136-1137. b) Bbosa, G.; Mwebaza, N.; Odda, J.; Kyegombe, D.; Ntale, M., Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, **2014**, *6*, 410-425.
[29] a) Peterson, E., & Kaur, P., Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.*, **2018** *9*. b) Wilcox, S., Encyclopædia-Britannica, **2013**, [14,52,54,55].
[30] Von Wintersdorff, C. J. H.; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; Van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H. M.; Wolffs, P. F. G., Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*.
[31] Sultan, I.; Rahman, S.; Jan, A. T.; Siddiqui, M. T.; Mondal, A. H.; Haq, Q. M. R., Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front. Microbiol*., **2018**, *9*.
[32] Cattoir, V.; Felden, B., Future antibacterial strategies: From basic concepts to clinical challenges, *J. Infect. Dis*., **2019**, *220* , 350–360,
[33] Belete, T. M., Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents, *Hum. Microb. J.*, **2019**, *11*, 100052.
[34] Fieulaine, S.; de Sousa, R. A.; Maigre, L.; Hamiche, K.; Alimi, M.; Bolla, J.; Taleb, A.; Denis, A.; Pagès, J.; Artaud, I.; Meinnel, T.; Giglione, C., A unique peptide deformylase platform to rationally design and challenge novel active compounds, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 35429.
[35] Paudel, A.; Hamamoto, H.; Panthee, S.; Sekimizu, K., Menaquinone as a potential target of antibacterial agents. *Drug Discov. Ther*., **2016**, *10*, 123–128.
[36] Wang, J.; Galgoci, .; Kodali, S.; Herath, K; B.; Jayasuriya, H.; Dorso, K., Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibacterial agents, *J. Biol. Chem*., **2003**, *278*, 44424–44428.
[37] Chon, J. ; Stover, P. J.; Field, M. S., Targeting nuclear thymidylate biosynthesis, *Mol. Aspects Med.*, **2017**, *53*, 48-56.
[38] a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnson, P. G.; Lenz, H-J.; Ladner, R. D., Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy, *Nature*, **2014**, *11*, 282-298. b) Hajian, B.; Scocchera, E.; Shoen, C.; Krucinska, J.; Viswanathan, K.; Dayanandan,N. G.; Erlandsen, H.; Estrada, A.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Cynamon, M.; Wright, D., Drugging the folate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The role of multi-targeting agents, *Cell Chem. Biol*., **2019**, 26, 781-791.
[39] Myllykallio, H.; Lipowski, G.; Leduc, D.; Filee, J.; Forterre, P.; Liebl, U., An alternative Flavin-Dependent Mechanism for Thymidylate synthesis, *Science*, **2002**, *297*, 105-107.
[40] Mathews, I. I., Flavin-Dependent Thymidylate Synthase as a drug target for deadly microbes : Mutational study and a strategy for inhibitor design, *J. Bioterror. Biodef.*, **2014**, suppl 12, 004.
[41] Chernyshev, A.; Fleischmann, T.; Kohen, A., Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, *74*, 282-289.
[42] Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A., Trappin of an intermediate in the reaction catalyzed by Flavin-Dependent, Thymidylate Synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4442-4448.
[43] Kanaan, N.; Ferrer, S.; Martí, S.; Garcia-Viloca, M.; Kohen, A.; Moliner, V., Temperature dependence of the kinetic isotope effects in *Thymidylate Synthase*. A theoretical study. *J. Am. Chem. Soc*., **2011**, *133*, 6692–6702.
[44] Wang, Z.; Ferrer, S.; Moliner, V.; Kohen, A., QM/MM calculations suggest a novel intermediate following the proton abstraction catalyzed by *Thymidylate Synthase*., *Biochemistry*, **2013**, *52*, 2348–2358.
[45] a) Pozzi, C.; Lopresti, L.; Tassone, G.; Mangani, S., Targeting methyltransferases in human pathogenic bacteria: Insights into *Thymidylate Synthase* (TS) and *Flavin-Dependent* (FDTS), *Molecules*, **2019**, *24*, 1638-1659. b) Kholodar, S.; Kohen, A., Noncovalent intermediate of *Thymidylate Synthase*: Fact or fiction?, *J. Aam. Chem. Soc*, **2016**, *138*, 8056-8059.
[46] a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnson, P. G.; Lenz, H.; Ladner, R. D., Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer thérapy, *Nature*, **2014**, *11*, 282-298. b) Danenberg, P. V.; Langenbach, J.; Heidelberg, H., Structures of reversible and irreversible complexes of thymidylate synthetase and fluorinated pyrimidine nucleotides, *Biochem.*, **1974**, *13*, 926-933. c) Singh, V.; Brecik, M.; Mukherjee, R.; Evans, J. C.; Svetlíková, Z.; Blaško, J.; Surade, S.; Blackburn, J.; Warner, D.F.; Mikušová, K.; Mizrahi, V., The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil, *Chem. Biol*., **2015**, *22*, 63-75.
[47] Ferrari, S.; Ingrami, M.; Soragni, F.; Wade, R.C.; Costi, M.P. Ligand-based discovery of N-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isochromen-5-yl)-carboxamide and sulfonamide derivatives as thymidylate synthase A inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 663-668.
[48] a) Mangani, S.; Cancian, L.; Leone, R.; Pozzi, C.; Lazzari, S.; Luciani, R.; Ferrari, S.; Costi, M.P. Identification of the Binding Modes of N-Phenylphthalimides Inhibiting Bacterial Thymidylate Synthase through X-Ray Crystallography Screening, *J. Med. Chem*. **2011**, *54*, 5454–5467. b) Catalano, A.; Luciani, R.; Carocci,

