



HAL
open science

Recherche de nouveaux agents anti-infectieux par conception d'inhibiteurs ciblant la protéine FtsZ de *Staphylococcus aureus* et la protéase majeure (MPro) de SARS-CoV-2

Thibaut Barbier

► To cite this version:

Thibaut Barbier. Recherche de nouveaux agents anti-infectieux par conception d'inhibiteurs ciblant la protéine FtsZ de *Staphylococcus aureus* et la protéase majeure (MPro) de SARS-CoV-2. Chimie organique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10014 . tel-04022881

HAL Id: tel-04022881

<https://theses.hal.science/tel-04022881v1>

Submitted on 10 Mar 2023

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° ED206
École Doctorale de Chimie de Lyon**

Discipline : Chimie organique

Soutenue publiquement le 06/10/2022, par :

Thibaut Barbier

**Recherche de nouveaux agents anti-
infectieux par conception d'inhibiteurs
ciblant la protéine FtsZ de *Staphylococcus
aureus* et la protéase majeure (M^{Pro}) de
SARS-CoV-2**

Devant le jury composé de :

M. LOMBERGET Thierry, Professeur des Universités, Université de Lyon	Président
M. BOUMENDJEL Ahcène, Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes	Rapporteur
M ^{me} MOREAU Pascale, Professeure des Universités, Université Clermont Auvergne	Rapporteuse
M ^{me} GUILLOU Catherine, Directrice de recherche, Université Paris-Saclay	Examinatrice
M ^{me} HIEBEL Marie-Aude, Maître de conférences, Université d'Orléans	Examinatrice
M. LINA Gérard, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lyon	Examinateur
M. SOULERE Laurent, Maître de conférences, INSA de Lyon	Directeur de thèse
M. QUENEAU Yves, Directeur de recherche, INSA de Lyon	Co-encadrant de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Pr Pascale MOREAU et le Pr Ahcène BOUMENDJEL d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ce manuscrit, ainsi que la Pr Catherine GUILLOU, la Dr Marie-Aude HIEBEL et le Pr Thierry LOMBERGET d'avoir également accepté d'évaluer mon travail.

Un immense merci à mon directeur de thèse, le Dr Laurent SOULÈRE, pour son encadrement, ses conseils et sa patience. Ce fut un réel plaisir de passer ces trois années de thèse sous ta direction marquée par une gentillesse et une bienveillance rare. Je te suis infiniment reconnaissant pour la qualité de l'environnement de travail que tu as pu générer. Tout ça m'en ferait presque oublier ton amour pour le Stade Toulousain et tes calembours (parfois) déplorable !

Un grand merci également à mon co-encadrant, le Dr Yves QUENEAU, pour la pertinence de ses multiples conseils. J'espère avoir acquis un peu de votre talent pour l'écriture.

Je tiens également à remercier le Pr Gérard LINA pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et accueilli au sein de son équipe. C'est grâce à vous que j'ai pu continuer de développer la part de biologiste qui est en moi en me permettant de venir tester moi-même mes produits, et je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Merci également à la Dr Christelle MARMINON et au Pr Patrice GOUET d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir ont vraiment participé à l'avancée de ce projet.

Je tiens évidemment à adresser un énorme merci à tous mes collègues de l'équipe COB qui ont eu le courage de me supporter durant ces trois années. Stéphane, souvent moqueur mais jamais méchant (et parfois un poil désespérant). Mohammed, avec tes anecdotes sur la chimie « à l'ancienne ». Sylvie, merci pour tes délicieux bredele et pour tes conseils avisés sur les tableaux dans Word. Eman, Rafael : what a trio we made ! I miss hanging out with you two. Jordan, plus jamais je ne fais de rando avec toi, j'ai suffisamment donné ! En revanche, tes chorés sur Beyoncé et High School Musical valent le détour. Quant aux jeux de mots pourris, vous vous valez avec Adrien. Flavien, tes histoires sur Pousse-Mousse me feront toujours autant rire (et tu n'en manques jamais). Et tu réussirais presque à faire passer Dijon et Besançon pour le paradis sur Terre ! Plus généralement, un grand merci à tous ceux qui sont passés dans l'équipe au cours de ces trois ans : Johal, Javier, Lianjie, Qiang, Yue, Jingjing, Pauline, Jordan, Adama, Marian, Solweig, Abdoulaye et Baptiste. Enfin, trois mentions spéciales.

Lucie, mon schtroumpf grognon préféré, je ne peux qu'imaginer ton soulagement à l'idée de me voir enfin débarrasser le plancher, mais n'abuse pas trop de gâteau au chocolat : ça donne mal à la tête (surtout à ton âge). Et attention à la propreté de ta paillasse !

Maïwenn, merci pour ton oreille attentive pendant toutes ces heures à m'écouter te raconter ma vie, ça devait te paraître long... Merci aussi pour nos soirées, chez toi, au Ninkasi ou ailleurs (même si tu triches à Just Dance, il faut que ce soit dit !). Profite bien de ta nouvelle vie ;) *Obrigado* également à Cris pour ta gentillesse et ces supers moments passés ensemble.

Florence, un énorme merci pour tout. Même si je faisais partie des derniers irréductibles à ne pas être un de tes poulains, tu as toujours trouvé le temps pour des discussions scientifiques de qualité. Merci aussi pour les randos (dont une célèbre montée à Fourvière), les après-midi jeux, les raclées au tennis ou au bras de fer et globalement tout ce qui nous a permis de construire cette amitié.

Un grand merci à mes collègues de l'équipe StaPath au CIRI qui ont accepté d'accueillir le chimiste que je suis parmi eux. Alexia, merci de m'avoir pris sous ton aile au début et de m'avoir formé. C'est aussi grâce à toi que j'ai pu m'épanouir dans mon projet de thèse en ne me limitant pas à la synthèse. Cédric, merci pour tout ce que tu as fait. Dans le doute, je pouvais toujours venir te voir, et tu étais toujours de bon conseil. Floriane, merci pour tous les coups de main que tu m'as donnés, que je sois sur place ou loin, tu étais toujours prête à m'aider. Et on a réussi à s'en sortir avec la cytotox ! Mona, merci pour nos échanges par mail très instructifs, que ce soit pour la rédaction des publis ou l'expérience au microscope à fluorescence. Merci également à Mariane, Pauline, Florence, Chloé, Maëlle, Katia et à toutes celles et ceux que je n'ai pas cités. Même si on ne s'est pas souvent vu, votre bonne humeur et votre gentillesse me donnait envie de revenir à chaque fois que je passais la porte du labo.

Merci à mes collègues de l'équipe pédagogique de chimie organique, et en particulier à mes partenaires de TP. Mention spéciale pour Didier : merci (et désolé) pour toutes ces fois où je venais te voir quand j'avais un doute en corrigeant mes copies.

J'adresse évidemment un immense merci à tous mes amis qui ont été présents et m'ont soutenu au cours de la thèse. Fanny, mon Golgoth, quel plaisir que de t'avoir sur Lyon. Merci pour nos brunchs, goûters, apéros et autres soirées (et pour ton brownie très riche, un vrai morceau d'immortalité). Merci également pour ta spontanéité légendaire (*too much information*), et pour avoir apporté Fifi et Arthur (et du Nutella ?) dans tes valises. Inès, mon Lapindawan. On s'est lancé ensemble dans cette galère, et on

ne s'est jamais lâché. On a toujours été là l'un pour l'autre, dans les hauts comme dans les bas, et ce n'est pas près de finir. J'ai de la chance de t'avoir pour amie. Mathilde, nos cours de chimie orga de L1 commencent à dater, et pourtant tu me supports toujours ! Vincent, je ne préfère pas savoir le nombre d'heures qu'on a passé en ligne à occuper nos soirs de confinement. Veronica et Alexia, merci pour toutes nos randos, et pour ne m'avoir jamais laissé tomber, y compris au sens propre du terme quand je « faisais une Thibaut » ! Merci à Auguste, Dylan et Clément, le Fan-Club de Chaton, pour tous ces moments passés ensemble. Enfin, merci à mes plantes vertes qui, outre prendre de la place dans mon cœur, prennent une place certaine dans mon appartement.

Malvina, mon gars sûr, mon pelo, ma choute. Merci d'avoir été là ces derniers mois. J'ai vraiment de la chance de t'avoir dans ma vie. A vrai dire, tout ce que je pourrais t'écrire ici, tu le sais déjà. Je vais donc plutôt en profiter pour te transférer mon titre autoproclamé de Happiness Manager. C'est désormais ton fardeau, ta croix, ton sacerdoce : à toi d'organiser (entre autres) le prochain Secret Santa !

Je finirai par remercier ma famille qui m'a soutenu tout au long de ces trois ans. Mes parents, déjà, pour qui mon travail pouvait paraître obscur mais qui ont quand même tenté de comprendre ce que je faisais. Papa, je suis sûr que tu es désormais au fait des différentes étapes lors de la révision d'un article scientifique. Maman, ça fait un an que tu me demandes la date de ma soutenance, je peux enfin te la donner ! Mais aussi Sylvain, mon GS, qui aurait cru il y a deux ans que je passerais autant de week-ends sur ton canapé. Je remercie aussi Raphaël, qui du haut de ses 3 ans et demi n'est sans doute pas près de lire cette thèse, mais qui fait de moi un tonton *légèrement* gaga.

Mention particulière pour ma sœur, Julie. Comme tu peux le voir sur la couverture, et malgré le fait que tu aies affirmé le contraire pendant trois ans, c'est bel et bien en chimie que je vais être diplômé ! Merci pour ton soutien indéfectible au cours de ces trois ans, pour tes relectures de dernière minute, pour toutes ces fois où on s'est appelé « juste 5 min », pour tes barbiérismes et autres boulettes qui me font toujours autant rire. Bref, merci d'être toi.

Merci à tous et à toutes.

Résumé

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent la recherche de molécules anti-infectieuses ciblant respectivement la protéine FtsZ de *Staphylococcus aureus* et la protéase majeure de SARS-CoV-2.

Une stratégie pour lutter contre les pathogènes antibiorésistants est de développer des molécules ayant un nouveau mécanisme d'action. FtsZ, protéine essentielle de la division bactérienne, est donc une cible de choix. Deux approches ont été utilisées pour identifier de nouveaux inhibiteurs de cette protéine. D'une part, des composés portant un motif 2,6-difluorobenzamide, pharmacophore récurrent chez les inhibiteurs de FtsZ, ont été développés. D'autre part, le criblage virtuel par docking au sein de la poche allostérique de FtsZ de deux chimiothèques a été réalisé. Les *hits* potentiels ont été synthétisés et testés, permettant en particulier d'identifier des dérivés benzo[*b*]thiophènes présentant une activité antibactérienne. L'action sur le divisome et la cytotoxicité des meilleurs composés issus de chaque démarche ont été évaluées.

La recherche de nouveaux antiviraux pour lutter contre la pandémie de COVID-19 causée par le SARS-CoV-2 a été au cœur de nombreuses études depuis deux ans. La protéase majeure (M^{Pro}) est une cible pertinente car elle est indispensable à la réplication virale. Deux études de criblage virtuel par docking ont été entreprises pour identifier de potentiels inhibiteurs de cette protéase. La première a été réalisée sur des chimiothèques d'électrophiles mous pouvant agir comme inhibiteurs covalents. La deuxième visait quant à elle à trouver des molécules potentiellement actives sur SARS-CoV-2 parmi une chimiothèque d'inhibiteurs connus de la protéase majeure du coronavirus aviaire. La stabilité des complexes entre les inhibiteurs non-covalents potentiels et la protéine a ensuite été étudiée par dynamique moléculaire.

Mots-clés : *S. aureus*, FtsZ, SARS-CoV-2, M^{Pro}, criblage virtuel, inhibition

Abstract

The work presented in this manuscript describes the research of anti-infective agents targeting respectively the protein FtsZ of *Staphylococcus aureus* and the main protease of SARS-CoV-2.

A strategy to fight drug-resistant pathogens is to develop molecules with a new mode of action. FtsZ, an essential protein for bacterial division, is therefore a prime target. Two approaches were used to identify new inhibitors of this protein. On the one hand, compounds bearing a 2,6-difluorobenzamide moiety, a recurrent pharmacophore in FtsZ inhibitors, were developed. On the other hand, the virtual screening by docking in the allosteric pocket of FtsZ of two chemical libraries was performed. The identified potential hits were synthesized and tested, allowing in particular the identification of benzo[*b*]thiophene derivatives showing an antibacterial activity. The action on divisome and the cytotoxicity of the best compounds from each approach were assayed.

Research of new antiviral agents to fight the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 was at the heart of many studies over the past two years. The main protease (M^{Pro}) is a relevant target for it is essential for viral replication. Two virtual screening studies by docking were undertaken to identify potential inhibitors of this protease. The first one was performed on soft electrophiles chemical libraries, theoretically able to act as covalent inhibitors. The second one aimed at the discovery of compounds potentially active on SARS-CoV-2 amongst a library of avian coronavirus' main protease known inhibitors. The stability of the complexes between the potential reversible inhibitors and the protein was studied by molecular dynamics studies.

Keywords: *S. aureus*, FtsZ, SARS-CoV-2, M^{Pro}, virtual screening, inhibition

Table des abréviations

3-MBA	3-méthoxybenzamide	IBV	Infectious bronchitis virus
ACN	Acétonitrile	K_D	Constante de dissociation
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination	LA-MRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ANP	Acide nucléique peptidique	LBVS	Ligand-based virtual screening
aq.	Aqueux	MciZ	Mother cell inhibitor of FtsZ
ARNg	ARN génomique	M ^{Pro}	Main protease
ARNg+	ARN génomique de polarité positive	NBD	Nucleotide-binding domain
ARNm	Acide ribonucléique messenger	ND	Non-déterminé
BHI	Brain-Heart Infusion	OMS	Organisation mondiale de la santé
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle	PBP2a	Penicillin-binding protein 2A
BsFtsZ	FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i>	PL ^{Pro}	Papain-like protease
CaMHB	Cation-adjusted Mueller Hilton Broth II	Protéine E	Protéine de l'enveloppe
CA-MRSA	Community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Protéine M	Protéine de la membrane
CAN	Cerium Ammonium Nitrate	Protéine N	Protéine de la nucléocapside
cat.	Catalytique	Protéine S	Protéine Spike
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50	PSA	Polar surface area
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	RdRp	RNA-dependant RNA polymerase
CMI	Concentration minimale inhibitrice	RMN	Résonance magnétique nucléaire
COVID-19	Coronavirus disease 2019	SaFtsZ	FtsZ de <i>Staphylococcus aureus</i>
CRAMP	Cathelin-related antimicrobial peptide	SAIV	<i>Staphylococcus aureus</i> de résistance intermédiaire à la vancomycine
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	SARD	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la daptomycine
DFNBA	2,6-Difluoro-3-nonyloxybenzamide	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate	SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
DIPEA	Diisopropyléthylamine	SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine	SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
DMF	Diméthylformamide	SBVS	Structure-based virtual screening
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SM	Spectrométrie de masse
DPPA	Diphenylphosphoryl azide	t.a.	Température ambiante
Et ₃ N	Triéthylamine	TFA	Trifluoroacetic acid
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z	THF	Tétrahydrofurane
GDP	Guanosine diphosphate	TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
GTP	Guanosine triphosphate	VHC	Virus de l'hépatite C
HA-MRSA	Healthcare-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RESUME	6
ABSTRACT	7
TABLE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION GENERALE	13
PARTIE 1 – CONCEPTION D’INHIBITEURS DE LA PROTEINE FTSZ DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	15
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	17
I. <i>La lutte contre Staphylococcus aureus</i>	19
1. Introduction	19
2. L’utilisation des antibiotiques contre <i>S. aureus</i> et ses limites.....	20
II. <i>La protéine FtsZ et le divisome bactérien</i>	22
1. Structure de la protéine FtsZ	22
2. Action de FtsZ dans le divisome bactérien.....	23
2.1. Polymérisation en présence de GTP	24
2.2. Formation de l’anneau Z.....	24
2.3. Contraction de l’anneau Z	24
2.4. Dépolymérisation	25
3. Inhibition de FtsZ	25
3.1. Inhibiteurs ciblant le site de liaison au GTP.....	26
3.2. Inhibiteurs ciblant la poche allostérique	31
3.3. Autres inhibiteurs et stratégies	46
3.4. Conclusion	51
III. <i>Objectifs du projet</i>	52
CHAPITRE 2 – VARIATIONS DU NOYAU A CINQ CHAINONS CENTRAL DANS DES COMPOSES TRICYCLIQUES DE TYPE BENZAMIDE	55
I. <i>Introduction et démarche</i>	57
II. <i>Synthèse des séries I, II, III, IV et V et évaluation biologique sur S. aureus</i>	60
1. Synthèse des composés	60
2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i>	67
III. <i>Evaluations biologiques supplémentaires du dérivé II.c</i>	71
1. Etude du mode d’action de II.c par microscopie à fluorescence	71
2. Etude de la cytotoxicité de II.c sur des cellules A549.....	73
IV. <i>Influence de la substitution du groupe méthylène : application à la série II</i>	75
1. Synthèse des dérivés méthylés (série VI).....	75
2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i> des composés de la série VI	78
V. <i>Etudes de modélisation moléculaire et de pharmacocinétique prédictive</i>	79
1. Etudes de docking	79
2. Etudes de pharmacocinétique prédictive	85
VI. <i>Conclusion</i>	86
CHAPITRE 3 – ÉTUDE DU PHARMACOPHORE 2,6-DIFLUOROBENZAMIDE : ANALOGUES ET DIMERES.....	89
I. <i>Introduction et démarche</i>	91
II. <i>Conception, synthèse et évaluation biologique d’analogues du 2,6-difluorobenzamide</i>	92
1. Synthèse des séries VII, VIII, IX et X.....	93
2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i> et études de docking.....	98
3. Conclusion.....	100
III. <i>Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés dimériques de 2,6-difluorobenzamide</i> ..	100
1. Synthèse des séries XI, XII et XIII	102
2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i>	104
3. Conclusion.....	106

CHAPITRE 4 – UTILISATION DU CRIBLAGE VIRTUEL POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX INHIBITEURS POTENTIELS DE FtsZ	109
I. Introduction et démarche	111
II. Base de données Asinex	113
1. Synthèse des dérivés biphényles (série XIV)	113
2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i>	115
III. Base de données PubChem	115
1. Criblage virtuel	115
2. Dérivés furanes (série XV)	117
2.1. Synthèse	118
2.2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i>	120
3. Dérivés benzo[b]thiophènes (série XVI)	122
3.1. Synthèse	122
3.2. Evaluation biologique sur <i>S. aureus</i>	124
3.3. Diversifications structurales basées sur XVI.a et XVI.c (série XVII)	126
3.4. Diversifications structurales basées sur XVII.b (série XVIII)	129
3.5. Etude du mode d'action de XVII.b par microscopie à fluorescence	134
3.6. Etude de la cytotoxicité de XVII.b sur des cellules A549	136
IV. Conclusion	137
CONCLUSION DE LA PARTIE 1	140
PARTIE 2 – IDENTIFICATION D'INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PROTEASE MAJEURE DE SARS-COV-2	144
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	146
I. SARS-CoV-2 et la pandémie de COVID-19	148
1. Introduction	148
2. Réplication de SARS-CoV-2	149
3. Exemples de stratégies antivirales pour lutter contre le COVID-19	150
II. Protéase majeure de SARS-CoV-2	151
1. Structure et mécanisme d'action	151
2. Stratégies pour la découverte d'inhibiteurs de M ^{Pro}	153
2.1. Identification <i>in vitro</i>	153
2.2. Identification <i>in silico</i>	155
3. Conclusion	158
III. Objectifs du projet	158
CHAPITRE 2 – UTILISATION DU CRIBLAGE VIRTUEL POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX INHIBITEURS COVALENTS POTENTIELS DE LA PROTEASE MAJEURE DE SARS-COV-2	162
I. Introduction et démarche	164
II. Validation de la démarche de docking	165
III. Criblage virtuel d'une chimiothèque d'électrophiles mous	166
1. Construction de la chimiothèque	166
2. Criblage virtuel de la chimiothèque	167
IV. Criblage virtuel d'une chimiothèque de médicaments actuellement sur le marché	172
1. Construction de la chimiothèque	172
2. Criblage virtuel de la chimiothèque	172
V. Conclusion	175
CHAPITRE 3 – EXPLOITATION DE L'HOMOLOGIE ENTRE LES PROTEASES MAJEURES DU CORONAVIRUS AVIAIRE ET DE SARS-COV-2 POUR LA RECHERCHE D'INHIBITEURS POTENTIELS PAR CRIBLAGE VIRTUEL	178
I. Introduction et démarche	180
II. Etude d'homologie	181
III. Inhibiteurs non-covalents potentiels	183
1. Criblage virtuel	183
2. Dynamique moléculaire	187
2.1. Principe de la dynamique moléculaire	187
2.2. Résultats de l'étude de dynamique	187

IV. <i>Inhibiteurs covalents potentiels</i>	190
V. <i>Etudes de pharmacocinétique prédictive</i>	190
VI. <i>Conclusion</i>	194
CONCLUSION DE LA PARTIE 2	196
CONCLUSION GENERALE	200
PARTIE 3 – DONNÉES EXPÉRIMENTALES	202
<i>I. Chemistry</i>	204
1. Part 1 – Chapter 2	204
1.1. Procedures for 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide	204
1.2. Procedures for 1,2,3-triazole derivatives from series I	206
1.3. Procedures for 1,2,4-oxadiazoles derivatives from series II	209
1.4. Procedures for 1,2,4-oxadiazoles derivatives from series III	215
1.5. Procedures for 1,3,4-oxadiazoles derivatives from series IV	219
1.6. Procedures for furans from series V	225
1.7. Procedures for 1,2,4-oxadiazoles from series VI	230
2. Part 1 – Chapter 3	234
2.1. Procedures for benzamides from series VII	234
2.2. Procedures for 3-(hexyloxy)benzoic acids	236
2.3. Procedures for hydrazides from series VIII	239
2.4. Procedures for hydroxamic acids from series IX	242
2.5. Procedures for ureas from series X	245
2.6. Procedures for ethers from series XI	247
2.7. Procedures for esters from series XII	250
2.8. Procedures for amides from series XIII	255
3. Part 1 – Chapter 4	257
3.1. Procedures for biphenyls from series XIV	257
3.2. Procedures for furans from series XV	260
3.3. Procedures for benzo[b]thiophenes from series XVI	265
3.4. Procedures for benzo[b]thiophenes from series XVII	273
3.5. Procedures for benzo[b]thiophenes from series XVIII	279
<i>II. Biology</i>	288
1. Minimum inhibitory concentration evaluation	288
2. Divisome inhibition assay	288
3. Cytotoxicity assay	288
<i>III. Molecular modeling</i>	289
1. Part 1 – Chapter 2	289
2. Part 1 – Chapter 3	289
3. Part 1 – Chapter 4	289
3.1. Shape-based method	289
3.2. Stochastic method	290
4. Part 2 – Chapter 2	290
4.1. Docking studies of known main protease inhibitors in the catalytic site	290
4.2. Docking-based virtual screening of potential covalent inhibitors	290
4.3. Docking-based virtual screening of approved covalent drugs	290
5. Part 2 – Chapter 3	291
5.1. Homology studies	291
5.2. Docking-based virtual screening of IBV main protease inhibitors for the reversible inhibition of SARS-CoV-2's main protease	291
5.3. Molecular dynamics studies	291
5.4. Docking-based virtual screening of IBV main protease inhibitors for the covalent inhibition of SARS-CoV-2's main protease	292
PARTIE 4 – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	294

Introduction générale

Ce manuscrit décrit mes travaux de thèse de conception, de synthèse organique, d'évaluation biologique et de modélisation moléculaire visant à l'identification de nouveaux agents anti-infectieux.

Une première partie, principale, porte sur la recherche d'inhibiteurs de FtsZ à visée anti-staphylococcique et se divise en cinq chapitres, à savoir i) une introduction exposant les informations clés sur *Staphylococcus aureus*, FtsZ et son inhibition, ii) trois chapitres développant les trois démarches appliquées pour la découverte de nouveaux composés bioactifs suivis de iii) une conclusion générale sur ces travaux.

La deuxième partie porte sur la recherche par criblage virtuel d'inhibiteurs de la protéase majeure de SARS-CoV-2, virus responsable de la pandémie de COVID-19. Quatre chapitres sont présentés ici, regroupant i) une introduction portant sur la protéase majeure de SARS-CoV-2 et les stratégies employées pour découvrir de petites molécules capables de l'inhiber, ii) deux chapitres décrivant les deux approches de criblage virtuel et iii) la conclusion de cette partie.

Vient ensuite une partie qui regroupe l'ensemble des données expérimentales des travaux présentés dans la thèse, à savoir les voies de synthèse des produits et leurs caractérisations, les protocoles des évaluations biologiques et les paramètres des études de modélisation moléculaire.

Le manuscrit est enfin complété par l'ensemble des références bibliographiques.

La réalisation de ce projet a été impactée par la pandémie de COVID-19 et les confinements qui en ont résulté, ce qui a eu pour conséquence une réduction du temps de présence au laboratoire. Une demande de prolongation de contrat doctoral de deux mois a alors été demandée à l'université mais celle-ci a été refusée. L'impact a cependant pu être limité en consacrant une partie du temps hors du laboratoire à des études de modélisation moléculaire.

Ce projet de thèse est le fruit d'une collaboration entre deux unités de recherche de la région lyonnaise. La partie chimie et modélisation moléculaire a été réalisée dans l'équipe de Chimie Organique et Bioorganique (COB-INSA) dirigée par le Dr Yves QUENEAU à l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS, UMR5246) à Villeurbanne. La partie biologie a été faite au sein du groupe du Pr Gérard LINA dans l'équipe Pathogénie des Staphylocoques (StaPath) dirigée par le Pr François VANDENESCH au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, INSERM U1111) à Lyon.

PARTIE 1

—

Conception d'inhibiteurs de la protéine
FtsZ de *Staphylococcus aureus*

Chapitre 1

—

Introduction

I. La lutte contre *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

Si le XX^{ème} siècle est celui de l'essor des antibiotiques avec la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, le XXI^{ème} siècle est quant à lui le siècle de l'antibiorésistance. Environ 700 000 décès sont attribués chaque année à des infections causées par des pathogènes résistant aux antibiotiques, et ce nombre pourrait atteindre 10 millions d'ici 2050¹.

Face à l'urgence de la situation, en février 2017, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié une liste de douze pathogènes pour lesquels de nouveaux antibiotiques sont urgemment nécessaires (Tableau 1)². Au sein de cette liste, on retrouve entre autres les six bactéries souvent regroupées sous l'acronyme ESKAPE, exprimant leur capacité à échapper à l'effet des antibiotiques couramment utilisés contre elles : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (de la famille des Enterobacteriaceae), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter* spp³. Le travail présenté dans ce manuscrit sera consacré à *S. aureus*.

Tableau 1 : Liste établie par l'OMS des pathogènes pour lesquelles la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques doit être une priorité.

Priorité 1 : Critique	Priorité 2 : Elevée	Priorité 3 : Moyenne
<i>Acinetobacter baumannii</i> Résistant aux carbapénèmes	<i>Enterococcus faecium</i> Résistant à la vancomycine	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Non-susceptible à la pénicilline
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Résistant aux carbapénèmes	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la méticilline Résistant et de résistance intermédiaire à la vancomycine	<i>Haemophilus influenzae</i> Résistant à l'ampicilline
<i>Enterobacteriaceae</i> Résistant aux carbapénèmes Produisant des BLSE (β - lactamases à spectre élargi)	<i>Helicobacter pylori</i> Résistant à la clarithromycine	<i>Shigella</i> spp. Résistant aux fluoroquinolones
	<i>Campylobacter</i> spp. Résistant aux fluoroquinolones	
	<i>Salmonellae</i> Résistant aux fluoroquinolones	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Résistant aux céphalosporines Résistant aux fluoroquinolones	

Staphylococcus aureus est une bactérie gram-positif du genre *Staphylococcus* découverte dans les années 1880 dont le nom provient de sa couleur jaune, causée par des pigments caroténoïdes^{4,5}. C'est à l'origine une bactérie commensale chez l'homme, portée par environ 30 % de la population, en particulier dans les fosses nasales⁶.

Cependant, c'est également un pathogène opportuniste, responsable de nombreuses infections⁷. *S. aureus* est en effet la première cause d'endocardite infectieuse à travers le monde, une pathologie cardiaque rare mais fatale dans 20 % des cas^{8,9}. Cette bactérie est également responsable d'un grand nombre d'infections de la peau et des tissus mous ou d'infections ostéoarticulaires comme l'ostéomyélite^{10,11}.

2. L'utilisation des antibiotiques contre *S. aureus* et ses limites

L'utilisation massive d'antibiotiques pour lutter contre les infections à *S. aureus* a entraîné l'émergence de souches résistantes. Dès les années 1950, de premières souches résistantes à la pénicilline ont été découvertes, portant le gène *blaZ* de la β -lactamase^{12,13}. A la fin des années 1990, moins de 5 % des isolats étaient encore sensibles à la pénicilline G, bien qu'il soit possible que ce pourcentage soit aujourd'hui plus élevé^{6,14}. Cette résistance a dans un premier temps été contrée par l'utilisation de méticilline, une pénicilline semi-synthétique résistante à la pénicillinase (Figure 1). Cependant en 1961, seulement deux ans après le début de son utilisation, une première souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) a été identifiée¹⁵. Cette résistance est due à la présence des gènes *mec*, codant pour la PBP2a (*Penicillin-Binding Protein 2A*), une enzyme responsable de la formation du peptidoglycane et ayant une faible affinité pour les β -lactames^{13,16}.

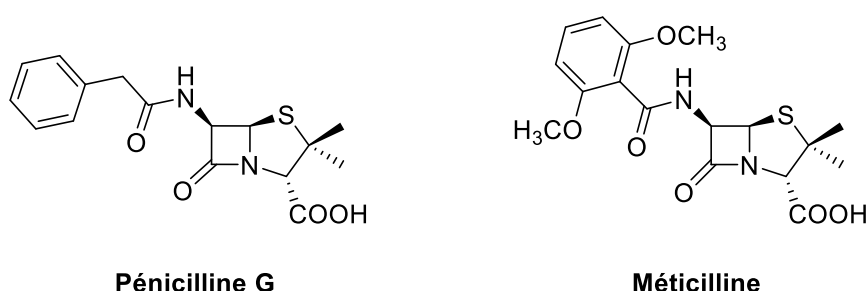
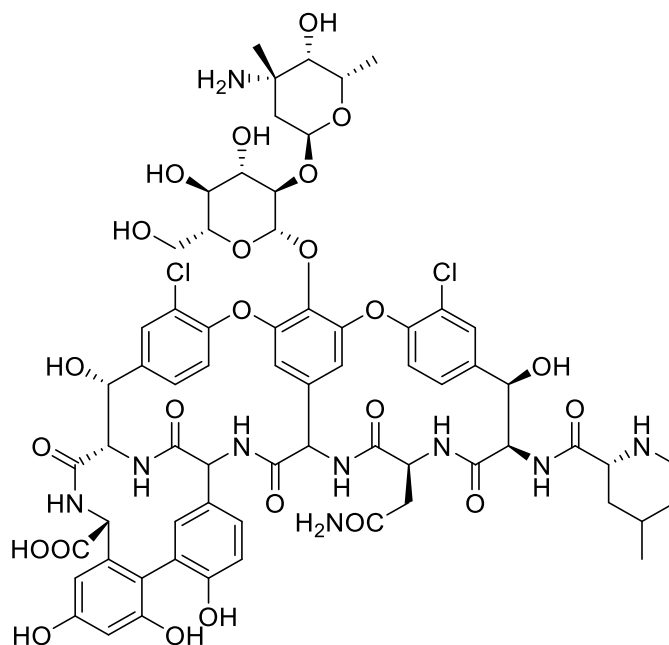


Figure 1 : Structures de la pénicilline G et de la méticilline.

La vancomycine (Figure 2), un glycopeptide découvert en 1952, s'est ensuite imposée comme le traitement de référence pour les infections au SARM et reste utilisée aujourd'hui encore¹⁷. Simultanément, de premières souches d'entérocoques résistant à la vancomycine ont émergé, suivi au début des années 2000 de souches de *S. aureus* résistant à la vancomycine (SARV) portant les mêmes gènes *van*, responsable du phénomène de résistance^{18,19}. Des souches de SARM modérément résistantes à la vancomycine (*S. aureus* de résistance intermédiaire à la vancomycine ou SAIV) ont également été isolées dès la fin des années 1990²⁰. En 2020, 52 souches de SARV portant les gènes *van* avaient été rapportées, et la prévalence de ces souches est passée de 2 % avant 2006 à 7 % en 2020, traduisant une progression inquiétante de ces souches parmi les infections à *S. aureus*^{21,22}. D'autres antibiotiques sont également utilisés pour lutter contre les infections à SARM, tels que la daptomycine, le linezolid ou différents glycolipopetides²³⁻²⁶. Il est cependant à noter que la méticilline et la vancomycine ne

sont pas les seuls antibiotiques touchés par des phénomènes de résistance. En effet, des gènes responsables de la résistance à d'autres antibiotiques (comme l'érythromycine, la clindamycine ou les tétracyclines) ont été retrouvés indépendamment chez différentes souches de SARM ou de SASM (*S. aureus* sensible à la méticilline)¹³.



Vancomycine

Figure 2 : Structure de la vancomycine.

Si à l'origine les infections à SARM étaient d'origine nosocomiales (HA-MRSA, *healthcare-associated methicillin-resistant S. aureus*), des souches résistantes ont par la suite été retrouvées chez des patients n'ayant pas fréquenté d'établissement de santé. Ces infections sont alors qualifiées d'origine communautaire (CA-MRSA, *community-associated methicillin-resistant S. aureus*)²⁷. Plus récemment encore, des cas d'infection au SARM ont également été attribués à l'exposition à du bétail (LA-MRSA, *livestock-associated methicillin-resistant S. aureus*)^{28,29}. Par conséquent, les souches antibiorésistantes de *S. aureus* ne se limitent plus aux établissements de santé, mais sont désormais présentes partout.

Il devient donc urgent de contrer l'expansion du SARM et du SARV, et une méthode pour trouver de nouveaux antibiotiques est d'utiliser des cibles pharmacologiques différentes. Parmi les méthodes actuellement en développement, on peut citer entre autres les bactériophages (seuls ou combinés à des antibiotiques classiques) ainsi que des anticorps monoclonaux ciblant par exemple la PBP2a ou la protéine A³⁰⁻³³. Une autre stratégie possible est de cibler le divisome bactérien.

II. La protéine FtsZ et le divisome bactérien

La division cellulaire chez les bactéries est un processus complexe impliquant de nombreux systèmes, responsables par exemple de la réplication du matériel génétique, de la ségrégation des chromosomes ou encore de la synthèse du peptidoglycane et de la cytokinèse. Cette dernière est régie par le divisome, un complexe protéique qui s'assemble au milieu de la bactérie lors de la division et qui permet de séparer la cellule-mère en deux cellules filles. Parmi les différentes protéines impliquées dans le divisome, FtsZ a un rôle clé³⁴.

FtsZ (**F**ilamenting **t**emperature-**s**ensitive mutant **Z**) est une protéine cytoplasmique du cytosquelette bactérien découverte chez *Escherichia coli* en 1980³⁵. Cette protéine hydrolysant le GTP (guanosine triphosphate) est une homologue de la tubuline eucaryote, bien que les deux protéines partagent moins de 20 % d'identité³⁶. La structure de FtsZ est en revanche très conservée entre les eubactéries et les archées, et on retrouve également cette protéine dans quelques organelles eucaryotes comme les chloroplastes ou les mitochondries³⁷.

1. Structure de la protéine FtsZ

FtsZ consiste en une protéine globulaire formée de deux domaines, N-terminal et C-terminal, reliés entre eux par l'hélice H7 ainsi que la boucle T7 (Figure 3)^{38,39}.

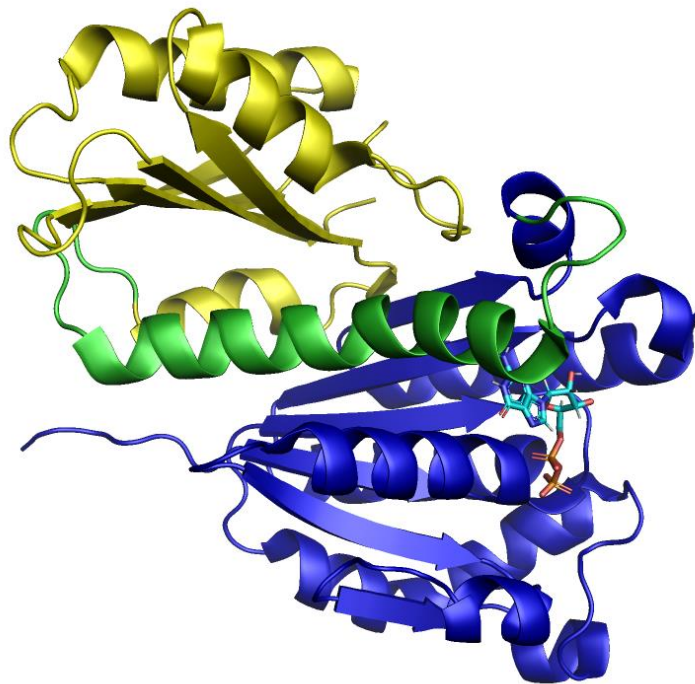


Figure 3 : Structure de FtsZ chez *S. aureus* (SaFtsZ, code PDB : 6RVN)⁴⁰. Bleu : domaine N-terminal ; jaune : domaine C-terminal ; vert : hélice H7 et boucle T7 ; cyan : guanosine diphosphate (GDP).

Le domaine N-terminal est constitué de six feuillets β parallèles (S1-S6) encadrés par cinq hélices α (H1-H6, deux d'un côté et trois de l'autre) et contient la poche de liaison au nucléotide (NBD, pour *nucleotide-binding domain*, résidus 12-171) permettant la liaison et l'hydrolyse du GTP. Le domaine C-terminal est quant à lui constitué de quatre feuillets β (S7-S10) majoritairement parallèles encadré par trois hélices α (H8-H10, deux d'un côté et une de l'autre)³⁹.

2. Action de FtsZ dans le divisome bactérien

L'action de FtsZ dans la cytokinèse bactérienne se fait en quatre étapes, comme montré dans la Figure 4. Brièvement, FtsZ polymérise en présence de GTP pour former des protofilaments qui s'agencent au milieu de la bactérie pour former l'anneau Z. La contraction de ce dernier permet la cytokinèse, ce qui entraîne la dépolymérisation subséquente des protofilaments et la disparition de l'anneau Z.

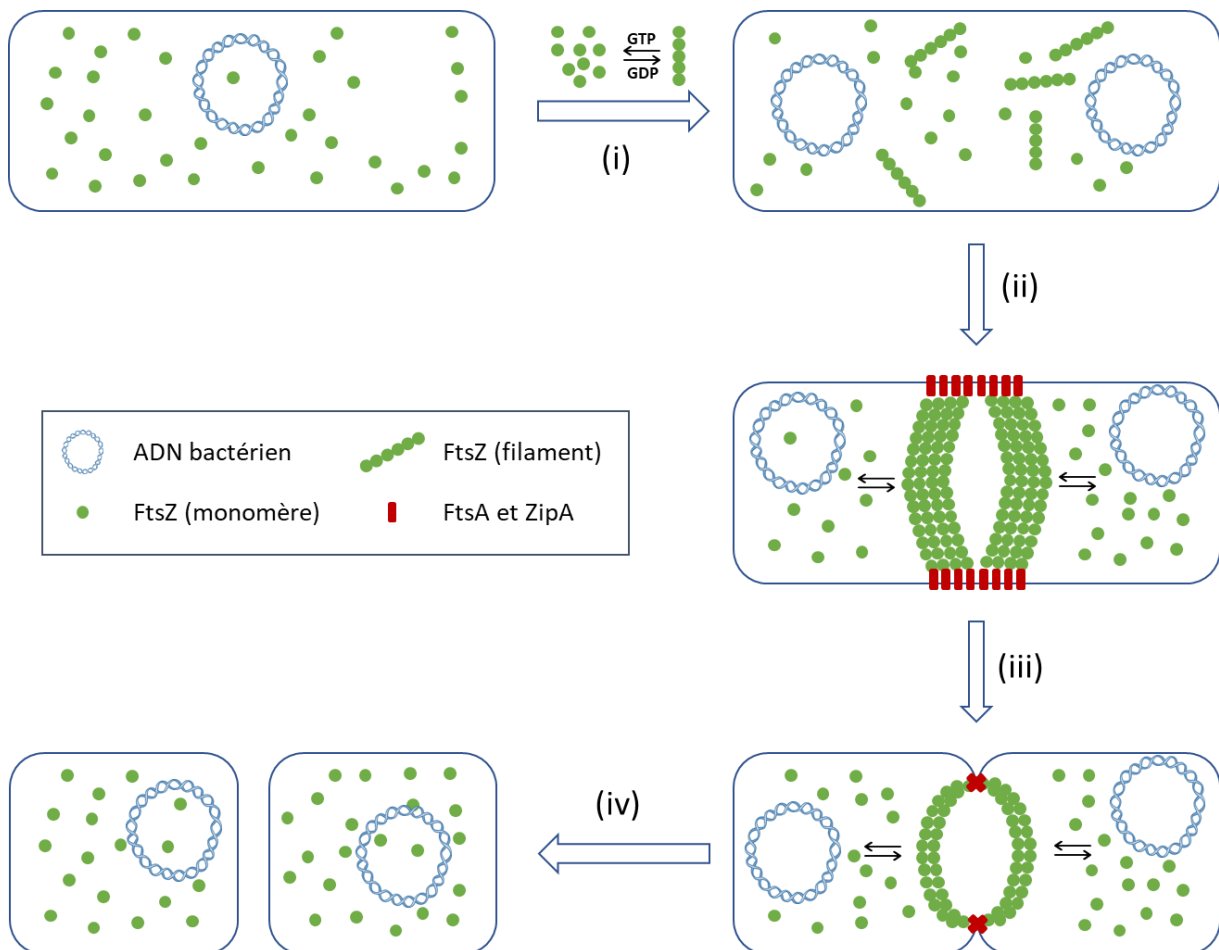


Figure 4 : Action de FtsZ dans la cytokinèse bactérienne. (i) Polymérisation en présence de GTP. (ii) Formation de l'anneau Z. (iii) Contraction de l'anneau Z. (iv) Dépolymérisation.

2.1. Polymérisation en présence de GTP

A l'instar de la tubuline homologue, FtsZ est capable de polymériser sous forme de filaments. Les monomères de FtsZ se lient dans un premier temps au GTP au sein du NBD, dans le domaine N-terminal. Un équilibre se fait entre la liaison au GTP et la liaison au GDP (par hydrolyse du GTP ou par liaison au GDP en solution) mais cet équilibre est déplacé vers le complexe FtsZ-GTP, plus stable⁴¹. La protéine, initialement dans une conformation dite « fermée », passe à une conformation dite « ouverte » qui permet la polymérisation⁴². En effet, la polymérisation se fait dans un format « tête-à-queue », par l'insertion de la boucle T7 du monomère A dans le NBD du monomère B, ce qui forme une unité fonctionnelle capable de lyser le GTP⁴³. La polymérisation entraîne alors la formation de protofilaments d'environ 30 monomères de long⁴⁴.

2.2. Formation de l'anneau Z

Les protofilaments s'assemblent ensuite latéralement pour former l'anneau Z au milieu de la cellule⁴⁴. Cet anneau, pièce maîtresse du divisome, est une structure très dynamique, ayant une demi-vie de 30 secondes, et qui se déplace à la manière d'un tapis-roulant, par la polymérisation d'un côté des filaments et dépolymérisation de l'autre^{45,46}. Environ 30 % des protéines FtsZ disponibles dans la cellule sont incluses dans l'anneau Z, le reste flottant autour et pouvant prendre part à la polymérisation⁴⁵. Au sein de cet anneau, l'extrémité C-terminale de FtsZ permet l'interaction avec d'autres protéines. On peut citer par exemple EzrA, qui sert entre autres à réguler la polymérisation, mais surtout FtsA et ZipA, deux protéines servant à relier FtsZ à la membrane⁴⁷⁻⁵⁰. Ce complexe permet également le recrutement des protéines synthétisant le peptidoglycane³⁴.

2.3. Contraction de l'anneau Z

Faisant suite à l'invagination de la membrane au milieu de la bactérie, l'anneau Z commence à se contracter. Les protofilaments de FtsZ reliés au GTP étant relativement linéaires alors que ceux reliés au GDP sont beaucoup plus courbés, l'hypothèse actuelle est que l'hydrolyse du GTP en GDP par la protéine entraîne un changement de conformation de la protéine et la courbure des protofilaments⁵¹. De plus, des études de dynamique moléculaire ont prédit que la force engendrée par l'hydrolyse du GTP serait de 30 pN par monomère de FtsZ, alors que la force nécessaire pour engendrer la septation est de 8 à 80 pN^{51,52}. C'est donc l'activité GTPasique de FtsZ qui serait responsable de la contraction de l'anneau Z.

2.4. Dépolymérisation

La contraction de l'anneau Z est suivie par la dépolymérisation des protofilaments, favorisée par l'hydrolyse du GTP. FtsZ est à nouveau sous forme de monomères en solution dans le cytosol.

3. Inhibition de FtsZ

FtsZ est devenue une cible pharmacologique de choix dans la recherche de nouveaux antibiotiques pour plusieurs raisons. Tout d'abord de par son rôle indispensable dans le divisome : une bactérie ne possédant pas de FtsZ fonctionnel ne peut pas se diviser et forme des filaments qui sont ensuite lysés⁵³. Ensuite, la conservation de FtsZ au sein des bactéries et des archées permettrait le développement d'antibiotiques à large spectre, luttant contre une grande variété de pathogènes⁵⁴. *A contrario*, FtsZ étant majoritairement absente chez les eucaryotes et l'homologie structurale avec la tubuline étant faible, les risques de toxicité des inhibiteurs de FtsZ sur les cellules humaines serait limitée³⁶. Enfin, aucun inhibiteur n'étant actuellement sur le marché, les cas de résistances croisées seraient exceptionnels (bien que possibles)⁵⁵.