A.; Cortesi, D.; Pozzi, C.; Borsari, C.; Ferrari, S.; Mangani, S. X-ray crystal structures of Enterococcus faecalis thymidylate synthase with folate binding site inhibitors, *Eur. J. Med. Chem*. **2016**, *123*, 649–664
[49] Gonen, N.; Assaraf, G., Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance, *Drug Res.*, **2002**, *15*, 183-210.
[50] Qian-Ru, D.; Dong-Dong, L.; Ya-Zhou, P.; Jing-Ran, L.; Jian, S.; Fei, F.; Wei-Qing, Z.; Hai-Bin, G.; Hai-Lang, Z., Novel 1,3,4-oxadiazole thioether targeting thymidylate synthase as dual anticancer/antimicrobial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 2286-2297.
[51] Agrawal, N.; Lesley, S. A.; Kuhn, P.; Kohen, A. mechanistic studies of a *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *Biochemistry*, **2004**, 43, 10295-10301.
[52] Mason, A.; Agrawal, N.; Washington, M. T.; Lesley, S. A.; Kohen, A., A lag-phase in the reduction of flavin dependent thymidylate synthase (FDTS) revealed a mechanistic missing link, *Chem. Commun*., **2006**, 1781.
[53] Wang, Z.; Chernyshev, A.; Koehn, E. M.; Manuel, T. D.; Lesley, S. A.; Kohen, A., Oxidase activity of a flavin-dependent thymidylate synthase, *FEBS Journal*, **2009**, *276*, 2801–2810.
[54] Kohen, E. M.; Fleischmann, T.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Kohen, A., An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the thyX gene, *Nature*, **2009**, *458*, 919-924.
[55] Mishanina, T. V.; Koehn, E. V.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A.,Trapping of an Intermediate in the reaction catalyzed by *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *J. Am. Chem. Soc.*,**2012**,*134*, 4442-4448.
[56] Conrad, J. A.; Maldonado, M. O.; Hoppe, S. W.; Palfey, B. A., Detection of intermediates in the oxidative half-reaction of the FAD-Dependent Thymidylate Synthase from Thermotoga maritima: Carbon transfer without covalent pyrimidine activation, *Biochemistry*, **2014**, *53*, 5199-5207.
[57] Stull, F. W.; Bernard, S. M.; Sapra, A.; Smith, J. L.; Zuiderweg, E. R. P.; Palfey, B. A., Deprotonations in the reaction of *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*, *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3261-3269.
[58] Mishanina, T. V.; Yu, L.; Karunaratne, K.; Mondal, D.; Corcoran, J. M.; Choi, M. A.; Kohen, A., An unprecedented mechanism of nucleotide methylation in organisms containing thyX, *Science*, **2016**, *351*, 507-510.
[59] Choi, M.; Karunaratne, K.; Kohen, A., *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase* as a new antibiotic target, *Molecules*, **2016**, *21*, 654-664.
[60] Galbàn, J.; Sanz-Vicente, I.; Navarro, J.; de Marcos, S., The ontronsic of FAD and its application in analytical chemistry : a review, *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, 042005.
[61] Ghisla, S.; Edmondson, D., Flavin coenzymes, *eLS. John Wiley & Son*, **2014.**
[62] Miles, B., *Biological Redox Reactions*, **2003**.
[63] Zhao,R-k.; Lukacs, A.; Haigney, A.; Brust, R.; Greetham, G. M.; Towrie, M.; Tonge P. J.; Meech, S. R., Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully reduced flavins, *Phys. Chem. Chem. Phys*., **2011**, *13*, 17642–17648.
[64] Broderick, J-B., Coenzymes and cofactors, *eLS*, **2001**.
[65] Abu El Asrar, R.; Margamuljana, L.; Klaassen, H.; Nijs, M.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Myllykallio, H.; Becker, F. B.; De Jonghe, S.; Herdewijn, P.; Lescrinier, E., Discovery of a new *Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthase* X inhibitor with a unique inhibition profile, *Biochem. Pharm*., **2017**, *135*, 69–78.
[66] Graziani, S.; Xia, Y.; Gurnon, J. R.; Van Etten, J. L.; Leduc, D.; Skouloubris, S.; Myllykallio, H.; Liebl, U., Functional analysis of FAD-dependent Thymidylate Synthase ThyX from Paramecium bursaria Chlorella Virus-1*, *J. Biologicol. Chem.*, **2004**, *279*, 54340–54347.
[67] Hunter, J. H.; Gujjar; R.; Pang, C. K. T.; Rathod, P. K., Kinetics and ligand-binding preferences of *Mycobacterium tuberculosis Thymidylate Synthases*, *ThyA* and *ThyX*, *PLoS ONE*, **2008**, *3*, 2237-2247.
[68] Önen, F. E.; Boum, Y.; Jacquement, C.; Spanedda, M. V.; Jaber, N.; Scherman, D.; Myllykallio, H.; Herscovici, J., Design, synthesis and evaluation of potent thymidylate synthase X inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2008**, *18*, 3628-3631.
[69] Basta, T.; Boum, Y.; Briffotaux, J.; Becker, H. F.; Lamarre-Jouenne, I.; Lambry, J-C.; Skouloubris, S.; Liebl, U.; Graille, M.; van Tilbeurgh, H.; Myllykallio, H., Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX, Open Biol., **2012**, *2*.
[70] Skouloubris, S.; Djaout, K.; Lamare, I.; Lambry, J-C. ; Anger, K. ; Briffotaux, J. ; Liebl, U. ; de Reuse, H. ; Myllykalio, H. ; Targeting of *Helicobacter pylori thymidylate synthase ThyX* non-mitotoxic hydroxy-naphtoquinones, *Open Biol.*, **2015**, *5*, 150015.
[71] Myllykallio, H.; Basta, T.; Boum, Y.; Liebl, U., Antimicrobial compounds of 1,4- naphtoquinone structure, France, Patent n° : WO2011EP55537. **2010**
[72] Modranka, J.; Li, J.; Parchina, A.; Vanmeert, M.; Dumbre, S.; Salman, M.; Myllykallio, H.; Becker, H. F.; Vanhoutte, R.; Margamuljana, L;; Nguyen, H.; Abu El-Asrar, R.; Rozenski, J.; Herdewijn, P.; De Jonghe, S.; Lescrinier, E., *ChemMedChem* **2019**, *14*, 645-663.

[73] Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4847–4862.
[74] Topalis, D.; Pradèere, U.; Roy, R.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; Alexandre, J. A. C.; El-Amri, C.; Deville-Bonne, D.; Meyer, P.; Balzarini, J.; Agrofoglio, L. A., Novel antiviral C5-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonates selected as human *Thymidylate Kinase* substrates, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 222-23.
[75] Johar, M.; Manning, T.; Tse, C.; Desroches, N.; Agrawal, B.; Kunimoto, D. Y.; Kumar, R., Growth inhibition of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in vitro: effect of 1-â-D-2′-arabinofuranosyl and 1-(2′-deoxy-2′-fluoro-â-D-2′-ribofuranosyl) pyrimidine nucleoside analogs, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3696-3705.
[76] De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Holý, A., (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: an aliphatic nucleoside analog with broad spectrum antiviral activity. *Science*, **1978**, *200*, 563–565.
[77] De Clercq, E.; Holý, A., Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drug, *Nature*, **2005**, *4*, 928-941.
[78] Novak, B. M.; Risse, W.; Grubbs, R. H., The development of well-defined catalysts for ring-opening olefin metathesis polymerizations (ROMP), *Adv. Poly. Sci*., **1992**, *10*, 48-69.
[79] Higman, C. S.; Lummiss, J. A. M.; Fogg, D. E.; Olefin metathesis at the dawn of implementation in pharmaceutical and specialty-chemicals manufacturing, , *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, *55*, 3552-3565.
[80] Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D., Metathesis reactions in total synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2005**, 44, 4490-4527.
[81] Chauvin, Y., Olefin metatesis: The early daus (Nobel Lecture), *Angew. Chem., Int. Ed*., **2006**, *45*, 3740-3748.
[82] Schrock, R. R., Multiple metal–carbon bonds for catalytic metathesis reactions (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed*., 2006, *45*, 3748-3759.
[83] Grubbs, R. H., Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed*., **2005**, *45*, 3760-3765
[84] Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A., The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction, *Nature*, **2007**, *450*, 243-252.
[85] Becker, M. R.; Watson, R. B.; Schindler, C. S., Beyond olefins: New metathesis directions for synthesis, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 7867-7881.
[86] Adjiman,C. S.; Clarke, A. J.; Cooperb, G.; Taylor, P. C., Solvents for ring-closing metathesis reactions, *Chem. Commun*, **2008**, *24*, 2806-2809.
[87] Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H., Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a group VIII carbene complex in protic media, *J. Am. Chem. Soc*. **1992**, *114*, 3974-3975.
[88] Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H.,Synthesis and activity of a new generation of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene ligands, *Org. Lett.*, **1999**, *16*, 953-956.
[89] Love, J. A.; Morgan, J. P.; Trnka, T. M.; Grubbs, R. H., A Practical and highly active ruthenium-based catalyst that effects the cross metathesis of acrylonitrile. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2002**, *41*, 4035-4037.
[90] Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L., Olefin metathesis-active ruthenium complexes bearing a nucleophilic carbene ligand , *J. Am. Chem. Soc*., **1999**, *121*, 2674-2678.
[91] Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L; Hoveyda, A. H., Efficient and recyclable monomeric and dendritic Ru-based
metathesis catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.
[92] Chatterjee, A. K.; Choi, T-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H., A general model for selectivity in olefin cross metathesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *125*, 11360-11370.
[93] a) Tomasek, J.; Schatz, J., Olefin metathesis in aqueous media, *Green Chem.*., **2013**, *15*, 2317-2338. b) Cravotto, G.; Cintas, P., Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitational chemistry fromacademia to innovative and large-scale applications, *Chem. Soc. Rev*., **2006**, *35*, 180–196. c) Varma, R. S., Chemical activation by mechanochemicalmixing, microwave and ultrasonsicirradiation, *Green Chem*., **2008**, *10*, 1129–1130.
[94] Sari, O.; Hamada, M.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio,L. A., The Preparation of Trisubstituted Alkenyl Nucleoside Phosphonates under Ultrasound-Assisted Olefin Cross-Metathesis, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 4390-4393.
[95] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J., The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tet. Lett*., **1986**, *26*, 279-282.
[96] Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G., Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tet. Lett*., **1986**, *27*, 4945-4948.