La recherche d'inhibiteurs de FtsZ s'articule majoritairement autour de deux sites de liaison, à savoir le site de liaison du GTP et la poche allostérique formée par l'hélice H7, la boucle T7 et le feuillet β du domaine C-terminal (Figure 5). Certains inhibiteurs de FtsZ n'ont aussi pas de site de liaison connu à ce jour, et d'autres stratégies d'inhibition de la protéine existent également. Plusieurs revues recensent les inhibiteurs de FtsZ décrits dans la littérature⁵⁶⁻⁶⁰. Dans cette partie, nous nous focaliserons donc sur les meilleures molécules de chaque série.

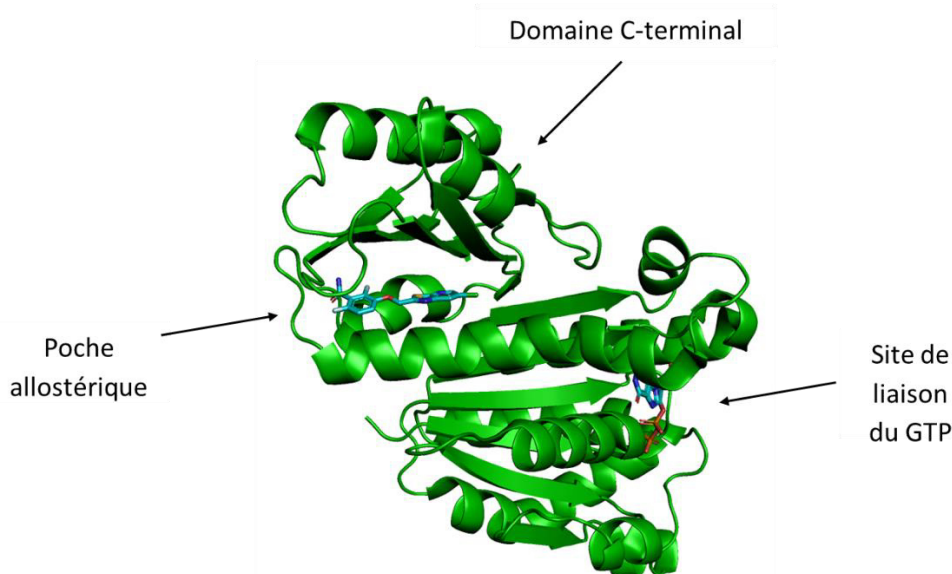


Figure 5 : Structure de SaFtsZ (vert) co-cristallisée avec l'inhibiteur allostérique **PC190723** (cyan) (code PDB : 4DXD)⁶¹.

3.1. Inhibiteurs ciblant le site de liaison au GTP

Servant à lier puis à hydrolyser le GTP, le site de liaison au nucléotide est un domaine clé pour l'action de FtsZ. Par conséquent, l'inhibition de FtsZ par des molécules ciblant cette poche a été rapportée, à la fois par des composés naturels et synthétiques.

3.1.1. Molécules naturelles

Curcumine

La **curcumine** (Figure 6) est un polyphénol naturel extrait du *Curcuma longa* connu pour ses propriétés anticancéreuses, antioxydantes et antibactériennes⁶². Elle possède une activité antiproliférative sur les cellules eucaryotes en se liant à la tubuline ce qui déstabilise les microtubules⁶³. Elle est également un effet similaire sur *Bacillus subtilis* : ce composé est capable de se lier au site de liaison au GTP de FtsZ, ce qui augmente l'activité GTPasique et entraîne une déstabilisation des protofilaments. La concentration minimale inhibitrice (la concentration minimale en composé nécessaire pour inhiber la croissance d'un inoculum bactérien standardisé) est de 100 μM pour cette molécule contre *B. subtilis*.

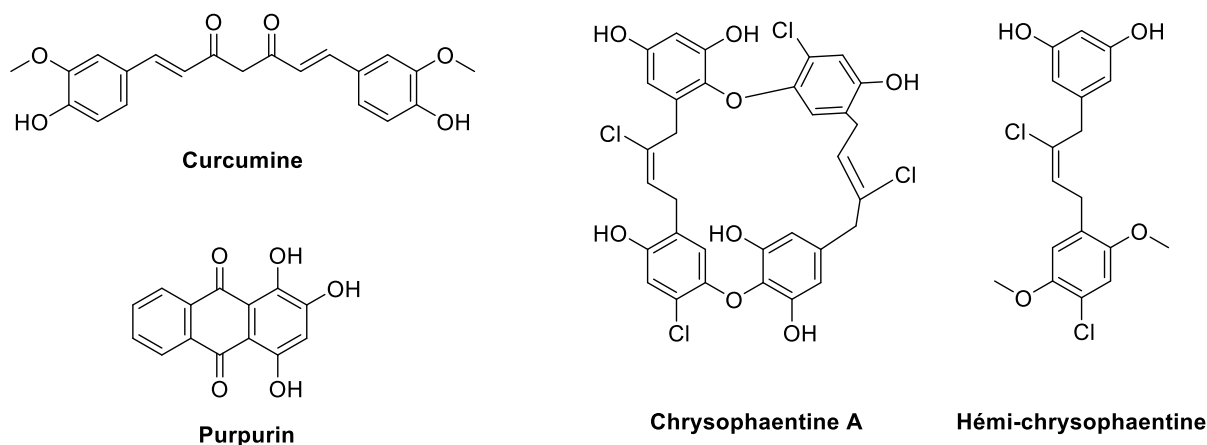


Figure 6 : Structures de molécules naturelles actives sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

Chrysophaentine A

Les chrysophaentines sont des macrocycles bisdiarylbutènes d'origine marine issus de l'algue *Chrysophaeum taylori*. Plusieurs ont montré une activité antibactérienne, et plus particulièrement la **chrysophaentine A** (Figure 6), active sur plusieurs bactéries antibiorésistantes à l'instar du SARM ou d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine⁶⁴. L'inhibition de FtsZ se fait par compétition avec le GTP au sein du site de liaison avec une CI_{50} (concentration inhibitrice 50, soit la concentration nécessaire pour inhiber à 50 % un processus biologique, ici la croissance bactérienne) de 67 μM chez SaFtsZ⁶⁵. Un dérivé synthétique, l'**héli-chrysophaentine**, a été identifié et a quant à lui une CI_{50} de 38 μM sur SaFtsZ.

Purpurine

La **purpurine** (Figure 6) est une anthraquinone naturelle identifiée chez plusieurs plantes du genre *Rubia*. En 2021, Susobhan Mahanty et Krishnan Rathinasamy ont démontré qu'elle inhibait la polymérisation et l'activité GTPasique de FtsZ⁶⁶. Elle se lie vraisemblablement au sein du site de liaison du GTP, avec une constante de dissociation (K_D) de 11 μM , et sa CMI contre *B. subtilis* est de 30 μM .

3.1.2. Analogues du GTP

Profitant de légères différences entre les sites de liaison au GTP de FtsZ et de la tubuline, den Baauwenn et son équipe ont développé une série d'analogues du GTP spécifiques de la protéine bactérienne. Le premier composé identifié est le 8-bromoguanosine 5'-triphosphate (**BrGTP**, Figure 7), inhibiteur compétitif du GTP chez FtsZ et ayant une CI_{50} de 60 μM pour l'activité GTPasique⁶⁷. Une diversification structurale a ensuite été menée et le dérivé méthoxy (**MeOGTP**) s'est révélé encore plus actif avec une CI_{50} de 15 μM ⁶⁸. Cependant, ces deux composés n'ont pas montré d'activité antibactérienne intéressante, vraisemblablement lié à une mauvaise perméabilité de la paroi bactérienne.

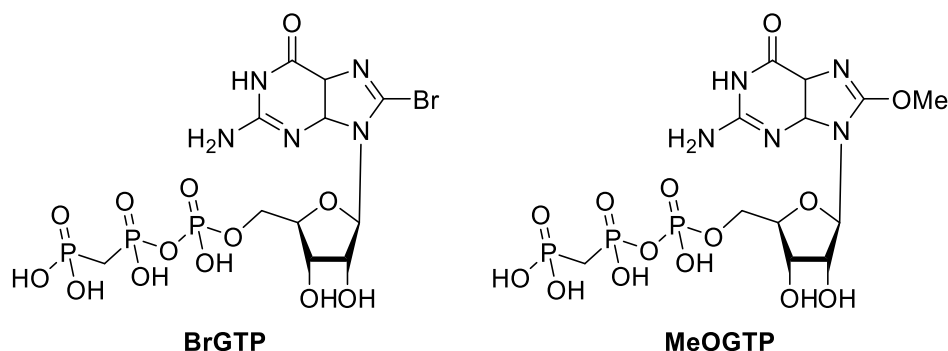


Figure 7 : Structures d'analogues de GTP actifs sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

3.1.3. UCM44 et biphényle

Afin de trouver de nouveaux inhibiteurs non-nucléotidiques pouvant cibler le site de liaison au GTP de FtsZ, José M. Andreu et ses collègues ont criblé plusieurs composés issus de leur chimiothèque propre sur FtsZ. Ils ont ainsi identifié plusieurs dérivés polyphénoliques à l'instar d'**UCM44** (Figure 8), ayant une CMI de 37 μM et n'inhibant qu'à hauteur de 20 % l'activité GTPasique de la protéine⁶⁹. Une diversification structurale a permis d'identifier **Bis-1**, inhibiteur beaucoup plus puissant avec une CMI de 7 μM et un K_D de 0,5 μM ⁷⁰.

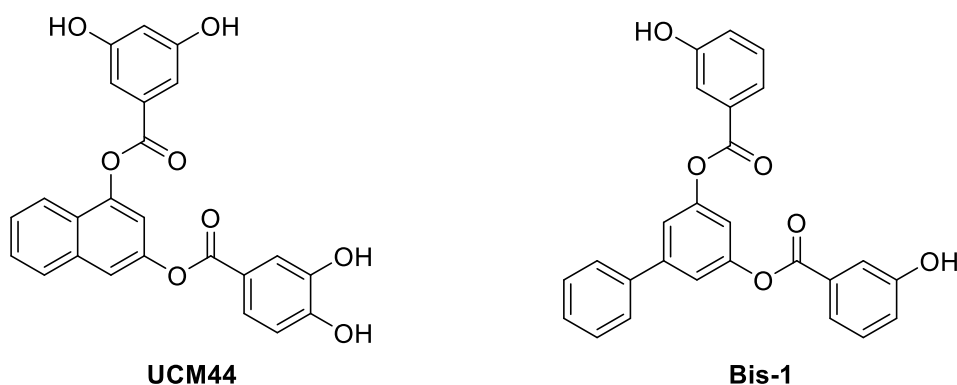


Figure 8 : Structures de **UCM44** et de son analogue biphenyle actifs sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

3.1.4. Zantrines

En 2004, 18 320 composés ont été criblés sur leur capacité à inhiber l'hydrolyse du GTP par FtsZ et cinq molécules structurellement très différentes appelées Zantrines ont été identifiées (**Z1-Z5**, Figure 9)⁷¹. Deux modes d'actions ont été observés : **Z1**, **Z2** et **Z4** déstabilisent les protofilaments, tandis que **Z3** (et **Z5**, mais dans une moindre mesure) les stabilisent. Ces deux effets étant néfastes pour l'anneau Z, ces composés possèdent une activité antibactérienne avec une CMI pour *S. aureus* allant de 1,25 μM à 10 μM , à l'exception de **Z5** pour lequel la CMI est supérieure à 80 μM .

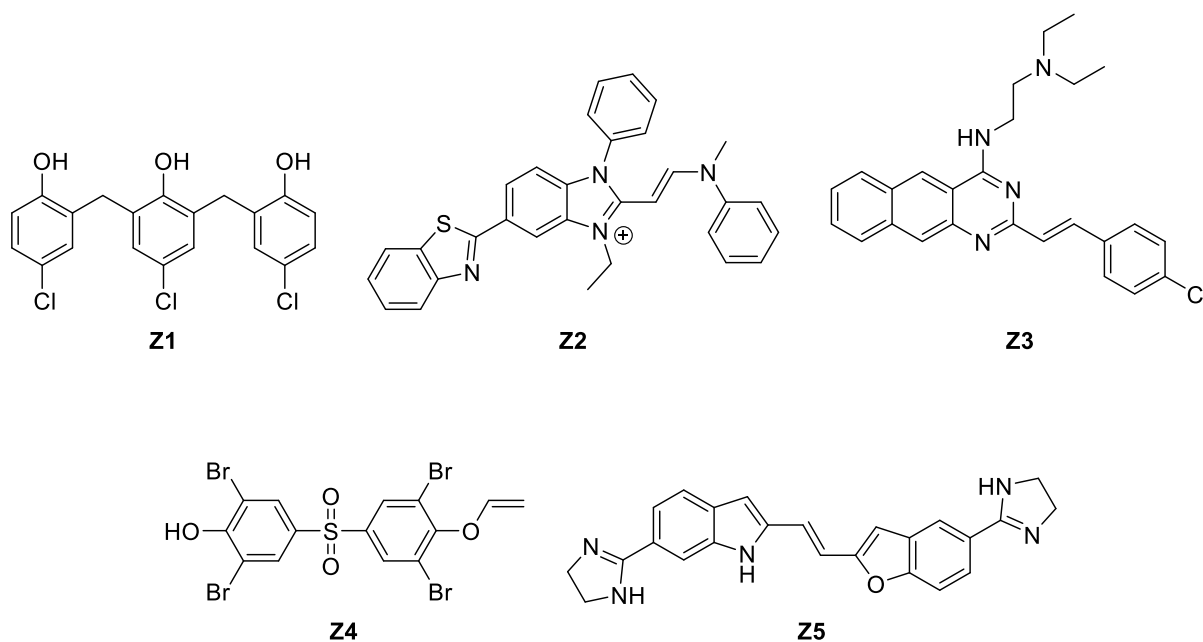


Figure 9 : Structures des Zantrines actives sur FtsZ.

Plusieurs dérivés de **Z3** dont **Zant-1** et **Zant-2** ont par la suite été développés et possèdent une CI_{50} respective de 12 μM et 9 μM , contre 24 μM pour **Z3** (Figure 10)⁷². Le site de liaison des Zantrines a été peu étudié, mais il était initialement pensé que **Z3** se

lierait au site du GTP. Cependant, cette hypothèse a été remise en question, et il semblerait que **Z3** ne se lie pas non plus au sein de la poche allostérique^{73,74}.

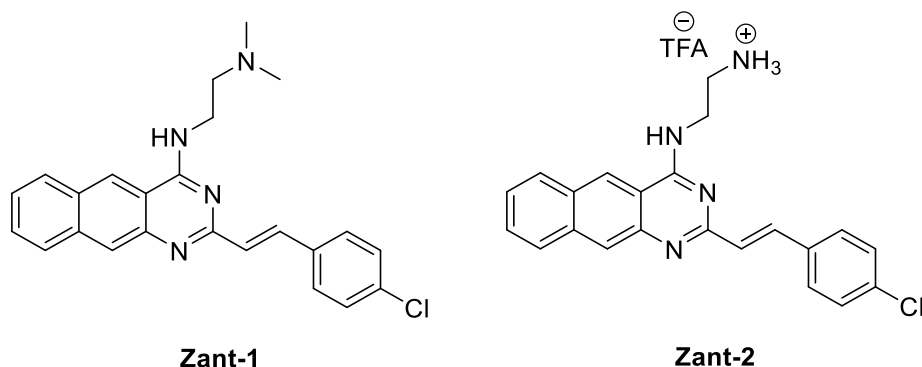


Figure 10 : Structure des dérivés de **Z3** actifs sur FtsZ.

3.1.5. Pyrimidines

En 2013, le criblage virtuel d'une chimiothèque de plus de 20 000 composés (naturels et synthétiques) a été réalisé sur le site de liaison au GTP de la protéine FtsZ de *Methanococcus jannaschii*. Ces travaux ont permis l'identification du composé **Pyr-1** (Figure 11), une pyrimidine portant un motif quinuclidine, également active sur *S. aureus*⁷⁵. L'optimisation structurale de ce dérivé a conduit à l'identification de **Pyr-2**, ayant une CMI de 26,9 μM sur *S. aureus*, contre 897 μM pour le *hit* identifié par criblage virtuel.

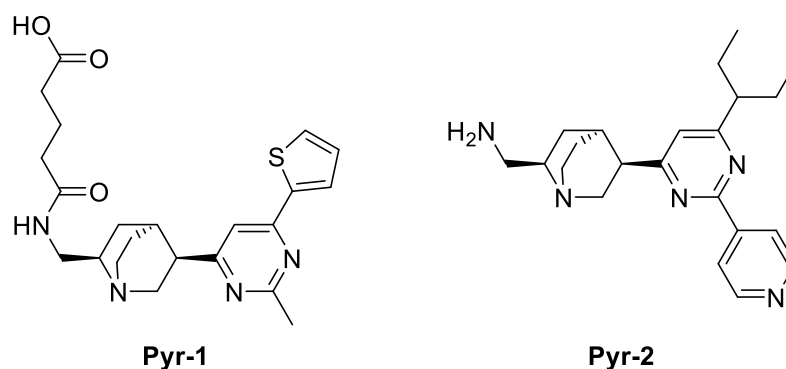


Figure 11 : Structure de dérivés pyrimidines quinuclidines actifs sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

Le motif pyrimidine 2,4,6-trisubstitué a continué d'être étudié dans les années suivantes par Chan *et al.* (**Pyr-3**) et Fang *et al.* (**Pyr-4** à **Pyr-7**), conduisant à la découverte de nouveaux inhibiteurs de type diazépène ayant des CMI allant de 4 à 8 μM pour les trois premiers et de 52 μM pour le dernier (Figure 12)⁷⁶⁻⁷⁸.

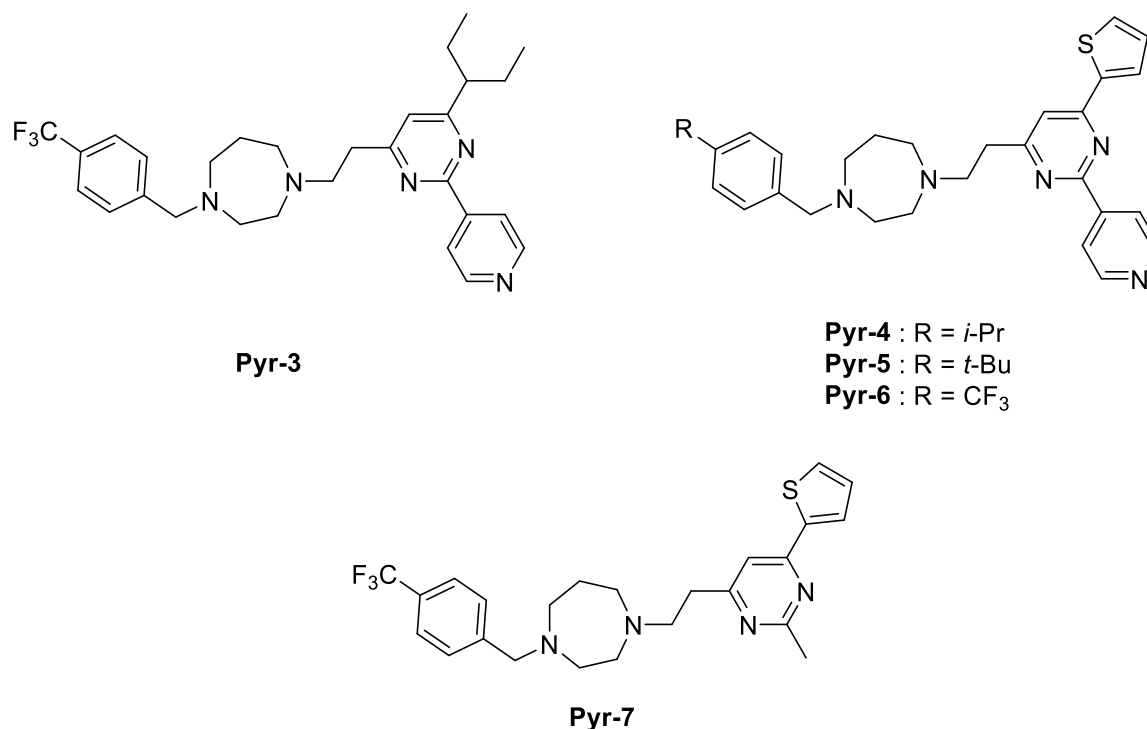


Figure 12 : Structure de dérivés pyrimidines diazépans actifs sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

3.1.6. [Dérivés de la vanilline](#)

En 2014, Hai-Liang Zhu et son équipe ont synthétisé et criblé 21 analogues de la vanilline pour leur activité antibactérienne⁷⁹. **Van-1** (Figure 13) a une excellente CMI de 0,79 μ M contre *E. coli*, et de 5,7 μ M contre *S. aureus*. Ce composé inhibe l'activité GTPasique de FtsZ et se lierait, d'après le docking, au niveau du site de liaison du GTP.

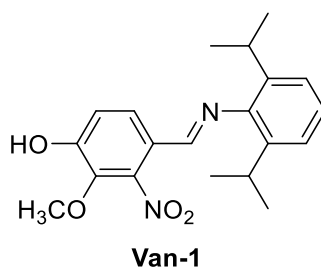


Figure 13 : Dérivé de la vanilline actif sur FtsZ et ciblant le site de liaison au GTP.

3.1.7. [Conclusion](#)

Compte-tenu de l'importance de la liaison et de l'hydrolyse du GTP par FtsZ, des mutations sur le site de liaison au GTP pourraient impacter négativement l'affinité de la protéine pour le nucléotide et par extension la division bactérienne toute entière. C'est donc un domaine très conservé, y compris entre bactéries Gram positives et négatives, ce qui en fait une cible de choix pour de nouveaux antibiotiques à large spectre. Cependant, l'homologie avec le site de liaison au GTP de la tubuline peut rendre difficile

le développement d'inhibiteurs spécifiques de FtsZ par rapport à la protéine eucaryote. Par exemple, la **curcumine** qui a une CMI de 100 μM a une CI_{50} de 18 μM sur des cellules HeLa (cellules eucaryotes issues de cancer du col de l'utérus)^{62,80}. De même, l'**UCM44** a une CI_{50} de 48 μM sur les cellules HeLa pour une CMI de 37 μM ⁶⁹. De plus, l'affinité très forte de la protéine pour le GTP (K_D de 20 nM) nécessite des inhibiteurs très puissants afin de déplacer l'équilibre⁴⁰. Une alternative est donc de cibler la poche allostérique de FtsZ, absente de la tubuline.

3.2. Inhibiteurs ciblant la poche allostérique

Cette poche allostérique, également appelée « fente inter-domaine » est formée par l'hélice H7, la boucle T7 et les feuilletts β du domaine C-terminal. Sa taille est variable, car elle dépend de la courbure de l'hélice H7. Quand la protéine est liée au GTP, l'hélice est peu courbée, ce qui génère une poche plus ouverte. *A contrario*, quand du GDP est lié, la courbure de l'hélice est plus importante, entraînant une poche plus fermée⁸¹. Ces différentes conformations entraînent une grande variété de ligands potentiels.

3.2.1. Benzamides

En 1999, Fujio Kawamura et son équipe découvrent que le 3-méthoxybenzamide (**3-MBA**, Figure 14) inhibe la prolifération de *B. subtilis* en ciblant FtsZ⁸². Même si les CMI sont élevées (13,2 mM sur *B. subtilis*, 6,6 mM sur *S. aureus*), le **3-MBA** est le point de départ de nombreux inhibiteurs de FtsZ.

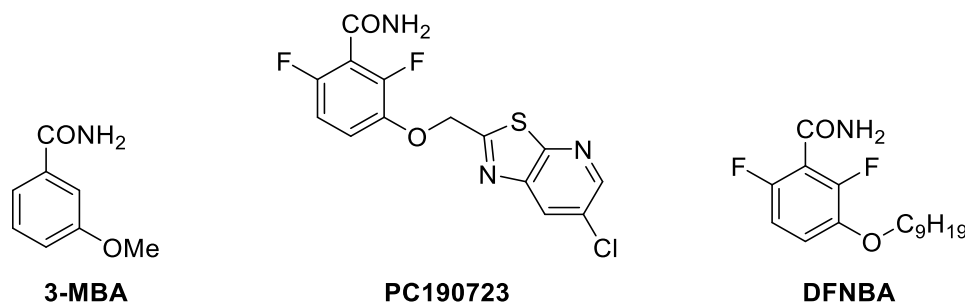


Figure 14 : Structure de dérivés benzamides actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

PC190723

En 2008, l'étude de 500 analogues du **3-MBA** a permis l'identification du **PC190723** (Figure 14), une thiazolopyridine couplée à un motif 2,6-difluorobenzamide⁵⁵. Cette découverte s'est faite en deux temps. Tout d'abord, une première étude portant sur le **3-MBA** avait permis de découvrir que la présence de deux fluorures en positions 2 et 6 du benzamide augmentait drastiquement l'activité anti-FtsZ⁸³. Cette étude a également montré que la substitution du groupement méthoxy par une chaîne alkyloxy plus longue permettait de diminuer la CMI. *In fine*, le 2,6-difluoro-3-nonyloxybenzamide (**DFNBA**, Figure 14) a une CMI de 1,7 μM contre *S. aureus*, soit 4 000 fois inférieure à celle du **3-**

MBA. Une deuxième étude visait quant à elle à remplacer la chaîne nonyle trop flexible par un groupement hétéroaromatique plus rigide pour permettre un développement pharmaceutique par la suite⁸⁴. Les benzamides portant un motif benzothiazole étaient les plus puissants, mais le dérivé pyridinothiazole a été retenu, car il était métaboliquement plus stable et se liait moins aux protéines plasmatiques.

Le **PC190723** est donc un inhibiteur de FtsZ ayant une CMI de 2,8 μM sur *B. subtilis* ainsi que sur plusieurs souches de *S. aureus*, sensibles ou résistantes à différents antibiotiques, mais étant inactif sur *E. coli* (car substrat de la pompe d'efflux AcrAB, un mécanisme classique de résistance aux antibiotiques)⁸⁵. Il est à noter que ce composé ne présente pas de cytotoxicité sur des cellules HepG2 (cellules de cancer hépatique humain). La liaison à FtsZ se fait au niveau de la poche allostérique, le benzamide faisant des liaisons hydrogène avec plusieurs acides aminés de la poche tandis que le bicyclic fait des interactions hydrophobes avec le reste de la poche (Figure 15). Cette liaison à la protéine prévient l'activité GTPasique, ce qui stabilise les protofilaments.

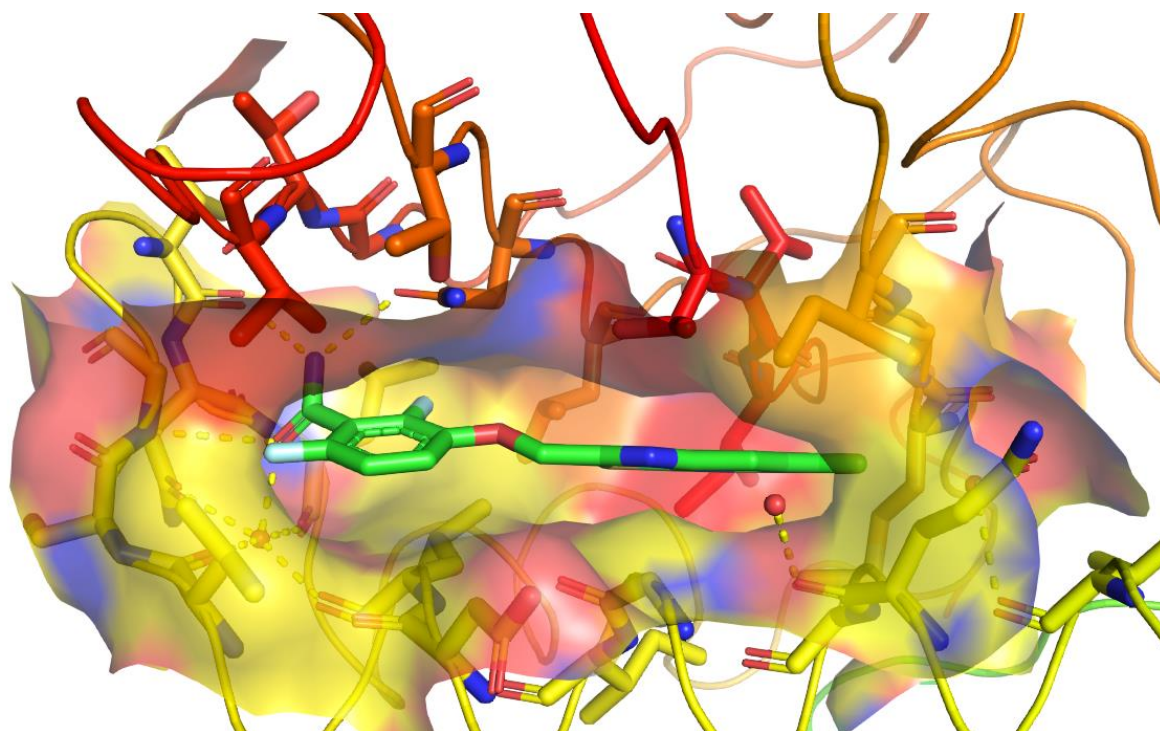


Figure 15 : Structure co-cristallisée de **PC190723** au sein de la poche allostérique de SaFtsZ (code PDB : 4DXD⁶¹).

Prodrogues du **PC190723**

L'hydrophobicité du **PC190723** limitant son développement *in vivo*, sa formulation sous forme de prodrogue a été envisagée. Deux dérivés ammoniums ont donc été synthétisés et testés, à savoir le **TXY541** et le **TXY436** (Figure 16)^{86,87}.

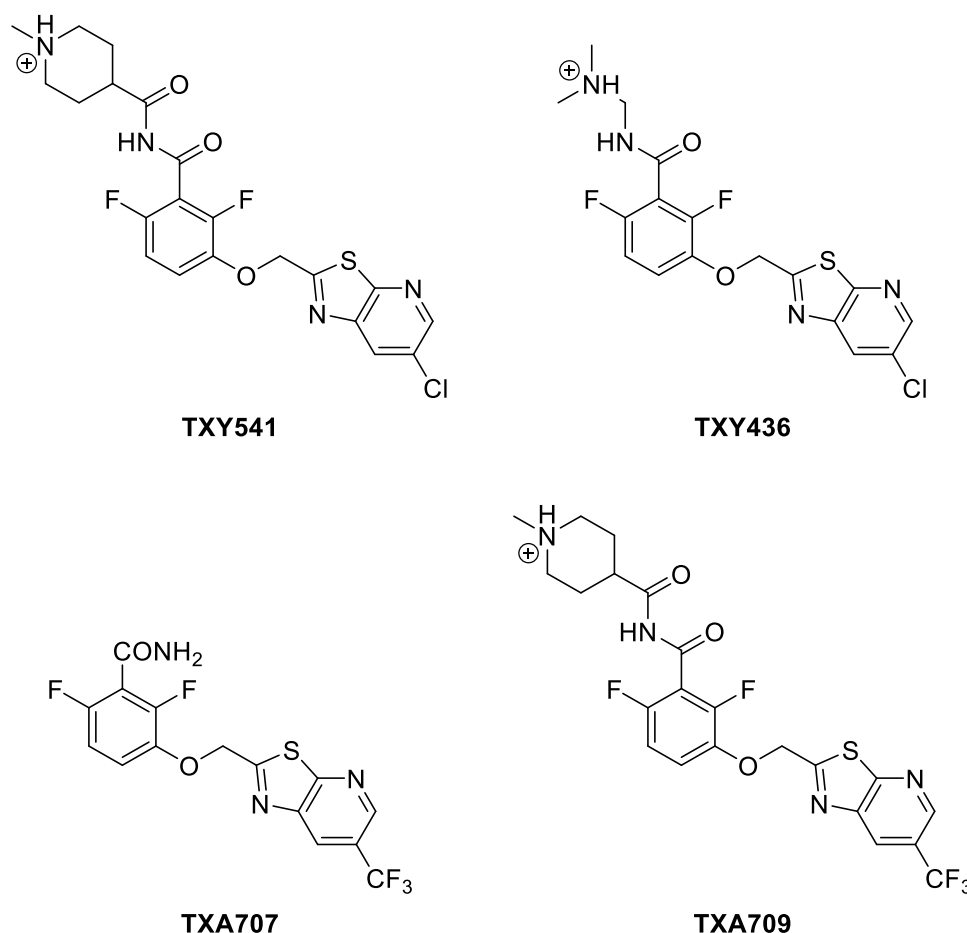


Figure 16 : Structures d'analogues et de prodrogues de **PC190723**.

Cette formulation a fortement augmenté la solubilité des produits, en particulier en milieu acide (facteur 140 pour **TXY541** et facteur 100 pour **TXY436**). Cependant, des doses élevées de produit restaient nécessaire pour obtenir un effet *in vivo*. De plus, le **PC190723** est capable d'être métabolisé par le cytochrome P450, ce qui entraîne une déchloration en position 5 suivie d'une monooxygénation⁸⁸.

L'atome de chlore sur le **PC190723** a donc été remplacé par un groupement trifluorométhyle (**TXA707**, Figure 16), et le nouveau produit formulé sous forme de prodrogue, **TXA709**⁸⁸. Si le **TXA707** a une activité similaire au **PC190723** *in vitro* (CMI de 1,3-2,6 μ M), le **TXA709** a en revanche une meilleure pharmacocinétique que **TXY541**, ce qui fait qu'il est actuellement en phase clinique I, développé par le laboratoire américain TAXIS Pharmaceuticals⁸⁹. Grâce aux structures co-cristallisées du **PC190723** et du **TXA707** avec FtsZ, on peut noter que le premier est plan tandis que le deuxième est courbé (Figure 17). Il semblerait donc que l'hydrophobicité du groupement CF₃ entraîne un changement de conformation de la protéine, et permette au ligand de se fixer plus en profondeur au sein de la poche allostérique.

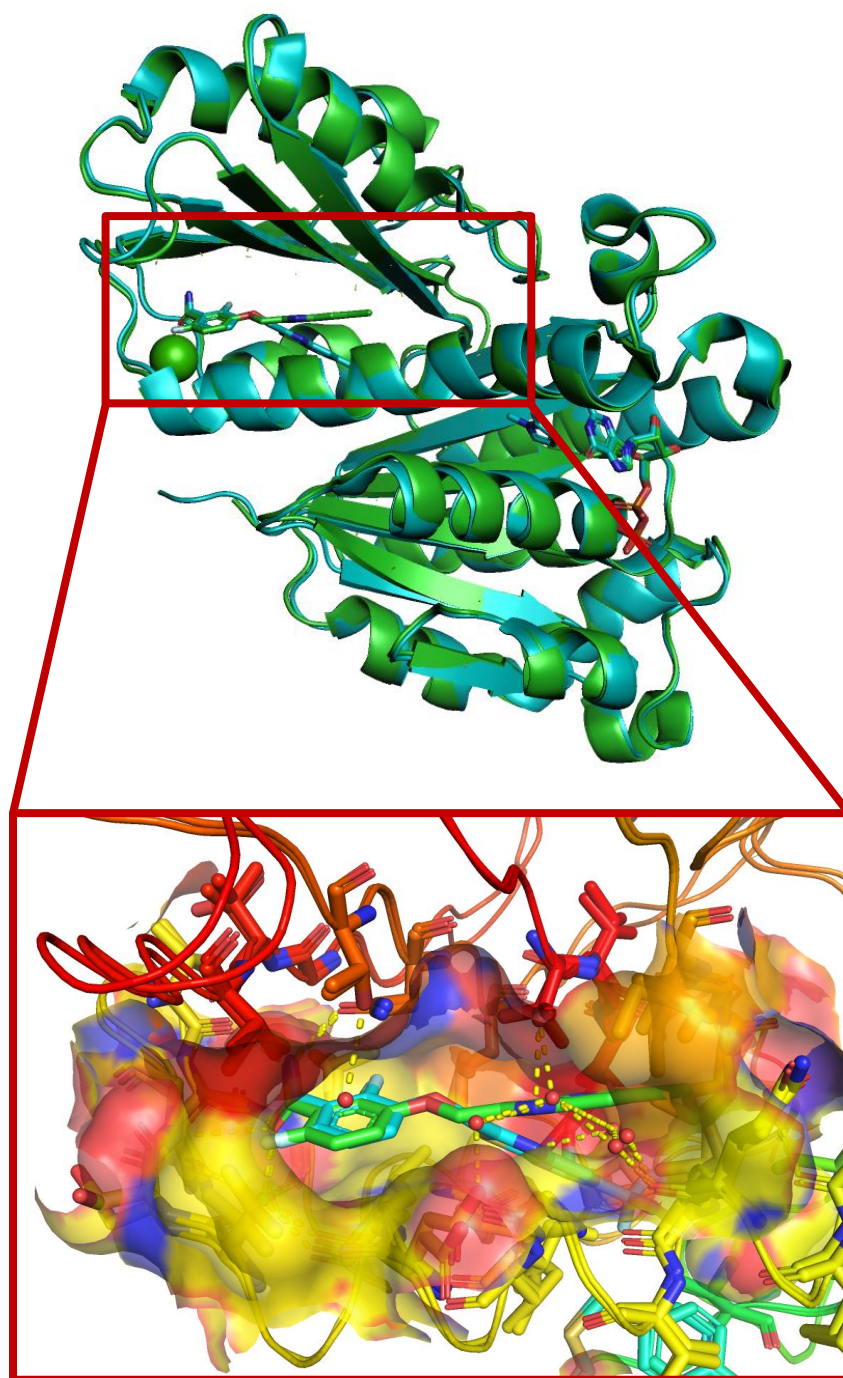


Figure 17 : Superposition des structures co-cristallisées de **PC190723** (vert, code PDB : 4DXD⁶¹) et de **TXA707** (cyan, code PDB : 5XDT⁹⁰) avec SaFtsZ.

Dérivés azolés

La recherche de nouveaux benzamides actifs sur FtsZ a conduit en 2012 à la découverte du dérivé oxazole **Azole-1** (Figure 18), et de sa prodrogue portant un motif succinate **Azole-2**^{91,92}. Beaucoup plus puissant que le **PC190723** et ses dérivés, **Azole-1** a une CMI de 0,24 μM contre *S. aureus*, et sa formulation sous forme de dérivé succinate permet un gain de solubilité aqueuse d'un facteur 32 pour atteindre 400 $\mu\text{g/mL}$ (contre 12,5 $\mu\text{g/mL}$ pour **Azole-1**)⁹³.

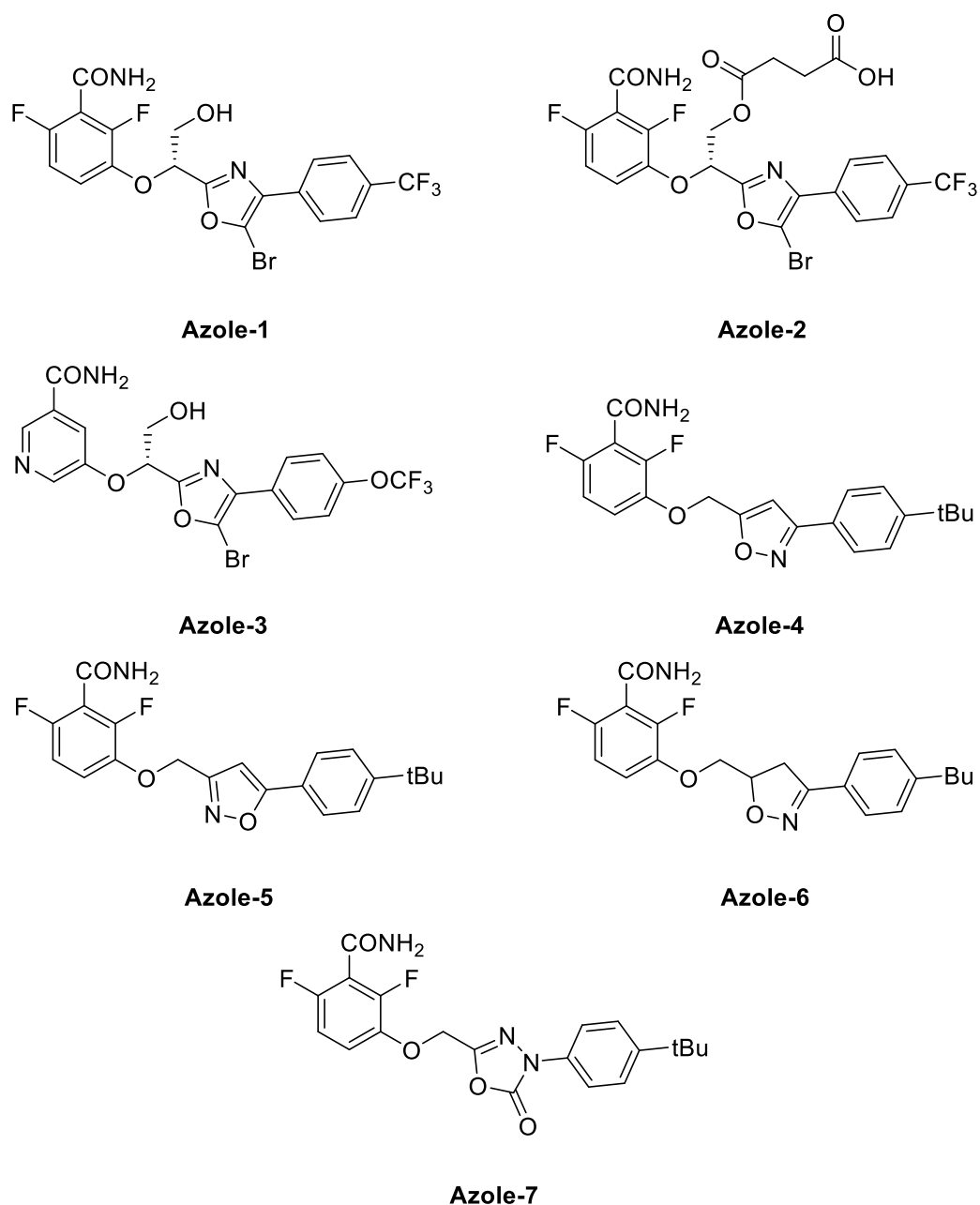


Figure 18 : Structures de dérivés azolés actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

La mutation de certains acides aminés de FtsZ, en particulier du résidu Gly196, rend le **PC190723** inactif⁵⁵. Cependant, chez un mutant G196A (une des mutations les plus fréquentes avec G196S), **Azole-1** reste actif sur FtsZ, mais avec une CMI plus élevée (7,9 μM). Cette activité est expliquée par la plus grande flexibilité de ce dérivé, la liaison entre le C4 de l'oxazole et le C1 du phényle pouvant tourner, à la différence du **PC190723** pour lequel les deux cycles sont fusionnés⁹⁰. La découverte de ce composé avec une structure flexible tripartite (benzamide – cycle azolé – phényle) a servi de base pour de nouveaux inhibiteurs azolés de FtsZ pouvant également lutter contre les souches mutées. Un autre oxazole a par exemple récemment été décrit avec une CMI de 1 μM sur *S. aureus* (**Azole-3**, Figure 18), sur lequel le difluorobenzamide a été remplacé par un motif nicotinamide⁹⁴.

En 2018, Shutao Ma a travaillé avec son équipe sur des dérivés isoxazoles, à savoir deux séries d'isoxazol-3-yl-5-benzamides et d'isoxazol-5-yl-3-benzamides⁹⁵. Les deux meilleurs composés (**Azole-4** et **Azole-5**, Figure 18), portant tous les deux un motif 4-*tert*-butylphényl, ont montré des CMI excellentes sur *B. subtilis* (0,078 μ M et 0,039 μ M) et bonnes sur *S. aureus* (21 μ M et 5,2 μ M). Les chercheurs de la même équipe ont ensuite fait des analogues 4,5-dihydroisoxazoles des mêmes séries d'isoxazol-3-yl-5-benzamides et d'isoxazol-5-yl-3-benzamides⁹⁶. Cette fois, c'est le dérivé 4-butylphényl qui s'est montré le plus actif (**Azole-6**, Figure 18), avec une CMI inférieure à 0,32 μ M contre *B. subtilis* et de 0,64 μ M contre *S. aureus*. Il est en revanche à noter que les analogues réduits de **Azole-4** et **Azole-5** ont vu leur activité baisser. Enfin, au cours d'une étude portant sur de nombreuses variations autour du motif oxadiazolone, cette même équipe a décrit en 2019 le composé **Azole-7**, avec une CMI de 0,31 μ M contre *B. subtilis* et 2,48 μ M contre *S. aureus*⁹⁷. Il est à noter que les meilleurs composés issus de ces séries isoxazole, 4,5-dihydroisoxazole et oxadiazolone n'ont pas montré de cytotoxicité contre des cellules HeLa.

Dérivés benzodioxane

Outre les dérivés du **PC190723** et les dérivés azolés, une troisième famille de benzamides portant un motif benzodioxane a été développée. En 2015, par optimisation du **DFNBA**, le composé **Bzdiox-1** (Figure 19) a été identifié et possède une CMI de 1,4 μ M contre *S. aureus*⁹⁸. Il est par ailleurs à noter que la CMI du composé énantiopur de configuration (*S*) est divisée par deux par rapport au mélange racémique, et ne montre pas de cytotoxicité sur des cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert africain). Différentes étapes d'optimisation de ce composé ont conduits à **Bzdiox-2**, **Bzdiox-3** et **Bzdiox-4** (Figure 19), avec des CMI respectives contre *S. aureus* de 1,6 μ M, 1,4 μ M et 0,25 μ M⁹⁹⁻¹⁰¹. Il est intéressant de noter que tel le **PC190723**, ce dernier composé est inactif sur *E. coli* car il est substrat de la pompe d'efflux AcrAB.