[97] Fang, W-P.; Cheng, Y-E.; Cheng, Y-R.; Cherng, Y-J., Synthesis of substituted uracils by the reactions of halouracils with selenium, sulfur, oxygen and nitrogen nucleophiles under focused microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 3107-3113.
[98] a) Kopp, F.; Knochel, P., Functionalization of unprotected uracil derivatives using the halogen−magnesium exchange, *Org. Lett*., **2007** *99*, 1639-1641. b) Prabhakar, V.; Sudhakar, B. K.; Ravindranath, L. K.; Latha, J.; Venkateswarlu, B., Synthesis, characterisation and biological evaluation of quinazoline derivatives as novel anti-microbial Agents, *Organic. Chem. Curr. Res*., **2016**, *5*.
[99] Bessières, M.; Hervin, V.; Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohierc, J-F.; Agrofoglioa, L. A., Highly convergent synthesis and antiviral activity of (E)-but-2-enyl nucleoside phosphonoamidates, *Eur. J. Med. Chem*., **2018**, *146*, 678-686.
[100] Mitsunobu, O., The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis*, **1981**, 1.
[101] Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agofoglio, L. A., Olefin cross-metathesis for the synthesis of alkenyl acyclonucleoside phosphonates. *Curr. Protoc. Nu. Ac. Chem.*, **2014,** 59, 14.11.1- 14.11.17.
[102] Agrofoglio, L. A.; Amblard, F.; Nolan, S. P.; Charamon, S.; Gillaizeau, I.; Zevacoc, T. A.; Guenotd, P., Synthesis of L-cyclopentenyl nucleosides using ring-closing metathesis and palladium-mediated allylic alkylation methodologies, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8397–8404.
[103] Claridge, T. D. W.; Davies, S. G.; Lee, J. A.; Nicholson, R. L.; Roberts, P. M.; Russel, A. J.; Smith, A. D.; Toms, S. M., Highly (*E*)-selective Wadsworth-Emmons reactions promoted by methylmagnesium bromide, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5437-5440.
[104] Blakemore, P. R.; Cole, W. J.; Kocieński, P. J.; Morley, A., A Stereoselective synthesis of trans-1,2-disubstituted alkenes based on the condensation of aldehydes with metallated 1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl sulfones, *Synlett*, **1998**, *1*, 26-28.
[105] Fang, W.; Cheng, Y.; Cheng, Y.; Cherng, Y., Synthesis of substituted uracils by the reactions of halouracils with selenium, sulfur, oxygen and nitrogen nucleophiles under focused microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 3107-3113.
[106] Wilson, J. M.; Henderson, G.; Black, F.; Sutherland, A.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H.; Robins, D. J., Synthesis of 5-deazaflavin derivatives and their activation of p53 in cells , *Bioorg. Med. Chem*., **2007**, *15*, 77-86.
[107] Yun, J, *et al*, US. Pat. Appl. Publ. **2012**, 20120142, 717, 07 jun.
[108] Krasovskiy, A.; Kopp, F.; Knochel, P., Soluble lanthanide salts ($LnCl_3 \cdot 2\,LiCl$) for the improved addition of organomagnesium reagents to carbonyl compounds. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2006**, *45*: 497-500.
[109] Krasovskiy, A.; Knochel, P., A LiCl-mediated Br/Mg exchange reaction for the preparation of functionalized aryl- and heteroarylmagnesium compounds from organic bromides. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2004**, *43*, 3333-3336.
[110] Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., A convenient, highly selective and eco-friendly N-Boc protection of pyrimidines under microwave irradiation, *RSC Adv*., **2014**, *4*, 59747-59749.
[111] Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A., Sonication-assisted synthesis of (E)-2-methyl-but-2-enyl nucleoside phosphonate prodrugs, *Chemistry Select*, **2016**, *1*, 3108.
[112] Bookser, B. C.; Raffaele, N. B., High-throughput five minute microwave accelerated glycosylation approach to the synthesis of nucleoside libraries, *J. Org. Chem*., **2007**, *72*, 173-179.
[113] Hernández-Reyes, X. C.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; González-Zamora, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Morales-Serna, J. A.; Negrón-Silva, J. E., Synthesis of azanucleosides through regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by sulphated zirconia under microwave and solvent-free conditions, *Molecules*, **2012**, *17*, 3359-3369.
[114] Głowacka, I. E.; Balzarini, J.; Wróblewski, A. E.; The synthesis, antiviral, cytostatic and cytotoxic evaluation of a new series of acyclonucleotide analogues with a 1,2,3-triazole linker, Eur. *J. Med. Chem*., **2013**, *70*, 703-722.
[115] Hardtmann, G. E.; Koletar, G.; Pfister, O. R., The chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)dione (isatoic anhydrides) 1. The synthesis of N-substituted 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)diones. *J. Het. Chem*., **1975**, *12*, 565-572.
[116] Kaboudin, B.; Balakrishna, M. S., Surface-mediated solid phase reactions: Microwave assisted Arbuzov rearrangemeent on the solid surface, *Synt. Comm*., **2001**, *31*, 2773-277.
[117] Liang, S.; Neisius, M.; Mispreuve, H.; Naescher, N.; Gaan, S., Flame retardancy and thermal decomposition of flexible polyurethane foams: Structural influence of organophosphorus compounds, *Polym. Degrad. and Stab*., **2012**, *97*, 2428-2440,
[118] Ireland, B. J.; Dobigny, B. T.; Fogg, B. E., Dedcomposition of a phosphine-free metathesis catalyst by amines and other bronsted acid, *ACS Catal.*, **2015**, *5*, 4690-4698.