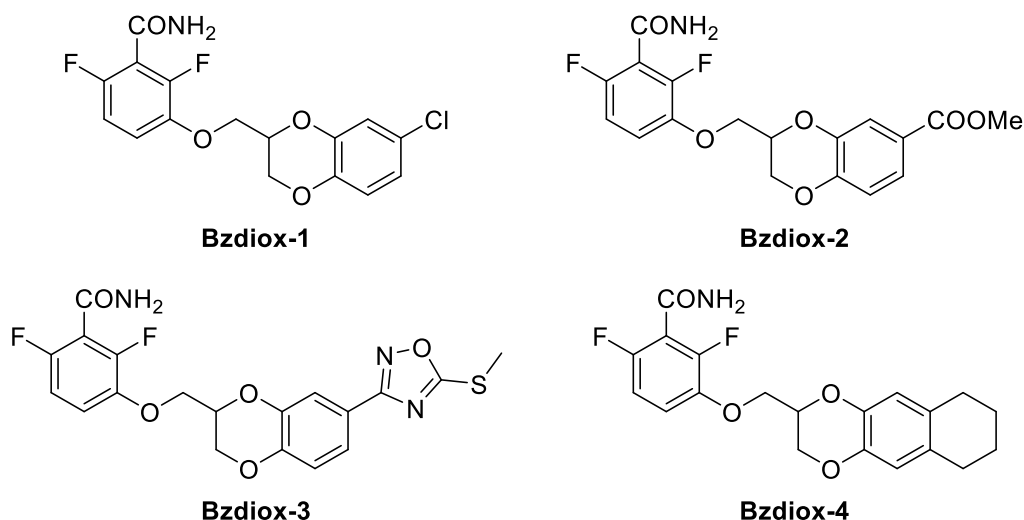


Figure 19 : Structures de dérivés benzodioxanes actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Autres dérivés du 3-MBA

D'autres dérivés du **3-MBA** ont également été développés ces dernières années, à l'instar de 3-aryloxybenzamides, dont le dérivé 3-chlorophényl (**Bzm-1**, Figure 20) a une CMI de 13 μM sur *S. aureus*¹⁰². L'étude de 3-alkyloxybenzamides a également conduit à l'identification des composés **Bzm-2** et **Bzm-3** avec des CMI respectives de 3 μM et 3,5 μM contre *S. aureus*¹⁰³. Kin-Fai Chan et son équipe ont également remplacé la fonction éther par une amine et le criblage de 47 molécules a permis de découvrir que l'analogue aminé du **DFNBA**, **Bzm-4**, avait une CMI de 3,7 μM contre *S. aureus*, n'était pas toxique contre des cellules L929 (fibroblastes du tissu conjonctif sous-cutané murin) et possède des propriétés pharmacocinétiques moyennes¹⁰⁴. La recherche de bioisostères de l'amide du benzamide a également été entreprise, mais à ce jour seuls des dérivés triazoles comme **Bzm-5** (CMI : 7,3 μM contre *S. aureus*) ont montré une activité¹⁰⁵.

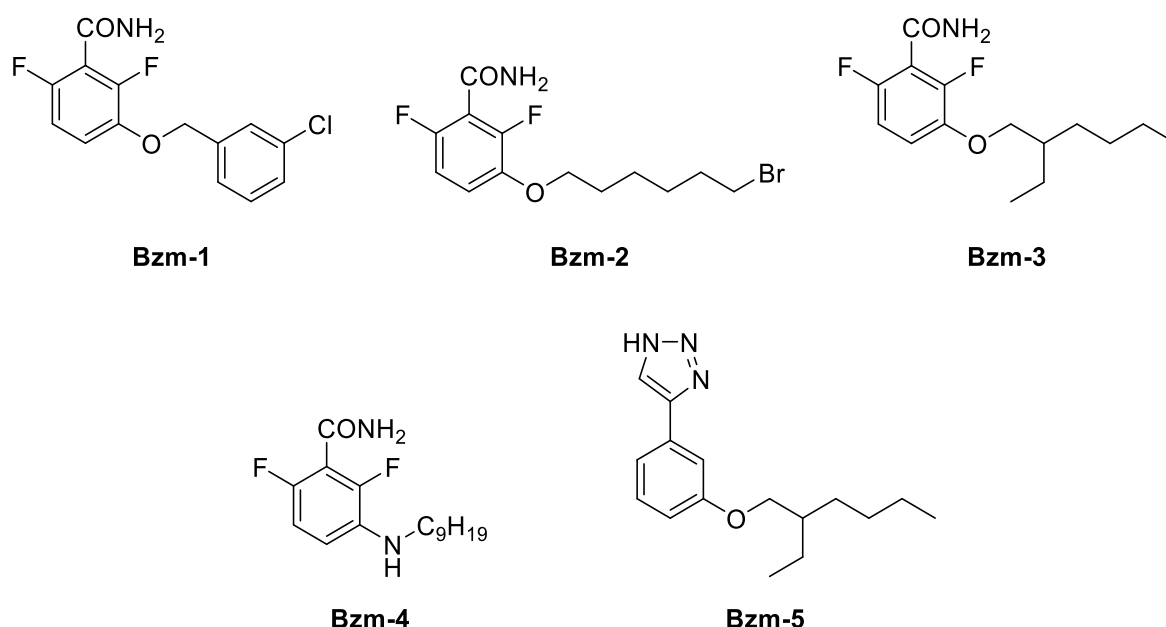


Figure 20 : Structures d'autres dérivés benzamides actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Utilisation de dérivés benzamides comme sondes fluorescentes

Les dérivés benzamides se lient au sein de la poche allostérique de FtsZ, le greffage de motifs fluorescents permet d'utiliser ces composés comme sondes fluorescentes pour l'étude de la fonction ou de l'inhibition de FtsZ. C'est ce qui a été fait en 2017 par José M. Andreu, Sonia Huecas et leur équipe, qui ont développé la sonde **Fluo-1** (Figure 21), portant un fluorophore nitrobenzoxadiazole¹⁰⁶. Cette sonde a permis de confirmer par fluorescence le phénomène de changement de conformation de la protéine « ouverte » / « fermée » expliqué précédemment. Afin de développer un test pour identifier par compétition de nouveaux inhibiteurs de FtsZ se liant au niveau de la poche allostérique, la sonde **Fluo-1** a été optimisée et **Fluo-2** a été identifiée, passant d'un K_D de 26 μM pour

la première contre 1,9 μM pour la deuxième. Basé sur la structure du dérivé oxadiazole **Azole-1** (Figure 18), la sonde **Fluo-3**, portant un BODIPY comme fluorophore, est capable de se lier aux protéines FtsZ de nombreuses bactéries avec de très bon K_D (0,6-4,6 μM pour les Gram-positives, 0,2-0,8 μM pour les Gram-négatives)¹⁰⁷.

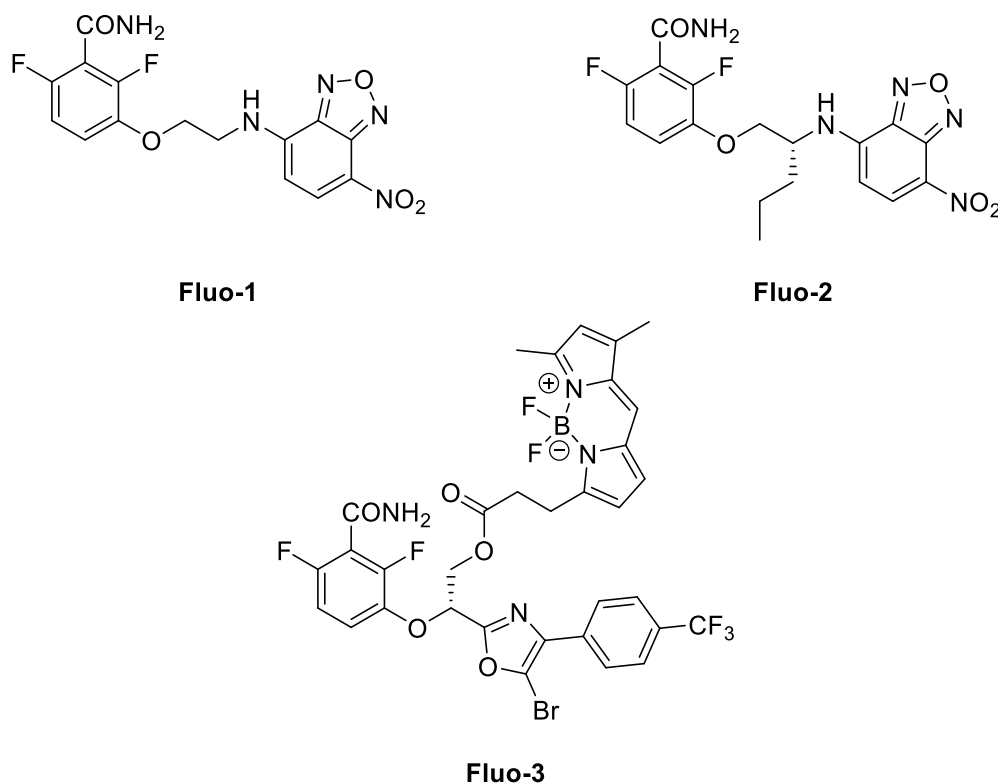


Figure 21 : Structures de dérivés benzamides fluorescents pouvant se lier à la poche allostérique de FtsZ.

3.2.2. Quinoliniums

Berbérine et dérivés

La **berbérine** (Figure 22) est un alcaloïde portant un motif isoquinolinium isolé chez diverses plantes du genre *Berberis*. Si l'activité antibactérienne était déjà connue depuis longtemps, son activité sur FtsZ a été décrite pour la première fois en 2008^{108,109}. La berbérine est en effet capable d'inhiber l'activité GTPasique de la protéine, prévenant la formation de l'anneau Z. S'il était initialement pensé que la berbérine se liait au site du GTP, des études de docking réalisées par Wong et son équipe ont identifié la poche allostérique, bien plus hydrophobe, comme le site de liaison le plus probable de la berbérine à FtsZ¹¹⁰. Suite à ces travaux, des dérivés synthétiques de type 9-phénoxyberbérine ont par la suite été synthétisés, conduisant à l'identification de **Ber-1**, ayant une CMI de 3,5 μM sur *S. aureus*, contre 360 μM pour la berbérine naturelle. D'autres analogues de la berbérine ont été développés, à l'instar du dérivé dibenzoquinolizinium **Ber-2** et de l'isoquinolinium **Ber-3**, avec des CMI respectives de 0,7 μM et 1,5 μM contre *S. aureus*^{111,112}.

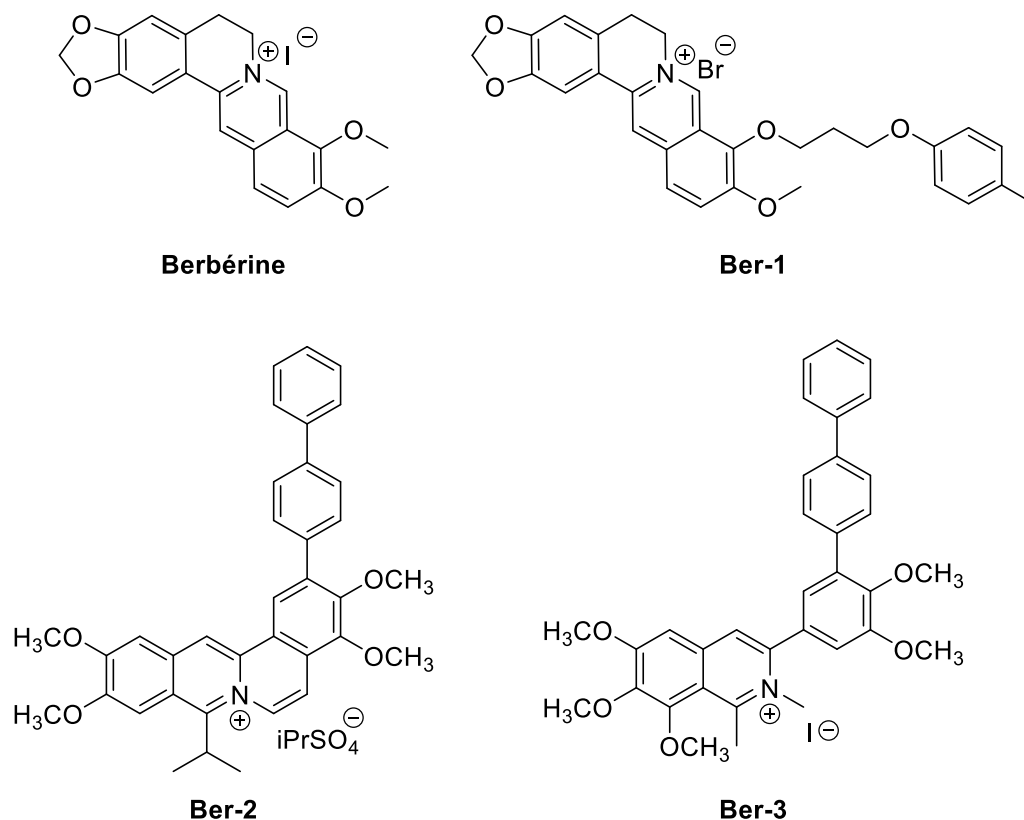


Figure 22 : Structures de la **berbérine** et de dérivés actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Sanguinarine et dérivés

La sanguinarine (Figure 23) est un phénanthridium naturel retrouvé chez *Sanguinaria canadensis* capable de se lier à FtsZ avec un K_D de $30 \mu\text{M}$ ¹¹³. Cependant, elle est également active sur la tubuline avec une CI_{50} de $1,6 \mu\text{M}$, ce qui la rend cytotoxique¹¹⁴. Des dérivés phénanthridium ont ensuite été développés, à l'instar de **Phen-1**, **Phen-2** et **Phen-3**, ayant respectivement une CMI de $29 \mu\text{M}$, $0,15 \mu\text{M}$ et $2,2 \mu\text{M}$ sur *S. aureus*¹¹⁵⁻¹¹⁷. Des dérivés naphthalènes, inspirés du bicyclic de la sanguinarine et n'étant pas chargés, promeuvent également la polymérisation de FtsZ et **Napht-1** a une CMI de $1,5 \mu\text{M}$ sur *S. aureus*¹¹⁸.

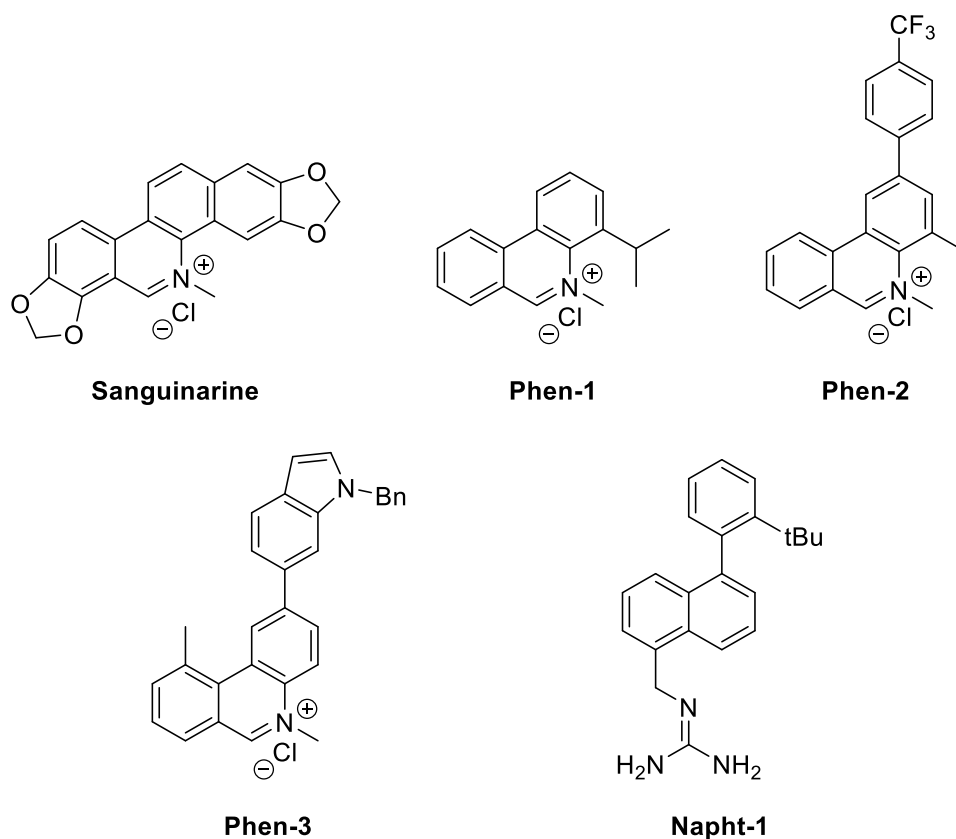


Figure 23 : Structures de la **sanguinarine** et de dérivés actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Indoloquinoliniums et benzofuroquinoliniums

Se basant sur la structure de la **berbérine** et de la **sanguinarine**, Yu-Jing Lu et son équipe ont développé de nouvelles séries de indolo- et benzofuroquinoliniums ciblant la poche allostérique de FtsZ et inhibant l'activité GTPasique¹¹⁹. Les meilleurs composés identifiés, deux dérivés 4-méthoxyphényl portant un motif benzofurane ou indole (Figure 24), ont montré respectivement une CMI de 8,3 et 4,2 μM sur *S. aureus*.

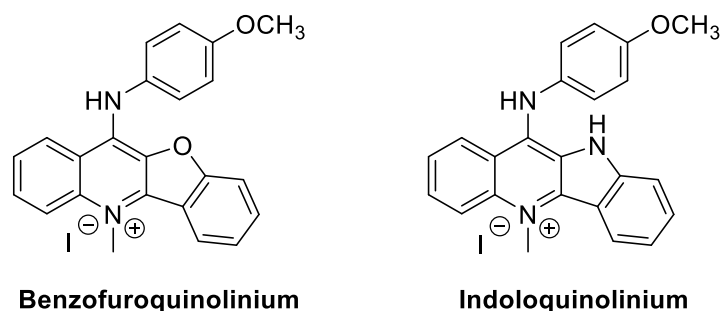


Figure 24 : Structures de dérivés benzofuroquinolinium et indoloquinolinium actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Thiazole orange

En 2017, le criblage sur *B. subtilis* de 200 molécules naturelles et synthétiques a conduit à l'identification d'un dérivé du thiazole orange (**Thia-1**, Figure 25), non cytotoxique et ayant une CMI de 2,7 μM sur *B. subtilis* et *S. aureus*¹²⁰. Par la suite, d'autres dérivés benzothiazoles ont également été développés, à l'instar des composés **Thia-2** à **Thia-5**, ayant respectivement des CMI de 2,7 μM , 1,8 μM , 2,8 μM et 0,48 μM ¹²¹⁻¹²⁴.

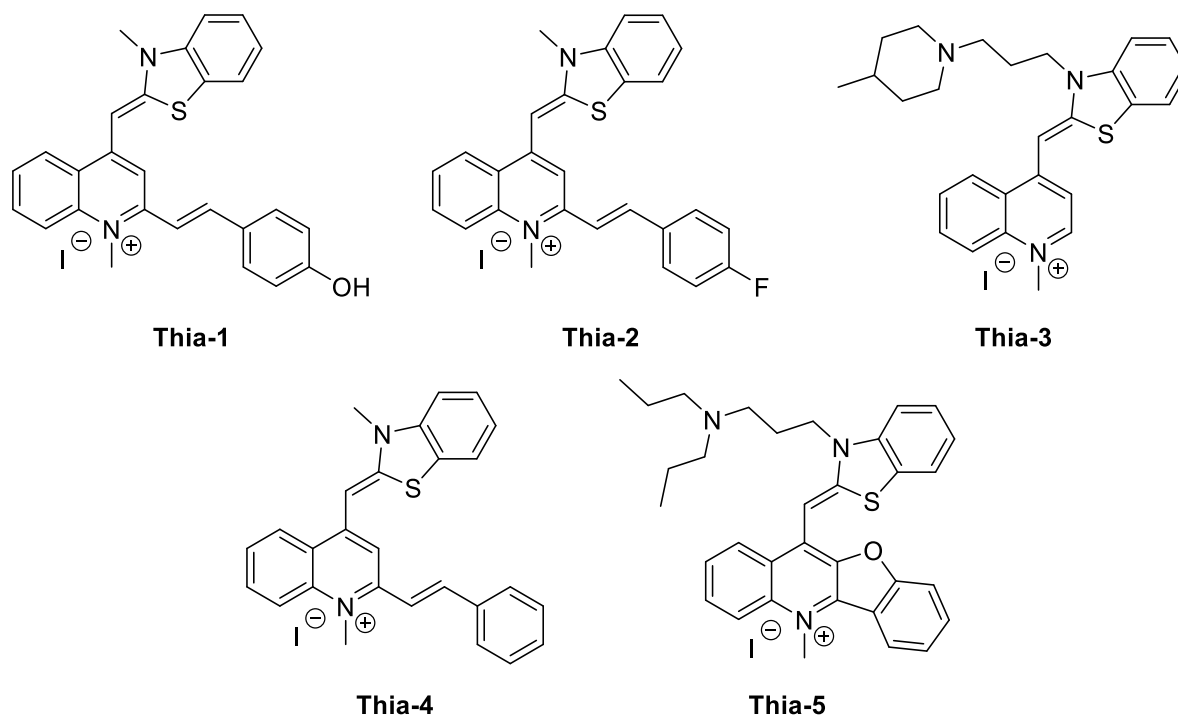


Figure 25 : Structures de dérivés thiazoles actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Indolylquinoliniums et dérivés

Une nouvelle série de quinoliniums portant un motif indole a été développée en 2019¹²⁵. Les deux meilleurs composés, **Indole-1** et **Indole-2** sont substitués en position 4 par un groupement pipéridinyl, et sont reliés respectivement sur les positions 2 et 3 de l'indole (Figure 26). Les deux produits ont montré une CMI de 2 à 4 μM sur des souches de SASM et de SARM. Un dérivé bisindole (**Indole-3**) a également été découvert et possède une CMI de 1,8 μM contre *S. aureus*¹²⁶.

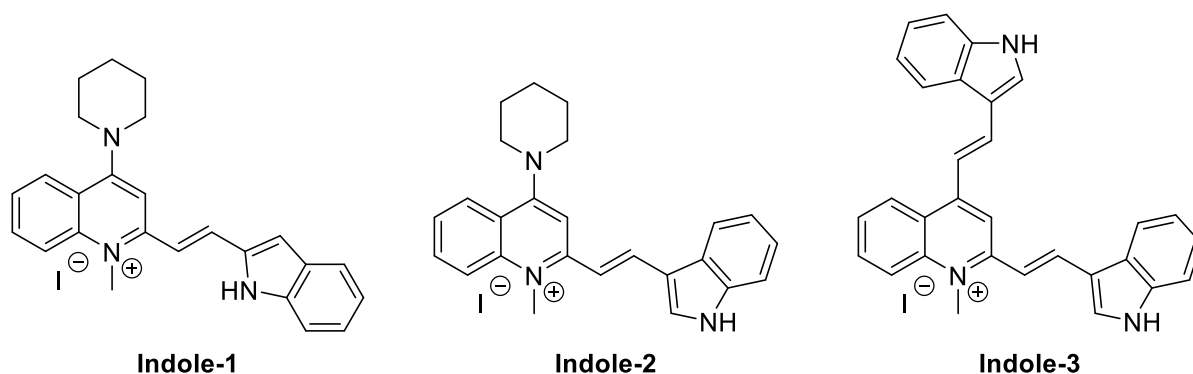


Figure 26 : Structures de dérivés indolylquinoliniums actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

Autres quinoliniums

D'autres structures portant un motif quinolinium ou apparenté ont été décrits comme inhibiteurs de FtsZ. En 2022, Lu et son équipe ont poursuivi leurs travaux sur **Indole-3** et ont identifié **Quin-1** (Figure 27) par diversification structurale, ayant une CMI de 1,9 μM sur *S. aureus*¹²⁷. Plusieurs dérivés acridiniums ont également été recensés, à l'instar de **Acri-1** et **Acri-2** avec des CMI respectives de 1 μM et 0,45 μM contre *S. aureus*^{128,129}.

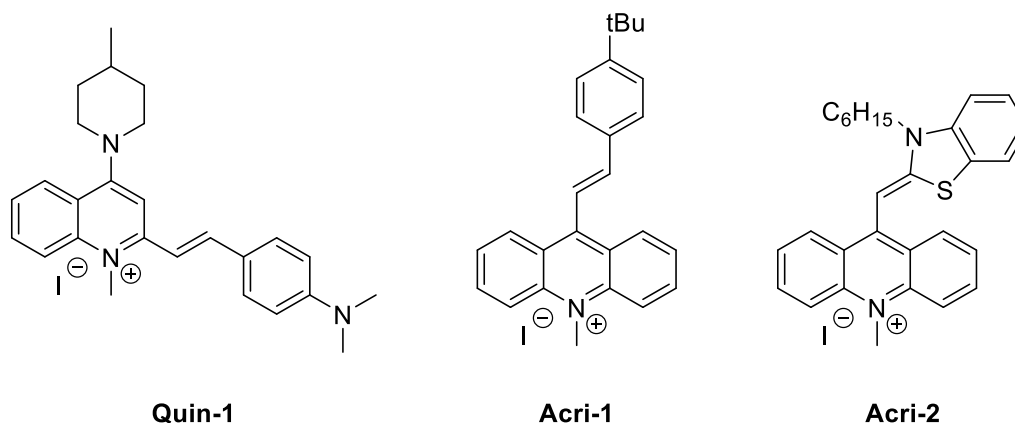


Figure 27 : Structures d'autres quinoliniums et motifs associés actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

3.2.3. Cinnamaldéhyde et phénylpropanoïdes

Le **cinnamaldéhyde** (Figure 28) est un phénylpropanoïde naturel issu de *Cinnamomum cassia* capable d'inhiber l'hydrolyse du GTP par FtsZ et possède une CMI sur *S. aureus* de quasiment 2 mM¹³⁰. La recherche de dérivés du **cinnamaldéhyde** a conduit à la découverte de **Cin-1**, ayant une CMI sur *S. aureus* de 12 μM ¹³¹.

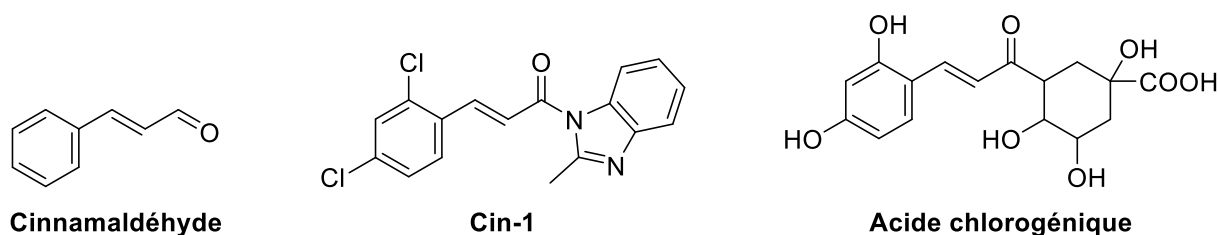


Figure 28 : Structures du **cinnamaldehyde** et de dérivés phénylpropanoïdes actif sur FtsZ et ciblant la poche allostérique

Plusieurs autres phénylpropanoïdes sont connus pour leur activité antibactérienne, à l'instar des acides cinnamique, *p*-coumarique, caféique, férulique et chlorogénique, ainsi que l'eugénol¹³². Une étude portant sur ces six derniers, ainsi que deux dérivés d'acides méthoxycinnamiques ont montré une CI_{50} de 70 μ M pour l'**acide chlorogénique** (Figure 28) pour la polymérisation de FtsZ. Des études de docking ont ensuite attribué la poche allostérique comme site de liaison probable.

3.2.4. Coumarines

Les coumarines sont des 2-benzopyrones d'origine végétale comportant de nombreuses propriétés pharmacologiques, dont une activité antimicrobienne¹³³. En 2014, le criblage de substances naturelles (dont des coumarines) a montré que la **scopolétine** et la **daphnéine** (Figure 29) étaient toutes deux capables d'inhiber l'activité GTPasique et la polymérisation de FtsZ¹³⁴. Des études de docking suggèrent que le site de liaison de la **scopolétine** à FtsZ serait au niveau de la poche allostérique chez *E. coli*, tandis que d'autres coumarines se lieraient plutôt sur le site du GTP chez *Mycobacterium tuberculosis*¹³⁵.

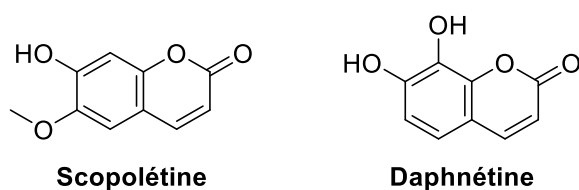


Figure 29 : Structures de coumarines actives sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

3.2.5. Autres molécules d'origine naturelle

De nombreuses autres molécules naturelles sont actives sur FtsZ. Plusieurs composés issus de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) dont la **gancaonine I**, la **glycirine** et l'**isolicoflavonol** (Figure 30) inhibent l'activité GTPasique de la protéine et la **gancaonine I** a également un effet antibactérien avec une CMI de 5 μ M contre *B. subtilis*¹³⁶.

Issue de plusieurs espèces du genre *Plumbago*, la **plumbagine** (Figure 30) est une naphthoquinone inhibant l'activité GTPasique et la polymérisation de FtsZ chez *B. subtilis* avec un K_D de 20,7 μM , mais pas chez *E. coli*^{137,138}. Il est cependant à noter que cette molécule inhibe également la prolifération de cellules eucaryotes en se liant au site de la colchicine chez la tubuline avec un K_D de 0,93 μM ¹³⁹.

L'étude de champignons obtenus à la surface de plants de *Ginkgo biloba* a permis d'observer l'activité antibactérienne d'une souche de *Penicillium cataractum*¹⁴⁰. Plusieurs molécules ont été isolées du milieu de culture, dont **Pen-1** (Figure 30), ayant une CMI de 23 μM sur *S. aureus*, et dont la liaison à la poche allostérique de FtsZ a été estimée par docking.

Molécule naturelle issue d'*Aspergillus viridinutans*, la **viriditoxine** (Figure 30) a été identifiée en 2003 par le criblage de plus de 100 000 molécules naturelles et possède une CMI de 6 μM contre *S. aureus*¹⁴¹. Des diversifications structurales ont par la suite été entreprises mais n'ont pas conduit à d'amélioration, et des études de docking ont identifié la poche allostérique comme site de liaison probable¹⁴².

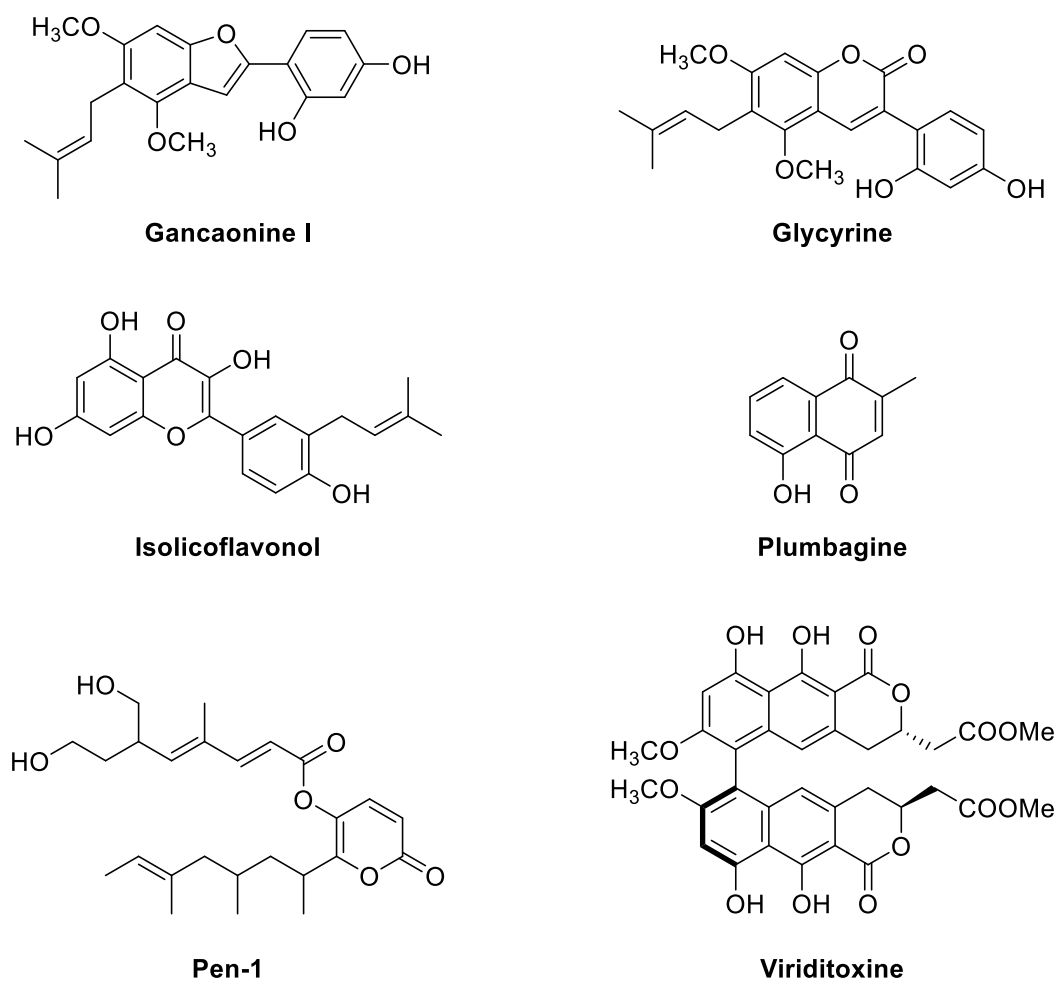


Figure 30 : Structures de molécules naturelles actives sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

3.2.6. Taxanes et autres anticancéreux

Compte-tenu de l'homologie entre FtsZ et la tubuline, les taxanes sont des candidats potentiels pour l'inhibition de la protéine bactérienne. En 2006, le criblage de 120 taxanes sur *M. tuberculosis* a permis d'identifier plusieurs molécules ayant une activité antibactérienne¹⁴³. Parmi celles-ci, on retrouve **SB-RA-2001** (Figure 31), structurellement proche du paclitaxel et ayant une CMI allant de 2,5 à 5 μM sur des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. Outre sa bonne activité antibactérienne, il s'est avéré que cette molécule inhibait l'activité GTPasique de FtsZ chez *B. subtilis*, vraisemblablement par liaison au sein de la poche allostérique¹⁴⁴. Cependant, **SB-RA-2001** restait cytotoxique, avec une CI_{50} de 15,7 μM sur des cellules A549 (cellules épithéliales alvéolaires basales d'adénocarcinome humain). La synthèse d'analogues a conduit à l'identification de **SB-RA-5001**, aussi puissant sur *M. tuberculosis* avec une CMI de 1,25 à 5 μM mais ayant une CI_{50} sur cellule humaine supérieure à 80 μM ¹⁴³. Le **dacomitinib** (Figure 31), un anticancéreux classiquement utilisé contre le cancer du poumon non à petites cellules, a également été identifié par criblage virtuel et montre une activité modeste sur *B. subtilis* et *S. aureus*¹⁴⁵.

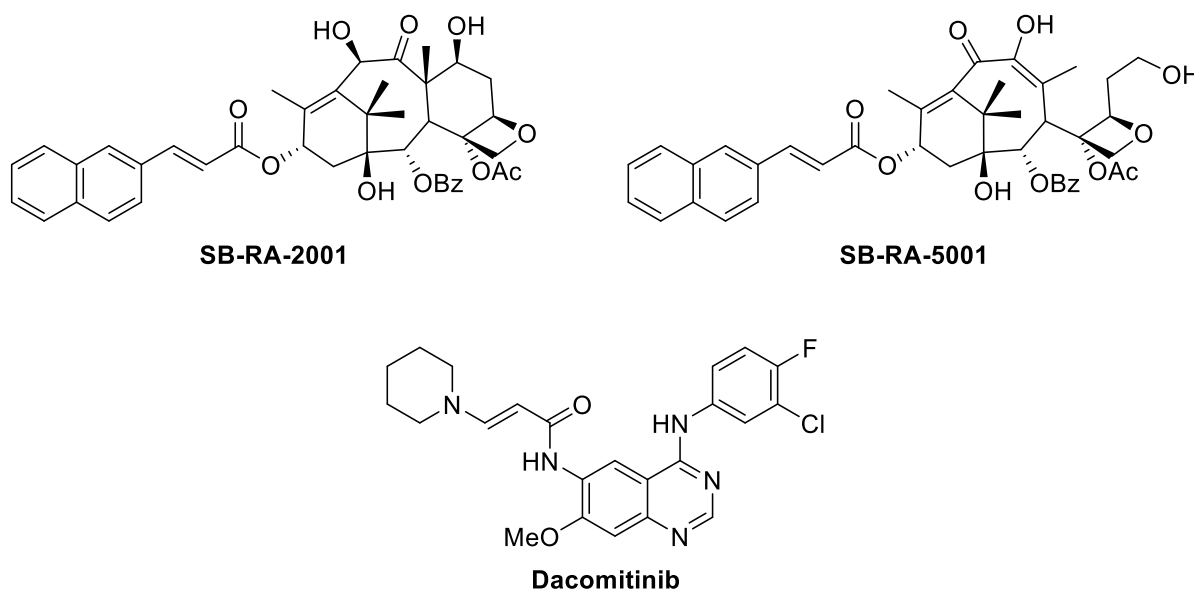


Figure 31 : Structures de taxanes et du **dacomitinib**, actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

3.2.7. Dérivés de la rhodanine

En 2009, le criblage d'une chimiothèque de 81 composés sur leur capacité à perturber la polymérisation de FtsZ a permis d'identifier l'**OTBA** (Figure 32), un dérivé de la rhodanine stabilisant les protofilaments de FtsZ et ayant une CMI de 2 μM sur *B. subtilis*¹⁴⁶. Trois ans plus tard, le criblage de 150 dérivés de la rhodanine a conduit à l'identification de huit composés antibactériens, dont **CCR-11**, capable d'inhiber l'activité GTPasique de FtsZ et se liant à la protéine avec un K_D de 1,5 μM ¹⁴⁷.

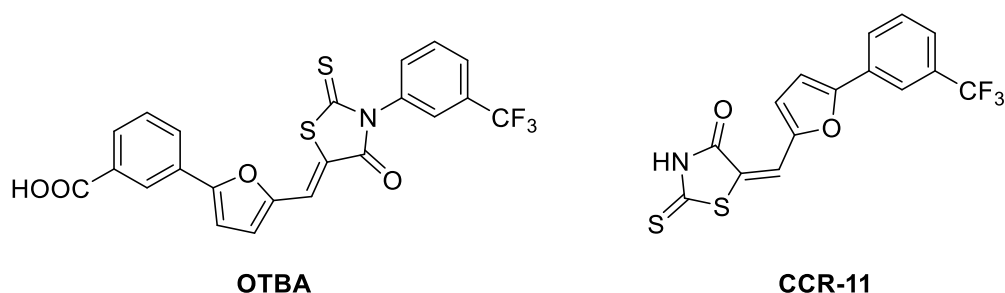


Figure 32 : Structures de dérivés de la rhodanine actifs sur FtsZ et ciblant la poche allostérique.

3.2.8. [Conclusion](#)

La poche allostérique de FtsZ située entre l'hélice H7, la boucle T7 et le domaine C-terminal est un domaine fréquemment ciblé lors de la recherche d'inhibiteurs de FtsZ. Certaines familles d'inhibiteurs sont très développées, à l'instar des dérivés benzamides et quinoliniums. Si cette poche peut s'apparenter aux sites de liaison à la colchicine ou aux taxanes chez la tubuline, aucun acide aminé n'est en commun, ce qui limite les risques de toxicité croisée : la colchicine et le **PC190723** peuvent tous deux se lier à la tubuline et à FtsZ, avec des affinités non-comparables⁵⁹. Cependant, cette poche allostérique est également peu conservée entre les espèces bactériennes, limitant le développement d'antibiotiques à large spectre. Il est également à noter que FtsZ n'échappe pas non plus aux mécanismes classiques de la résistance, et que la mutation spontanée de certains acides aminés de la poche (comme les mutations G196A ou G196S) empêchent la liaison de certains composés à la protéine^{55,90}.

3.3. [Autres inhibiteurs et stratégies](#)

Outre le site de liaison au GTP ou la poche allostérique, d'autres sites de liaison sont possibles pour l'inhibition de FtsZ. Certains inhibiteurs ont également été décrits sans site de liaison défini. Enfin, d'autres stratégies d'inhibition de l'action de FtsZ, impliquant entre autres des peptides, sont également possibles.

3.3.1. [Site de liaison différent](#)

Benzoimidazoles et indènes

Plusieurs séries d'inhibiteurs portant un bicyclic aromatique ont été développées. En 2011, 300 benzoimidazoles trisubstitués en position 2,5,6 et 2,5,7 ont été criblés sur leur activité antituberculeuse¹⁴⁸. L'un des composés identifiés, **Imidazole-1** (Figure 33), a une CMI de 2 μM sur *M. tuberculosis* pour une CI_{50} supérieure à 400 μM sur des cellules Vero. La liaison du ligand à FtsZ entraîne une augmentation de l'activité GTPasique, ce qui déstabilise les protofilaments. D'autres benzimidazoles trisubstitués en position 2, 5 et 6 ont été synthétisés et testés sur *M. tuberculosis* en 2014, et **Imidazole-2** a été identifié comme capable de se lier à FtsZ avec un K_D de 1,32 μM ¹⁴⁹. Le criblage en 2015

d'une autre chimiothèque de benzoimidazoles a permis d'identifier **Imidazole-3**, ayant une CMI de 17 μM contre *B. subtilis*¹⁵⁰. Ce composé se lie à FtsZ avec un K_D de 24 μM et inhibe l'activité GTPasique. Il est à noter que les études de docking montrent que ce ligand se fixerait proche de la boucle T7, mais pas dans le site allostérique. Cependant, il est cytotoxique avec une CI_{50} de 17 μM sur des cellules HeLa.

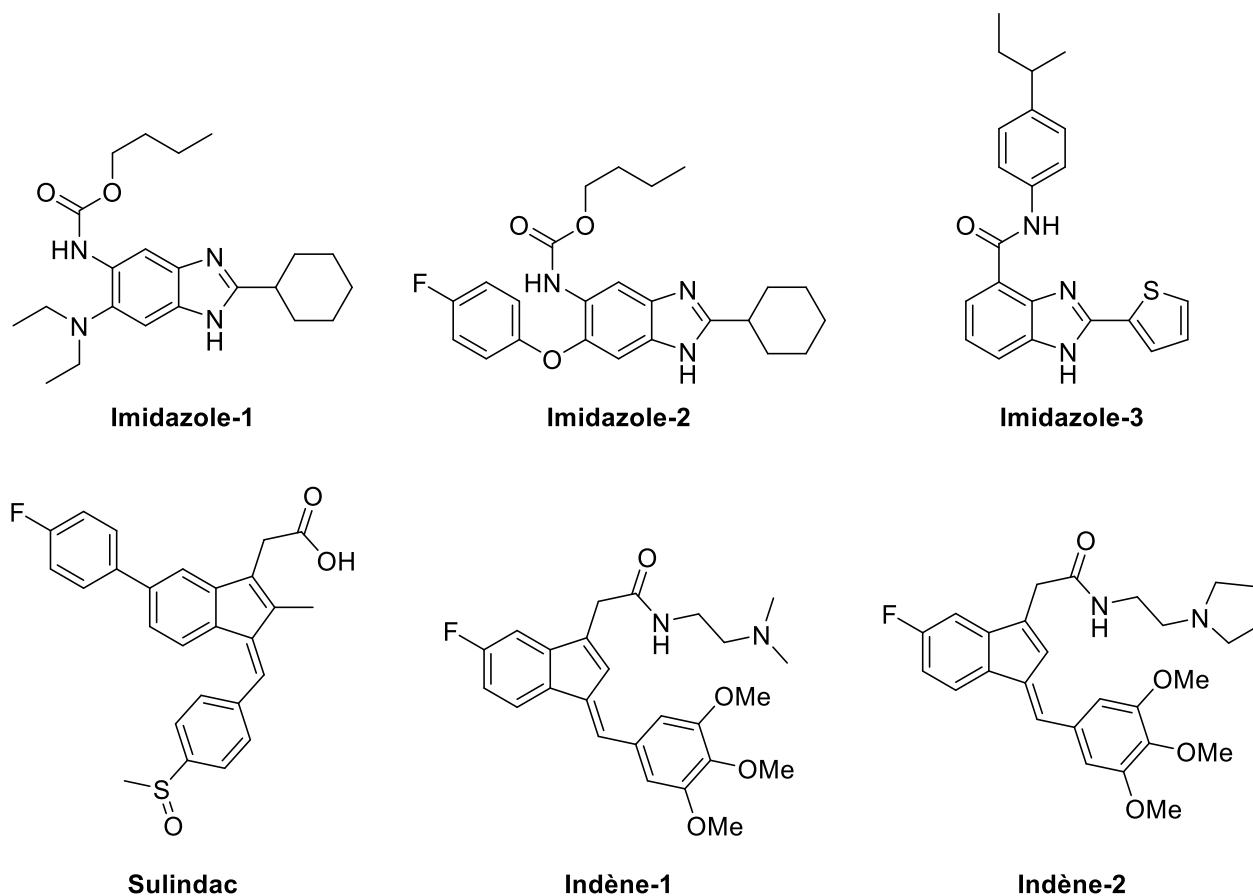
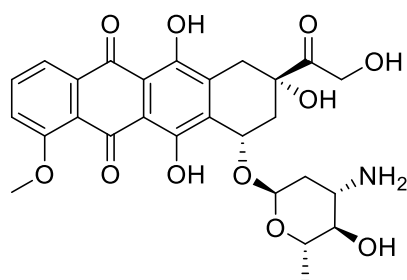


Figure 33 : Structures de dérivés bicycliques actifs sur FtsZ.

En 2016, Robert C. Reynolds et son équipe ont développé de nouveaux antituberculeux basés sur la structure du **Sulindac** (Figure 33), un anti-inflammatoire non-stéroïdien portant un motif indène. Les meilleurs composés (**Indène-1** et **Indène-2**) ont des CMI de 72,5 et 68,5 μM respectivement, et inhibent la polymérisation de FtsZ mais pas de la tubuline¹⁵¹. A l'instar d'**Imidazole-3**, le docking suggère que le site de liaison soit à côté de la poche allostérique.

Doxorubicine

Molécule naturelle issue de *Streptomyces peucetius*, la **doxorubicine** (Figure 34) a une CMI de 5 μM contre *S. aureus* en inhibant l'activité GTPasique de FtsZ¹⁵². La liaison à la protéine est forte (K_D de 120 nM) et des études de modélisation et de mutations ont montré un site de liaison différent de celui du GTP et de la poche allostérique.



Doxorubicine

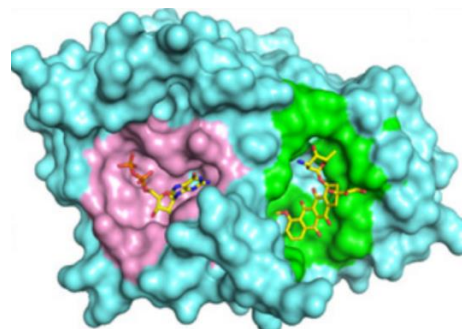
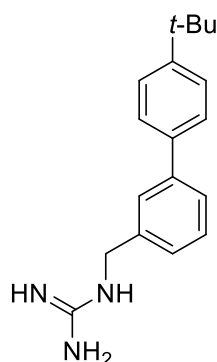


Figure 34 : Structure de la **doxorubicine** et site de liaison probable sur SaFtsZ (rose : site de liaison du GTP ; vert : site de liaison de la doxorubicine) (figure issue de Panda *et al.* 2015¹⁵²).

Guanidinométhyl-biaryle

Durant un travail consistant à découvrir de nouveaux inhibiteurs de FtsZ, Daniel S. Pilch et son équipe ont identifié en 2012 **Gua-1**, un dérivé guanidinométhyle portant un motif biphenyl (Figure 35)¹⁵³. Cette molécule a une CMI de 3,6 μM et se fixerait à proximité du domaine C-terminal. Cette structure n'est également pas sans rappeler **Napht-1** (Figure 23, page 40), molécule portant également un motif guanidine en position benzylique et développée par la même équipe en 2013.



Gua-1

Figure 35 : Structure de dérivé guanidinométhyle actif sur FtsZ.

3.3.2. Site de liaison non décrit

De nombreux inhibiteurs de FtsZ ont également été décrits sans site de liaison défini dont les structures sont regroupées dans la Figure 36. C'est le cas de plusieurs molécules naturelles, comme le **totarol**, issu de *Podocarpus totara* et inhibant l'activité GTPasique de FtsZ et ayant une CMI de 2 μM chez *B. subtilis* sans montrer de toxicité sur des cellules HeLa¹⁵⁴. Des analogues indolototarol bioactifs ont également été synthétisés, mais ils ne ciblent pas FtsZ¹⁵⁵. La **dichamanetine**, isolée depuis *Uvaria chamae*, est également capable d'inhiber l'activité GTPasique de FtsZ et a une CMI de 1,7 μM contre *B. subtilis* et *S. aureus*¹⁵⁶. En 2002, le criblage d'inhibiteurs potentiels de la tubuline sur *M. tuberculosis* a permis d'identifier **SRI-3072**, une ptéridine inactive sur la tubuline et ayant une CMI de 0,47 μM contre cette bactérie¹⁵⁷. Par la suite, des analogues ptérazines

ont été synthétisés et testés, mais ils étaient moins puissants et plus cytotoxiques^{158,159}. On retrouve également le **C109**, un benzothiadiazole initialement décrit comme actif contre *Burkholderia cenocepacia* qui a également une CMI de 7 μM à 14 μM contre *S. aureus*, et le **DAPI**, sonde fluorescente se liant à la tubuline également capable d'inhiber l'activité GTPasique de FtsZ chez *E. coli* de manière incompétitive¹⁶⁰⁻¹⁶². La **tiplaxtinine** est un acide oxoacétique indole connu pour être un inhibiteur de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1). Une étude menée en 2017 a également montré que ce composé était également actif sur FtsZ, et a une CMI de 4,5 μM sur *S. aureus*¹⁶³. Son action se fait par inhibition de l'activité GTPasique, stimulant la polymérisation des protofilaments. Un dérivé dihydroacridine **DHA** a été identifié en 2021 comme promouvant la polymérisation de FtsZ et ayant une CMI de 4 μM contre *S. aureus*¹⁶⁴. Enfin, le **rouge de ruthénium** est capable de réduire l'activité GTPasique de FtsZ par compétition avec les ions calcium¹⁶⁵.

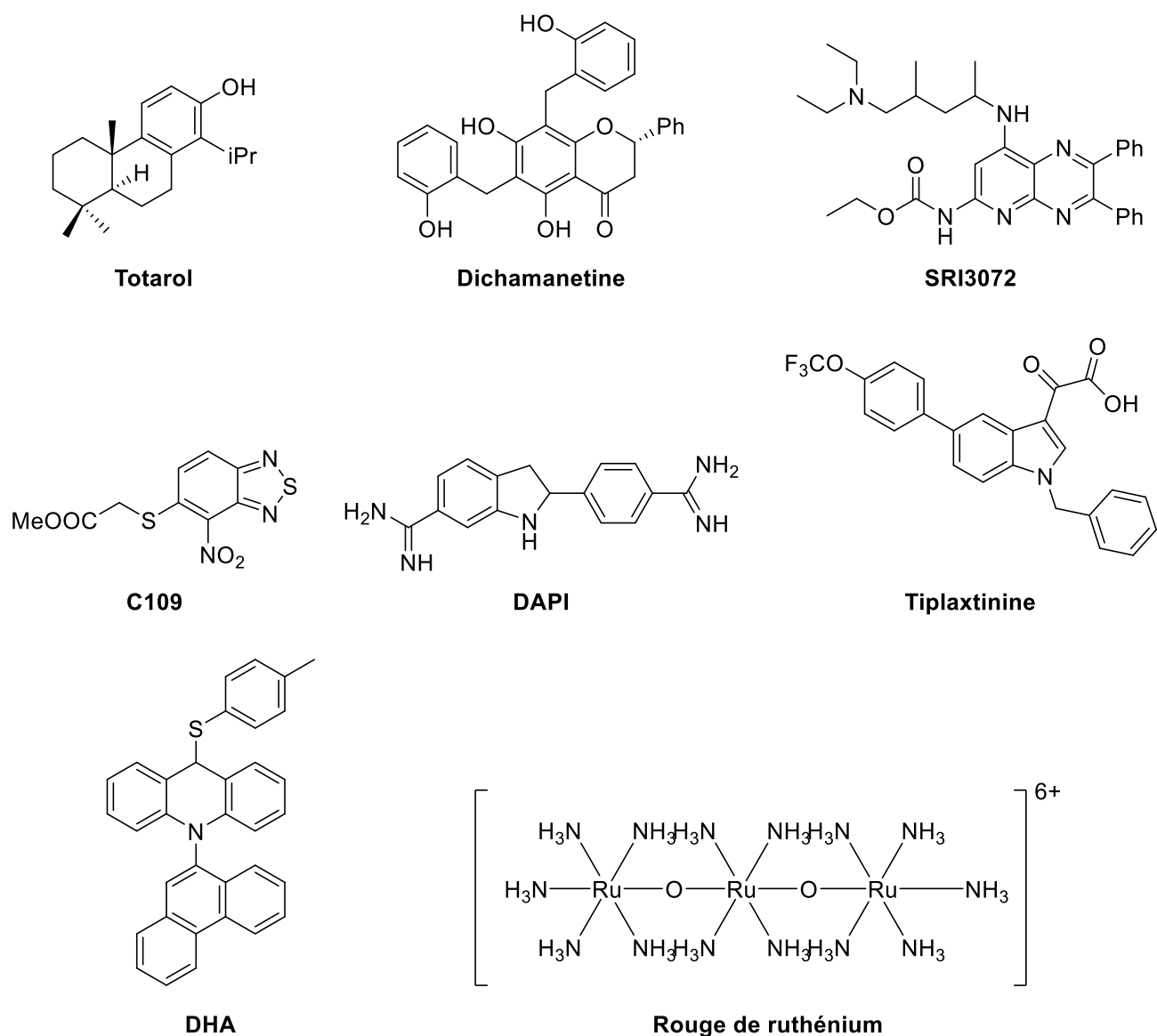


Figure 36 : Inhibiteurs de FtsZ sans site de liaison à la protéine défini

3.3.3. Stratégies alternatives

Outre l'utilisation de petites molécules se liant au sein de FtsZ, d'autres stratégies existent pour inhiber l'action de la protéine dans le divisome.

Peptides

Plusieurs peptides naturels sont capables d'inhiber l'action de FtsZ, à l'instar du MciZ (*mother cell inhibitor of FtsZ*), issu de *B. subtilis*. En effet, ce peptide de 40 acides aminés se lie à l'extrémité C-terminale de FtsZ, ce qui déplace la boucle T7 et prévient la polymérisation (Figure 37)^{166,167}. Chez les cellules de mammifères, le peptide de 37 acides aminés CRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*) est un mécanisme de défense qui se fixe au niveau de la boucle T7 et inhibe la polymérisation de FtsZ¹⁶⁸. Enfin, l'édéine B, peptide antibiotique inhibant la biosynthèse des protéines est également capable d'inhiber la polymérisation de FtsZ¹⁶⁹.

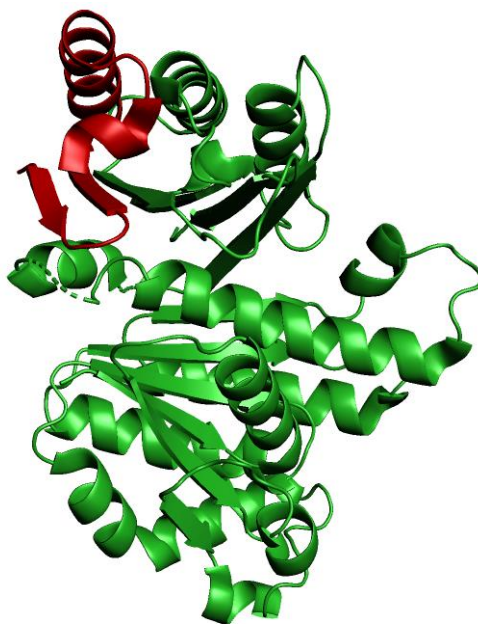
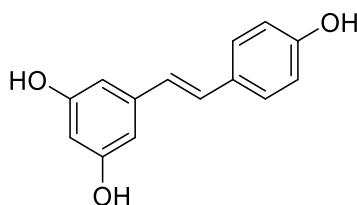


Figure 37 : Structure de FtsZ de *B. subtilis* (BsFtsZ, vert) co-cristallisé avec MciZ (rouge), (code PDB : 4U39)¹⁶⁷.

Inhibition de la synthèse de FtsZ

Une stratégie alternative en recherche médicale est de cibler non pas la protéine dont l'action doit être inhibée, mais directement l'ARN messager (ARNm) codant pour cette protéine, prévenant donc sa synthèse. Les acides nucléiques peptidiques (ANP) sont des analogues synthétiques d'acides nucléiques pour lesquels le squelette glycoposphaté a été remplacé par un pseudo-peptide¹⁷⁰. Un ANP ayant une séquence complémentaire de la séquence de l'ARNm ciblé se lie à ce dernier, empêchant la traduction de l'ARNm. Ces dernières années, plusieurs ANP ciblant l'ARNm de FtsZ ont

été développés, prévenant la croissance des bactéries¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Des acides nucléiques bloqués (des analogues d'acides nucléiques ayant un pont méthylène entre l'oxygène du C2 et le C4) ont également été utilisés contre FtsZ¹⁷⁵. Enfin, le **resvératrol** (Figure 38) inhibe l'expression du gène *ftsZ*, prévenant ainsi la formation de l'anneau Z et la cytokinèse¹⁷⁶.



Resvératrol

Figure 38 : Structure de **resvératrol** inhibant l'expression du gène *ftsZ*.

Interaction FtsZ – ZipA

L'inhibition de l'interaction protéine-protéine entre FtsZ et ZipA est également une stratégie intéressante¹⁷⁷. Cependant, les composés des travaux rapportés dans la littérature ne ciblent pas l'extrémité C-terminale de FtsZ mais plutôt la poche de ZipA où cette dernière s'insère¹⁷⁸⁻¹⁸¹.

3.3.4. Synergie avec les β -lactames

Si l'inhibition de FtsZ permet à elle seule de prévenir la croissance bactérienne, il a également été démontré qu'elle pouvait resensibiliser des souches comme le SARM aux β -lactames⁶¹. Cet effet est dû à une délocalisation des PBP (Penicillin-Binding Protein) loin du septum de division, dont la protéine PBP2a responsable du phénomène de résistance¹⁸². L'utilisation combinée d'inhibiteurs de FtsZ et de β -lactames peut donc être une alternative thérapeutique dans la lutte contre les bactéries résistantes.

3.4. Conclusion

Face à la nécessité de trouver de nouveaux antibiotiques avec des mécanismes d'action innovants, l'inhibition de la protéine FtsZ est un choix pertinent. Plusieurs sites de liaison sont possibles, et un nombre conséquent d'inhibiteurs ont été recensés avec des CMI pouvant parfois aller jusque 39 nM contre *B. subtilis*⁹⁵. Cependant, à ce jour un seul composé est actuellement en phase de développement clinique, le **TXA709**, illustrant ainsi les difficultés à transposer les nouveaux antibiotiques potentiels de la paille au lit du patient. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux inhibiteurs de FtsZ reste d'autant plus pertinente.

III. Objectifs du projet

L'objectif de ce projet était donc de concevoir et de développer de nouveaux inhibiteurs de FtsZ afin de lutter contre le staphylocoque doré antibiorésistant. Ces travaux se positionnent comme une contribution aux diverses stratégies qui visent à faire face au danger imminent que constitue l'émergence de pathogènes antibiorésistants.

Deux démarches ont été envisagées afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de FtsZ. La première consistait à développer de nouveaux dérivés en se basant sur le 2,6-difluorobenzamide, pharmacophore récurrent chez les inhibiteurs de FtsZ. Trois méthodes ont été utilisées pour développer les nouveaux composés, à savoir :

- Synthétiser des molécules tripartites comportant un cycle central à cinq chaînons, analogues d'inhibiteurs décrits
- Remplacer le 2,6-difluorobenzamide par des analogues afin d'identifier un nouveau pharmacophore innovant pour l'inhibition de FtsZ
- Synthétiser des composés dimériques portant deux motifs benzamides

La deuxième démarche était quant à elle basée sur l'identification de nouveaux inhibiteurs potentiels de FtsZ par criblage virtuel. Deux chimiothèques ont été criblées par docking au sein de la poche allostérique de la protéine, constituées respectivement :

- De molécules variées ayant un potentiel médicamenteux important
- De molécules ayant été identifiées pour leur capacité à stabiliser les microtubules

Après conception ou identification par le criblage virtuel, tous les produits ont été synthétisés et purifiés par des méthodes classiques en chimie organique, puis caractérisés par RMN (résonance magnétique nucléaire) et SM (spectrométrie de masse). L'activité antibactérienne des composés a ensuite été évaluée directement contre *S. aureus* par la mesure de la concentration minimale inhibitrice des produits, à savoir la concentration minimale en produit nécessaire pour inhiber la croissance d'un inoculum bactérien standardisé. Pour les meilleurs produits, l'action sur le divisome et l'absence de cytotoxicité ont également été évaluées. La relation entre la structure des différents produits et leurs activités antibactériennes a également été discutée à la lumière d'études de docking moléculaire.

Dans ce manuscrit sont présentés les travaux portant sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux composés à visée anti-staphylococcique par l'inhibition de la protéine FtsZ.

Chapitre 2

—

Variations du noyau à cinq chaînons
central dans des composés
tricycliques de type benzamide

I. Introduction et démarche

Comme il a été montré dans le chapitre 1, de nombreux inhibiteurs de FtsZ portent un motif benzamide ou difluorobenzamide. Parmi ceux-ci, plusieurs composés tels que les dérivés azolés présentent une structure tripartite similaire à celle montrée dans la Figure 39.

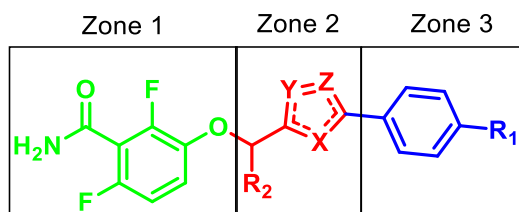


Figure 39 : Structure générale tripartite d'inhibiteurs de FtsZ portant un motif benzamide.

Dans la zone 1, on retrouve un motif 2,6-difluorobenzamide, identifié comme un pharmacophore de choix pour l'inhibition de FtsZ, formant de nombreuses liaisons hydrogène avec les acides aminés de la poche allostérique de la protéine. Par exemple dans le cas de l'oxazole **1**, co-cristallisé avec SaFtsZ (code PDB : 6KVP), le benzamide fait des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Asn263 ainsi qu'avec le squelette des résidus Val207 et Leu209 (Figure 40)¹⁰⁷.

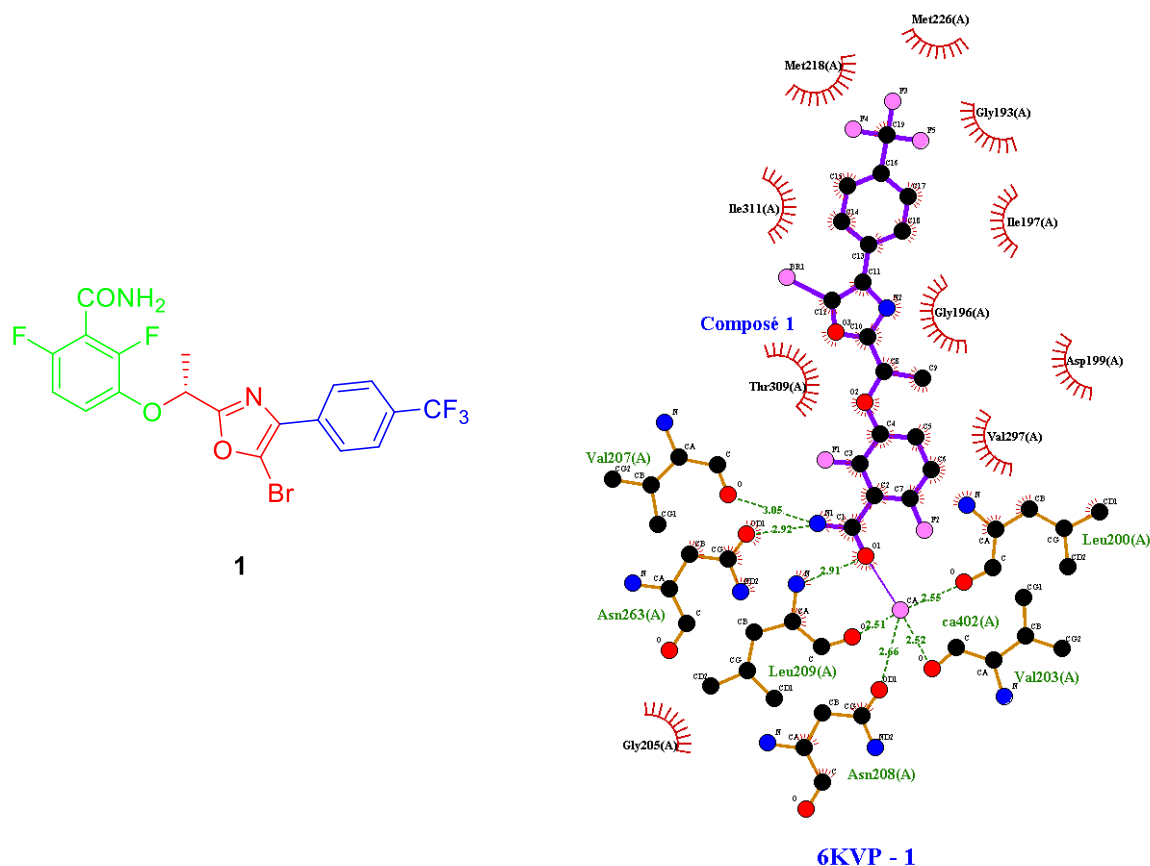


Figure 40 : Structure de l'oxazole **1** et représentation 2D des interactions avec FtsZ.

A la jonction entre les zones 2 et 3, l'oxygène en position 3 du benzamide est relié par une liaison éther à un cycle azolé à cinq chaînons via un groupe méthylène. A ce jour, parmi les hétérocycles recensés comme squelette de cette zone 2, on trouve des dérivés oxazoles, isoxazoles, dihydroisoxazoles et oxadiazolones (Figure 18, page 35)^{93,95-97}. Le groupe méthylène peut également être substitué (R₂), la méthylation étant la modification la plus favorable dans le cas d'analogues du composé **1**.

Enfin, la zone 3 correspond à un noyau phényle substitué en position 4. Plusieurs groupements favorisant l'activité antibactérienne ont été décrits (OCF₃, Cl, OMe) mais le gain d'activité le plus marqué concernait le CF₃ et des substituants très hydrophobes à l'instar du *t*-Bu et du *n*-Bu. Comme on peut le voir dans le cas du dérivé **1**, cela peut s'expliquer par les interactions hydrophobes réalisées entre le groupement trifluorométhyle et les acides aminés Gly193, Met218 et Met226 (Figure 40).

En se basant sur cette structure générale tripartite, le but de notre étude est de trouver de nouveaux inhibiteurs de FtsZ en modifiant de manière systématique les zones 2 et 3.

Concernant la zone 2, le rôle de l'atome d'oxygène présent chez les oxazoles et isoxazoles a été étudié. Une première série de dérivé 1,2,3-triazoles (ne portant donc pas d'atome d'oxygène) a été synthétisée (série **I**). La position de l'atome d'oxygène a également été étudiée *via* trois séries de composés, respectivement deux séries de 1,2,4-oxadiazoles (séries **II** et **III**) et une série de 1,3,4-oxadiazoles (série **IV**). Enfin, une dernière série de furanes (portant donc un oxygène mais pas d'azote) substitués en position 2 et 5 (série **V**) a été préparée. Si les triazoles et les furanes n'ont jamais été rapportés dans la littérature pour une activité antimicrobienne, certains oxadiazoles ont déjà été mentionnés dans un brevet¹⁸³. Cependant, seules des plages d'activité sont rapportées, rendant difficile toute étude de relation structure-activité.

Concernant la zone 3, trois motifs ont été utilisés : un groupement phényle servant de référence, et deux groupements 4-trifluorométhylphényle et 4-*tert*-butylphényle, meilleurs substituants décrits dans la littérature^{93,95}.

La structure générale des composés des cinq séries est présentée ci-contre (Figure 41).

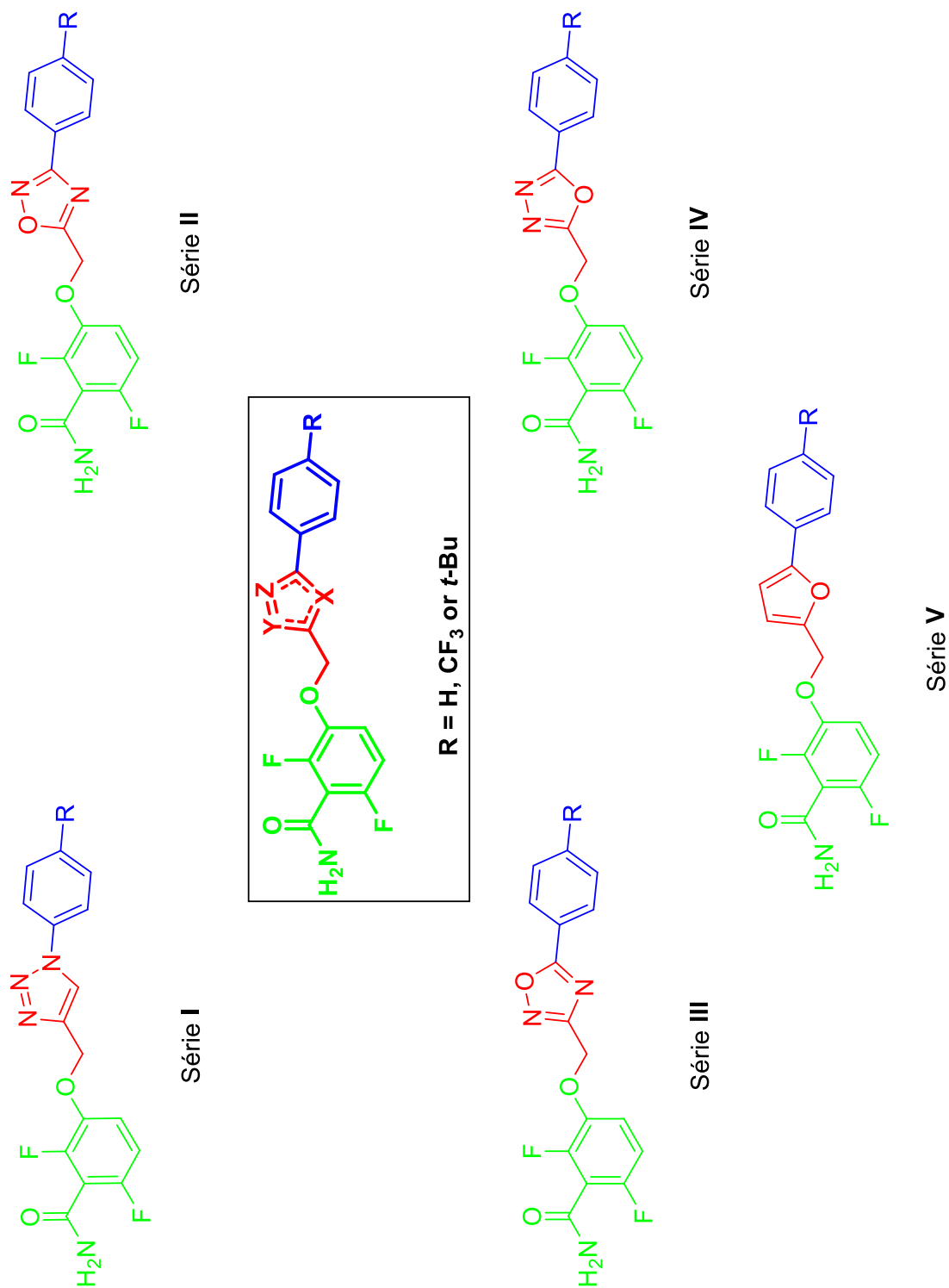


Figure 41 : Structures générales des dérivés triazoles de la série I, des dérivés oxadiazoles des séries II, III et IV et des dérivés furanes de la série V.

II. Synthèse des séries I, II, III, IV et V et évaluation biologique sur *S. aureus*

1. Synthèse des composés

La synthèse du 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide, synthon commun aux cinq séries, est décrite dans le Schéma 1 et se base sur la littérature récente⁹⁷. La première étape consistait à protéger le 2,4-difluorophénol par un groupement benzyle pour obtenir le dérivé **3**. Ce dernier a ensuite été déprotoné sélectivement sur le carbone 3, puis le lithien formé a été carboxylé en présence de carboglace pour obtenir l'acide benzoïque **4**. Cet acide a ensuite été converti en benzamide correspondant via un intermédiaire chlorure d'acyle et de l'ammoniaque, puis débenzylé en présence de palladium sur charbon 10 % et de formiate d'ammonium pour obtenir le dérivé phénolique **6** avec un rendement global de 59 % sur six étapes.

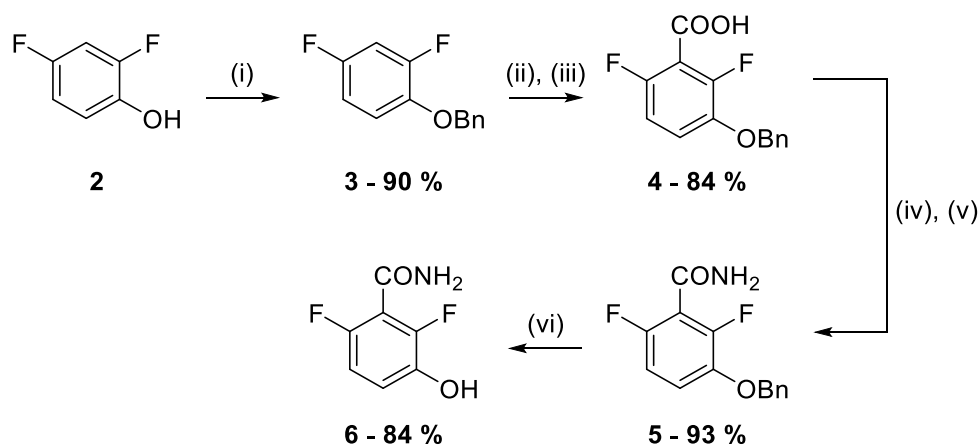


Schéma 1 : Synthèse du 2,6-difluoro-3-hydroxyphénol **6**. Réactifs et conditions : (i) BnBr, K₂CO₃, NaI, ACN, 70 °C, 16 h ; (ii) *n*-BuLi, THF, - 78 °C, 1 h ; (iii) carboglace, t.a., 16 h ; (iv) (COCl)₂, DMF cat., DCM, t.a., 1 h ; (v) NH₃ 30 % aq., THF, 0 °C puis t.a., 3 h ; (vi) Pd/C, formiate d'ammonium, EtOH, 65 °C, 6 h.

Le benzamide **6** désiré a bien été obtenu, comme on peut le voir sur le spectre RMN ¹H (Figure 42). D'une part, on peut noter que l'environnement électronique des deux protons de l'amide est différent, séparant le signal du NH₂ en deux singulets élargis intégrant chacun pour un des protons. D'autre part, le couplage ¹⁹F – ¹H est également visible en RMN, ce qui explique pourquoi les signaux des protons H4 et H5 sont respectivement un doublet de doublet de doublet et un triplet de doublet. Les couplages ¹⁹F – ¹³C sont également visibles en RMN du carbone (Figure 42), et à l'exception du carbone de l'amide, tous les signaux sont des doublets de doublets. Les pics des carbones 2 et 6 ont ainsi des constantes de couplages autour de 240 Hz et 7 Hz, tandis que les deux ²J du carbone 1 sont de 24,6 et 20,4 Hz.

Partie 1 – Chapitre 2

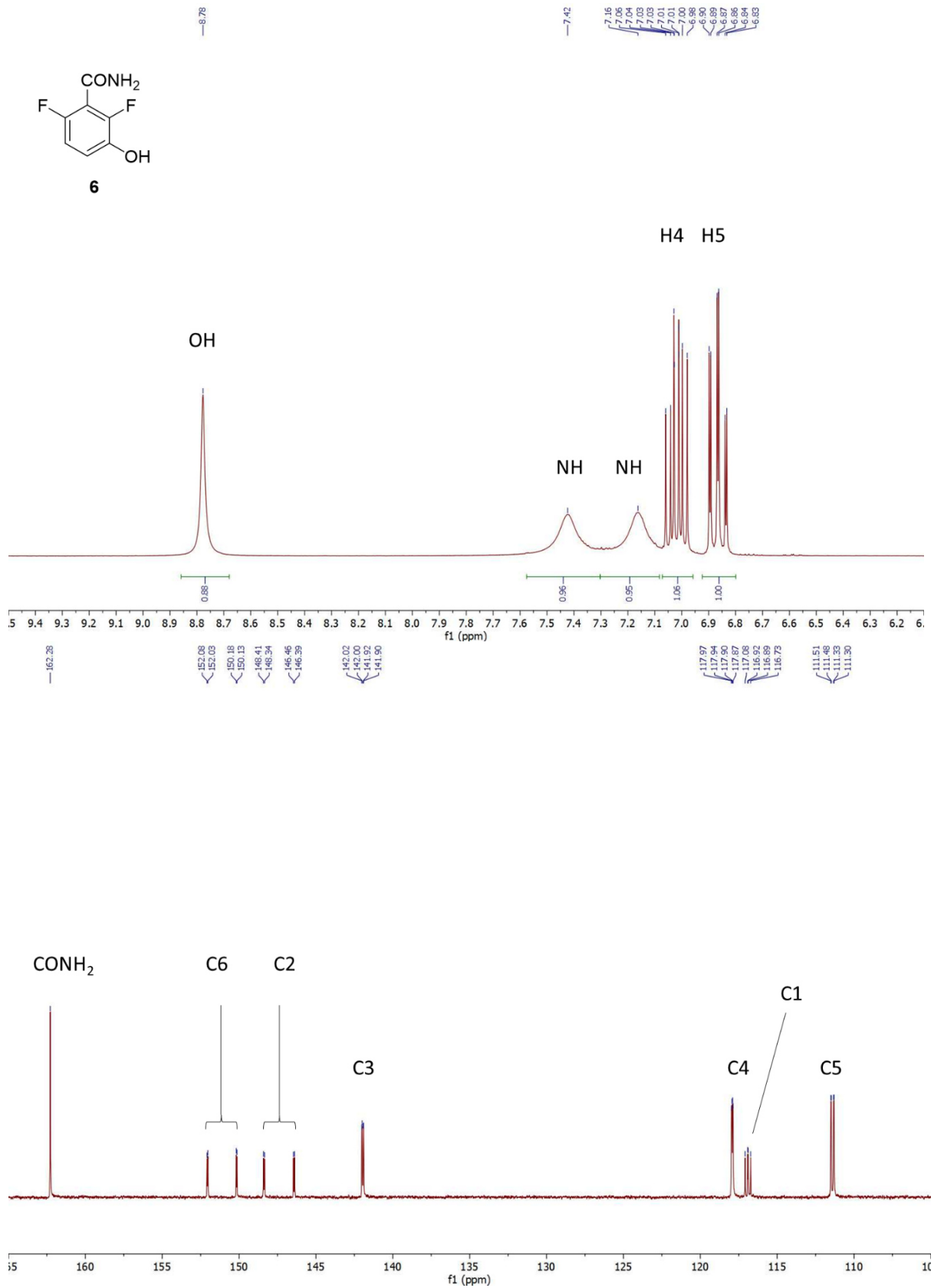


Figure 42 : Spectres RMN ^1H et ^{13}C du benzamide 6.

La synthèse des dérivés 1,2,3-triazoles de la série **I** est décrite dans le Schéma 2. Le benzamide **6** précédemment synthétisé a été alkylé avec du bromure de propargyle pour obtenir l'alcyne **7**. En parallèle, les fonctions amines de trois anilines (respectivement l'aniline **8a**, la 4-trifluorométhylaniline **8b** et la 4-*tert*-butylaniline **8c**) ont été converties en azotures à l'aide de *tert*-butylnitrite et d'azoture de triméthylsilyle tel que décrit dans la littérature¹⁸⁴. Les intermédiaires azotures n'ont pas été isolés mais directement engagés en présence de l'alcyne **7** et d'iodure de cuivre (I) pour obtenir par cycloaddition les dérivés 1,2,3-triazoles **I.a-c**. Il est à noter que les réactions n'ont pas été répétées et optimisées pour augmenter le rendement, car le but était d'obtenir les produits en quantité et en pureté suffisante pour les étapes suivantes et l'évaluation biologique. Cette approche peut donc expliquer les rendements parfois modestes obtenus lors de la synthèse des différents produits présentés dans ce manuscrit.

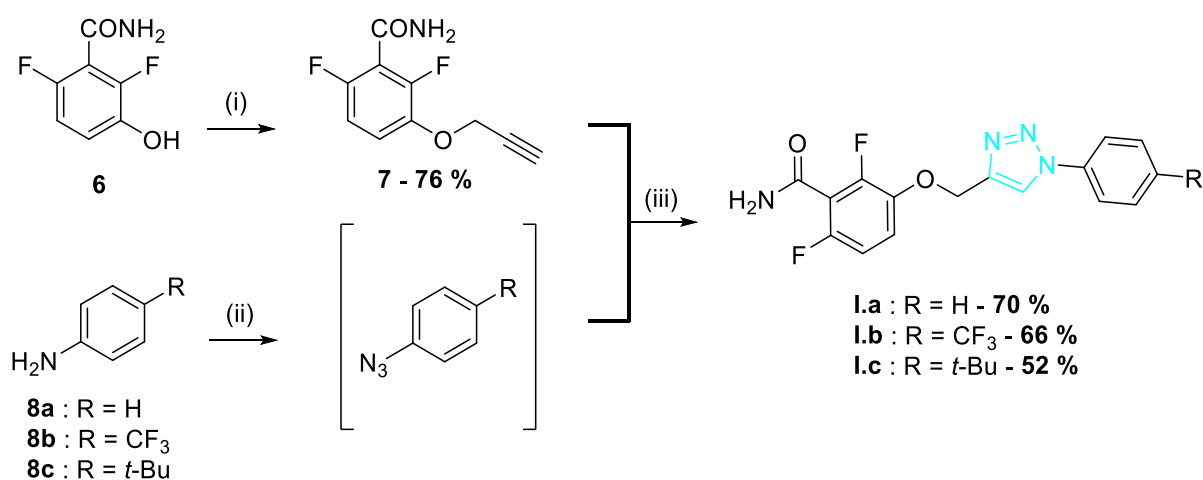


Schéma 2 : Synthèse des dérivés triazoles de la série **I**. Réactifs et conditions : (i) bromure de propargyle, K₂CO₃, acétone, t.a., 24 h ; (ii) *t*-BuONO, TMSN₃, ACN, 0 °C puis t.a., 7 h ; (iii) CuI, DIPEA, t.a., 16 h.

La voie de synthèse initialement envisagée pour les 1,2,4-oxadiazoles de la série **II** est décrite dans le Schéma 3. A l'instar de la synthèse des dérivés 1,2,3-triazoles, l'idée était de fonctionnaliser le groupement phénol du benzamide et de réaliser la diversification structurale lors de la dernière étape. Pour ceci, le phénol a dans un premier temps été alkylé par du bromoacétate de *tert*-butyle pour obtenir l'ester **9**, qui a ensuite été déprotégé par de l'acide trifluoroacétique (TFA) pour conduire à l'acide **10**⁹⁷. En parallèle, différents benzonitriles **11** ont été convertis en hydroxyamidines correspondantes **12** à l'aide d'hydroxylamine et de triéthylamine dans l'éthanol, tel que décrit dans la littérature¹⁸⁵. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'acyler les hydroxyamidines (via un intermédiaire chlorure d'acyle ou des agents de couplages) puis de cycliser la molécule pour conduire aux produits finaux.

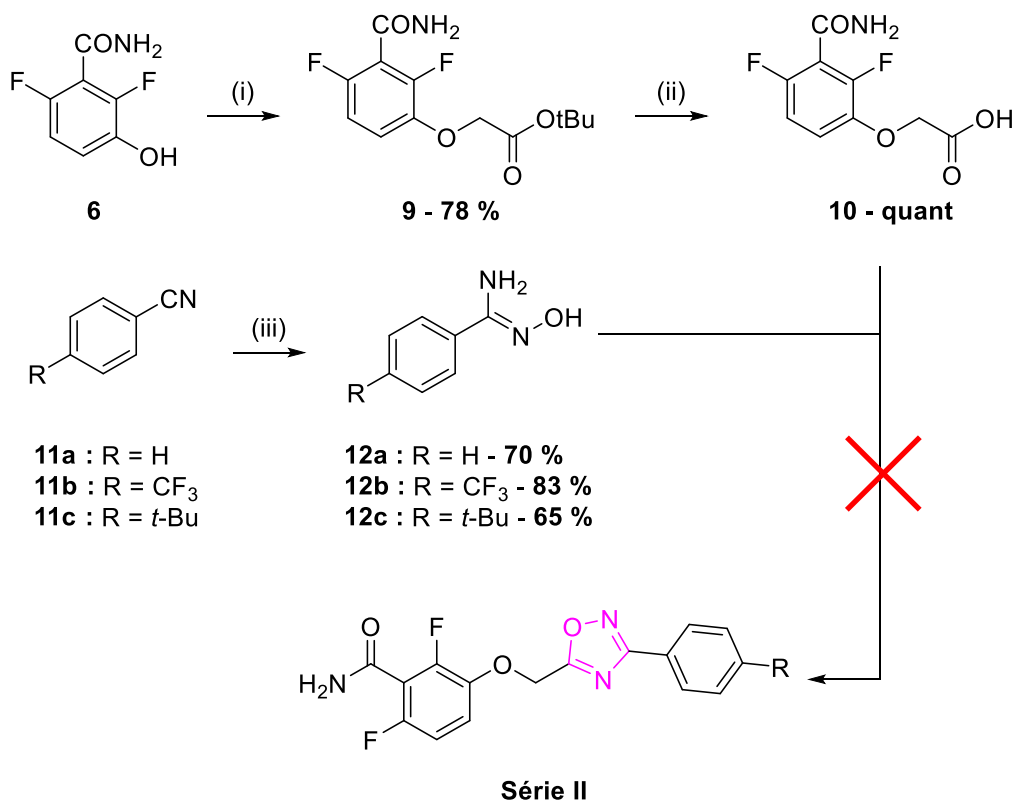


Schéma 3 : Voie de synthèse initialement envisagée pour la synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles de la série II. Réactifs et conditions : (i) bromoacétate de *tert*-butyle, K₂CO₃, acétone, t.a., 24 h ; (ii) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (iii) HO-NH₂·HCl, Et₃N, EtOH, 80 °C, 2 h.

Ce problème a été contourné en acylant les hydroxyamidines **11** avec du chlorure de chloroacétyle, puis en réalisant la cyclisation dans du toluène à reflux pour obtenir les intermédiaires chlorés **13** (Schéma 4)¹⁸⁶. L'alkylation du benzamide **6** a permis pour finir d'obtenir les composés finaux **II.a-c**⁸⁴.

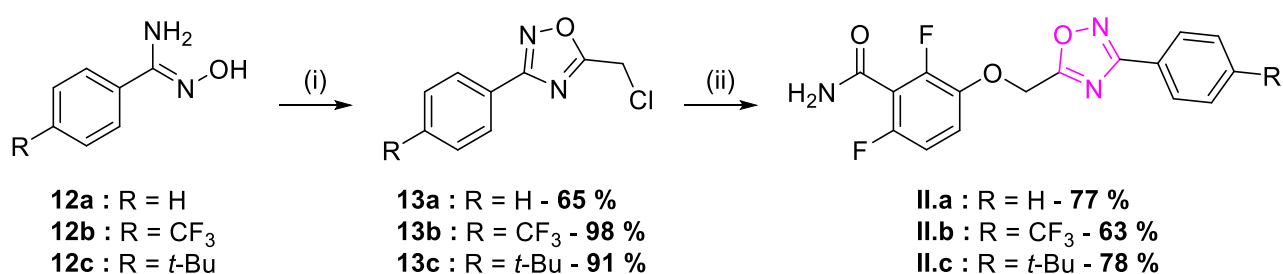


Schéma 4 : Synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles de la série II. Réactifs et conditions : (i) chlorure de chloroacétyle, Et₃N, toluène, 0 °C, 15 min puis reflux, 4 h ; (ii) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 3 h.

En analysant le spectre RMN ^1H du composé **II.c** (Figure 43), on voit qu'on retrouve les pics caractéristiques du noyau difluorobenzamide (H4 et H5, ainsi que les deux singulets élargis du NH₂). Concernant les protons du phényle (H2' et H3'), on peut voir les couplages en 3J et en 4J , ce qui explique que les multiplets correspondant ressemblent à des doublets de triplet.

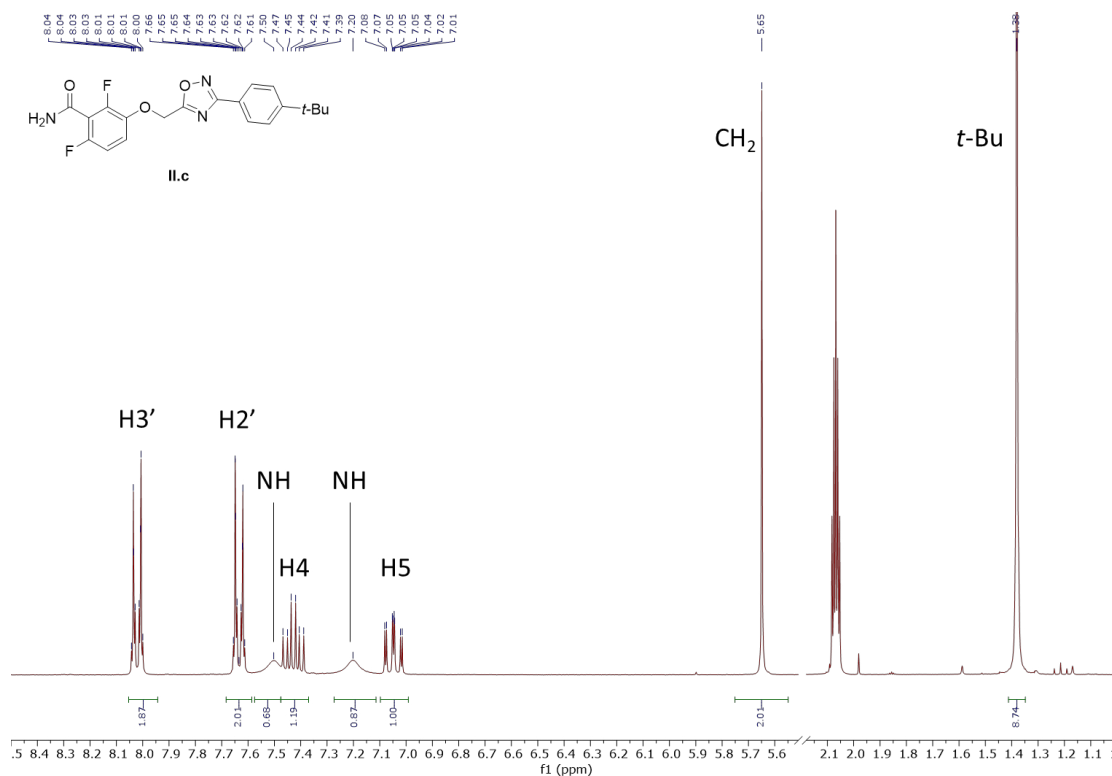


Figure 43 : Spectre RMN ^1H du composé **II.c**.

La synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles de la série **III** est décrite dans le Schéma 5. A l'instar de la série **II**, la stratégie consistait à obtenir un intermédiaire halogéné puis d'alkyler le benzamide **6**. Pour ceci, le chloroacétonitrile **14** a été converti en 2-chloro-*N*-hydroxyacetamidine **15**, puis acylé par différents chlorures de benzoyle et cyclisé à reflux dans le toluène^{187,188}. Dans le cas du composé **16a**, le chlorure de benzoyle commercial a été utilisé, tandis que pour les dérivés 4-trifluorométhylphényle **16b** et 4-*tert*-butylphényle **16c**, les chlorures d'acyles ont été préalablement formés à partir des acides benzoïques correspondants et de chlorure d'oxalyle. L'alkylation finale du benzamide **6** dans les mêmes conditions que précédemment a permis d'obtenir les oxadiazoles **III.a-c**.

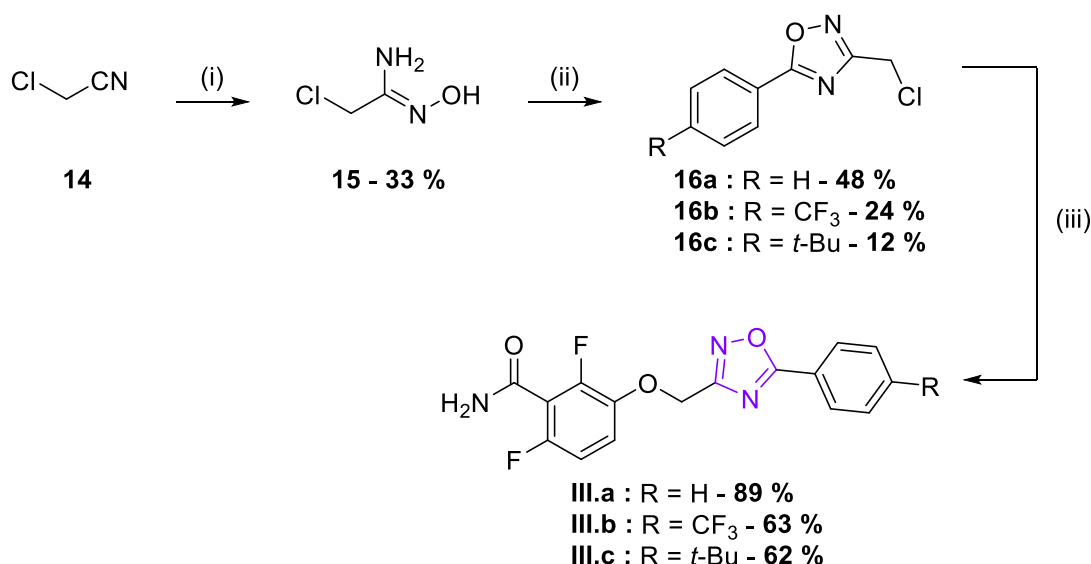


Schéma 5 : Synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles de la série **III**. Réactifs et conditions :
 (i) HO-NH₂·HCl, Na₂CO₃, H₂O, 0 °C, 2 h puis t.a., 2 h ; (ii) RPhCOCl, Et₃N, toluène, 0 °C, 15 min puis reflux, 4 h ; (iii) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 3 h.

La synthèse des dérivés 1,3,4-oxadiazoles de la série **IV** est décrite dans le Schéma 6. Tout d'abord, les acides 4-trifluorométhyl- et 4-*tert*-butylbenzoïques **17b** et **17c** ont été couplés à de la *N*-Boc hydrazine via du DCC (dicyclohexylcarbodiimide) pour obtenir **18b** et **18c**, tandis que **18a** a été obtenu depuis le chlorure de benzoyle¹⁸⁹. Les hydrazides ont ensuite été déprotégés par du TFA et les hydrazines libres ont été acylées par du chlorure de chloroacétyle, puis les intermédiaires ont été cyclisés en présence de POCl₃ pour obtenir les dérivés chlorés **19**¹⁹⁰. Enfin, l'alkylation du benzamide **6** a conduit aux oxadiazoles **IV.a-c**.

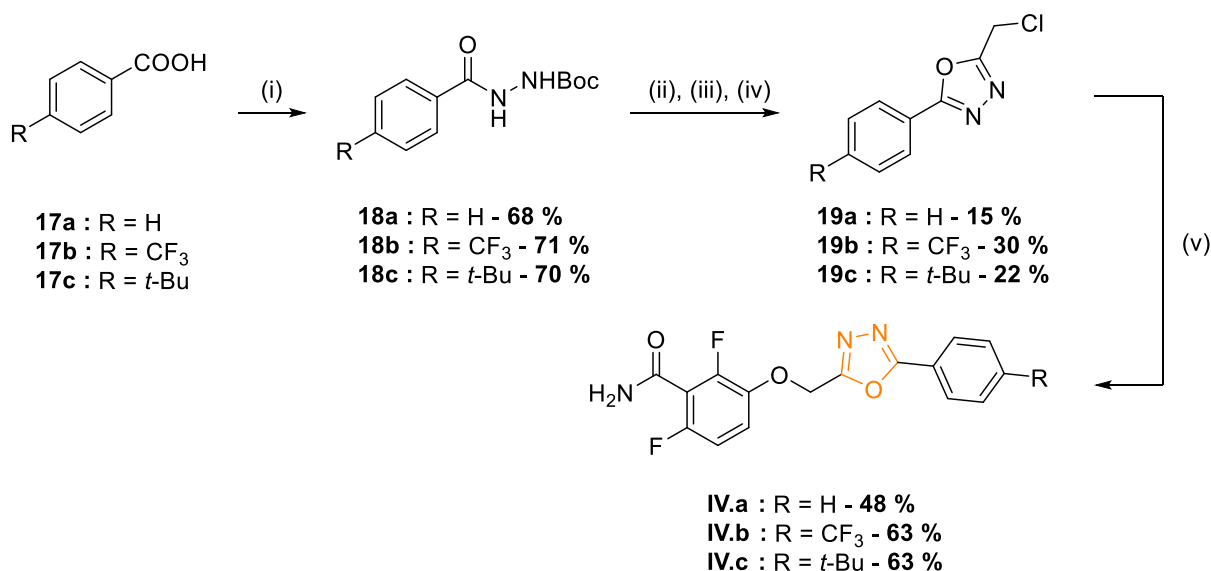


Schéma 6 : Synthèse des dérivés 1,3,4-oxadiazoles de la série **IV**. Réactifs et conditions :
 (i) H₂N-NHBoc, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 16 h ; (ii) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (iii) chlorure de chloroacétyle, Et₃N, toluène, 0 °C, 15 min ; (iv) POCl₃, 110 °C, 3 h ; (v) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 3 h.

La synthèse des dérivés furanes est décrite dans le Schéma 7. L'acide 5-bromo-2-furoïque **20** a été estérifié dans le méthanol, puis a été mis en présence de différents acides boroniques pour obtenir les dérivés **22** par un couplage de Suzuki de manière similaire à ce qui est décrit dans la littérature¹⁹¹. Les esters ont ensuite été réduits en alcools par du triéthylborohydrure de lithium¹⁹². Dans un premier temps, l'activation des alcools **23** a été envisagée, afin d'alkyler le benzamide. Plusieurs méthodes avaient été testées, à savoir le remplacement du groupement hydroxyle par un halogène (brome, chlore ou iode) et la sulfonylation par un mésyle, un tosyle et un triflate. Cependant, la trop grande réactivité de l'intermédiaire activé conduisait à chaque fois à une dimérisation des produits sous la forme de la molécule **24**, dont le spectre RMN ¹H est montré en Figure 44. Une réaction de Mitsunobu avec le benzamide **6** a donc permis de contourner ce problème et de relier le furane au benzamide par le méthylène en une étape et ainsi d'obtenir les dérivés **V** désirés⁹³.

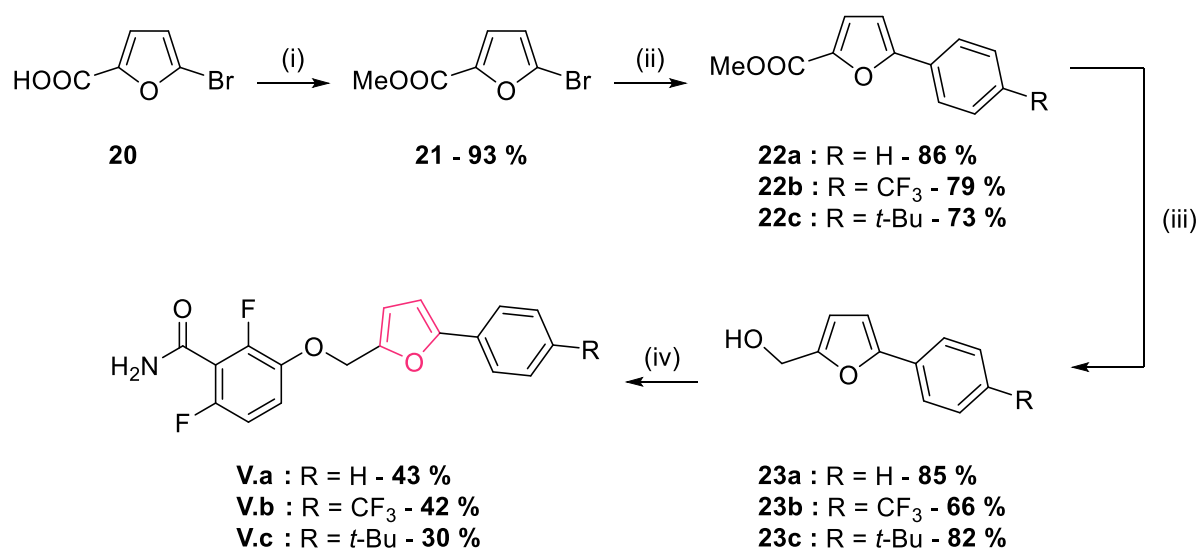


Schéma 7 : Synthèse des dérivés furanes de la série **V**. Réactifs et conditions : (i) SOCl₂, MeOH, 0 °C puis reflux, 3 h ; RPhB(OH)₂, PdCl₂(PPh₃)₂, Na₂CO₃, *i*-PrOH, H₂O, 80 °C, 4 h ; (iii) LiBEt₃H, THF, 0 °C puis t.a., 1 h 30 ; (iv) **6**, PPh₃, DIAD, DCM, t.a., 4 h.

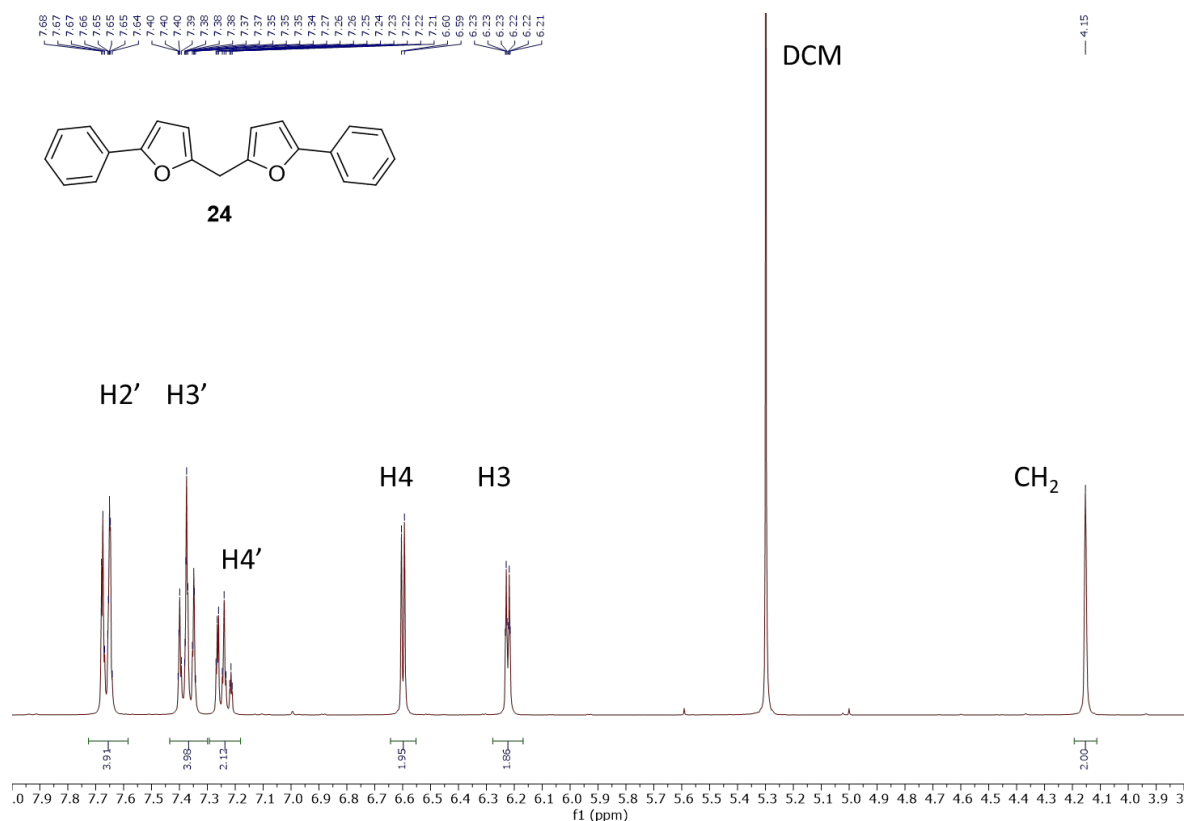


Figure 44 : Spectre RMN ^1H du composé **24**.

Les 15 produits des séries **I** à **V** ont donc pu être obtenus et leurs structures sont présentées dans la Figure 45 ci-après.

2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

Les composés des séries **I**, **II**, **III**, **IV** et **V** ont ensuite été testés pour leur activité antibactérienne contre trois souches de *S. aureus*, à savoir i) une souche ATCC 29213 servant de référence, sensibles aux antibiotiques classique, ii) une souche SF8300, isolat clinique résistant à la méticilline et iii) une souche ST20171643, un isolat clinique résistant à la daptomycine^{193,194}.

Le but de l'expérience est de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque molécule, soit la concentration minimale en produit nécessaire pour inhiber la croissance d'un inoculum bactérien standardisé. Cette expérience se fait par la méthode de microdilution en milieu liquide, tel que recommandé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹⁹⁵.

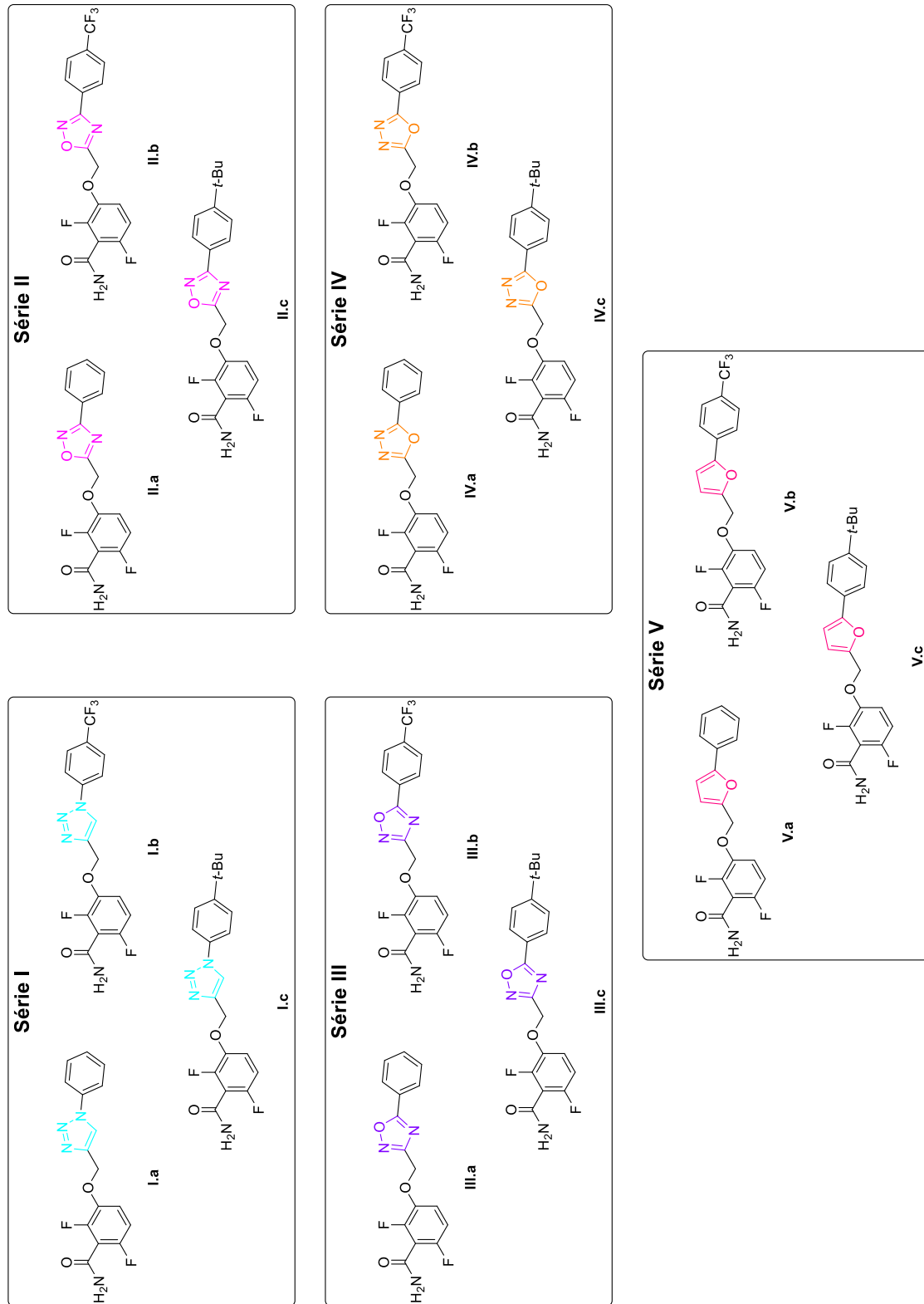


Figure 45 : Structures des composés des séries I à V.

L'expérience est réalisée en trois étapes. Dans un premier temps, les bactéries sont repiquées sur gélose Columbia et cultivées à 37 °C pendant une nuit. Les colonies sont ensuite mises en suspension dans une solution de NaCl 0,45 % à 0,5 McFarland. Cette valeur de turbidité est utilisée comme référence pour les études de CMI et correspond à une absorbance de 0,063 à la longueur d'onde de 600 nm. Les solutions salines sont ensuite diluées au 1/100^{ème} dans le milieu liquide CaMHB (Cation-adjusted Mueller Hilton Broth II) afin d'atteindre une concentration deux fois supérieure à la valeur finale. En parallèle, les produits à tester sont solubilisés dans du DMSO à la concentration de 5 mg/mL, puis les solutions sont stérilisées et diluées au 1/5^{ème} dans le milieu CaMHB pour atteindre une concentration de 1 mg/mL (Figure 46).

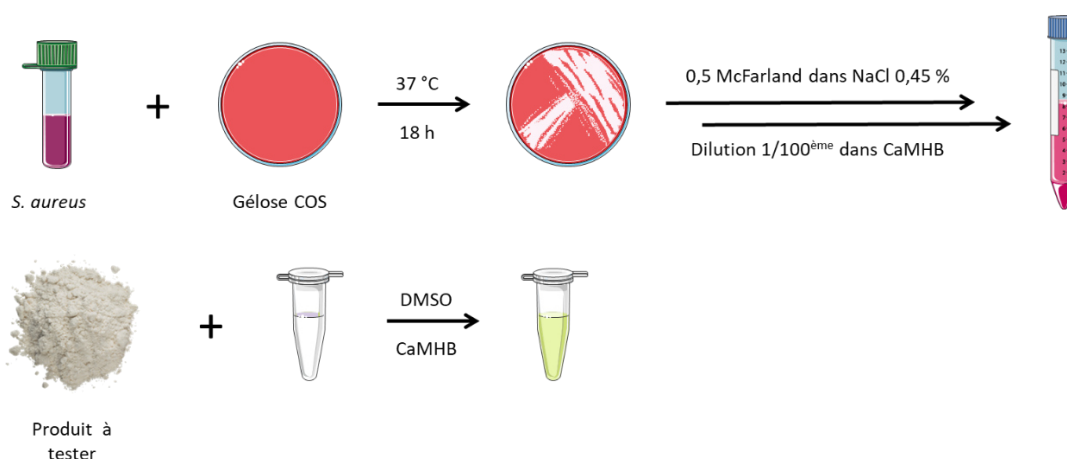


Figure 46 : Première étape lors de l'évaluation des CMI de nouveaux composés sur *S. aureus* : préparation des solutions bactériennes et des composés à tester.

Les composés à tester sont ajoutés sur une plaque 96 puits par une dilution sériée de facteur 2 pour obtenir une concentration finale allant de 256 à 0,25 µg/mL. La dernière ligne correspond au témoin de pousse, pour lequel aucun produit n'est ajouté. Les trois souches bactériennes sont ensuite ensemencées en triplicat pour chaque produit, et les bactéries sont incubées à 37 °C pour la nuit (Figure 47).

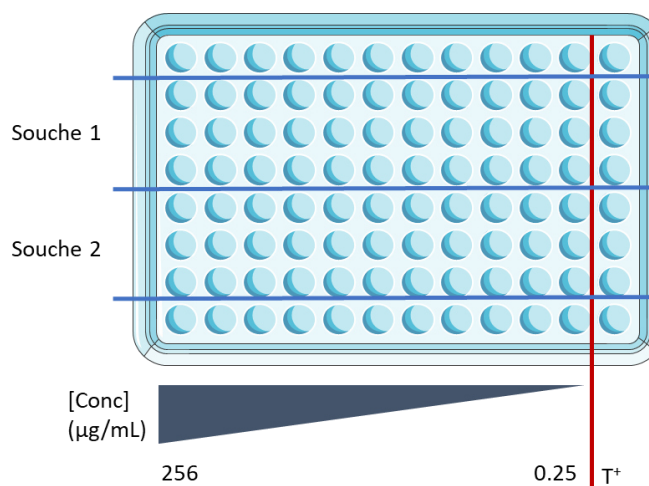


Figure 47 : Deuxième étape lors de l'évaluation des CMI de nouveaux composés sur *S. aureus* : ensemencement de plaque 96 puits avec dilution sériée pour les nouveaux produits.

La CMI est déterminée le lendemain comme étant la concentration en produit la plus basse pour laquelle il n'y a pas eu de croissance bactérienne (Figure 48). Les produits étant testés en triplicats, la valeur médiane est conservée.

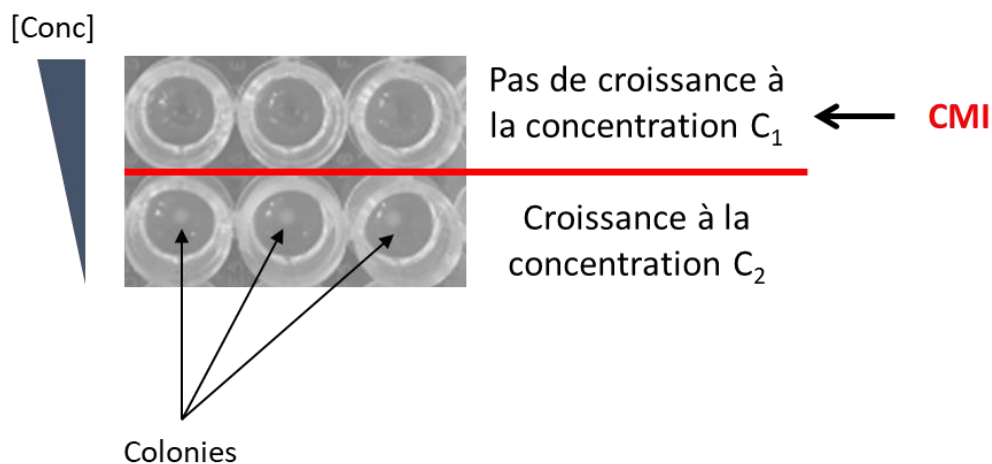
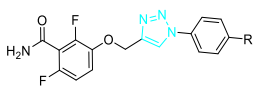
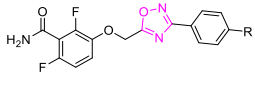
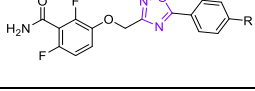
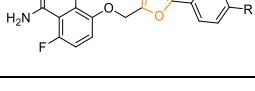
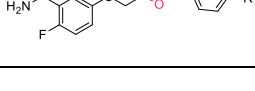


Figure 48 : Troisième étape lors de l'évaluation des CMI de nouveaux composés sur *S. aureus* : lecture des résultats.

Les résultats des tests de CMI des molécules des séries **I**, **II**, **III**, **IV** et **V** sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations minimales inhibitrices des composés des séries **I**, **II**, **III** et **IV** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	R	cLogP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
				ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	I.a	H	2,02	> 256	> 256	> 256
	I.b	CF ₃	2,92	> 256	> 256	> 256
	I.c	<i>t</i> -Bu	3,73	256	128	256
	II.a	H	2,70	32	64	32
	II.b	CF ₃	3,60	16	32	8
	II.c	<i>t</i> -Bu	4,41	0,5	1	0,5
	III.a	H	2,37	128	128	> 256
	III.b	CF ₃	3,27	> 256	> 256	128
	III.c	<i>t</i> -Bu	4,08	8	8	8
	IV.a	H	2,01	> 256	> 256	> 256
	IV.b	CF ₃	2,91	> 256	> 256	> 256
	IV.c	<i>t</i> -Bu	3,72	256	256	256
	V.a	H	3,77	256	256	256
	V.b	CF ₃	4,66	256	> 256	> 256
	V.c	<i>t</i> -Bu	5,47	> 256	> 256	> 256
PC190723				0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la métilcilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la métilcilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

Les 1,2,3-triazoles (séries **I**), les 1,3,4-oxadiazoles (série **IV**) et les furanes (série **V**) n'ont pas montré d'activité à des concentrations inférieures à 256 µg/mL. Les oxadiazoles de la série **II** sont plus actifs que leurs régioisomères de la série **III**, et pour chaque série le dérivé 4-*tert*-butylphényle est plus actif que les dérivés phényle et 4-trifluorométhyle. Par conséquent, le dérivé **II.c**, dérivé 1,2,4-oxadiazole portant un motif 4-*tert*-butylphényle, a été identifié comme étant le plus actif avec une CMI entre 0,5 et 1 µg/mL selon la souche, soit 1,3 à 2,6 µM. On peut également noter que pour les séries **I** à **IV**, l'activité est directement corrélée au LogP, que ce soit au sein des séries comme entre série. La seule exception est pour la série **V**, pour laquelle une augmentation du LogP n'est pas corrélée avec une hausse d'activité. Il reste cependant difficile d'interpréter les absences d'activité, et d'autres facteurs que l'hydrophobicité entrent sans doute en jeu. Dans le cas des furanes, on peut aussi supposer que la présence d'autres hétéroatomes soit nécessaire pour avoir une activité biologique. Les très bons résultats de **II.c** sur la croissance de *S. aureus* nous ont donc logiquement poussé à réaliser de nouvelles évaluations biologiques sur ce composé.

III. Evaluations biologiques supplémentaires du dérivé **II.c**

La structure des molécules des cinq premières séries a été pensée pour l'inhibition de FtsZ, mais il est nécessaire de vérifier que l'action antibactérienne du dérivé **II.c** est bien liée au ciblage du divisome bactérien. Pour ceci, une analyse morphologique des bactéries a été réalisée au microscope à fluorescence. De plus, pour espérer une utilisation *in vivo* ultérieure, l'absence de cytotoxicité contre des cellules humaines doit être assurée.

1. Etude du mode d'action de **II.c** par microscopie à fluorescence

Comme expliqué précédemment, l'inhibition de FtsZ prévient la formation de l'anneau Z, ce qui entraîne une mauvaise localisation du septum de division et la formation de bactéries plus grosses (dans le cas de coques comme *S. aureus*) ou filamenteuses (dans le cas de bacilles comme *B. subtilis*)¹⁹⁶. Par conséquent, l'inhibition de FtsZ entraîne un changement de phénotype visible par microscopie. L'action de **II.c** sur le divisome bactérien a donc été étudié par microscopie à fluorescence.

Si la différence de morphologie des bactéries peut se voir par microscopie photonique par lumière blanche, une meilleure visualisation est possible en marquant par fluorescence la paroi bactérienne. Pour ceci, nous avons utilisé un conjugué vancomycine-BODIPY (Figure 49). Cette structure est constituée d'une molécule de vancomycine, s'intégrant dans la paroi bactérienne, portant un motif BODIPY, groupement fluorescent qui une fois excité permet de visualiser la paroi bactérienne.

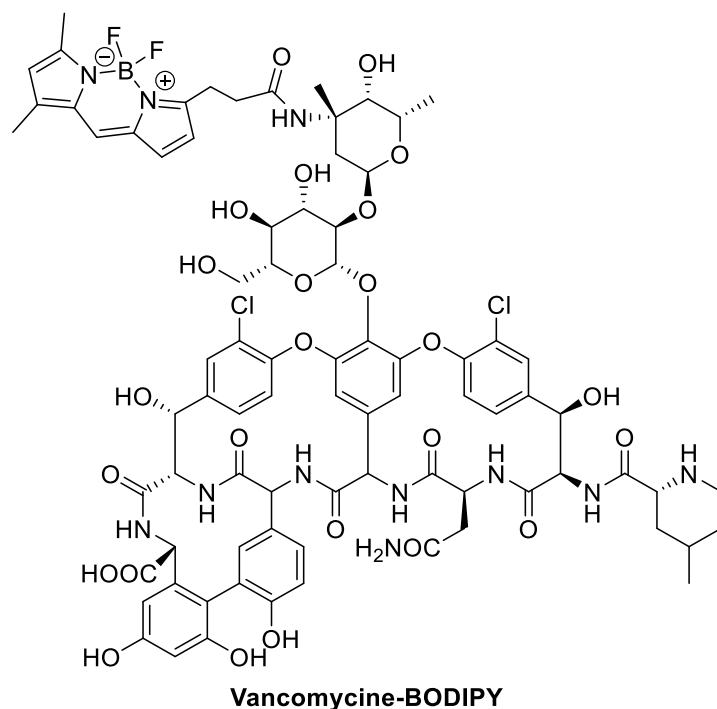


Figure 49 : Structure du conjugué vancomycine-BODIPY.

Les différentes étapes sont présentées ci-dessous (Figure 50). Après avoir été cultivées dans du milieu liquide BHI (*Brain Heart Infusion* ou bouillon cœur-cerveau) en présence de D-sérine (125 mM), les bactéries sont incubées sur plaque 96 puits en présence du composé à tester à la concentration minimale inhibitrice (ici **II.c** à 0,5 µg/mL), de **PC190723** (2 µg/mL, témoin positif) ou sans inhibiteur (témoin négatif) pendant 4 h. Les bactéries sont ensuite prélevées, centrifugées puis reprises dans le même milieu sans D-sérine mais contenant le conjugué vancomycine-BODIPY. Après 15 min d'incubation, les bactéries sont ensuite déposées entre lame et lamelle, fixées à la chaleur et analysées au microscope à fluorescence.

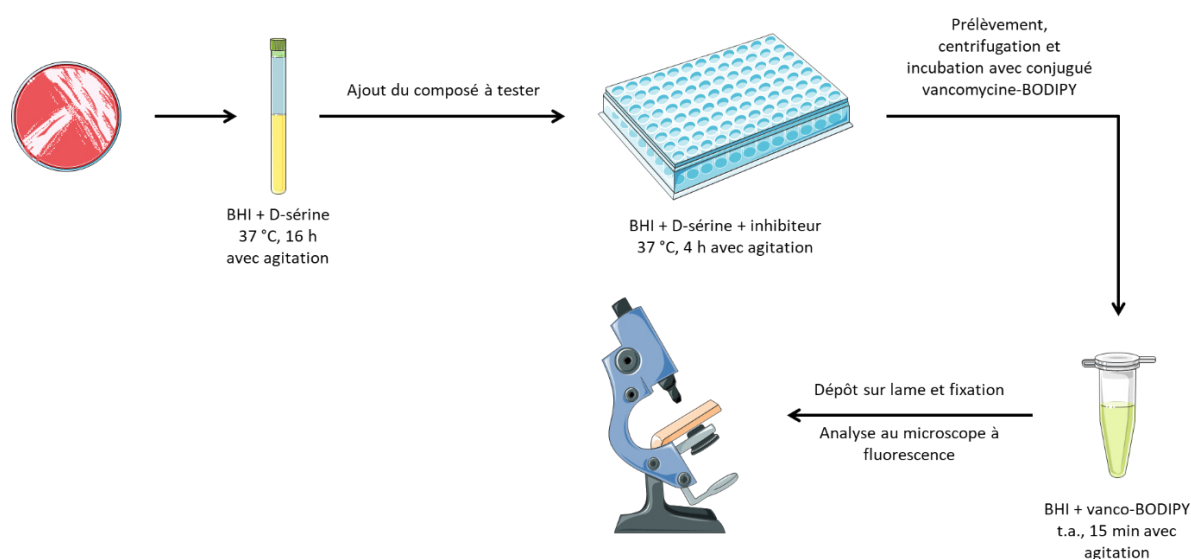


Figure 50 : Etapes de l'analyse au microscope à fluorescence de la morphologie de bactéries traitées avec un inhibiteur de FtsZ.

Les résultats de l'expérience sont présentés sur la Figure 51. Les bactéries témoin sont rondes avec un septum bien centré, tandis que les bactéries incubées en présence de **PC190723**, inhibiteur de FtsZ, sont plus grosses avec plusieurs septa de division simultanés et mal localisés. C'est également le cas des bactéries incubées avec **II.c**, ce qui indique que l'action de ce composé impacte bien le divisome bactérien. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la souche SF8300 (résistante à la méticilline), dont les images ne sont pas montrées ici. Compte-tenu de l'homologie entre la structure de **II.c** avec d'autres inhibiteurs de FtsZ connus et l'action sur le divisome, nous pouvons en déduire que ce composé cible très certainement FtsZ.

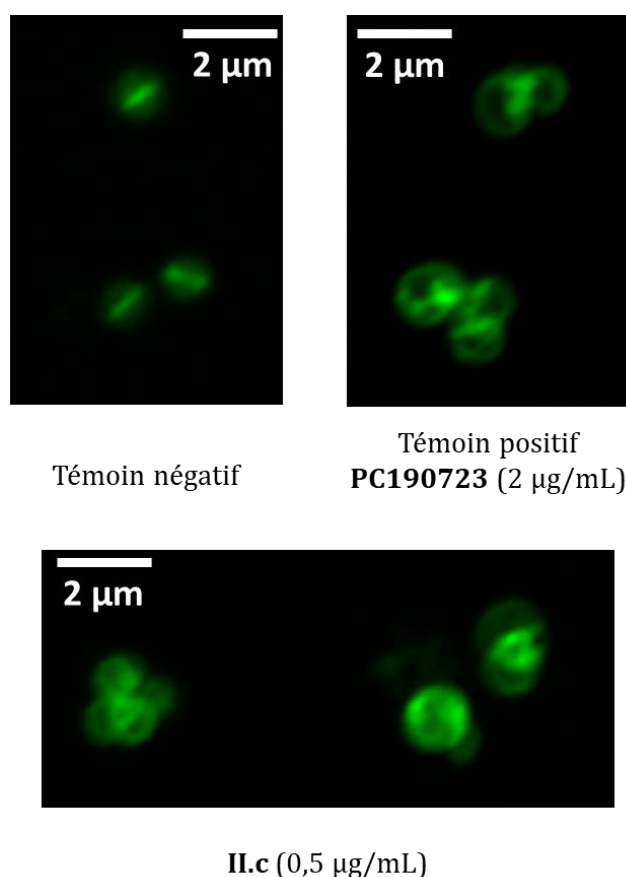


Figure 51 : Image de microscopie à fluorescence de bactéries *S. aureus* (souche ATCC 29213) marquées par un conjugué vancomycine-BODIPY en présence ou en absence de composé antimicrobien (**PC190723** et **II.c**).

2. Etude de la cytotoxicité de **II.c** sur des cellules A549

Le composé **II.c** ayant une bonne CMI et ciblant bien le divisome bactérien comme supposé, il était nécessaire de s'assurer de l'absence de cytotoxicité contre des cellules humaines pour permettre un éventuel développement *in vivo* par la suite.

Le principe de l'expérience est expliqué dans la Figure 52. L'incubation de cellules en présence d'un composé cytotoxique entraîne une fragilisation de la membrane

plasmique. De l'iodure de propidium, agent intercalant de l'ADN ajouté dans le milieu, peut alors se lier à l'acide nucléique. Quand cet agent est excité à 535 nm, il génère de la fluorescence à 618 nm. La mesure de cette fluorescence permet d'étudier la cytotoxicité d'un produit.

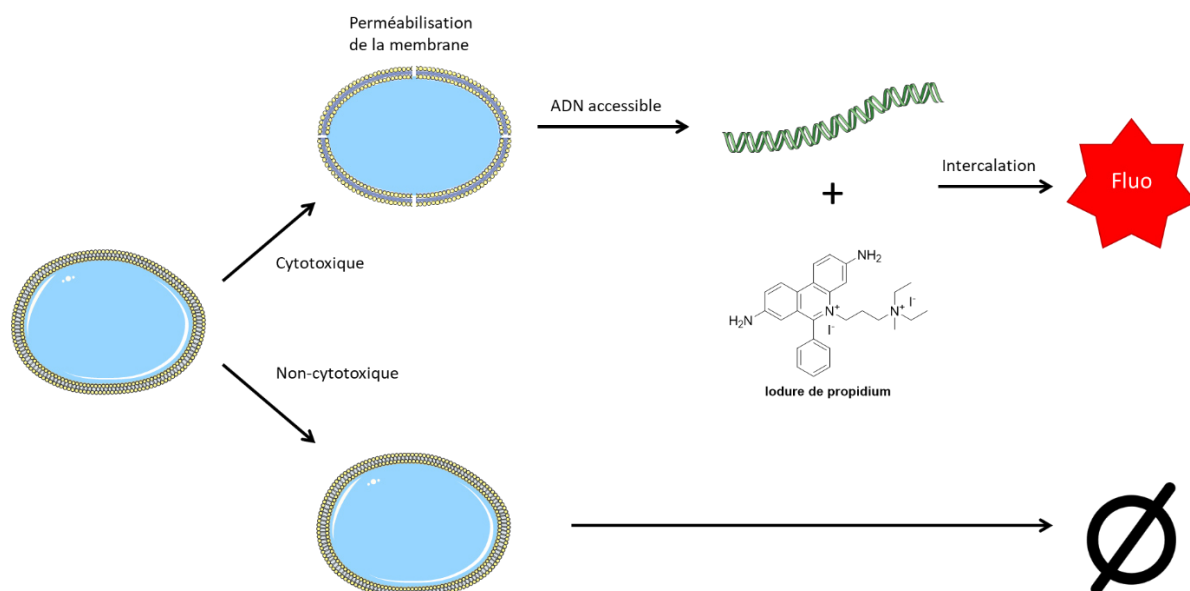


Figure 52 : Principe de l'expérience déterminant la cytotoxicité éventuelle d'un produit.

L'étude de cytotoxicité a été réalisée sur des cellules A549, des cellules épithéliales alvéolaires basales d'adénocarcinome humain. Elles ont d'abord été cultivées en flasque dans du milieu DMEM GlutaMAX supplémenté à hauteur de 10 % de sérum de veau fœtal et de 1% de mélange pénicilline/streptomycine. Les cellules ont ensuite été ensemencées et cultivées sur plaque 96 puits pendant 24 h à 37 °C, puis le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant de l'iodure de propidium (2,5 µg/mL). Ont également été ajoutés selon les conditions le composé **II.c** (64 µg/mL, soit 64 fois la CMI), de l' α -hémolysine recombinante (0,2 µg/mL, toxine de *S. aureus* cytotoxique) ou du DMSO (2,56 % v/v, servant de témoin négatif et correspondant à la quantité de DMSO utilisée comme véhicule pour le composé **II.c**). Les cellules ont ensuite été incubées 7 h à 37 °C et la fluorescence à 618 nm a été mesurée.

Les résultats de l'expérience sont présentés sur la Figure 53. En présence d' α -hémolysine, le maximum de fluorescence est atteint au bout de deux heures, montrant un effet cytotoxique. Pour le témoin négatif, une légère hausse de fluorescence est observée au bout de 6 h. Les courbes de fluorescence correspondant au produit **II.c** et au témoin négatif étant confondues, aucune cytotoxicité n'a été montrée par le dérivé oxadiazole après 7 h à la concentration de 64 µg/mL, soit 64 à 128 fois sa CMI.

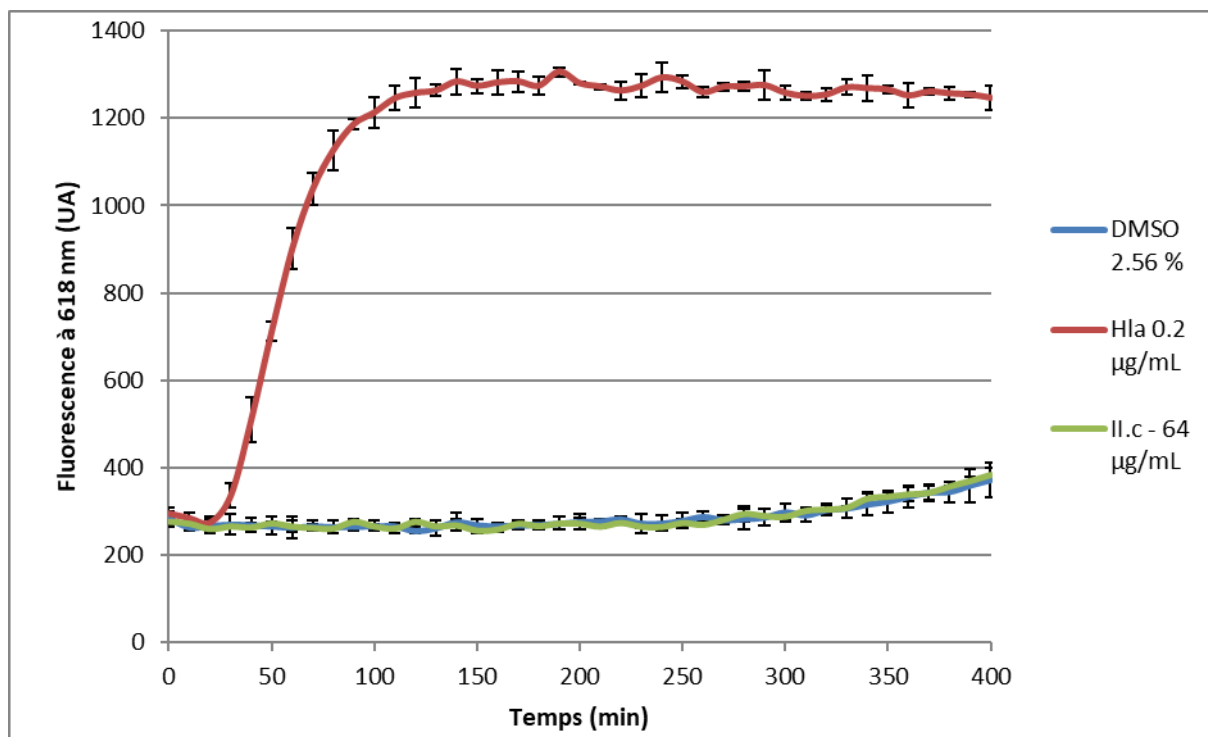


Figure 53 : Courbes de fluorescence montrant l'absence de cytotoxicité du composé **II.c** contre des cellules A549.

IV. Influence de la substitution du groupe méthylène : application à la série II

Suite aux bonnes CMI du composé **II.c** contre les différentes souches de *S. aureus* et la confirmation de son mode d'action ciblant le divisome, l'optimisation structurale de la série **II** a été entreprise. En effet, c'est la série qui a montré les meilleures activités antibactériennes dans l'ensemble, et pour laquelle la synthèse était la plus facilement accessible. La substitution du méthylène reliant le benzamide au cycle azolé a été étudiée dans la littérature et il a été montré que l'addition d'un groupement méthyle pouvait fortement augmenter l'activité antibactérienne⁹³. Une série **VI** a été développée, analogue des 1,2,4-oxadiazoles de la série **II** mais portant un méthyle sur le groupement méthylène reliant le cycle azolé au benzamide.

1. Synthèse des dérivés méthylés (série VI)

La synthèse des composés de la série **VI** est décrite dans le Schéma 8. A l'instar de la série **II**, les hydroxyamidines **12** ont été acylées par du chlorure de chloropropionyle et cyclisées pour obtenir les oxadiazoles **24**¹⁸⁶. L'alkylation du benzamide **6** a permis d'obtenir les produits finaux **VI.a-c**⁸⁴.