[119] Schröder, N.; Wencel-Delord, J.; Glorius, F., High-yielding, versatile, and practical [Rh(III)Cp*]-catalyzed ortho bromination and iodination of arenes, *J. Am. Chem. Soc*., **2012**, *134*, 8298-8301.
[120] Yoosaf, K.; Llanes-Pallas, A.; Marangoni, T.; Belbakra, A.; Marega, R.; Botek, E.; Champagne, B.; Bonifazi , D.; Armaroli, N., From molecular to macroscopic engineering: Shaping hydrogen-bonded organic nanomaterials. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3262-3273.
[121] Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G., Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α-amino acids, *Org. Lett*., **2004**, *6*, 3675-3678.
[12]2 Kadyrov, R., Olefin Metathesis: Catalyst inhibition as a result of isomerization., *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 113-116.
[123] Leitao, E. M.; Dubberley, S. R.; Piers, W. E.; WU, Q.; McDonald, R., Thermal decoomposition modes for four-coordinate ruthenium phosphonium alkylidene olefin metathesis catalysts, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 11565-11572.
[124] a) Hong, S. H.; Wenzel, A. G.; Salguero, T. T.; Day, M. W.; Grubbs, R. H., Decomposition of ruthenium olefin metathesis catalysts, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7961-7968. b) Lafaye, K.; Bosset, C.; Nicolas, L.; Guérinot, A.; Cossy, J., Beyond catalyst deactivation: cross-metathesis involving olefins containing N-heteroaromatics,, *Beilstein J. Org. Chem*. **2015**, *11*, 2223–2241.
[125] Schmidt, B.; Hauke, S., Cross metathesis of allyl alcohols: how to suppress and how to promote double bond isomerization, *Org. Biomol. Chem*., **2013**, *11*, 4194-4207.
[126] Hong,S. H.; Sanders, D. P.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H., Prevention of undesirable isomerization during olefin metathesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* , 17160-17161.
[127] Csjernyik, G.; Éll, A. H.; Fadini, L.; Pugin, B.;Bäckvall, J-E., Efficient ruthenium-catalyzed aerobic oxidation of alcohols using a biomimetic coupled catalytic system, *J. Org. Chem.*, **2002**, *6*, 1657-1662.
[128] McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; McKenna, M-C., The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane, *Tetrahedron Lett*., **1977**, *18*, 155-158,
[129] Kumamoto, H.; Topalis, D.; Broggi, J.; Pradère, H.; Roy, V.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Deville-Bonne, D.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Garin, D.; Crance, J-M.; Agrofoglio, L. A., Preparation of acyclo nucleoside phosphonate analogues based on cross-metathesis, Tetrahedron, **2008**, *64*, 3517-3526.
[130] Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A., Sonication-Assisted Synthesis of (E)-2-Methyl-but-2-enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs, *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 3108–3113.
[131] Alexandrova, L. A.; Chekhov, V. O.; Shmalenyuk, E .R.; Kochetkov, S. N.; El-Asrar, R. A.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of C-5 modified 20-deoxyuridinemonophosphates as inhibitors of M. tuberculosis thymidylate synthase, *Bioorg. Med. Chem*., **2015**, *23*, 7131–7137.
[132] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.,et al., A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines, *Tetrahedron Lett*., **1975**, *16*, 4467–4470.
[133] Chinchilla, R.; Nàjera, C., Recent advances in Sonogashira reactions, *Chem. Soc. Rev*., **2011**, *40*, 5084–5121.
[134] Beaupérinn, M.; Job, A.; Cattey, H.; Royer, S.; Meunier, P.; Hierso, J-C., Copper(I) iodide polyphosphine adducts at low loading for Sonogashira alkynylation of demanding halide substrates: Ligand exchange study between copper and palladium, *Organometallics*, **2010**, *29*, 2815-2822.
[135] Agrofoglio, L. A.; Gillaizeau, I.; Sait, Y., Palladium-assisted routes to nucleosides, *Chem. Rev*. **2003**, *103*, 1875−1916.
[136] Kore, A. R.; Charles, I., Recent developments in the synthesis and applications of C5-substituted pyrimidine nucleosides and nucleotides, *Curr. Org. Chem*., **2012**, *16*, 1996-2013.
[137] Dana Hockovà, D.; masojìdokovà, M.; Holý, A., Sonogashira cross coupling in the synthesis of cyclonucleoside phosphonates: Preparation of 6-[(phosphonomethoxy)alkynyl]- and 6-[(phosphonomethoxy)alkyl]pyrimidine, *Collect. Czech. Chem. Commun*., **2005**, *70*, 247-259.
[138] Hervé, G.; Len, C., Heck and Sonogashira couplings in agueous mieda-application to unprotected nucleosides and nucleotides, *Sustain. Chem. Process.*, **2015**, *3*.
[139] Hockova, D.; Holy, A.; Masojdkova, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J., 5-Substituted-2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidines acyclic nucleoside phosphonate analogues with antiviral activity, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5064-5073.
[140] Castro, C. E.; Gaughan, E. J.; Owsley, D. C., Indoles, benzofurans, phthalides, and tolanes via copper(I) acetylides, *J. Org. Chem.*,**1966**, *31*, 4071-4078.
[141] Bleackely, R. C.; Jones, A. L.; Walker, R. T, Incorporation of 5-substituted uracil derivatives into nucleic acid-III Synthesis of 5-substituted uracils derived from 5-acetyluracil, *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 2795-2797.
[142] Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L. A., Highly efficient AgNO3-catalyzed preparation of substituted furano-pyrimidine nucleosides, *Synlett*, **2004**, *13*, 2406-2408.

[143] Kögler, M.; Busson, R.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Louat, T.; Munier-Lehmann, H.; Herdewijn, P., Synthesis and evaluation of 6-aza-2′-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of Thymidine Monophosphate Kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biodivers*., **2012**, *9*, 536-556.
[144] Pradère, U.; Clavier, H.; Roy, V.; Nolan, S. P.; Agrofoglio, L. A., The shortest strategy for generating phosphonate prodrugs by olefin cross-metathesis – Application to acyclonucleoside phosphonates. *Eur. J. Org. Chem*., **2011**, 7324-7330.
[145] Karunaratne, K.; Luedtke, N.; Quinn, D. M.; Kohen, A., Flavin-dependent thymidylate synthase: N5 of flavin as a methylene carrier, *Arch.Biochem. Biophys*., **2017**, 632, 11-19.
[146] Tber, Z.; Biteau, N. G.; Agrofoglio, L. A.; Cros, J.; Goffinont, S.; Castaing, B.; Nicolas, C.; Roy, V., Microwave-assisted Suzuki–Miyaura and Sonogashira coupling of 4-chloro-2-(trifluoromethyl)pyrido[1,2-e]purine derivatives. *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**.
[147] Baraldi, P. G.; Borea, P. A., New potent and selective human adenosine A_3 receptor antagonists, *Current Awarness*, **2000**, *21*, 456-459.
[148] Bouma, M. G.; Jeunhomme, T. M.; Boyle, D. L.; Dentener, M. A.; Voitenok, N. N.; van den Wildenberg, F. A.; Buurman, W. A., Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J. Immunol*., **1997**, *158*, 5400-5408.
[149] a) Cheong, S. L.; Federico, S.; Venkatesan, G.; Mandel, A. L.; Shao, Y.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G., The A_3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches. *Med. Res. Rev*., **2013**, *33*, 235-335. b) Priego, E.; Pérez-Pérez, M.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; de Vries, H.; Ijzerman, A.; Camarasa, M.; Martín-Santamaría, S., Selective human adenosine A_3 antagonists based on pyrido[2,1-*f*]purine-2,4-diones: novel features of hA_3 antagonist binding. *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 111-119. c) Priego, E.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; IJzerman, A.; Camarasa, M.; Pérez-Pérez, M., Pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as a novel class of highly potent human A3 adenosine receptor antagonists, *J. Med. Chem*. **2002**, *45*, 3337-3344.
[150] a) Huang, J.; Dong, L.; Han, B.; Peng, C.; Chen, Y., Synthesis of aza-fused polycyclic quinolines *via* Double C-H Bond activation. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 8896-8900. b) Dong, L.; Huang, J.; Qu, C.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Hanb, B.; Peng, C., Rhodium(III)-catalyzed vinylic sp2 C–H bond functionalization: efficient synthesis of pyrido[1,2-α]benzimidazoles and imidazo[1,2-α]pyridines, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 6142-6149.
[151] a) Priego, E.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; IJzerman, A.; Camarasa, M.; Pérez-Pérez, M., Pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as a novel class of highly potent human A3 adenosine receptor antagonist., *J. Med. Chem*., **2002**, *45*, 3337-3344 b) Yang, X.; van Veldhoven, J. P. D.; Offringa, J.; Kuiper, B. J.; Lenselink, E. B.; Heitman, L. H.; van der Es, D.; IJzerman. A. P., Development of covalent ligands for G protein-coupled receptors: A case for the human adenosine A3 receptor, *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 3539-3552. c) Xia, L.; Burger, W. A. C.; van Veldhoven, J. P. D.; Kuiper, B. J.; van Duijl,T T.; Lenselink, E. B.; Paasman, E.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. J., Structure–affinity relationships and structure–kinetics relationships of pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as human adenosine A3 receptor antagonists, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 77555-7568 .
[152] Chaudhary, V.; Das, S.; Nayak, A.; Guchhait, S. K.; Kundub, C. N., Scaffold-hopping and hybridization based design and building block strategic synthesis of pyridine-annulated purines: discovery of novel apoptotic anticancer agents, *RSC Adv*., **2015**, *5*, 26051-26060.
[153] Maes, J.; Rauws, T. R. M.; Meas, B. U W., Synthesis of C8-N9 annulated purines by iron-catalyzed C-H aination, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 9137-9141.
[154] Guchhait, S. K.; Chaundhary, V., Desilylative activation of TMSCN in chemoselective Strecker-Ugi type reaction : functional fused imidazoles as building blocks as an entry route too annulated purines, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 6694-6705.
[155] Kumar, P.; Mahalanobish, M.; Mahalanobish, A., Copper accelerated one-pot sequential tandem synthesis of tetrahydropurinoisoquinoline derivatives, *Heterocycles*, **2017**, *94*, 1847-1855.
[156] Prabhakar, V.; Sudhakar, B. K.; Ravindranath, L. K.; Latha, J.; Venkateswarlu, B., Synthesis, characterisation and biological evaluation of quinazoline derivatives as novel anti-microbial agents, *Organic Chem. Curr. Res.*, **2016**, *5*, 4.
[157] Chong, L. S.; Desai, M. C.; Gallagher, B.; Graupe, M.; Halcomb, R. L.; Yang, H.; Zhang, J. R. Preparation of purine and thiadeazapurine phosphonate derivatives as modulators of toll-like receptor 7. WO2008005555A1, 2008.
[158] a) Torhan, M. C.; Peet, N. P.; Williams, J. D., A comparison of N- versus O-alkylation of substituted 2-pyridones under Mitsunobu conditions, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 3926–3928. b) Paramaguru, G.; Solomon, R. V.; Jagadeeswari, S.; Venuvanalingam, P.; Renganathan, R., Tuning the photophysical properties of 2-quinolinone-based donor–acceptor molecules through N- versus O-Alkylation: Insights from experimental and theoretical investigations. *Eur. J. Org. Chem*., **2014,** *2014*, 753-76.