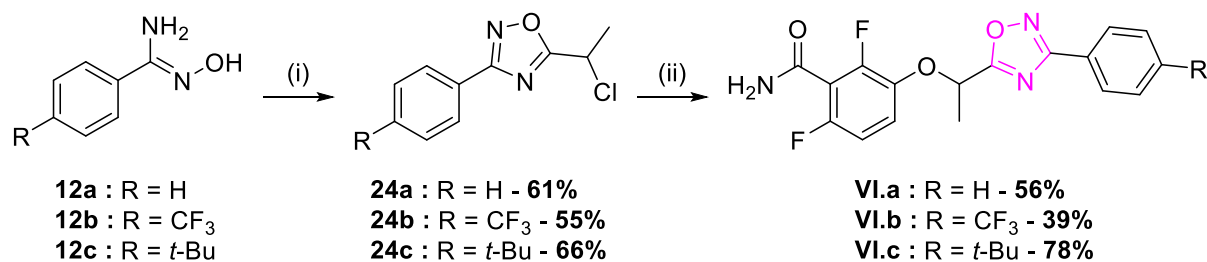


Schéma 8 : Synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles de la série **VI** substitués sur le méthylène. Réactifs et conditions : (i) chlorure de chloropropionyle, Et₃N, toluène, 0 °C, 15 min puis reflux, 4 h ; (ii) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 3 h.

Initialement, la synthèse des composés énantiopurs était envisagée. Pour ceci, le (*R*)- et le (*S*)-chlorure de propionyle étaient synthétisés *in situ* depuis les acides correspondants en présence de chlorure d'oxalyle puis réagissaient avec les hydroxyamidines **12** pour obtenir les dérivés **24**, suivi par l'alkylation du benzamide **6**. Les pouvoirs rotatoires des produits finaux ont ensuite été mesurés. Il s'est alors avéré que ces derniers étaient proches de zéro et que les pouvoirs rotatoires de deux énantiomères supposés étaient de signe opposé mais pas de valeur absolue égale. La racémisation est sans doute liée à un mélange de SN1 et de SN2 lors de l'alkylation du benzamide. En effet, le carbocation formé lors de la déchloration des intermédiaires **24** est stabilisé par mésomérie à la fois sur le cycle oxadiazole et sur le phényle, ce qui favorise la SN1 (et *a fortiori* la racémisation).

L'analyse des spectres RMN ¹H et ¹³C (Figure 54, ci-contre) du composé **VI.b** permettent tout d'abord de confirmer que le produit désiré a bien été obtenu et en pureté suffisante pour l'évaluation biologique subséquente. On peut également noter que les protons du phényle (H2' et H3') couplent avec les fluors du groupement trifluorométhyle, les signaux étant donc des doublets démultipliés. Le couplage ¹⁹F – ¹³C est encore plus marqué. En effet, le signal du CF₃ est un quadruplet avec une constante de couplage de 271,4 Hz. Le couplage s'étend également aux carbones 4 (C4') et 3 (C3'), pour lesquels les signaux sont également des quadruplets et avec comme constante de couplage respective 32,3 Hz et 3,8 Hz.

Les trois composés de la série **VI** ont donc été obtenus et leurs structures sont présentées dans la Figure 55 ci-après.

Partie 1 – Chapitre 2

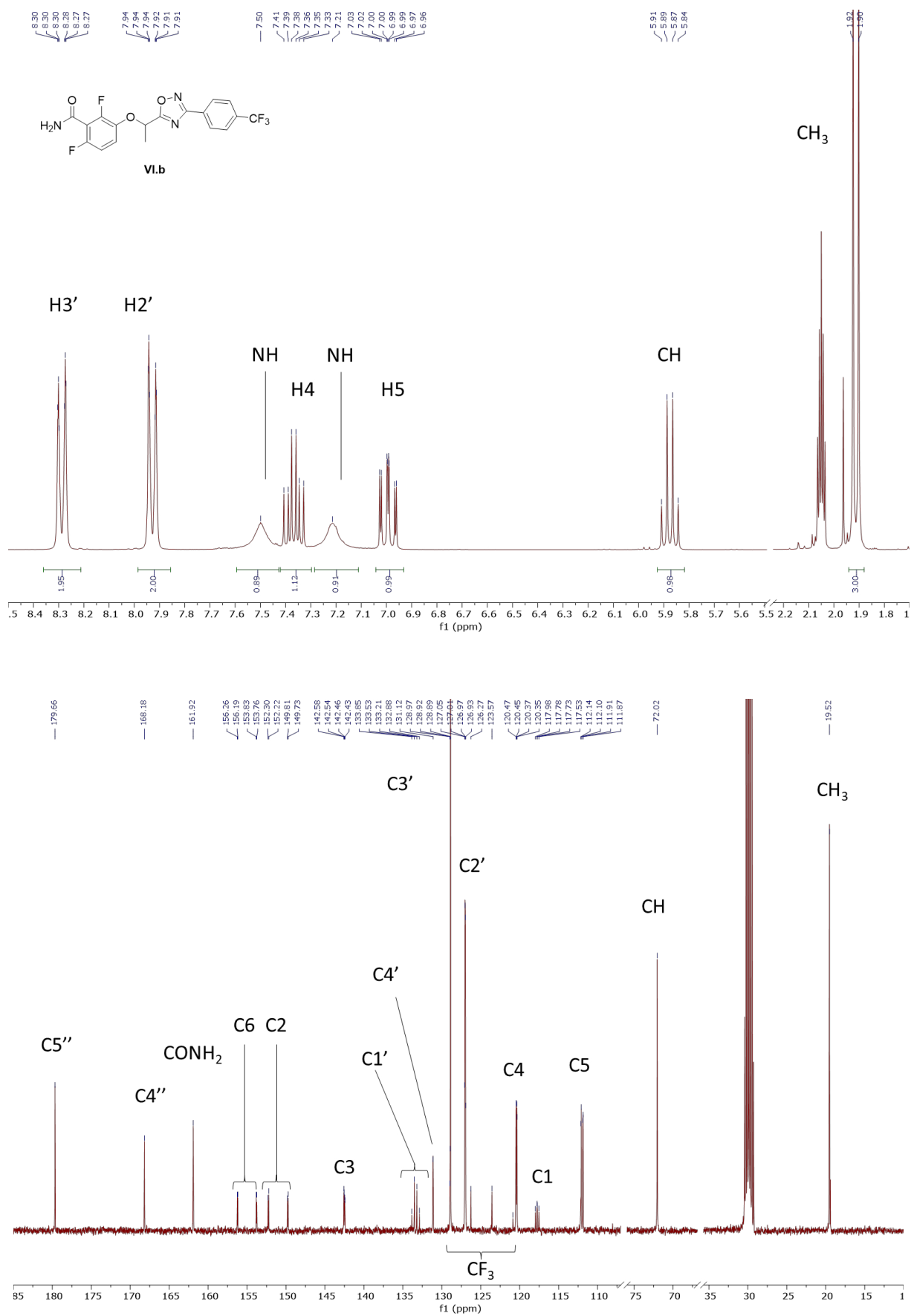


Figure 54 : Spectres RMN ¹H et ¹³C du composé VI.b.

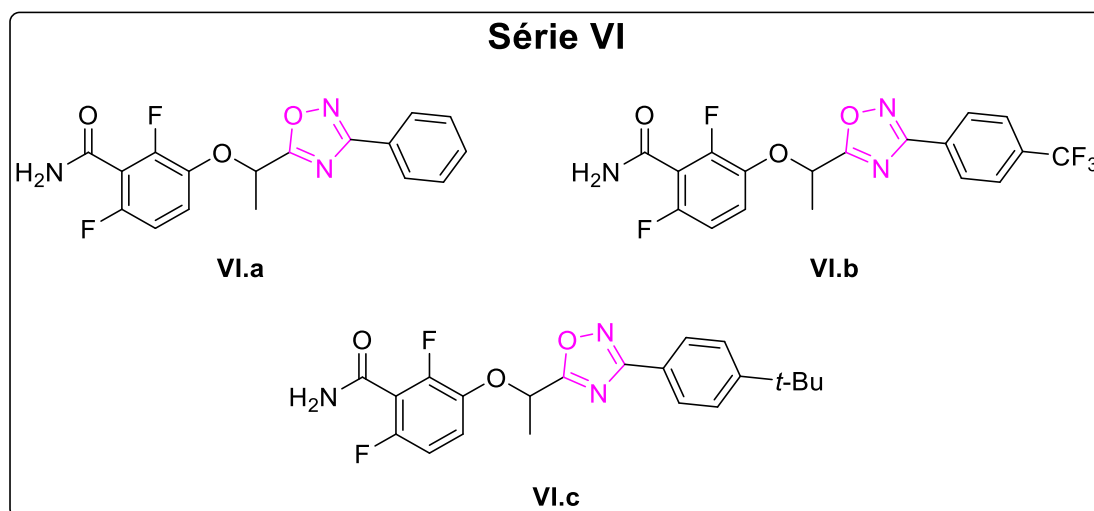


Figure 55 : Structures des composés de la série **VI**.

2. Evaluation biologique sur *S. aureus* des composés de la série VI

Les résultats des tests de CMI des composés de la série **VI** sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **VI** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	R	cLogP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
				ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	VI.a	H	3,06	16	16	16
	VI.b	CF ₃	3,96	1	1	1
	VI.c	<i>t</i> -Bu	4,77	1	1	1
PC190723				0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

L'ajout d'un groupement méthyle a drastiquement augmenté l'activité des composés **VI.a** et **VI.b** en comparaison à **II.a** (32/64/32 $\mu\text{g/mL}$) et **II.b** (16/32/8 $\mu\text{g/mL}$). En revanche, l'ajout du méthyle n'a quasiment pas eu d'influence sur le dérivé *tert*-butyle **VI.c**, augmentant légèrement la CMI à 1 $\mu\text{g/mL}$ pour les trois souches. Cette nouvelle série a donc permis d'identifier le composé **VI.b**, plus actif que son homologue non-méthylé, ayant une CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$ pour les trois souches de *S. aureus* testées.

V. Etudes de modélisation moléculaire et de pharmacocinétique prédictive

1. Etudes de docking

Afin d'étudier la relation structure-activité des molécules actives, des travaux de docking moléculaire ont été menés. Le docking est une méthode de bioinformatique qui permet de prédire la conformation la plus stable d'un ligand au sein d'une protéine et de calculer l'énergie d'interaction. Plus les interactions (liaisons hydrogène, liaisons halogène, π -stacking, interactions hydrophobes...) sont fortes et nombreuses entre la protéine et le ligand, plus le complexe est stable, ce qui est caractérisé par une énergie d'interaction faible. Dans le cas présent, cette méthode est utilisée à l'échelle d'un seul ligand afin d'étudier son mode de liaison à FtsZ. Cependant, le docking peut également être utilisé à l'échelle de dizaines voire de centaines de milliers de composés afin de faire un criblage virtuel de ligands pouvant théoriquement se lier à la protéine cible, ce qui sera présenté dans la suite de ce manuscrit. Lors du docking, la structure de la protéine est le plus souvent rigide. On peut cependant aussi décider de laisser de la flexibilité aux chaînes latérales des acides aminés du site ciblé lorsque c'est nécessaire, ce qui augmente considérablement le temps de calcul mais traduit plus fidèlement la flexibilité naturelle des protéines.

Les différentes étapes pour réaliser le docking d'une molécule au sein d'une protéine sont décrites dans la Figure 56 ci-après. Tout d'abord, la molécule à docker doit être dessinée puis l'énergie de sa structure minimisée afin d'obtenir une structure 3D. En parallèle, il faut choisir la structure cristalline de la protéine d'intérêt (seule, co-cristallisée avec un ligand qui doit être retiré avant le docking...) ainsi que le site ciblé (site actif, poche allostérique, etc.) et si nécessaire les acides aminés flexibles. La « grid box » est un espace parallélépipédique au sein duquel le docking du ligand est réalisé, qui doit être suffisamment grande pour contenir l'ensemble de la zone ciblée. Le docking est ensuite réalisé au sein de cette boîte, centrée sur la zone d'intérêt. Lors du docking, la structure du ligand est flexible, afin de trouver les meilleures conformations au sein de la poche. A l'issue des calculs, les poses des ligands ayant les énergies d'interactions les plus faibles correspondent aux conformations préférentielles au sein de la protéine.

Partie 1 – Chapitre 2

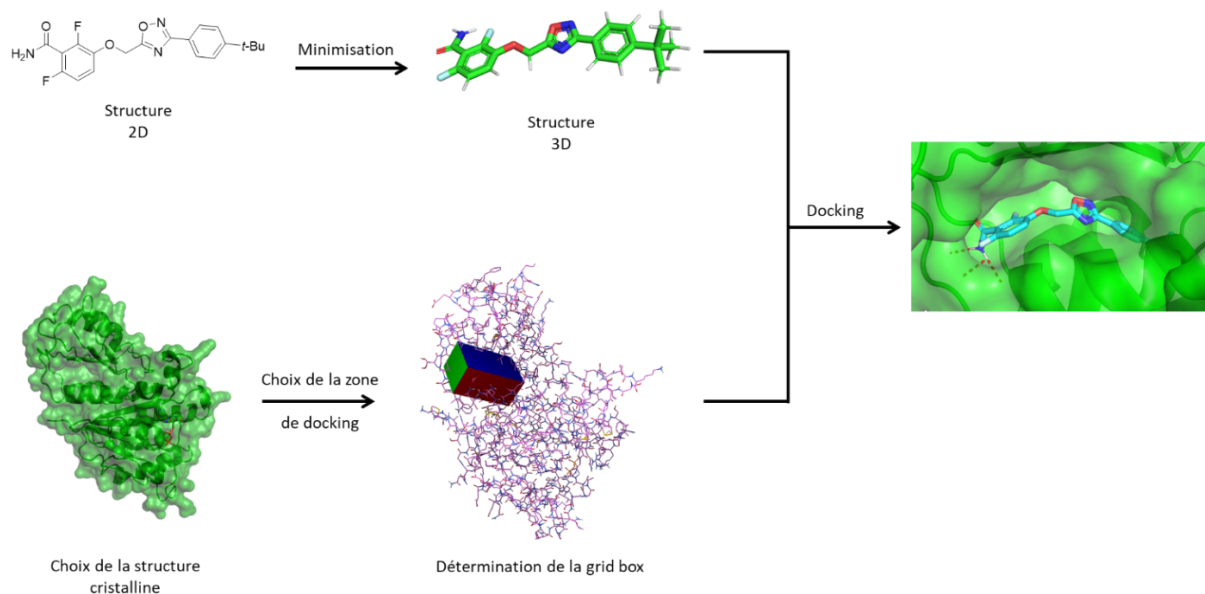


Figure 56 : Etapes pour le docking d'un composé au sein de la structure d'une protéine.

Les interactions avec FtsZ des dérivés trifluorométhyle **II.b** et *tert*-butyle **II.c**, ainsi que des homologues méthylés **VI.b** et **VI.c**, dont les structures sont rappelées en Figure 57, ont été étudiés par docking avec le logiciel Vina¹⁹⁷.

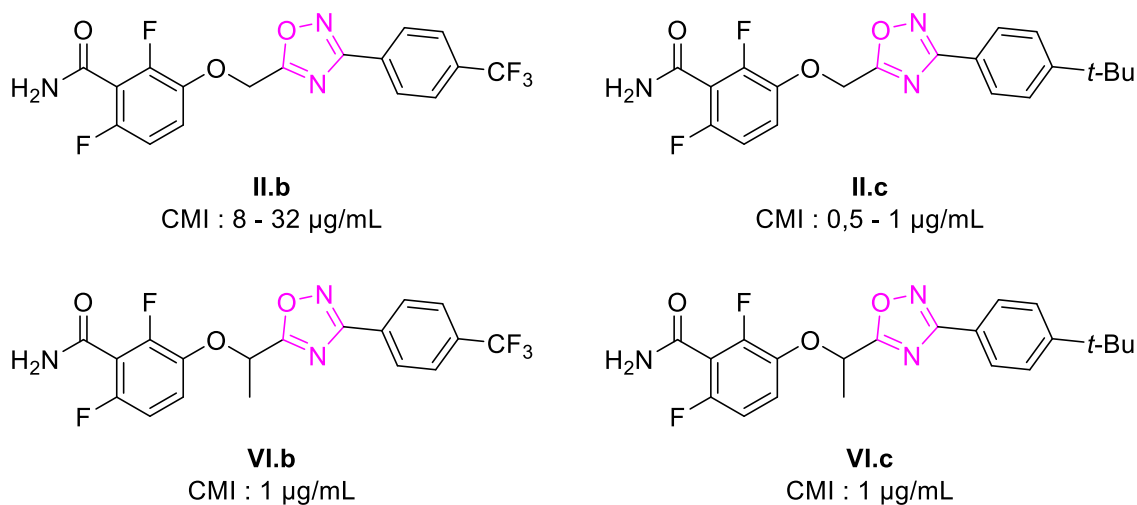


Figure 57 : Structures et CMI des quatre composés étudiés par docking.

La structure cristalline utilisée est celle avec le code PDB 6KVP, pour laquelle FtsZ est co-cristallisée avec l'oxazole **1** vu précédemment (Figure 40, page 57)¹⁰⁷. Les chaînes latérales de plusieurs acides aminés formant la poche allostérique ont été définies comme flexibles, à savoir Met98, Val129, Ile197, Leu200, Val203, Asn208, Leu209, Val214, Met218, Ile228, Asn263, Val297 et Thr309. Cela permet ainsi de simuler au mieux les mouvements potentiels de la poche allostérique déjà montrée comme étant très flexible⁸¹. De plus, la prédiction de la liaison des dérivés *tert*-butyles à la protéine, plus gros que le ligand co-cristallisé **1**, est plus pertinente.

Les résultats du docking du composé **II.b** sont présentés dans la Figure 58. On peut voir que le benzamide interagit avec quatre acides aminés, à savoir Leu200, Val203, Asn208 et Leu209, tandis que le reste de la molécule fait des interactions hydrophobes avec la poche allostérique. Cependant, il est à noter que **II.b** est peu superposé avec le ligand co-cristallisé (Figure 58C). En effet, le cycle azolé est plus situé vers l'arrière de la poche, ce qui fait que le motif trifluorométhylphényle est ancré moins profondément.

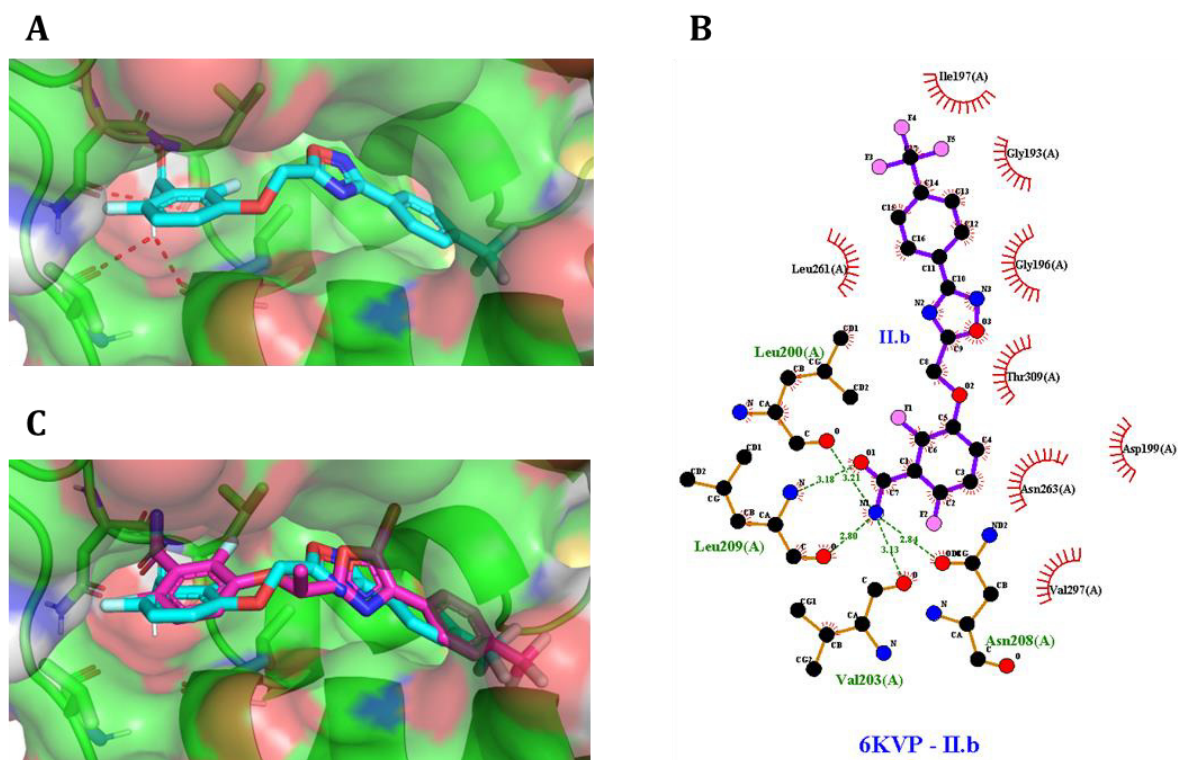


Figure 58 : Résultats du docking du composé **II.b** avec FtsZ. **A** : Structure de **II.b** au sein de la poche allostérique. **B** : Interactions réalisées entre **II.b** et la protéine. **C** : Superposition de **II.b** docké (cyan) et du ligand co-cristallisé **1** (magenta).

Le fort gain d'activité entre **II.b** (CMI entre 8 et 32 $\mu\text{g/mL}$) et **VI.b** (1 $\mu\text{g/mL}$) peut être expliqué par le docking. Comme on peut le voir sur la Figure 59, les liaisons hydrogène avec la poche sont globalement les mêmes pour **VI.b** que pour **II.b**. En revanche, le positionnement du ligand au sein de la poche n'est plus le même, et celui-ci est ancré plus profondément dans la partie hydrophobe de la poche. Ceci se traduit par le fait que les molécules **VI.b** et **1** peuvent se superposer. Le groupement méthyle, par ses interactions hydrophobes à l'entrée de la poche, permet donc un meilleur positionnement de l'ensemble de la molécule au sein du site de liaison, permettant une meilleure inhibition de FtsZ et donc une meilleure activité antibactérienne.

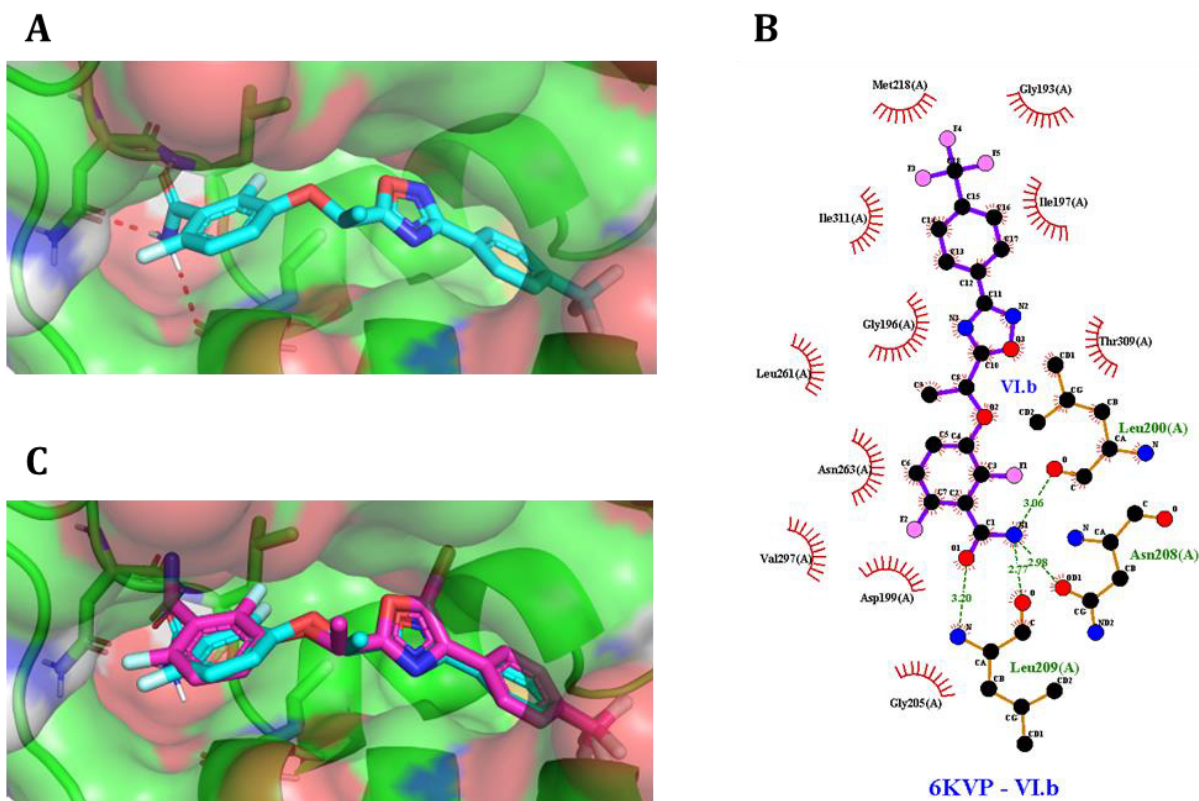


Figure 59 : Résultats du docking du composé **VI.b** avec FtsZ. **A** : Structure de **VI.b** au sein de la poche allostérique. **B** : Interactions réalisées entre **VI.b** et la protéine. **C** : Superposition de **VI.b** docké (cyan) et du ligand co-cristallisé **1** (magenta).

Le docking du dérivé **II.c**, meilleur composé obtenu, a également été réalisé et les résultats sont présentés dans la Figure 60. Outre les liaisons hydrogène avec les résidus Leu200, Asn208 et Leu209, on observe que l'oxygène de l'oxadiazole est également à même de faire une liaison hydrogène avec l'hydroxyle du résidu Thr309. L'existence de cette interaction, même temporaire lors de la liaison à la poche, pourrait alors expliquer pourquoi les dérivés furanes de la série **V** n'ont pas montré d'activité antibactérienne. En effet, même si ces derniers ont des LogP élevés à l'instar de la série **II**, l'absence d'hétéroatome sur les positions 3 et 4 préviendrait la formation de cette liaison hydrogène et la liaison subséquente à la protéine. Par ailleurs, le ligand est globalement bien superposé avec le ligand co-cristallisé, ce qui est cohérent avec la bonne activité antibactérienne mesurée.

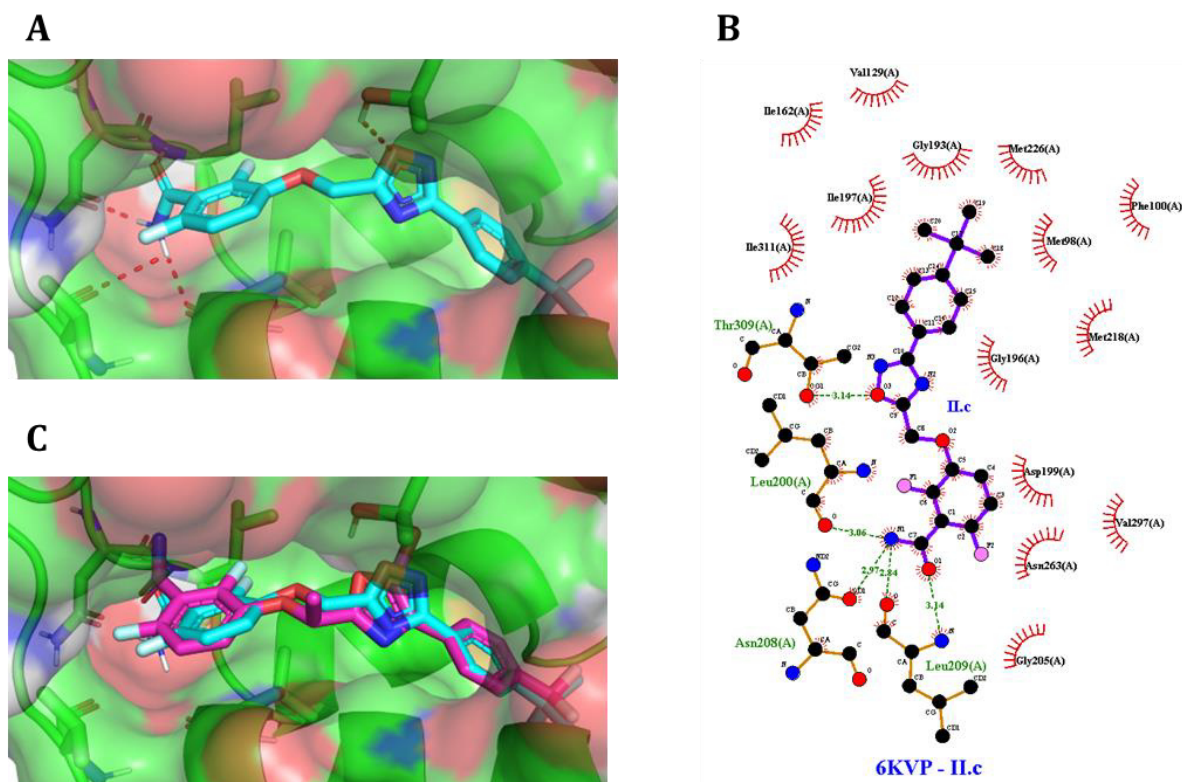


Figure 60 : Résultats du docking du composé **II.c** avec FtsZ. **A** : Structure de **II.c** au sein de la poche allostérique. **B** : Interactions réalisées entre **II.c** et la protéine. **C** : Superposition de **II.c** docké (cyan) et du ligand co-cristallisé **1** (magenta).

Enfin, l'analogue méthylé de **II.c**, **VI.c**, a été docké au sein de FtsZ, tel que montré dans la Figure 61. La différence majeure avec **II.c** tient au fait que l'oxadiazole soit un peu plus ancré dans la poche et complètement superposé avec l'oxazole de la molécule **1**, ce qui entraîne la disparition de la liaison hydrogène avec la Thr309. Le réseau de liaisons hydrogène faites entre le benzamide et la protéine reste conséquent, avec quatre acides aminés ciblés.

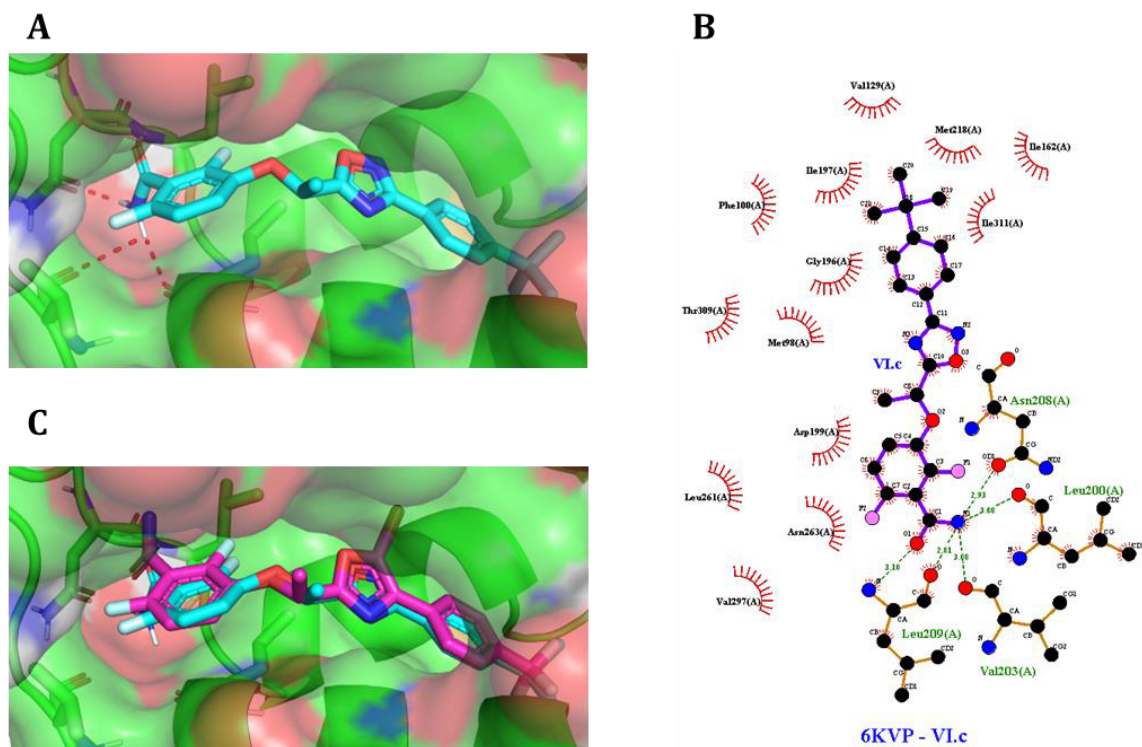


Figure 61 : Résultats du docking du composé **VI.c** avec FtsZ. **A** : Structure de **VI.c** au sein de la poche allostérique. **B** : Interactions réalisées entre **VI.c** et la protéine. **C** : Superposition de **VI.c** docké (cyan) et du ligand co-cristallisé **1** (magenta).

Il est alors intéressant de constater que les composés **VI.b** et **VI.c**, ayant tous deux une CMI de 1 µg/mL pour les trois souches de *S. aureus* testées, sont également parfaitement superposés par docking (Figure 62), ce qui n'était pas le cas des analogues non méthylés de la série **II**. On peut également noter que pour tous les composés dockés, la fonction amide est inversée par rapport au benzamide de l'oxazole **1**, ce qui peut expliquer pourquoi aucun ne fait de liaison hydrogène avec le résidu Asn263.

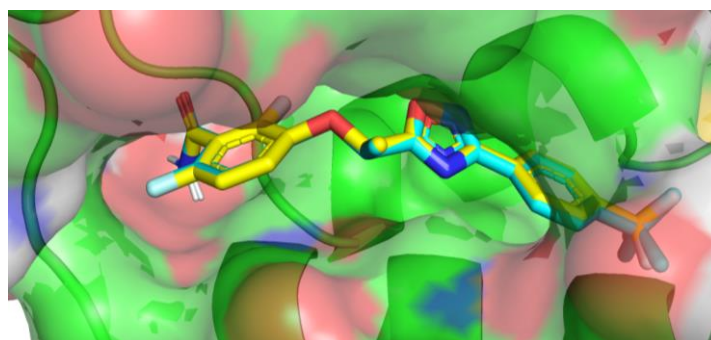


Figure 62 : Superposition des résultats de docking de **VI.b** (jaune) et **VI.c** (cyan) au sein de la poche allostérique de FtsZ.

Pour conclure sur les études de docking, les calculs montrent que l'interaction des composés avec FtsZ se fait de deux manières. D'une part, le motif 2,6-difluorobenzamide fait des liaisons hydrogène avec trois ou quatre acides aminés de la poche. D'autre part, le reste de la structure s'insère dans le reste de la poche, très hydrophobe. Dans le cas de

II.c, le motif *tert*-butyl s'insère profondément dans la poche et il est stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobes. L'oxygène de l'oxadiazole formerait également une liaison hydrogène avec le résidu Thr309. L'analogue méthylé de **II.c**, **VI.c**, a une conformation légèrement différente pour laquelle la liaison hydrogène avec le résidu Thr309 n'a plus lieu, ce qui peut expliquer la légère baisse d'activité antibactérienne. Dans le cas de **VI.b**, l'ajout du méthyle par rapport à **II.b** permet de réaliser de nouvelles interactions hydrophobes à l'entrée de la poche avec la protéine, ce qui déplace le ligand et permet un meilleur ancrage de la zone 3 dans la partie hydrophobe de la poche, entraînant un gain d'activité.

2. Etudes de pharmacocinétique prédictive

Afin d'estimer le potentiel des composés **II.c** et **VI.b** à devenir un jour des médicaments, leurs propriétés pharmacocinétiques ont été prédites à l'aide de SwissADME et pkCSM^{198,199}. Les valeurs obtenues sont calculées par comparaison avec d'autres molécules dont les propriétés sont connues. Par conséquent, ces données prédictives permettent d'avoir un aperçu des propriétés pharmacocinétiques des produits, mais devraient évidemment être corroborées par des tests biologiques. Les résultats concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME) des produits sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Données d'ADME prédictives des dérivés **II.c** et **VI.b**.

Propriété	Unité	Dérivé	
		II.c	VI.b
Masse molaire	g/mol	387,38	413,3
LogP		4,41	3,96
Donneur de liaison H	#	1	1
Accepteur de liaison H	#	7	10
Liaisons flexibles	#	6	6
PSA	Å ²	91,24	91,24
Perméabilité Caco-2	log Papp en 10 ⁻⁶ cm/s	1,213	1,312
Absorption intestinale	% Absorbé	92	89
VDss	log L/kg	-0,82	-0,663
Fraction non liée	Fnl	0,181	0,073
Perméabilité BHE	log BB	-1,1	-1,442
Perméabilité SNC	log PS	-3,303	-3,012
Inhibiteur CYP2D6	Oui/Non	Non	Non
Inhibiteur CYP3A4	Oui/Non	Oui	Oui
Clairance totale	log ml/min/kg	-0,102	-0,519

Tout d'abord, les deux produits respectent les règles de Lipinski (masse molaire < 500 g/mol, LogP < 5, nombre de donneurs de liaisons hydrogène < 5 et nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène < 10) et de Veber (nombre de liaisons flexibles < 10

et $PSA < 140 \text{ \AA}^2$), ce qui présume d'une bonne biodisponibilité orale^{200,201}. Les deux composés seraient également bien absorbés au niveau intestinal avec un log de la perméabilité aux cellules Caco-2 supérieur à $0,9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, et une absorption intestinale autour de 90 %. En revanche, le volume de distribution prédit est très faible, et les produits seraient très liés aux protéines plasmatiques. On peut également noter qu'ils ne seraient pas à même de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et accéder au système nerveux central (SNC), ce qui aurait pu causer une toxicité neurologique. Enfin, ils seraient capables d'inhiber l'isoforme 3A4 du cytochrome P450, et resteraient longtemps dans l'organisme en raison d'une faible clairance.

Ces données d'ADME prédictive sont globalement prometteuses, et encouragent le développement des dérivés **II.c** et **VI.b** comme nouveaux antibiotiques. Les problèmes de distribution pourraient en revanche faire considérer la formulation sous forme de prodrogue, à l'instar du **TXA709** décrit dans le chapitre 1.

VI. Conclusion

En se basant sur un modèle tripartite retrouvé à plusieurs reprises dans la littérature parmi les inhibiteurs de FtsZ, la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux dérivés benzamides portant un cycle à cinq chaînons a été entreprise. Plusieurs séries de triazoles, oxadiazoles et furanes ont été étudiées, ce qui a permis de mettre en évidence l'importance de la présence et de la position de l'atome d'oxygène dans l'hétérocycle de la zone 2 des inhibiteurs tripartites. Ceci a conduit à l'identification du composé **II.c**, un 3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole relié au pharmacophore 2,6-difluorobenzamide par un méthylène ayant une CMI de 0,5 à 1 $\mu\text{g/mL}$ contre différentes souches de *S. aureus* antibiorésistantes. La diversification structurale de ce dérivé a permis d'identifier **VI.b**, un 1,2,4-oxadiazole portant un noyau 4-trifluorométhylphényle et relié au 2,6-difluorobenzamide par un méthylène méthylé ayant également une CMI de l'ordre de 1 $\mu\text{g/mL}$ contre *S. aureus*. Une étude de relation structure activité aidée par le docking a ensuite permis de mieux identifier l'importance de chaque partie de la molécule pour l'interaction avec FtsZ. L'importance de l'hydrophobicité globale de la molécule, caractérisée par un LogP élevé, a également été mise en avant. Il a par ailleurs été démontré que **II.c** ciblait bien le divisome bactérien, entraînant une délocalisation du septum de division, et ne présentait pas de cytotoxicité contre des cellules humaines A549.

Les perspectives concernant ces travaux sont multiples. D'une part, des évaluations biologiques supplémentaires sur **II.c** sont envisagées. *S. aureus* pouvant se développer sous forme de biofilms, il serait intéressant d'étudier l'action de notre composé dans ces conditions. Comme expliqué dans le chapitre 1, la synergie entre le dérivé **II.c** et des β -lactames sur des souches de SARM mériterait également d'être investiguée.

D'autre part, de nouvelles modifications structurales sur **II.c** et **V.b** pourraient être faites. Comme mentionné suite à l'étude de pharmacocinétique prédictive, la formulation sous forme de prodrogues pourrait être étudiées, afin d'augmenter l'hydrosolubilité des deux meilleurs composés, très hydrophobes (LogP supérieurs ou égaux à 4). La substitution sur le groupement méthylène pourrait également être investiguée. Si l'ajout d'un méthyle a augmenté l'activité grâce à des interactions hydrophobes supplémentaires, une chaîne alkyle polaire pourrait réaliser de nouvelles liaisons hydrogène à l'extérieure de la poche. Le docking d'un dérivé propanamide (Figure 63) montre en effet des interactions entre la chaîne portée par le groupement méthylène et les chaînes latérales des résidus Asp199 et Asn263.

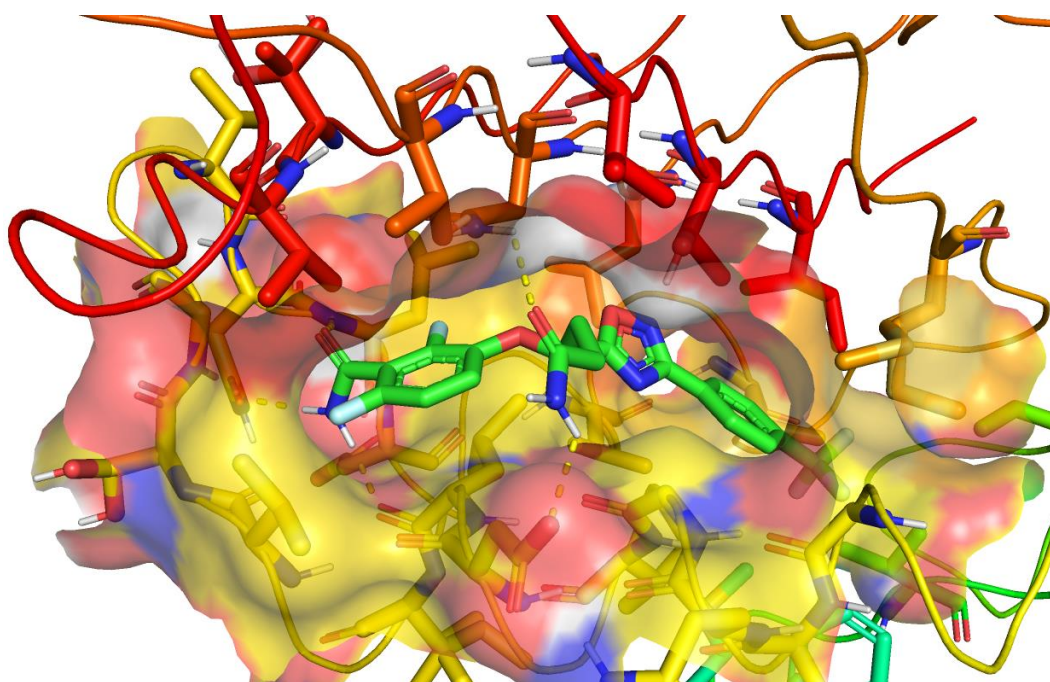


Figure 63 : Docking au sein de la poche allostérique de FtsZ d'un analogue de **V.b** portant une chaîne propanamide sur le groupement méthylène (code PDB : 6KVP)¹⁰⁷.

Chapitre 3

—

Étude du pharmacophore 2,6- difluorobenzamide : analogues et dimères

I. Introduction et démarche

Cette deuxième partie du travail est consacrée au motif 2,6-difluorobenzamide, formant la zone 1 des inhibiteurs tripartites vu précédemment. C'est un des pharmacophores les plus décrits chez les inhibiteurs de FtsZ, et la seule molécule actuellement en phase clinique, le **TXA709**, est un dérivé benzamide. L'intérêt de ce groupement dans l'inhibition de la protéine est lié aux nombreuses liaisons hydrogène qu'il peut faire avec les acides aminés de la poche. FtsZ a été co-cristallisée avec différents inhibiteurs portant un benzamide comme le **PC190723** (code PDB : 4DXD), l'oxazole **1** (code PDB : 6KVP) ou encore le 2,6-difluoro-3-méthoxybenzamide (code PDB : 6YD1)^{61,74,107}. L'étude de onze complexes (dont ces trois derniers ainsi que huit autres, dont les codes PDB sont 6YD6, 6YD5, 5XDV, 5XDU, 5XDT, 5XVQ, 6KVQ et 3VOB) ont permis d'identifier les trois acides aminés clés avec lesquels le benzamide fait des liaisons hydrogène : Val207, Leu209 et Asn263^{39,74,90,107}. Le réseau de liaisons hydrogène formé par le **PC190723** est utilisé comme exemple dans la Figure 64.

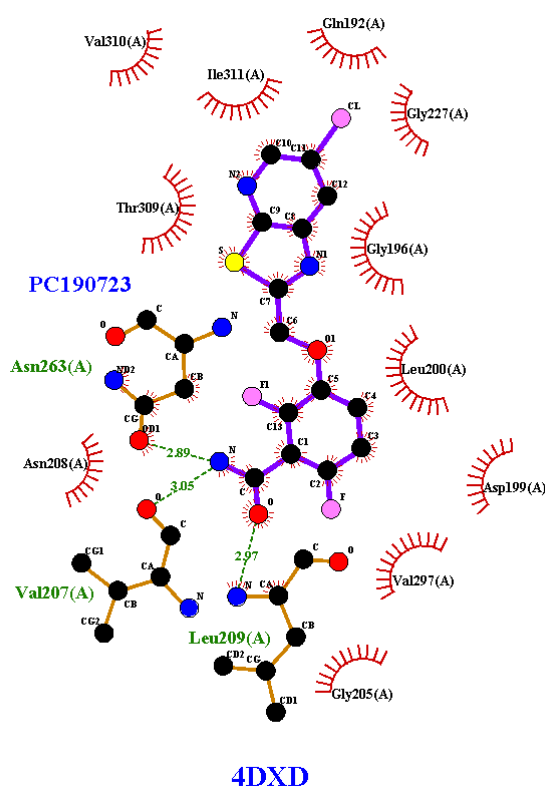


Figure 64 : Réseau de liaisons hydrogène formé par le **PC190723** au sein de la poche allostérique de FtsZ (code PDB : 4DXD⁶¹).

Une stratégie pour identifier de nouveaux inhibiteurs de FtsZ serait donc de synthétiser des analogues du 2,6-difluorobenzamide capables de cibler les mêmes acides aminés. Une autre méthode serait de développer des inhibiteurs multivalents portant plusieurs motifs benzamides. Ces deux stratégies ont été menées et les résultats sont présentés dans ce chapitre.

II. Conception, synthèse et évaluation biologique d'analogues du 2,6-difluorobenzamide

La recherche d'analogues du motif benzamide a déjà été recensée dans la littérature, mais a rarement été couronnée de succès. Des analogues du **PC190723** pour lequel le benzamide a été remplacé par son bioisostère sulfonamide a conduit à la perte totale d'activité antibactérienne (composés **25a** et **25b**, Figure 65)²⁰². Les analogues trifluorométhyle et imidazoles **26**, **27a** et **27b** ont également montré une activité antibactérienne réduite⁷⁴. Les seuls exemples à ce jour d'analogues de benzamides actifs sur FtsZ sont des dérivés 1,2,3-triazoles (**28a** et **28b**, Figure 65), bioisostères de la fonction amide déjà décrits dans le chapitre 1¹⁰⁵.

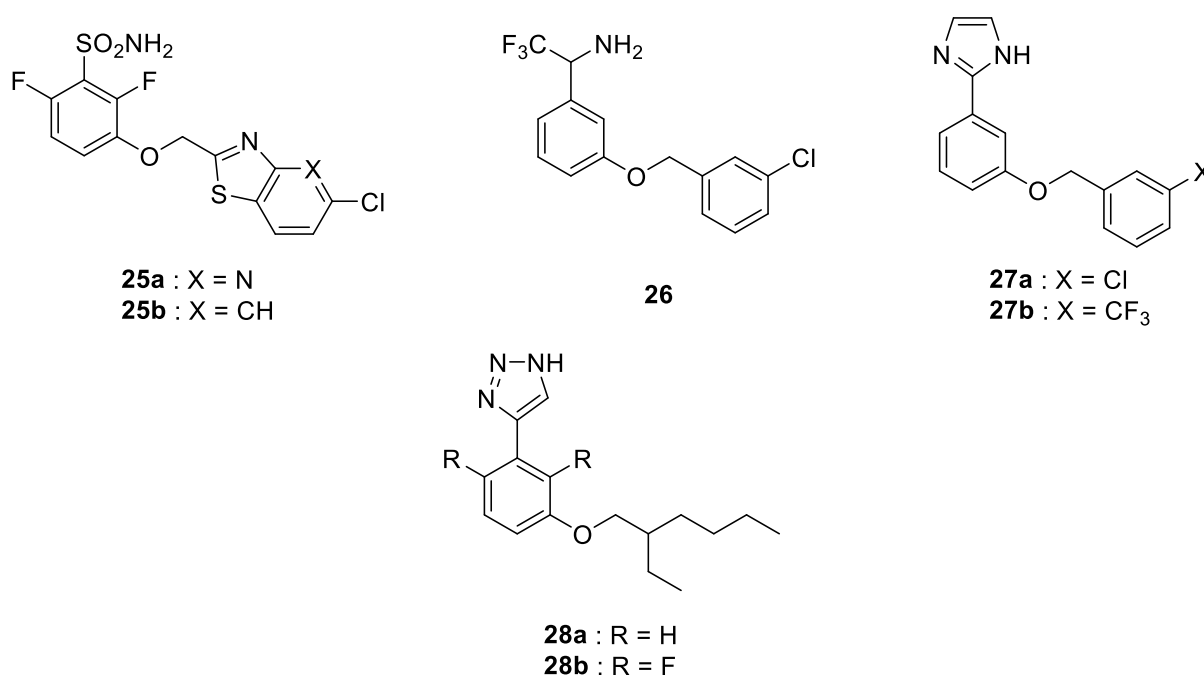


Figure 65 : Structure d'analogues de benzamides.

Dans cette étude, nous avons étudié trois séries d'analogues, à savoir des hydrazides, des acides hydroxamiques et des urées, portées à chaque fois par un phényl difluoré ou non sur les positions 2 et 6. Deux dérivés benzamide et 2,6-difluorobenzamide ont également servi de référence (Figure 66). Afin de se focaliser sur l'influence du remplacement de la fonction amide, tous les composés étaient substitués en position 3 par un motif hexyloxy. Il a été démontré que pour l'inhibition de FtsZ la longueur optimale d'une chaîne alkyloxy en position 3 était de neuf atomes de carbones⁸³. Cependant, les analogues étant plus volumineux qu'une fonction amide, il a été décidé d'utiliser une chaîne plus courte pour s'assurer que les molécules puissent s'insérer correctement dans la poche allostérique. C'est également cohérent avec les résultats obtenus par Shutao Ma et son équipe lors de la découverte des dérivés triazoles (Figure 65)¹⁰⁵.

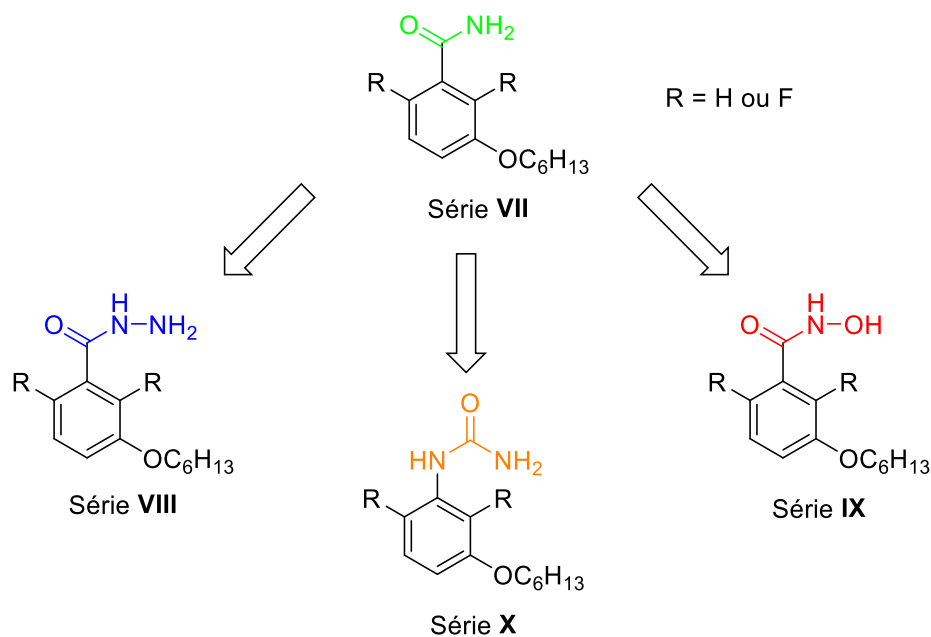


Figure 66 : Structures des benzamides de la série VII et des analogues hydrazides, hydroxamates et urées des séries VIII, IX et X.

1. Synthèse des séries VII, VIII, IX et X

Tout d'abord, les benzamides de la série VII ont été synthétisés tel que décrit dans le Schéma 9. Dans un premier temps, l'acide 3-hydroxybenzoïque **29** a été converti en benzamide correspondant en passant par un intermédiaire chlorure d'acyle mis en présence d'ammoniaque aqueux. La fonction phénol a ensuite été alkylée par du 1-bromohexane pour obtenir l'amide désiré VII.a avec un rendement de 85 % sur deux étapes⁸⁴. Le benzamide difluoré VII.b a quant à lui été obtenu dans les mêmes conditions en partant du dérivé phénolique **6** précédemment synthétisé.

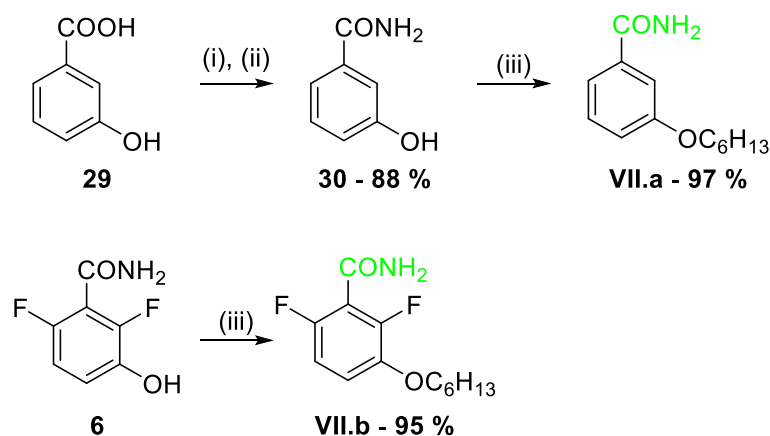


Schéma 9 : Synthèse des dérivés benzamide de la série VII. Réactifs et conditions : (i) SOCl_2 , DMF cat., DCM, 70 °C, 4 h ; (ii) NH_3 25% aq., 0 °C puis t.a., 16 h ; (iii) 1-bromohexane, K_2CO_3 , DMF, 35 °C, 16 h.

La synthèse des composés des séries **VIII**, **IX** et **X** nécessitait l'obtention préalable des acides 3-(hexyloxy)benzoïque et 2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzoïque dont les synthèses sont décrites dans le Schéma 10 et le Schéma 11. Pour le dérivé non fluoré, l'acide 3-hydroxybenzoïque **29** a été estérifié dans le méthanol en présence de chlorure de thionyle, puis alkylé avec du 1-bromohexane pour obtenir l'intermédiaire **32**^{97,203}. Cet ester a ensuite été saponifié pour conduire à l'acide désiré **33**²⁰⁴.

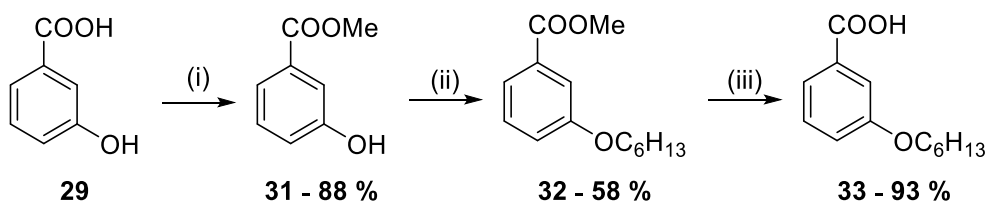


Schéma 10 : Synthèse de l'acide **33**. Réactifs et conditions : (i) SOCl_2 , MeOH, 0 °C puis 65 °C, 3 h ; (ii) 1-bromohexane, K_2CO_3 , NaI, ACN, 70 °C, 7 h ; (iii) NaOH, EtOH, t.a., 16 h.

Le dérivé fluoré **35** a été obtenu par l'alkylation du 2,4-difluorophénol **2** suivie de la déprotonation du carbone 3 par du *n*-BuLi et la carboxylation de cette position par de la carboglace⁹⁷.

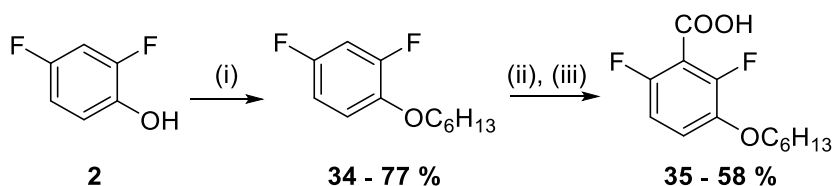


Schéma 11 : Synthèse de l'acide **35**. Réactifs et conditions : (i) 1-bromohexane, K_2CO_3 , NaI, ACN, 70 °C, 7 h ; (ii) *n*-BuLi, THF, -78 °C, 1 h ; (v) carboglace, THF, t.a., 2 h.

La synthèse des hydrazides de la série **VIII** est décrite dans le Schéma 12. Les acides sont couplés avec de la *N*-Boc hydrazine avec du DCC comme agent de couplage pour obtenir les intermédiaires **36** qui sont ensuite déprotégés au TFA pour obtenir les hydrazides **VIII.a** et **VIII.b**¹⁸⁹. La différence de rendement entre les deux dérivés est vraisemblablement liée à une perte du produit non fluoré lors de l'extraction en raison d'une meilleure hydrosolubilité.

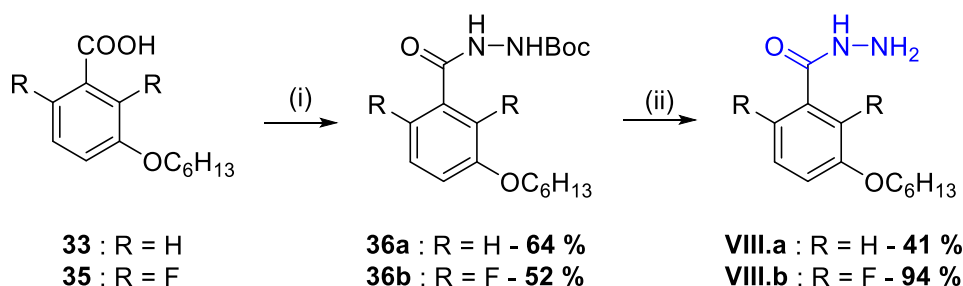


Schéma 12 : Synthèse des dérivés hydrazides de la série **VIII**. Réactifs et conditions : (i) $\text{H}_2\text{N-NHBoc}$, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 16 h ; (ii) TFA, DCM, t.a., 24 h.

La voie de synthèse initialement étudiée pour les dérivés hydroxamates de la série **IX** était similaire à celles des hydrazides, comme montré sur le Schéma 13. Dans un premier temps, les acides carboxyliques ont été couplés à de la *O*-benzylhydroxylamine pour obtenir les intermédiaires **37**, qui devaient être ensuite déprotégés à l'aide de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène²⁰⁵. Cependant, nous avons observé qu'au lieu de la débenzylation, le clivage de l'acide hydroxamique avait lieu, conduisant dans le cas des dérivés fluorés au benzamide **VII.b**.

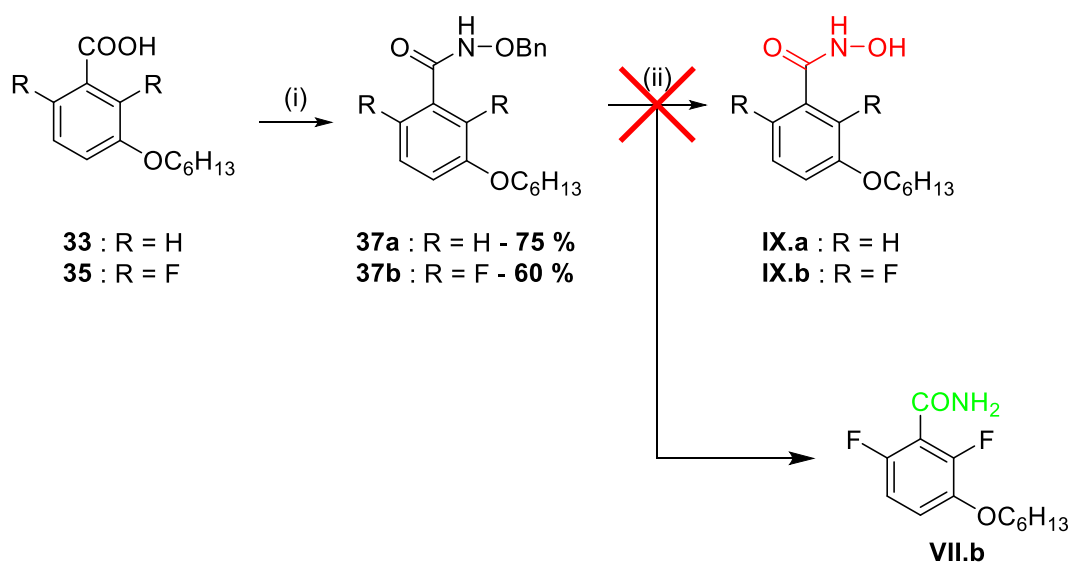


Schéma 13 : Voie de synthèse initialement envisagée pour les dérivés acides hydroxamiques de la série **IX**. Réactifs et conditions : (i) BnO-NH₂·HCl, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 16 h ; (ii) H₂, Pd/C 10 %, MeOH, t.a., 10 h.

La formation de la molécule **VII.b** a été constatée grâce aux analyses structurales du produit obtenu, à savoir la RMN et la spectrométrie de masse. L'analyse RMN ¹H ayant été faite dans le méthanol deutéré, les protons échangeables ne sont pas visibles. En revanche, la comparaison des spectres RMN de **VII.b** (en rouge sur la Figure 67A) et du produit obtenu après réaction avec le palladium (en vert) montre que les pics caractéristiques ont exactement les mêmes multiplicités et déplacements. *A contrario*, les protons H4 et H5 sont légèrement plus déblindés sur le spectre du composé **IX.b** (obtenu par la suite, en bleu). L'analyse par spectrométrie de masse (Figure 67B) montre également que le produit obtenu a une masse m/z égale à 258,1 pour l'ion [M+H]⁺ et à 280,1 pour l'ion [M+Na]⁺, ce qui correspond à la masse du composé **VII.b**. La masse exacte attendue pour le composé **IX.b**, 273,1 pour l'ion [M+H]⁺, n'apparaît quant à elle pas sur le spectre.

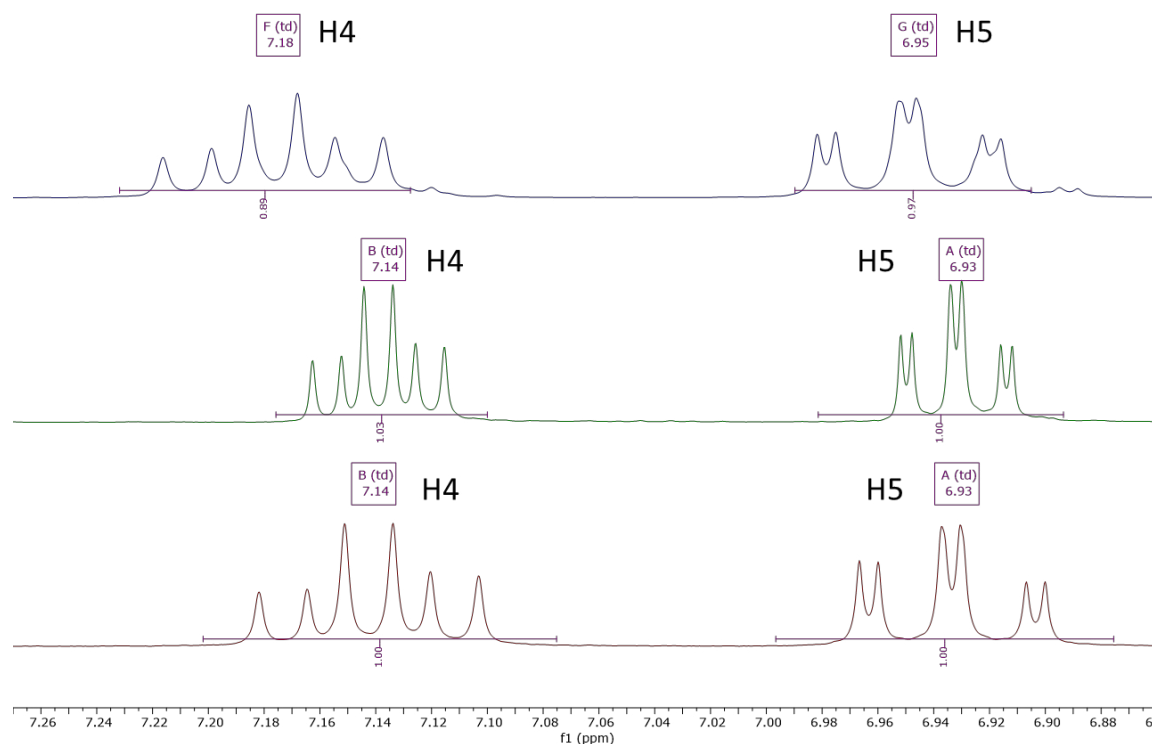
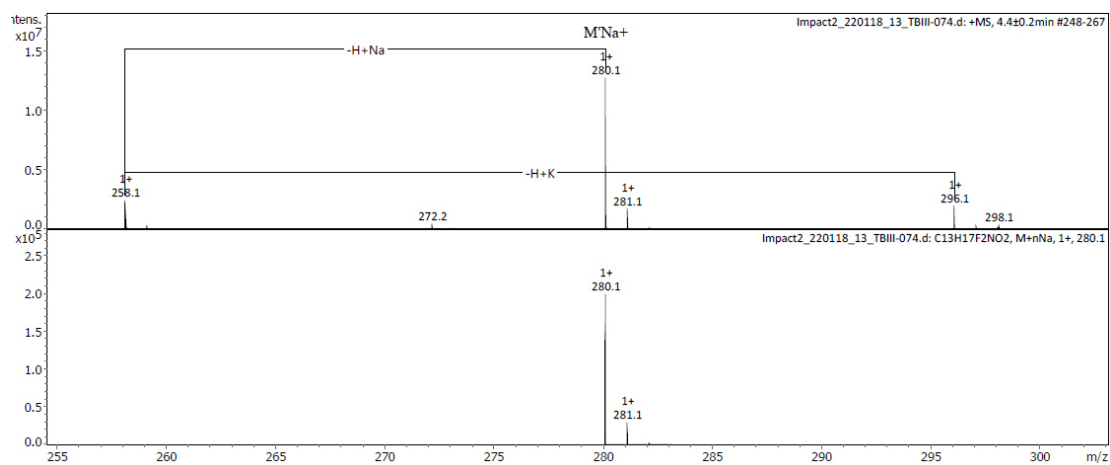
A**B**

Figure 67 : Analyses structurales du dérivé **VII.b** obtenu comme sous-produit lors de la synthèse de l'acide hydroxamique **IX.b**. **A** : Superposition des spectres RMN ^1H de **VII.b** (rouge), du produit obtenu par clivage (vert) et de **IX.b** (bleu). **B** : Spectre de masse du produit obtenu par clivage.

La voie de synthèse finale des acides hydroxamiques de la série **IX** est décrite dans le Schéma 14 et nécessitait la synthèse des esters **31** et **37**. Le premier a déjà été synthétisé précédemment (Schéma 10, page 94), tandis que le second a été obtenu depuis l'acide benzoïque correspondant **35** dans le méthanol²⁰³. La réaction de ces esters en présence d'hydroxylamine a permis d'obtenir les composés **IX.a** et **IX.b** voulus²⁰⁶.

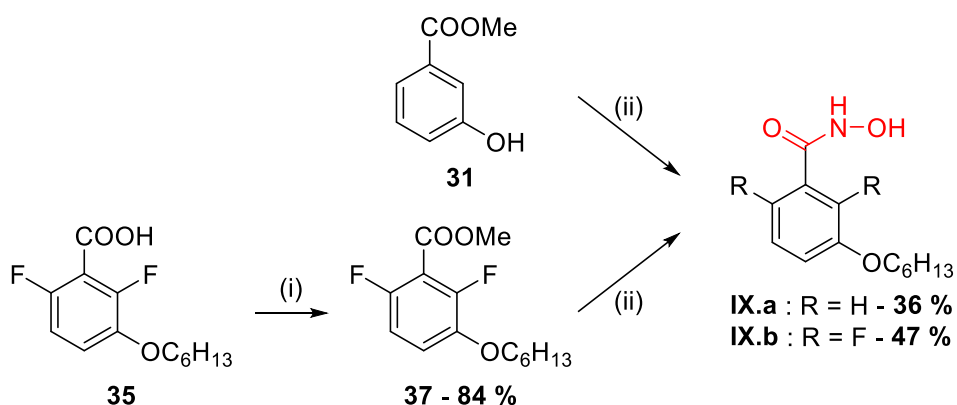


Schéma 14 : Synthèse des dérivés acides hydroxamiques de la série **IX**. Réactifs et conditions : (i) SOCl_2 , MeOH, 0 °C puis 65 °C, 3 h ; (ii) HO-NH₂·HCl, NaOH, H₂O, dioxane, 0 °C puis t.a., 16 h.

La 3-hydroxyphénylurée étant commerciale, une simple alkylation a permis d'obtenir le composé **X.a**, comme montré sur le Schéma 15⁸⁴. Le dérivé difluoré **X.b** a quant à lui été obtenu en deux étapes d'après un protocole adapté de la littérature : l'acide carboxylique **35** a d'abord été converti en isocyanate par un réarrangement de Curtius, puis cet intermédiaire a subi une attaque nucléophile par de l'ammoniaque ce qui a conduit à la formation de l'urée²⁰⁷.

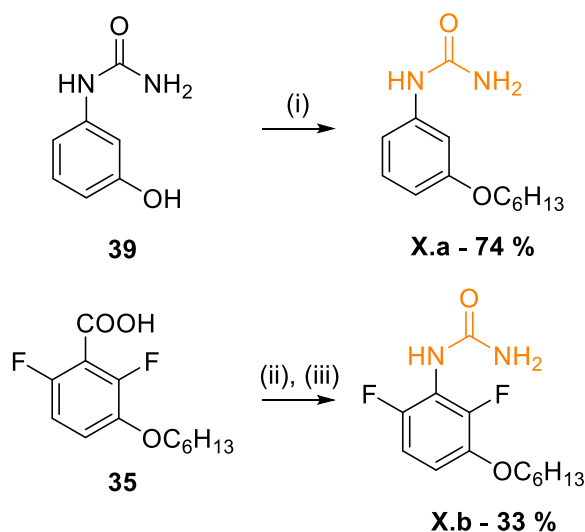


Schéma 15 : Synthèse des dérivés urées de la série **X**. Réactifs et conditions : (i) 1-bromohexane, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 16 h ; (ii) DPPA, Et₃N, toluène, 100 °C, 1 h ; (iii) NH₃, dioxane, t.a., 16 h.

Les huit produits des séries **VII** à **X** ont donc pu être obtenus et leurs structures sont présentées dans la Figure 68.

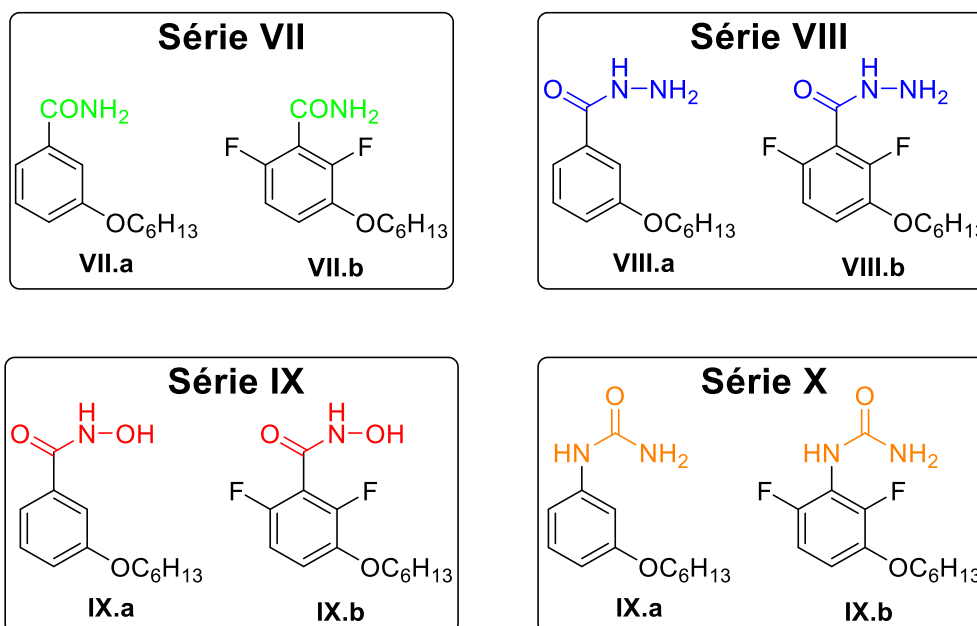


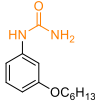

Figure 68 : Structures des composés des séries VII à X.

2. Evaluation biologique sur *S. aureus* et études de docking

A l'instar des autres produits synthétisés au cours de ce projet, l'activité antibactérienne des molécules des séries VII, VIII, IX et X a été évaluée contre trois souches de *S. aureus*, à savoir ATCC 29213 (SASM), SF8300 (SARM) et ST20171643 (SARD) avec le PC190723 comme molécule de référence. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices des composés des séries VII, VIII, IX et X contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	VII.a	256	256	256
	VII.b	8	8	8
	VIII.a	128	128	128
	VIII.b	> 256	> 256	> 256
	IX.a	64	64	64
	IX.b	> 256	> 256	> 256

	X.a	> 256	> 256	> 256
	X.b	> 256	> 256	> 256
PC190723		0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

Tout d'abord, on observe chez les benzamides que la présence des fluors entraîne un gain d'activité de facteur 32. Ce résultat est cohérent avec la littérature, l'importance des fluors ayant déjà été démontrée⁸³. Il est également à noter que la CMI du dérivé **VII.b** est identique aux valeurs de la littérature, alors que celle du dérivé **VII.a** est plus élevée que dans d'autres études (256 µg/mL contre 16 à 64 µg/mL)^{83,183}. De faibles activités ont été observées pour les hydrazides **VIII.a** (128 µg/mL) et acides hydroxamiques **IX.a** (64 µg/mL) tandis que leurs analogues difluorés sont inactifs, de même que les urées de la série **X**.

Afin d'étudier la relation structure-activité du composé **IX.a**, celui-ci a été docké au sein de la poche allostérique de FtsZ (code PDB : 4DXD), comme montré sur la Figure 69.

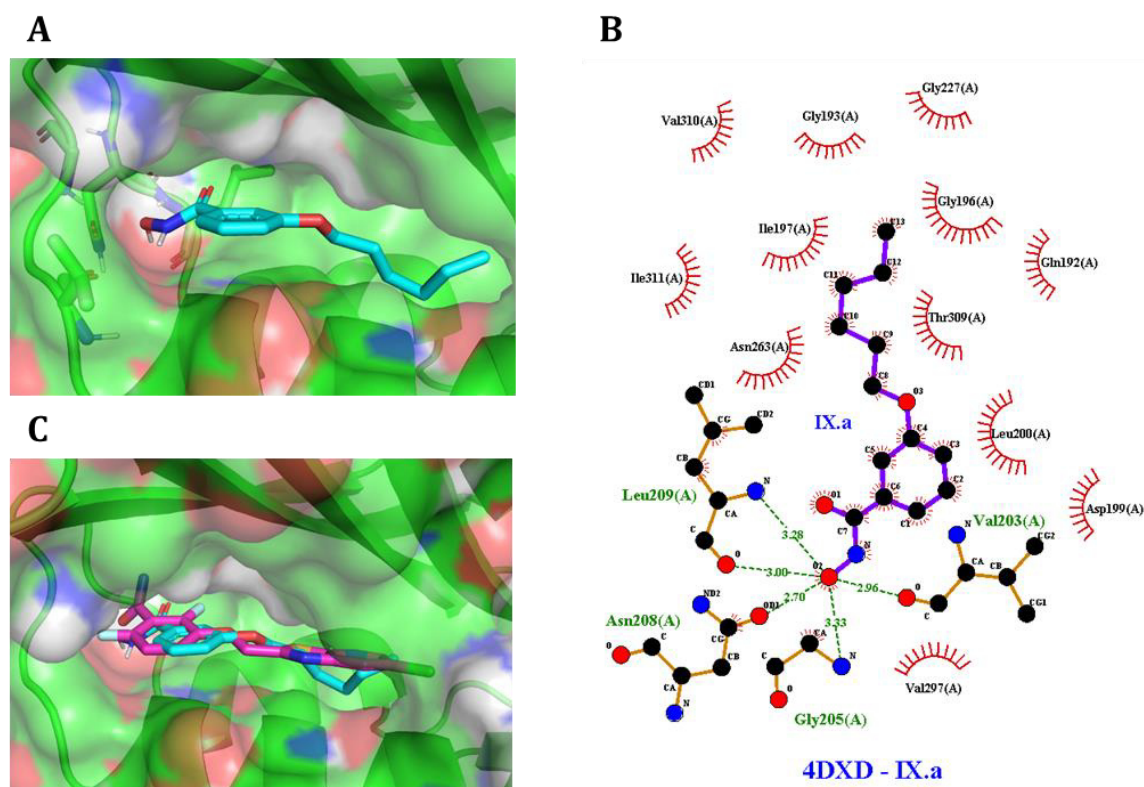


Figure 69 : Résultats du docking du composé **IX.a** avec FtsZ. **A** : Structure de **IX.a** au sein de la poche allostérique. **B** : Interactions réalisées entre **IX.a** et la protéine. **C** : Superposition de **IX.a** docké (cyan) et du ligand co-cristallisé **PC190723** (magenta).

Logiquement, on observe que la chaîne alkyle réalise de nombreuses interactions hydrophobes avec la poche allostérique. Le motif hydroxamate développe également un important réseau de liaisons hydrogène. Cependant, il ne cible qu'un seul des trois acides aminés clés identifiés précédemment, à savoir Leu209. Cependant, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent concernant les dérivés benzamides, il est possible que toutes les liaisons hydrogène possibles ne soient pas visibles par docking. Cependant, si on compare avec le **PC190723**, dérivé benzamide co-cristallisé (Figure 69C), on voit que l'encombrement de l'hydroxamate par rapport au groupement amide décale le noyau phényle dans la poche ce qui contribue à l'activité réduite de **IX.a** par rapport à l'homologue benzamide **VII.b**.

3. Conclusion

La recherche d'analogues du 2,6-difluorobenzamide a conduit à la synthèse de trois nouvelles séries de phénylhydrazides (**VIII**), acides phénylhydroxamiques (**IX**) et phénylurées (**X**) et une série de benzamides témoins (**VII**), difluorés ou non sur les positions 2 et 6. Les concentrations minimales inhibitrices des huit composés ont été évaluées contre *S. aureus* et seul le dérivé hydroxamate non fluoré **IX.a** a montré une légère activité (64 µg/mL). L'analyse par docking de la relation structure-activité a montré que ce composé est capable de faire un réseau conséquent de liaisons hydrogène au sein de la poche allostérique, mais compte-tenu de son encombrement est décalé par rapport à un homologue benzamide, ce qui est délétère pour l'inhibition de FtsZ. La faible activité des nouveaux dérivés identifiés tend donc à confirmer l'importance du motif 2,6-difluorobenzamide pour l'inhibition de cette protéine.

III. Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés dimériques de 2,6-difluorobenzamide

Les inhibiteurs multivalents sont des molécules portant plusieurs motifs (identiques ou non) capables d'inhiber une fonction biologique. Dans le cas d'inhibiteurs dimériques pour lesquels les deux motifs sont différents, l'intérêt est de cibler deux sites de liaison différents proches l'un de l'autre (Figure 70)²⁰⁸. Pour des protéines oligomériques, la liaison de plusieurs ligands simultanément diminue le K_D global (effet chélate). De manière générale, la liaison d'un ligand porté par une molécule multimérique à une cible augmente la concentration locale en ce ligand autour du site de liaison. Cet « effet statistique » permet donc, lorsqu'un ligand n'est plus lié à la cible, qu'un autre prenne sa place.

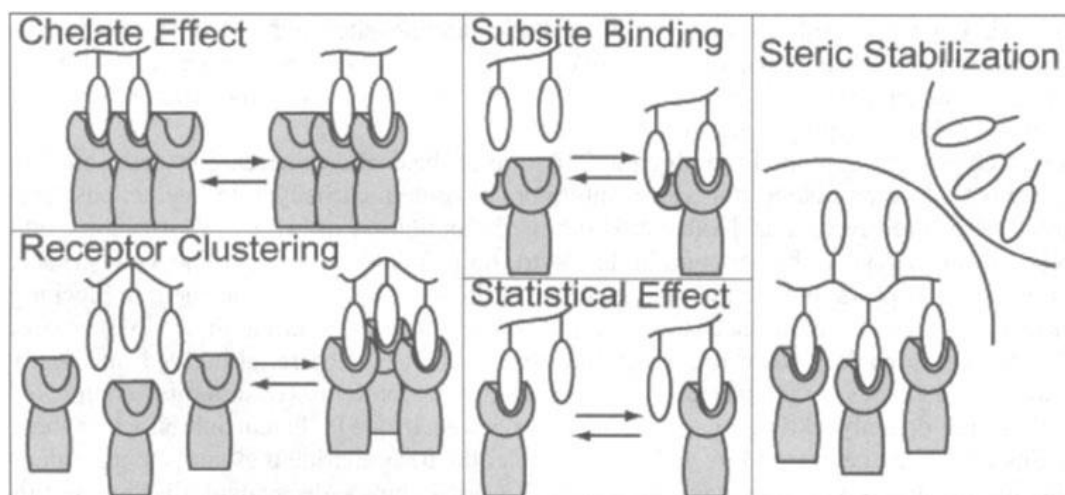


Figure 70 : Modes de liaisons d'inhibiteurs multivalents (figure issue *Chemical Probes in Biology* publié par Kluwer Academic Publishers, 2003²⁰⁸).

C'est cet effet statistique que nous avons voulu expérimenter en synthétisant différents dimères de 2,6-difluorobenzamides. Trois chaînes de différentes longueurs servant de « linker » ont été étudiées, reliées aux benzamides par des liaisons éther (série **XI**), ester (série **XII**) et amide (série **XIII**). Pour les dérivés éthers et esters, des chaînes à six et huit atomes de carbones ainsi qu'une chaîne à huit chaînons de type triéthylène glycol ont été étudiées, tandis que seule une chaîne à six carbones a été investiguée pour les amides (Figure 71). Pour chaque série, en plus des composés dimérique, un dérivé monomérique (portant soit une chaîne éther, ester ou amide) a été également synthétisé afin d'étudier l'impact de ces fonctions chimiques sur la liaison à FtsZ.

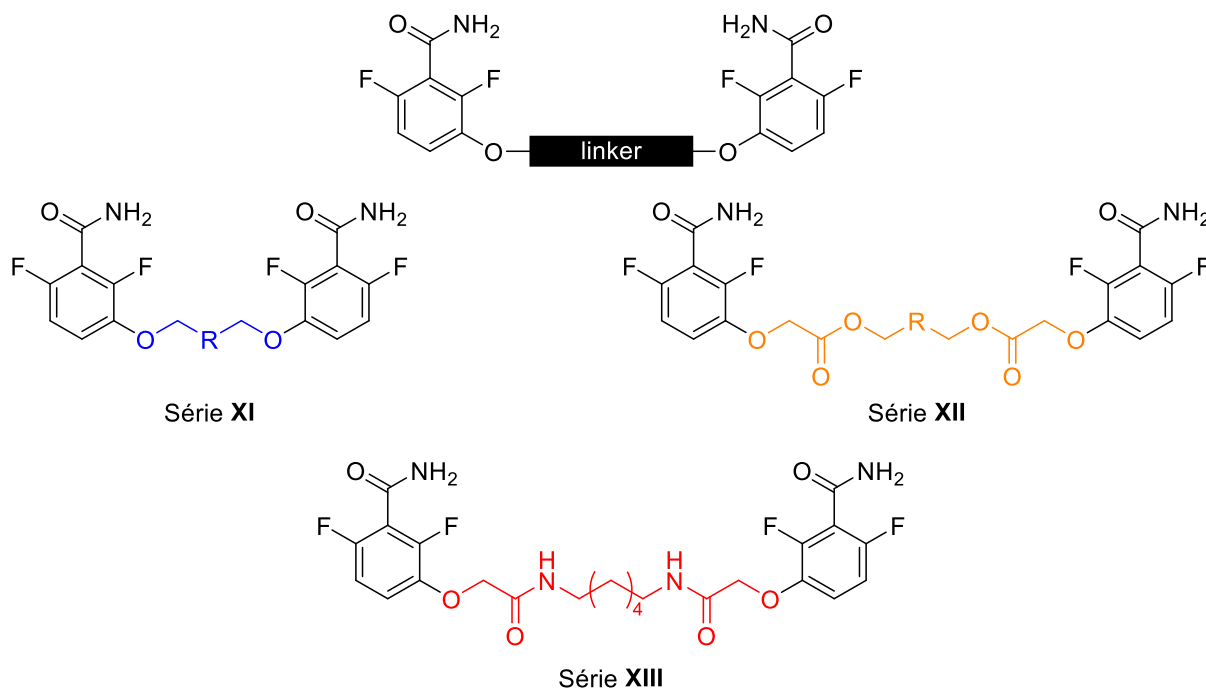


Figure 71 : Structure générale des dérivés dimériques éthers (série **XI**), esters (série **XII**) et amides (série **XIII**).

1. Synthèse des séries **XI**, **XII** et **XIII**

Pour les dérivés éthers, le composé monomérique **XI.a** a été obtenu par alkylation du benzamide **6** précédemment synthétisé par du 1-bromononane comme décrit sur le Schéma 16⁸⁴.

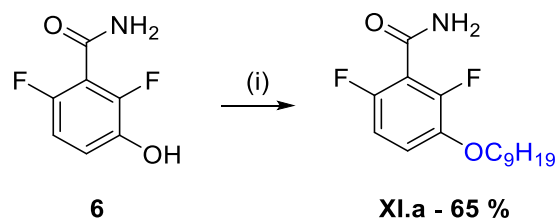


Schéma 16 : Synthèse du monomère éther **XI.a**. Réactifs et conditions : (i) 1-bromononane, K_2CO_3 , DMF, 35 °C, 16 h.

Les molécules dimériques ont été obtenues par la même méthode en utilisant du 1,6-dibromohexane ou du 1,8-dibromooctane, conduisant ainsi aux composés **XI.b** et **XI.c** (Schéma 17).

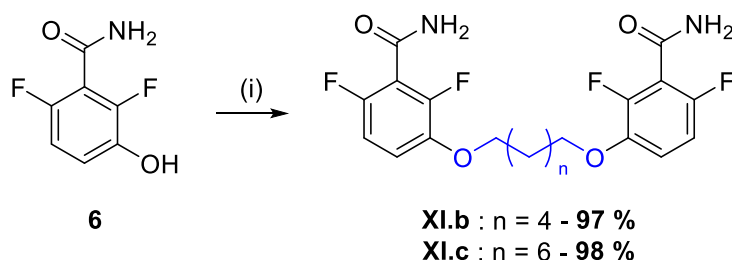


Schéma 17 : Synthèse des dimères éthers de la série **XI**. Réactifs et conditions : (i) α,ω -dibromoalcane, K_2CO_3 , DMF, 35 °C, 16 h.

Enfin, dans le cas du composé polyoxygéné, la synthèse a été réalisée à partir du benzamide **6** et de 1,2-bis(2-chloroéthoxy)éthane (Schéma 18). La réaction n'a pas lieu à 35 °C dans la mesure où ce dérivé chloré était moins réactif que les analogues alcanes bromés utilisés précédemment. L'alkylation a donc été réalisée à plus forte température, comme décrit dans la littérature, afin d'obtenir le produit voulu **XI.d**²⁰⁹.

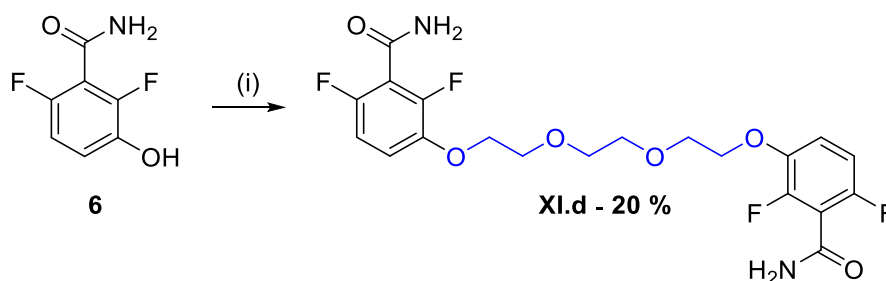


Schéma 18 : Synthèse du dimère éther **XI.d**. Réactifs et conditions : (i) 1,2-bis(2-chloroéthoxy)éthane, K_2CO_3 , DMF, 150 °C, 2 h puis 100 °C, 16 h.

Comme décrit dans le Schéma 19, les dérivés monomériques ester **XII.a** et amide **XIII.a** ont été obtenus en deux étapes, à savoir par l'acylation de l'hexan-1-ol ou de

l'hexan-1-amine par du chlorure de chloroacétyle, suivie de l'alkylation du benzamide **6**²¹⁰.

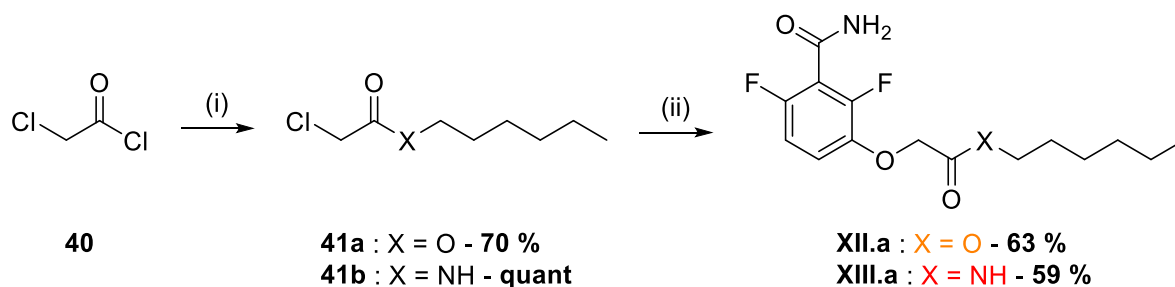


Schéma 19 : Synthèse du monomère ester **XII.a**. Réactifs et conditions : (i) hexan-1-ol ou hexan-1-amine, Et₃N, DCM, t.a., 1 h 30 ; (ii) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 16 h.

La même voie de synthèse a été utilisée pour la synthèse des esters dimériques (Schéma 20). L'acylation de 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol et de triéthylène glycol a permis d'obtenir les intermédiaires **42**, qui ont ensuite conduit aux esters finaux **XII.b**, **XII.c** et **XII.d** par alkylation du benzamide **6**.