[159] a) Bookser, B. C.; Weinhouse, M. L.; Burns, A. C.; Valiere, A. N.; Valdez, L. J.; Stanczak, P.; Na, J.; Rheingold, A. L.; Moore, C. E.; Dyck, D., Solvent-controlled, site-selective N-alkylation reactions of azolo fused ring heterocycles at N1-, N2-, and N3-positions, including pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, purines, [1,2,3]Triazolo[4,5]pyridines, and related deaza-compounds, : *J. Org. Chem*. **2018**, *83*, 6334−6353. b) Hartung,R. E.; Wall, M. C.; Lebreton, S.; Smrcina, M.; Patek, M., selectivity of N-versus O-alkylation in Mitsuobu reactions with various quinazolinols and isoquinolinols, *Heterocyles*, **2017**, *94*, 1305-13.14.
[160] Zhao, S., Kang, J., Du, Y., Kang, J., Zhao, X., Xu, Y., Chen, R., Wang, Q. and Shi, X., An efficient ultrasound-assisted synthesis of N-alkyl derivatives of carbazole, indole, and phenothiazine, J. *Het. Chem*, **2014**, *51*, 683-690.
[161] LaPlante, S. R.; Bilodeau, F.; Aubry, N.; Gillard, J. R.; O'Meara, J.; Coulombe, R., N- versus O-alkylation: Utilizing NMR methods to establish reliable primary structure determinations for drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4663-4668,
[162] Ghizzoni, M.; Wu, J.; Gao, T.; Haismaa, H. J.; Dekker, F. J.; Zheng, Y. G., 6-alkylsalicylates are selective Tip60 inhibitors and target the acetyl-CoA binding site, *Eur. J. Med. Chem*., **2012**, *47*, 337-344.
[163] Asano, Y.; Kitamura, S.; Ohra, T.; Aso, K.; Igata, H.; Tamura, T.; Kawamoto, T.; Tanaka, T.; Sogabe, S.; Matsumoto, S.; Yamaguchi, M.; Kimura, H.; Itoh, F., Discovery, synthesis and biological evaluation of isoquinolones as novel and highly selective JNK inhibitors, *Bioorg. Med. Chem*., **2008**, *16*, 4715-4732.
[164] a) Crabtree, R. H.; Lei, A., Introduction: CH activation, *Chem. Rev.*, **2017**,*117*, 8481-8482 b) Roudesly, F.; Oble, J.; Poli, G., Metal-catalyzed CH activation/functionalization: The fundamentals, J. Mol. Cat. A: Chemical, **2017**, *426*, 275-296.
[165] Debjit, B.; Sarvesh, K.; Sai, S. V.; Rakeshwar, B., Transition metal catalyzed C-H activation for the synthesis of medicinally relevant molecules: A Review, *J. Chem. Sci*., **2018**, *71*.
[166] Roudesly, F.; Oble, J.; Poli, G., Metal-catalyzed CH activation/functionalization: The fundamentals, *J. Mol. Cat.*, **2017**, *426*, 275-296.
[165] Zhang, M.; Zhang, Y.; Jie, X.; Zhao, H.; Li, G.; Su, W., Recent advances in directed C–H functionalizations using monodentate nitrogen-based directing groups, *Org. Chem. Front*., **2014**, *1*, 843-895.
[166] Chatt, J. ; Davidson, J. M., The tautomerism of arene and ditertiary phosphine complexes of ruthenium(0), and the preparation of new types of hydrido-complexes of ruthenium(II), *J. Chem. Soc.*, **1965**, 843-855.
[169] Zaistsev, V, G.; Shabashov, D.; Daugulis, O., Highly arylation of sp^3 C-H bonds catalyzed by palladium acetate, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13154-13155.
[170] Rouquet, G.; Chatani, N., Catalytic functionalization of C(sp^2)-H and C(sp^3)-H bonds by using bidentate directing groups, *Angew. Chem. Ed*., **2013**, *52*, 11726-117743.
[171] a) Huang, L.; Li, Q.; Wang, C.; Qi, C., Palladium(II)-catalyzed regioselective arylation of naphthylamides with aryl iodides utilizing a quinolinamide bidentate system, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78* , 3030-3038. b) Aihara, Y.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed direct arylation of C–H bonds in aromatic amides containing a bidentate directing group: significant electronic effects on arylation, *Chem. Sci*., **2013**, *4*, 664-670. c) Rouquet, G.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed ortho-C–H bond alkylation of aromatic amides with α,β-unsaturated ketones *via* bidentate-chelation assistance , *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2201-2208. d) Nishino, M.; Hirano, K.; Satoh, T.; Miura, M., Copper-mediated biaryl coupling of benzoic acid derivatives and 1,3-azoles. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2013**, *52*, 4457-4461.
[172] a) Shabashov, D. Daugulis, O., Auxiliary-assisted palladium-catalyzed arylation and alkylation of sp2 and sp3 carbon−hydrogen bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3965-3972. b) Rouquet, G.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed ortho-C–H bond alkylation of aromatic amides with α,β-unsaturated ketones *via* bidentate-chelation assistance, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2201-2208. c) Eckermann, L.; Lygin, A. V.; Hofmann, N., Ruthenium-catalyzed oxidative annulation by cleavage of CH/NH bonds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *50*, 6379-6382.
[173] Ano, Y.; Tobisu, M.; Chatani, N., Palladium-catalyzed direct ortho-alkynylation of aromatic carboxylic acid derivatives, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 354-357.
[174] Giri, R.; Maugel, N.; Foxman, B. M.; Yu, J., Dehydrogenation of inert alkyl groups *via* remote C−H activation: Converting a propyl group into a π-allylic complex, *Organometallics*, **2008**, *27*, 1667-1670.
[175] a) Reddy, B. V. S; Reddy, L. R.; Corey, E. J., Novel acetoxylation and C−C coupling reactions at unactivated positions in α-amino acid derivatives, *Org. Lett*., **2006**, *8*, 3391-3394.
[176] Inoue, S.; Shiota, H.; Fukumoto, Y.; Chatani, N., Ruthenium-catalyzed carbonylation at ortho C−H bonds in aromatic amides leading to phthalimides: C−H bond activation utilizing a bidentate system, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6898-6899.
[177] Dieu, L.; Popov, T.; Daugulis, O., Copper-promoted sulfenylation of sp2 C–H bonds, *J. Am. Chem. Soc*., **2012**, *134*, 18237-18240.
[178] Song, J.; Chen, W.; Zhao, Y.; Li, C.; Liang, G.; Huang, L., Palladium-catalyzed ortho-C-H bond alkylation of benzylamides with alpha-bromo ketones, RSC. Adv., **2016**, 6, 54984-84992.

[179] Huang, L.; Sun, X.; Li, Q.; Qi, C., Palladium-catalyzed C8 alkylation of 1-naphthylamides with alkyl halides *via* bidentate-chelation assistance, *J. Org. Chem*., 2014, *79*, 6720-6725.
[180] Grosse, S.; Pillard, C.; Massip, S.; Marchivie, M.; Jarry, C.; Bernard, P.; Guillaumet, G., Ligandless Palladium-catalyzed regioselective direct C–H arylation of imidazo[1,2-a]imidazole derivatives, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 8539-8551.
[181] Pingali, S. R. K.; Upadhyay, S. K.; Jursic, B. S., Microwave assisted benzyl mono- and dibromination in diethyl carbonate as environmentaly friendly alternative to radical bromination in carbon tetrachloride, *Green. Chem.*, **2011**, *13*, 928-933.
[182] Chu, G.; Saeui, C. T.; Worm, K.; Weaver, D. G.; Goodman, A. J.; Broadrup, R. L.; Cassel, J. A.; DeHaven, R. N.; LaBuda, C. J.; Koblish, M.; Brogdon, B.; Smith, S.; Le Bourdonnec, B.; Dolle, R. E.,Novel pyridine derivatives as potent and selective CB2 cannabinoid receptor agonists ,*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5931-5935,
[183] Thapa, R.; Brown, J.; Balestri, T.; Taylor, R. T., Regioselectivity in free radical bromination of unsymmetrical dimethylated pyridines, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 6743-6746.
[184] Chinchilla, R.; Nájera, C., Recent advances in Sonogashira reactions, *Chem. Soc. Rev*., **2011**, *40*, 5084-5121.
[185] Baig, R. B. N.; Varma, R. S., Alternative energy input: mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis, *Chem. Soc. Rev*., **2012**, *41*, 1559–1584.
[186] Chinchilla, R.; Nájera, C., The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry, *Chem. Rev*. **2007**, *107*, 874−922.
[187] Mehtaa, V. P.; Van der Eycken, E. V., Microwave-assisted C–C bond forming cross-coupling reactions: an overview, *Chem. Soc. Rev*., **2011**, *40*, 4925-4936.
[188] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides". *Tetrahedron Lett*., **1979** , *20*, 3437–3440.
[189] Miyaura, N.; Ishiyama, T.; Sasaki, H.; Ishikawa, M.; Satoh, M.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed inter- and intramolecular cross-coupling reactions of R-alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane derivatives with 1-halo-1-alkenes or haloarenes. Syntheses of functionalized alkenes, arenes, and cycloalkenes *via* a hydroboration-coupling sequence, *J. Am. Chem. Soc*. **1989**, *111*, 314-321.
[190] Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Hughes, D. L.; King, A. O.; Verhoeven, T. R., Mechanistic studies of the Suzuki cross-coupling reaction, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 8151-8156.
[191] Phan, N. T. S.; Van Der Sluys, M.; Jones, J., On the nature of the active species in palladium catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura couplings – Homogeneousor heterogeneous catalysis, A critical review, *Adv. Synth. Catal*., **2006**, *348*, 609–679.
[192] Taheri, A.; Koshvandi, K.; Heravi, M. M.; Momeni, T., Current applications of Suzuki–Miyaura coupling reaction in the total synthesis of natural products: An update, *Appl Organometal Chem.*, **2018**, *32*, e4210.
[193] Biteau, N. G.; Hervin, V.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A., Suzuki-Miyaura cross-coupling as a synthetic tool for nucleoside and nucleotide modifications Chap. 3, in "Palladium-catalyzed modification of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides" Eds AR Kapdi, D Maiti & YS Sanghvi, *Elsevier* **2018**, 37-75.
[194] Polshettiwar, V.; Decottignies, A.; Len, C.; Fihri, A., Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions in aqueous media: Green and sustainable syntheses of biaryls, *ChemSusChem*, **2000**, *3*, 502-522.
[195] Felpin, F., Practical and efficient Suzuki-Miyaura cross-coupling of 2-iodocycloenones with arylboronic acids catalyzed by recyclable Pd(0)/C, *J. Org. Chem*., **2005**, *70*, 8575-8578.
[196] Marck, G.; Villiger, A.; Buchecker, R., Aryl couplings with heterogeneous palladium catalysts, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3277-3280.
[197] Hattori, T.; Tsubone, A.; Sawama, Y.; Monguchi, Y.; Sajiki, H., Palladium on carbon-catalyzed Suzuki-Miyaura coupling reaction using an eficient and continuous flow system, *Catalysts*, **2015**, *5*, 18-26.
[198] Felpin, F.; Ayad, T.; Mitra, S., Pd/C: An old catalyst for new applications – Its use for the Suzuki–Miyaura reaction. *Eur. J. Org. Chem*., **2006**, *2006*, 2679-2690.
[199] Webster, L. A.; Thomas, M.; Urbaniak, M.; Wyllie, S.; Ong, H.; Tinti, M.; Fairlamb, M. H.; Boesche, M.; Ghidelli-Disse, S.; Drewes, G.; Gilbert, I. H., Development of chemical proteomics for the folateome and analysis of the kinetoplastid folateome, *ACS Infect. Dis*., **2018**, *4*, 1475-1486.
[200] Hajian, B.; Scocchera, E.; Shoen, C.; Krucinska, J.; Viswanathan, K.; G-Dayanandan, N.; Erlandsen, H.; Estrada, A.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Cynamon, M.; Wright, D., Drugging the folate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The role of multi-targeting agents, *Cell Chem. Biol*., **2019,** *26*, 781-791.
[201] Dawadi, S.; Kordus, S. L.; Baughn, A. D.; Aldrich, C. C., Synthesis and analysis of bacterial folate metabolism intermediates and antifolates, *Org. Lett*., **2017**, *19*, 5220-5223.

Nicolas Gwenaël Biteau

Synthèse d'acyclonucléotides et hétérocycles visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante

Résumé :

Depuis une dizaine d'année, l'OMS a déclaré l'apparition de bactéries multi-résistantes comme problèmes de santé publique mondiale. Dans cette situation, la recherche de nouvelles cibles enzymatiques bactériennes et le développement de molécules actives de manières sélectives sur ces dernières est devenue un enjeu primordial. Ces dernières années, la découverte d'une nouvelle cible enzymatique appartenant à la famille des Thymidylate synthase par l'équipe du de Myllykalio et son étude complète font d'elle une cible prometteuse dans la conception de nouvelles molécules actives. Absente chez l'Homme, présente dans de nombreux pathogènes possédant de nombreuses résistances, avec une structure et un mécanisme différents faisant intervenir un couple oxydo-réducteur NADPH/FAD, cette enzyme permettrait l'inhibition sélective de bactéries pathogènes. Dans ce manuscrit, il est décrit dans un premier temps la synthèse d'analogues mixtes du dUMP/FAD de type ANPs dont les modulations portent sur la base hétérocyclique et la longueur de la chaîne acyclique via une alkylation régiosélective, une réaction de métathèse croisée et d'un couplage organopalladé. Dans un second temps le développement s'est porté sur des hétérocycliques polyazotés intercalants par SAR faisant intervenir des étapes d'alkylation régiosélective, activation CH et de couplage organopalladés. Ces divers procédés ont permis l'obtention d'une bibliothèque de molécules qui ont montré une faible activité sur la ThyX de Mycobacterium tuberculosis.

Mots clés : Bactéries multi-rrésistantes, *Mycobacterium tuberculosis*, *Thymidylate synthase*, *FDTS*, acylo nucléosides phosphonate, hétérocycles, métathèse croissée, couplage organopalladés

Synthesis of acyclonucleotides and heterocycles targeting *Flavin-Dependent Thymidylate Synthase*

Abstract :

Over the past decade, WHO has declared the emergence of multi-drug resistant bacteria as a global public health problem. In this situation, search for new bacterial enzymatic targets and development of selectively active molecules has become a key issue. In recent years, discovery of a new enzymatic target belonging to the Thymidilate synthase family by Myllykalio's team and its comprehensive study make it a promising target in the design of new active molecules. Absent in humans, present in many pathogens with many resistances, with a different structure and mechanism involving an oxydo-reducing NADPH/FAD couple, this enzyme would allow selective inhibition of pathogenic bacteria. In this manuscript, it is described at first the synthesis ANPS as mixed analogs of dUMP/FAD whose modulations relate the heterocycle and on the length of the chain by a regioselective alkylation, a cross metathesis coupling and palladium cross coupling. In a second phase the development was focus on intercalating heterocycles by SAR involving stages of regioselective alkylation, CH activation and palladium cross coupling. These various processes resulted in a library of molecules that showed low activity on Mycobacterium tuberculosis ThyX.

Keywords : Multi-resistants bacterias, *Mycobacterium tuberculosis*, *Thymidylate synthase*, *FDTS*, acyclo nucleosides phosphonates, heterocycles, cross metathesis, palladium coupling

ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de Chartres
45067 Orléans cedex 2