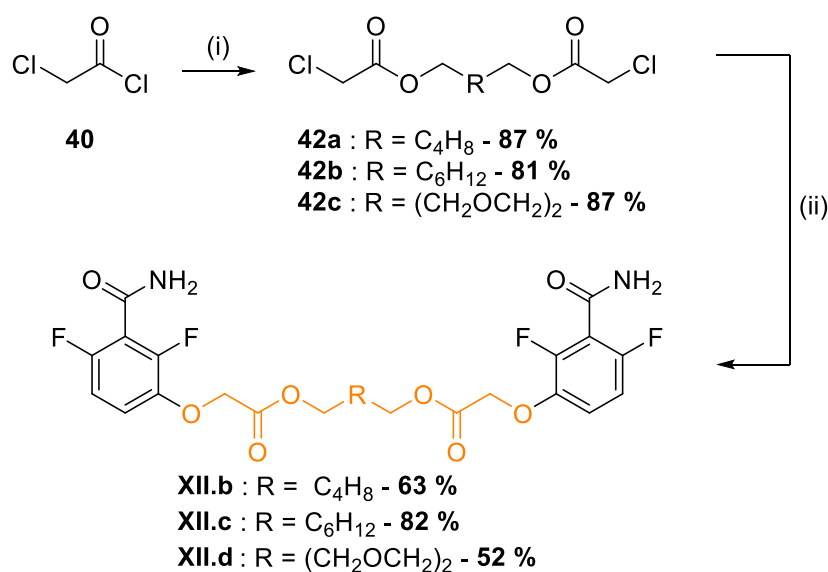


Schéma 20 : Synthèse des dimères esters de la série **XII**. Réactifs et conditions : (i) α,ω-alcanediol, Et₃N, DCM, t.a., 1 h 30 ; (ii) **6**, K₂CO₃, DMF, 35 °C, 16 h.

Enfin, la synthèse du dimère amide **XIII.b** a été obtenue par acylation de l'hexane-1,6-diamine par du bromure de bromoacétyle suivie de l'alkylation du benzamide **6** (Schéma 21)²¹¹.

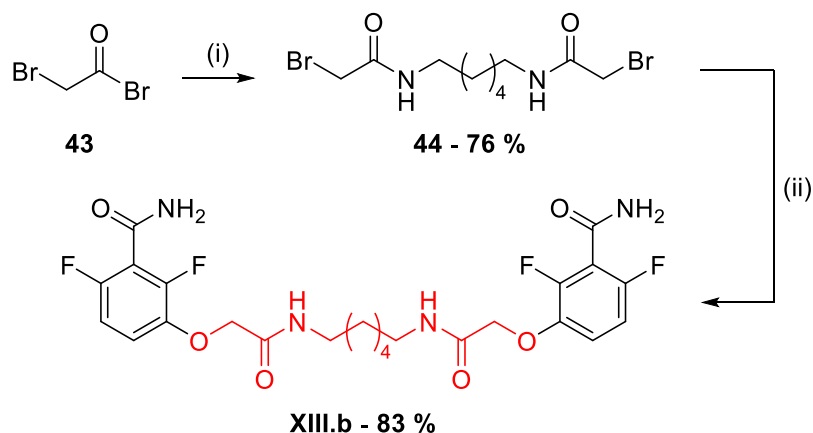


Schéma 21 : Synthèse du dimère amide **XIII.b**. Réactifs et conditions : (i) 1,6-hexanediamine, K_2CO_3 , $CHCl_3$, H_2O , t.a., 24 h ; (ii) **6**, K_2CO_3 , DMF, 35 °C, 16 h.

Les dix produits des séries **XI** à **XIII** obtenus sont présentées dans la Figure 72 ci-contre.

2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

L'activité anti-staphylococcique des molécules des séries **XI**, **XII** et **XIII** a été évaluée contre les mêmes souches de *S. aureus* que précédemment (Tableau 6).

Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices des composés des séries **XI**, **XII** et **XIII** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	R	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
			ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XI.a	/	< 0,25	< 0,25	< 0,25
	XI.b	C_4H_8	> 256	> 256	> 256
	XI.c	C_6H_{12}	> 256	> 256	> 256
	XI.d	$(CH_2OCH_2)_2$	> 256	> 256	> 256
	XII.a	/	8	8	8
	XII.b	C_4H_8	> 256	> 256	> 256
	XII.c	C_6H_{12}	> 256	> 256	> 256
	XII.d	$(CH_2OCH_2)_2$	> 256	> 256	> 256
	XIII.a	/	128	256	128
XIII.b	C_4H_8	> 256	> 256	> 256	
PC190723			0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la métilcilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la métilcilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

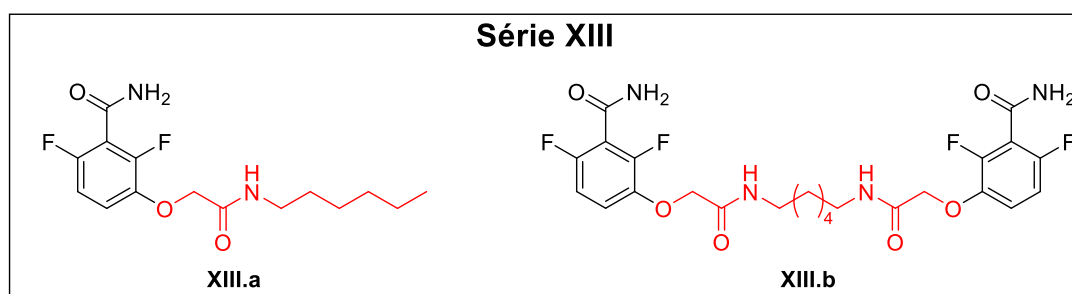
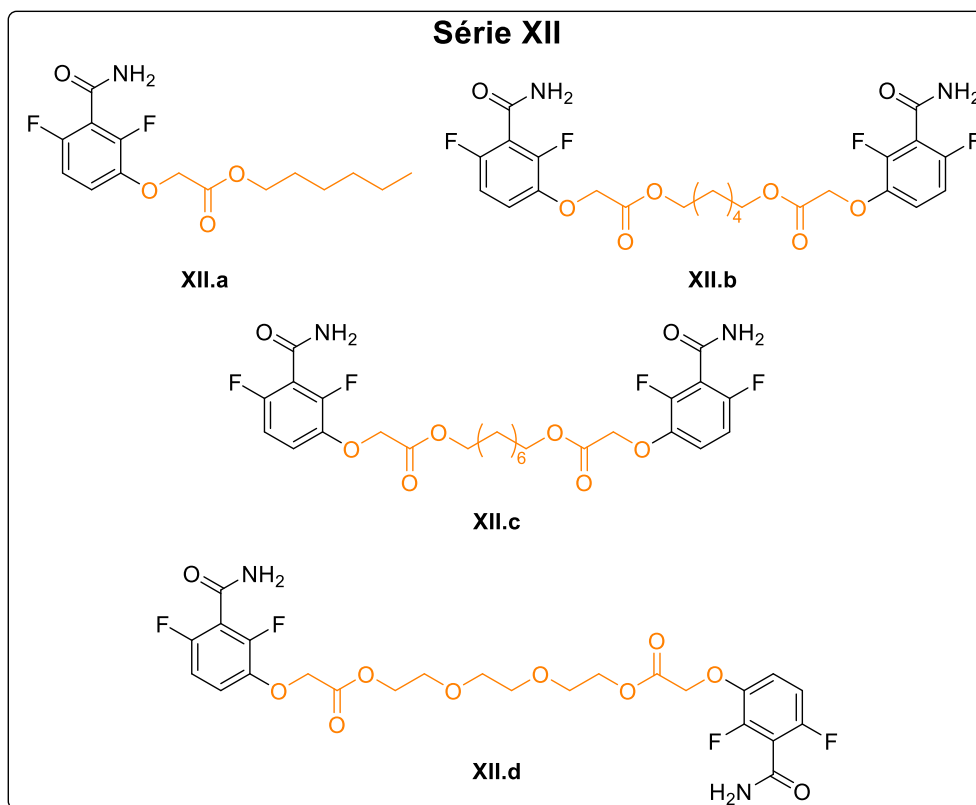
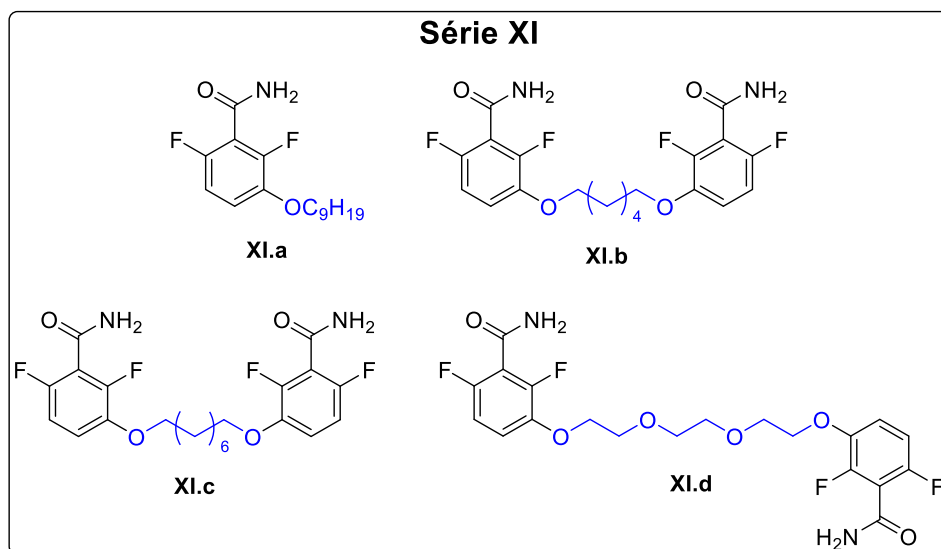


Figure 72 : Structures des produits des séries XI à XIII.

Tout d'abord, on voit que l'éther **XI.a** a une CMI inférieure à 0,25 µg/mL (l'évaluation étant réalisée entre 256 et 0,25 µg/mL), ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui indiquent une CMI de 0,125 µg/mL contre *S. aureus*⁸³. On voit ensuite qu'aucun dimère n'a montré d'activité à des concentrations inférieures ou égales à 256 µg/mL. Enfin, les esters et amides monomériques **XII.a** et **XIII.a** ont montré des CMI beaucoup plus élevées que celles du dérivé éther.

3. Conclusion

Bien que les monomères aient présenté une activité antibactérienne, les systèmes dimériques ne permettent pas d'inhiber la croissance de *S. aureus*. Le bras espaceur entre les benzamides n'est donc pas apte à jouer le rôle de chaîne interagissant avec la protéine tout en augmentant la concentration locale en benzamide.

Chapitre 4

—

Utilisation du criblage virtuel pour
identifier de nouveaux inhibiteurs
potentiels de FtsZ

I. Introduction et démarche

Le criblage virtuel est une démarche de bioinformatique visant à identifier de nouveaux composés potentiellement bioactifs. Deux méthodes sont principalement utilisées : le criblage virtuel basé sur un ligand (LBVS, pour *ligand-based virtual screening*) ou sur une protéine (SBVS, pour *structure-based virtual screening*)²¹². Dans le premier cas, la structure de la cible n'est pas connue, et le criblage permet d'identifier des dérivés similaires à une molécule active sur la cible servant de base²¹³. Dans le deuxième cas, la structure de la protéine-cible est connue, et le docking permet d'identifier des composés en se basant sur la complémentarité chimique et structurale avec la cible²¹⁴. Lors du criblage virtuel basé sur la structure, les molécules sont dockées successivement au sein de la protéine, et leur énergie d'interaction est calculée. Les composés formant les complexes les plus stables sont ainsi identifiés comme de potentiels ligands de la protéine ciblée (ou *hits* potentiels). A l'inverse du criblage à haut débit pour lesquels les molécules sont testées directement sur des cibles biologiques, cette démarche de criblage virtuel est purement calculatoire et implique l'obtention des composés identifiés et leur évaluation biologique pour s'assurer de l'activité sur la protéine. Initialement développé dans les années 1980, le criblage virtuel a ensuite connu un essor au début des années 2000 grâce aux progrès de l'informatique²¹⁵. Cet essor se poursuit toujours : le nombre de publications traitant du criblage virtuel a encore doublé entre 2017 et 2021, passant d'environ 700 articles à plus de 1 400 (Figure 73).

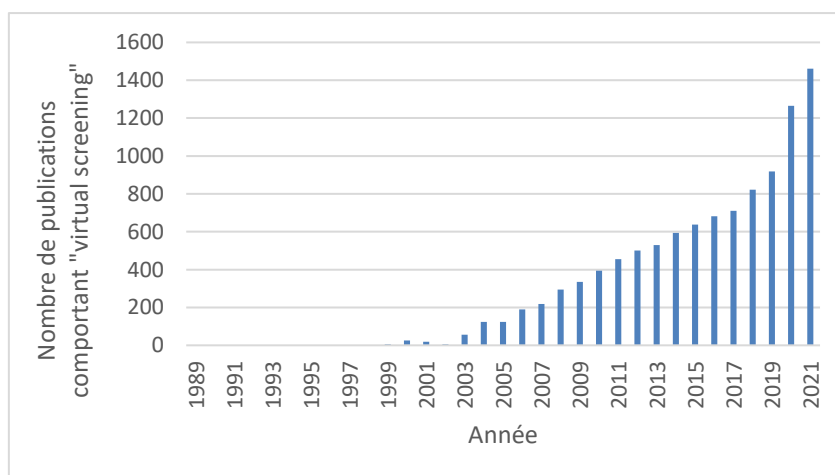


Figure 73 : Nombre de publications recensées sur PubMed contenant l'expression « virtual screening ».

La structure tridimensionnelle de FtsZ est disponible depuis 1998, et la protéine a été cristallisée à de nombreuses reprises depuis, en présence ou non d'inhibiteurs³⁸. Ceci a permis la recherche de nouveaux inhibiteurs potentiels par criblage virtuel de différentes chimiothèques^{216–221}. Il est à noter qu'à de rares exceptions près, ces travaux restent purement computationnels, c'est-à-dire que les composés identifiés n'ont pas été obtenus et évalués biologiquement par la suite^{75,222}.

Parmi les études précédemment citées, l'une d'entre elles a été réalisée au sein du laboratoire²¹⁷. Celle-ci consistait au criblage virtuel par docking dans la poche allostérique de FtsZ d'une chimiothèque de 12 055 molécules commerciales issues de la collection Gold & Platinum d'Asinex, avec une forte variabilité structurale et ayant un potentiel médicamenteux. La structure cristalline de FtsZ utilisée est celle de code PDB 4DXD, pour laquelle la protéine est co-cristallisée avec le **PC190723**⁶¹.

La base de données a été criblée par deux méthodes différentes. Le premier criblage a été fait par une méthode stochastique, qui consiste à faire varier la conformation du ligand au sein de la poche pour identifier la pose optimale²²³. Dans le cas présent, un algorithme génétique a été utilisé. Au cours de cet algorithme, les variables propres au ligand au sein de la protéine (orientation, conformation...) sont considérées comme étant des gènes. Des mutations (changement aléatoire d'une des valeurs sur le gène) et des *crossovers* (combinaison des gènes de deux conformères parents) permettent alors d'obtenir de nouvelles poses pour le ligand. Plus les altérations sont bénéfiques, plus elles sont conservées au cours du calcul, ce qui permet d'obtenir *in fine* le conformère le plus optimisé pour l'interaction avec la protéine²²⁴. Le deuxième criblage a été réalisé par la méthode de complémentarité de forme, qui se base sur l'adéquation stérique et électronique entre le ligand et la protéine²²⁵.

Chaque docking a été réalisé à quatre reprises, et le meilleur *hit* potentiel était retenu. Les deux *hits* identifiés sont présentés en Figure 74.

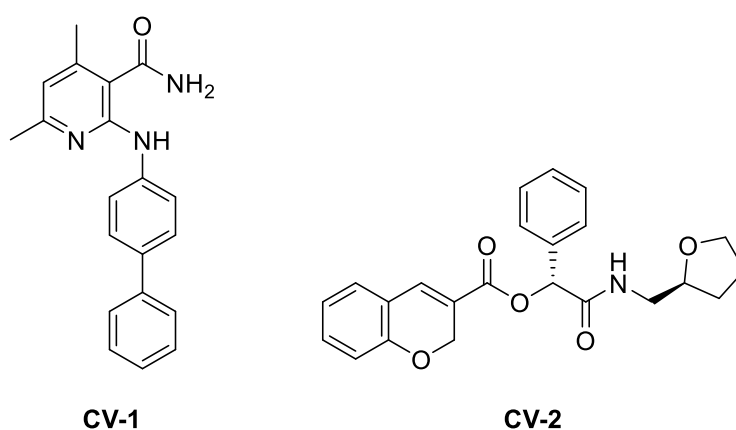


Figure 74 : Structures des *hits* potentiels identifiés par le criblage virtuel de la chimiothèque Asinex.

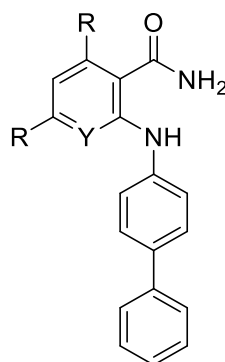
Le criblage virtuel d'une deuxième base de données issue de PubChem BioAssay (AID 2205) constituée de 1 625 dérivés stabilisant les microtubules a également été réalisé afin d'identifier d'autres potentiels inhibiteurs de FtsZ, ce qui sera montré dans ce chapitre. Suite à ces criblages virtuels, l'objectif était d'obtenir les composés identifiés, de réaliser une diversification structurale puis d'évaluer leur activité biologique sur *S. aureus*.

II. Base de données Asinex

Le criblage virtuel de la base de données Asinex a conduit à l'identification de deux inhibiteurs potentiels de FtsZ, à savoir les dérivés biphenyle **CV-1** et chromène **CV-2**. Pour des raisons d'accessibilité synthétique, seul le composé **CV-1** a été diversifié et synthétisé.

1. Synthèse des dérivés biphenyles (série XIV)

Suite à l'identification de **CV-1** par criblage virtuel, ce dernier a été synthétisé ainsi que deux autres analogues, à savoir les dérivés anthranilamide et nicotinamide (Figure 75).



Série XIV

Figure 75 : Structure générale des dérivés biphenyles de la série **XIV**.

La synthèse des composés de la série **XIV** a dans un premier temps été tentée sans succès par un couplage de Buchwald-Hartwig entre du 4-bromobiphényle et de l'anthranilamide²²⁶. Les produits ont cependant pu être obtenus *via* un couplage de Chan-Evans-Lam catalysé au cuivre, tel que montré sur le Schéma 22²²⁷.

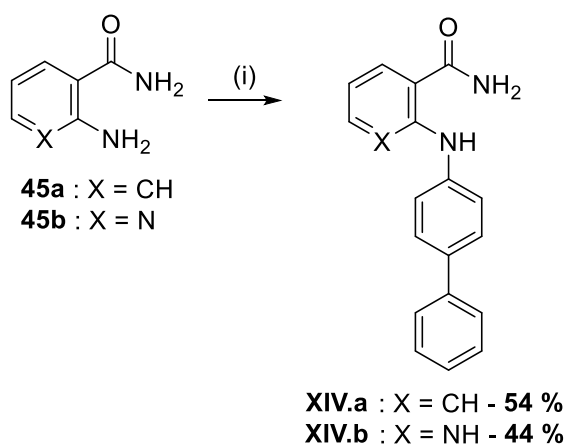


Schéma 22 : Synthèse des dérivés biphenyles **XIV.a** et **XIV.b**. Réactifs et conditions : (i) acide 4-biphénylboronique, CuCl, Et₃N, MeOH, t.a., 24 h.

A l'inverse de l'antranilamide et du nicotinamide, tous deux commerciaux, le 4,6-diméthylnicotinamide a été synthétisé. Ce dernier a donc été obtenu à partir de malonamidine et d'acétylacétone (Schéma 23) tel que décrit dans la littérature²²⁸. Cet intermédiaire **45c** a ensuite été couplé à de l'acide 4-biphénylboronique pour donner le composé CV-1, appelé désormais **XIV.c** pour être homogène avec le reste de la série.

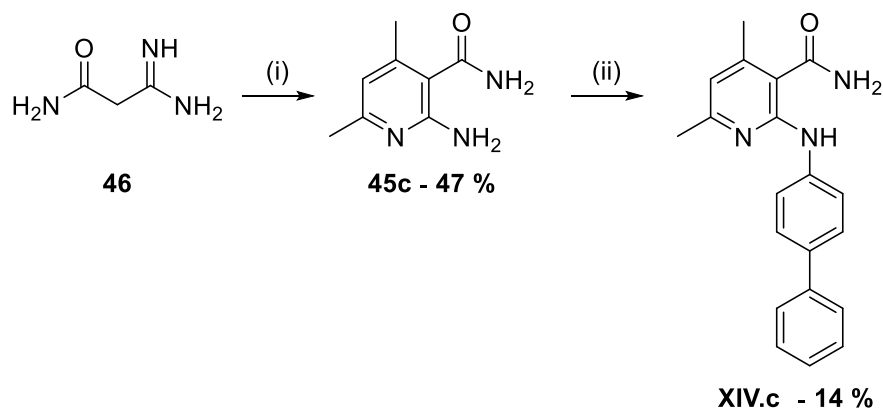


Schéma 23 : Synthèse du dérivé biphényle **XIV.c**. Réactifs et conditions : (i) acétylacétone, KOH, MeOH, t.a., 24 h ; (ii) acide 4-biphénylboronique, CuCl, Et₃N, MeOH, t.a., 24 h.

Les trois produits de la série **XIV** ont pu être obtenus et leurs structures sont décrites dans la Figure 76.

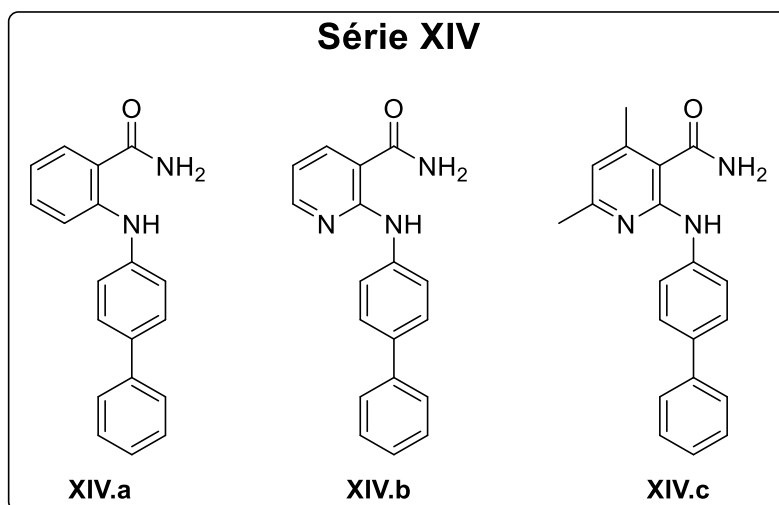
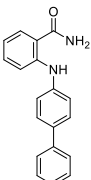
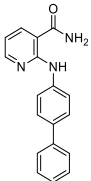
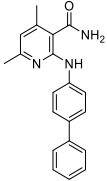


Figure 76 : Structures des dérivés biphényles de la série **XIV**.

2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

A l'instar des autres produits synthétisés au cours de ce projet, l'activité antibactérienne des dérivés biphényles de la série **XIV** a été évaluée sur trois souches de *S. aureus*. Ces souches sont les mêmes que celles utilisées lors des précédentes évaluations, à savoir ATCC 29213 (SASM), SF8300 (SARM) et ST20171643 (SARD). Comme on peut le voir dans le Tableau 7, aucun des trois produits n'a montré d'activité à des concentrations inférieures ou égales à 256 µg/mL.

Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **XIV** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	CMI (µg/mL)		
		ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XIV.a	> 256	> 256	> 256
	XIV.b	> 256	> 256	> 256
	XIV.c	> 256	> 256	> 256
PC190723		0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

III. Base de données PubChem

1. Criblage virtuel

Comme il a été vu précédemment dans ce manuscrit, compte-tenu de l'homologie entre FtsZ et la tubuline chez les mammifères, un certain nombre de molécules sont actives sur les deux protéines à la fois, à l'instar de la curcumine⁸⁰. Cependant, des dérivés taxanes capables d'inhiber sélectivement la protéine bactérienne ont également été identifiés, bien que ce soient des analogues d'anticancéreux puissants¹⁴³. Par conséquent, la recherche d'inhibiteurs de FtsZ parmi des molécules biologiquement actives sur la tubuline et leur diversification structurales subséquente est pertinente.

PubChem BioAssay est une base de données publique contenant les résultats d'études de criblages de molécules contre des cibles biologiques. En 2009, 195 853 molécules ont été évaluées pour leur capacité à stabiliser les microtubules lors d'un criblage à haut débit, et 1 625 d'entre elles se sont montrées actives (PubChem BioAssay – AID 2205)²²⁹. Dans l'optique d'identifier de nouveaux inhibiteurs de FtsZ parmi ces dérivés, la chimiothèque de 1 625 composés bioactifs a été criblée par docking au sein de la poche allostérique de FtsZ.

Le premier criblage virtuel de la base de données PubChem a été réalisé par méthode stochastique utilisant l'algorithme Monte-Carlo. Celui-ci consiste à faire varier de manière aléatoire les angles de torsions et la position du ligand au sein de la poche, et de conserver les nouvelles valeurs si l'énergie d'interaction du nouveau complexe est plus faible²³⁰. Cette méthode a conduit à l'identification de **CV-3** (Figure 77) comme *hit* potentiel.

Etrangement, la bonne énergie d'interaction du complexe formé n'est pas causée par des liaisons hydrogène mais par de très nombreuses interactions hydrophobes entre le ligand et la protéine, en particulier au niveau du noyau chlorophényle et du furane. On peut cependant noter que l'oxygène de ce dernier est à 2,1 Å de l'hydroxyle de Thr309, ce qui pourrait éventuellement générer une liaison hydrogène.

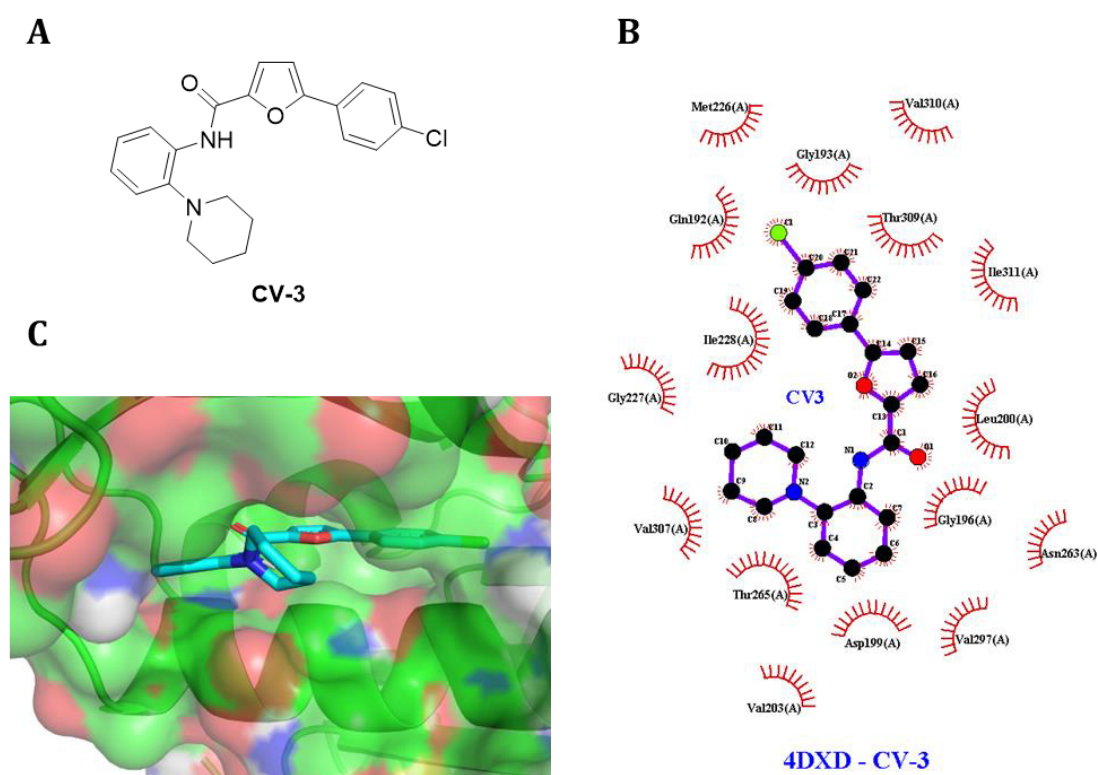


Figure 77 : Résultats du criblage virtuel de la chimiothèque PubChem par la méthode stochastique sur la poche allostérique de FtsZ (code PDB : 4DXD⁶¹). **A** : structure de **CV-3**, *hit* potentiel identifié. **B** : interactions réalisées entre **CV-3** et la protéine. **C** : Structure de **CV-3** au sein de la poche allostérique.

Le criblage virtuel par la méthode de complémentarité de forme a permis d'identifier **CV-4** (Figure 78) comme *hit* potentiel. Bien que neuvième en termes d'énergie d'interaction, **CV-4** a été choisi en raison de sa structure analogue avec le **PC190723**. De plus, le motif acylhydrazone porté par un noyau thiophène était présent à plusieurs reprises parmi les meilleurs résultats de docking. Comme on peut le voir sur la Figure 78, le noyau benzo[*b*]thiophène dichloré est inséré au sein de la partie hydrophobe de la poche allostérique. Des liaisons hydrogène entre le motif acylhydrazone et le résidu Thr309 ainsi qu'entre le pipéronyle et le résidu Gly205 complètent les interactions avec la protéine.

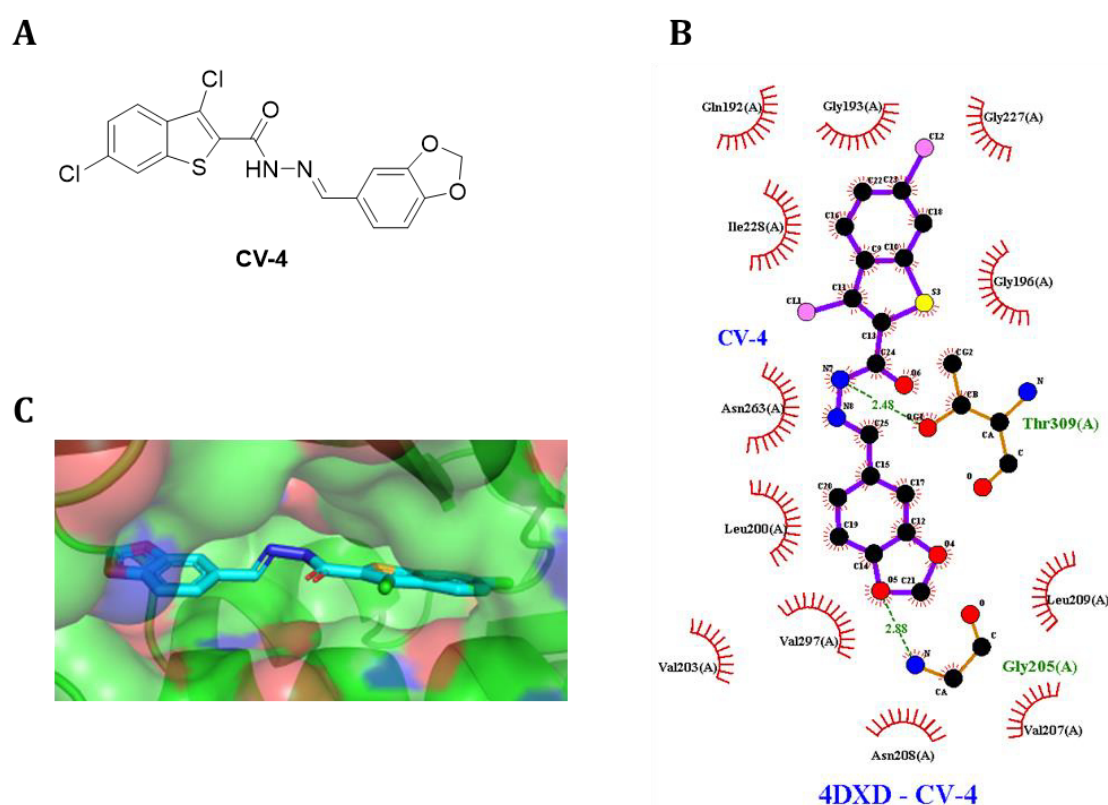
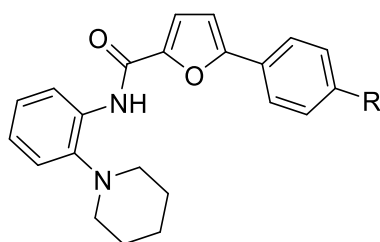


Figure 78 : Résultats du criblage virtuel de la chimiothèque PubChem par la méthode de complémentarité de forme sur la poche allostérique de FtsZ (code PDB : 4DXD⁶¹). **A** : structure de **CV-4**, *hit* potentiel identifié. **B** : Interactions réalisées entre **CV-4** et la protéine. **C** : Structure de **CV-4** au sein de la poche allostérique.

Suite aux criblages virtuels de la chimiothèque PubChem, deux séries d'analogues de **CV-3** (dérivés furaniques, série **XV**) et de **CV-4** (dérivés benzo[*b*]thiophènes, série **XVI**) ont été synthétisées et évaluées sur *S. aureus*.

2. Dérivés furanes (série XV)

Suite à l'identification de **CV-3** comme inhibiteur potentiel de FtsZ, ce dernier ainsi que plusieurs analogues ont été synthétisés et testés sous le nom de série **XV**, dont la structure générale est présentée sur la Figure 79.



Série XV

Figure 79 : Structure générale des dérivés furanes de la série XV.

2.1. Synthèse

La première voie de synthèse envisagée pour les dérivés de la série XV est décrite dans le Schéma 24. La stratégie consistait à synthétiser l'intermédiaire **48** par un couplage de Meerwein entre l'acide 2-furoïque et un sel de diazonium préparé *in situ* depuis l'aniline correspondante. Cependant, si la conversion de l'aniline était observée, le couplage n'a pas eu lieu, y compris en changeant de solvant (mélange acétone/eau 1:1), de catalyseur (CuCl_2) ou de stœchiométrie (deux équivalents d'aniline au lieu d'un).

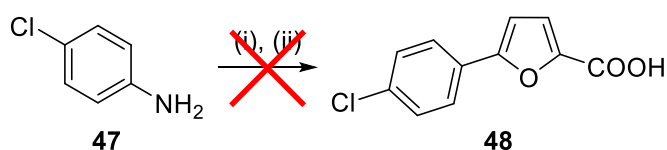


Schéma 24 : Voie de synthèse initialement envisagée pour l'intermédiaire **48**. Réactifs et conditions : (i) NaNO_2 , HCl , H_2O , 0°C , 5 min ; (ii) acide 2-furoïque, CAN , H_2O , t.a., 16 h.

Une alternative était alors de commencer par la formation de l'amide **50**, puis de réaliser le couplage (Schéma 25). Cependant, cette méthode n'a non plus conduit au composé **XV.a**.

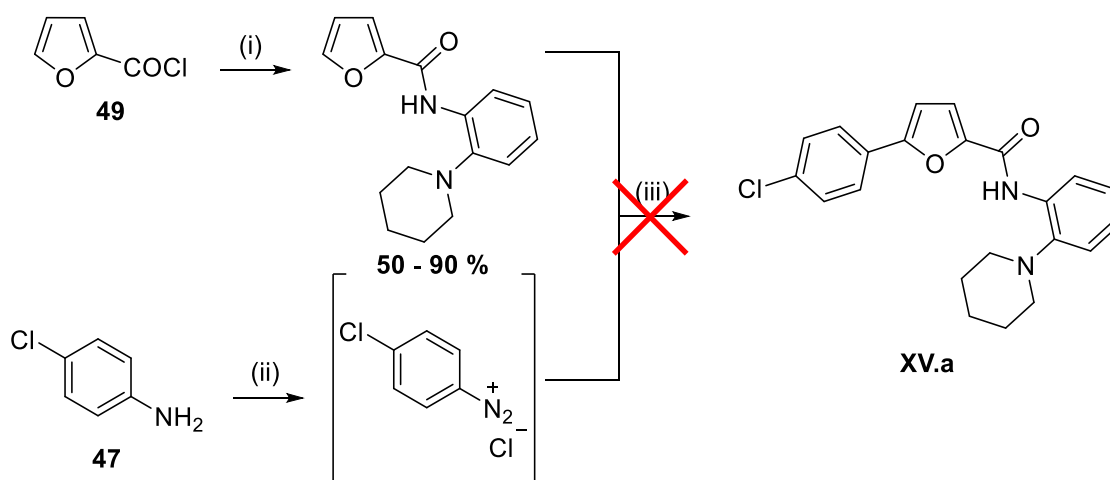


Schéma 25 : Deuxième voie de synthèse initialement envisagée pour le dérivé furane **XV.a**. Réactifs et conditions : (i) 2-(pipéridin-2-yl)aniline, Et_3N , DCM , t.a., 2 j ; (iii) NaNO_2 , HCl , H_2O , 0°C , 5 min ; (ii) CAN , H_2O , t.a., 16 h.

La voie de synthèse qui a permis d'obtenir les composés de la série **XV** est décrite dans le Schéma 26 ci-dessous. La 2-(pipéridin-2-yl)aniline a dans un premier temps été acylée par du chlorure de 5-bromofuroyle préparé *in situ* à partir d'acide 5-bromo-2-furoïque **51** et de chlorure d'oxalyle pour donner l'amide **52**. Ce dernier a ensuite été mis en présence de différents acides phénylboroniques pour donner par couplage de Suzuki les dérivés **XV.a** à **XV.g**¹⁹¹.

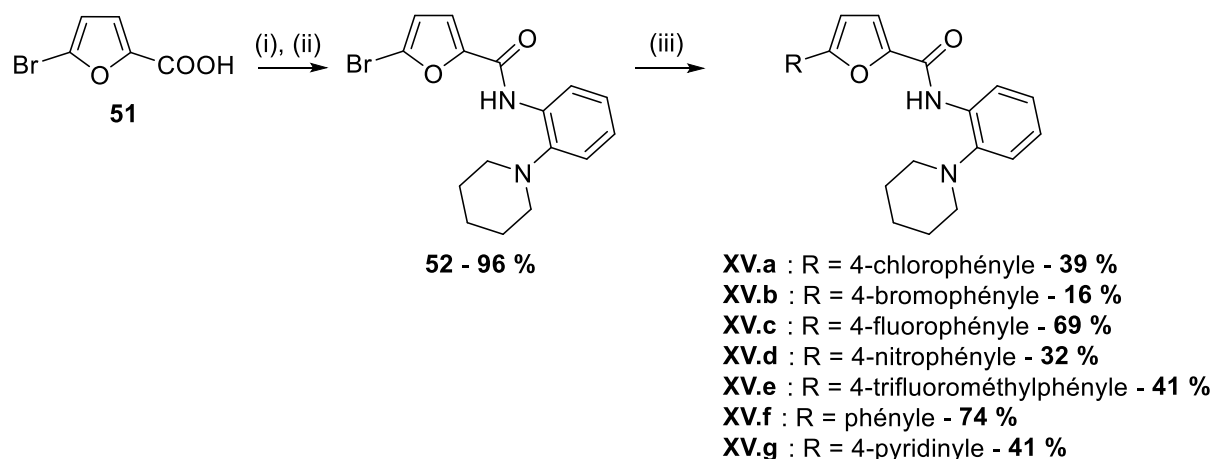


Schéma 26 : Synthèse des dérivés furanes de la série **XV**. Réactifs et conditions :
 (i) $(\text{COCl})_2$, DMF cat, DCM, 0 °C puis t.a., 1 h ; (ii) : 2-(pipéridin-2-yl)aniline, Et_3N , DCM, t.a., 16 h ; (iii) acide boronique, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, Na_2CO_3 , *i*-PrOH, H_2O , 80 °C, 4 h.

Le faible rendement pour le composé **XV.b** est expliqué par la présence du brome sur la molécule finale. En effet, un deuxième couplage de Suzuki pouvait avoir lieu, conduisant au dérivé **XV.b'** comme montré par spectrométrie de masse (Figure 80). Les produits, de polarités très proches, ont pu être isolés par chromatographie sur couche mince préparative.

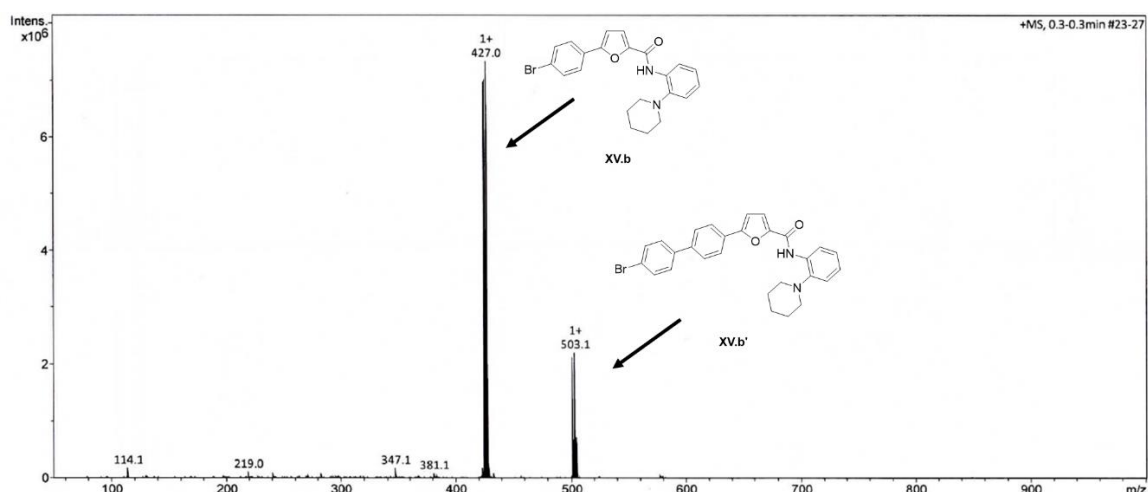


Figure 80 : Spectre de masse du composé **XV.b** après purification par colonne de chromatographie.

L'analyse du spectre RMN ^1H de **XV.a** montre que le produit identifié par docking a bien été obtenu. Comme on peut le voir sur la Figure 81, on retrouve tout d'abord les

quatre protons du motif 4-chlorophényle (H2'' et H3''). On voit également les deux doublets H3 et H4 du furane avec une constante de couplage de 3,6 Hz. Les dix protons du motif pipéridinyle sont également présents entre 2,84 et 1,56 ppm.

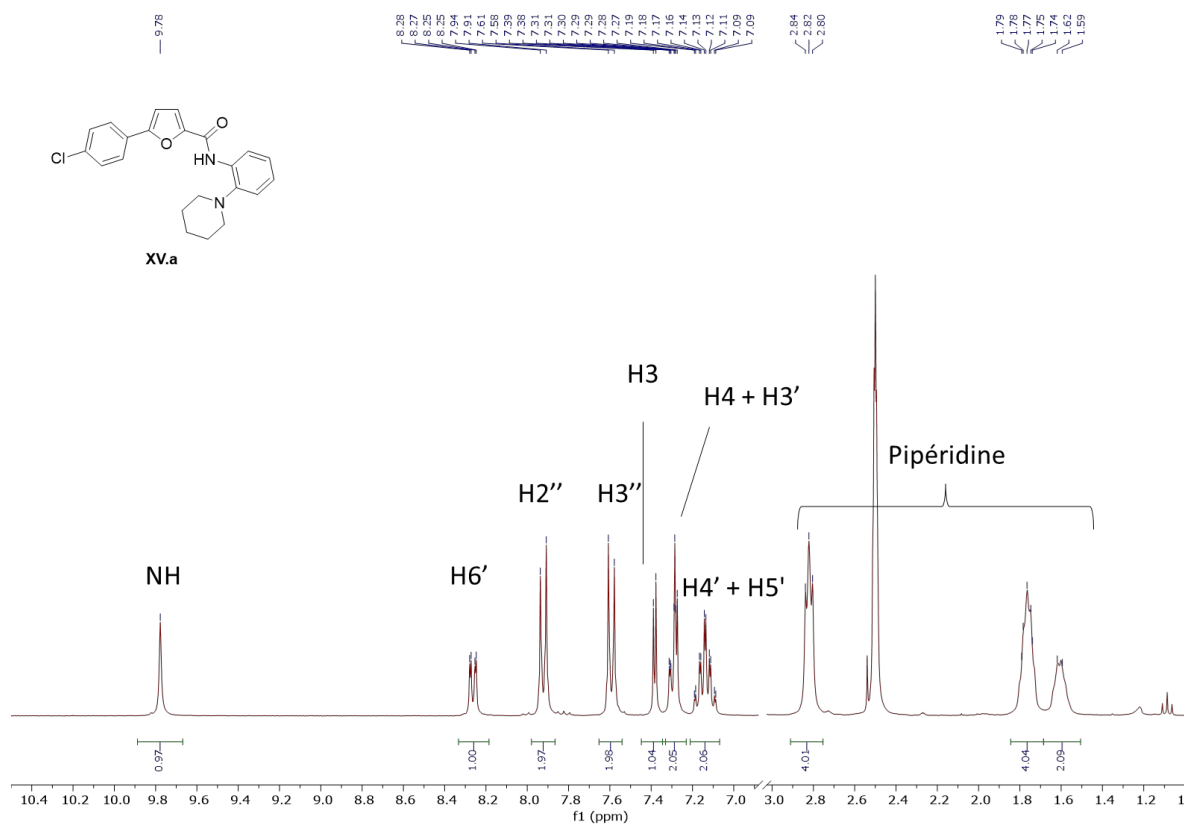


Figure 81 : Spectre RMN ^1H du composé **XV.a**.

Les sept composés issus de la série **XV** ont été obtenus et leurs structures sont décrites en Figure 82 ci-contre.

2.2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

Les concentrations minimales inhibitrices des sept dérivés furanes de la série **XV** ont été évaluées contre *S. aureus* et sont présentées dans le Tableau 8. Aucun des produits n'ayant montré d'activité antibactérienne à des concentrations inférieures ou égales à 256 $\mu\text{g/mL}$, le développement de cette série n'a pas été poursuivi.

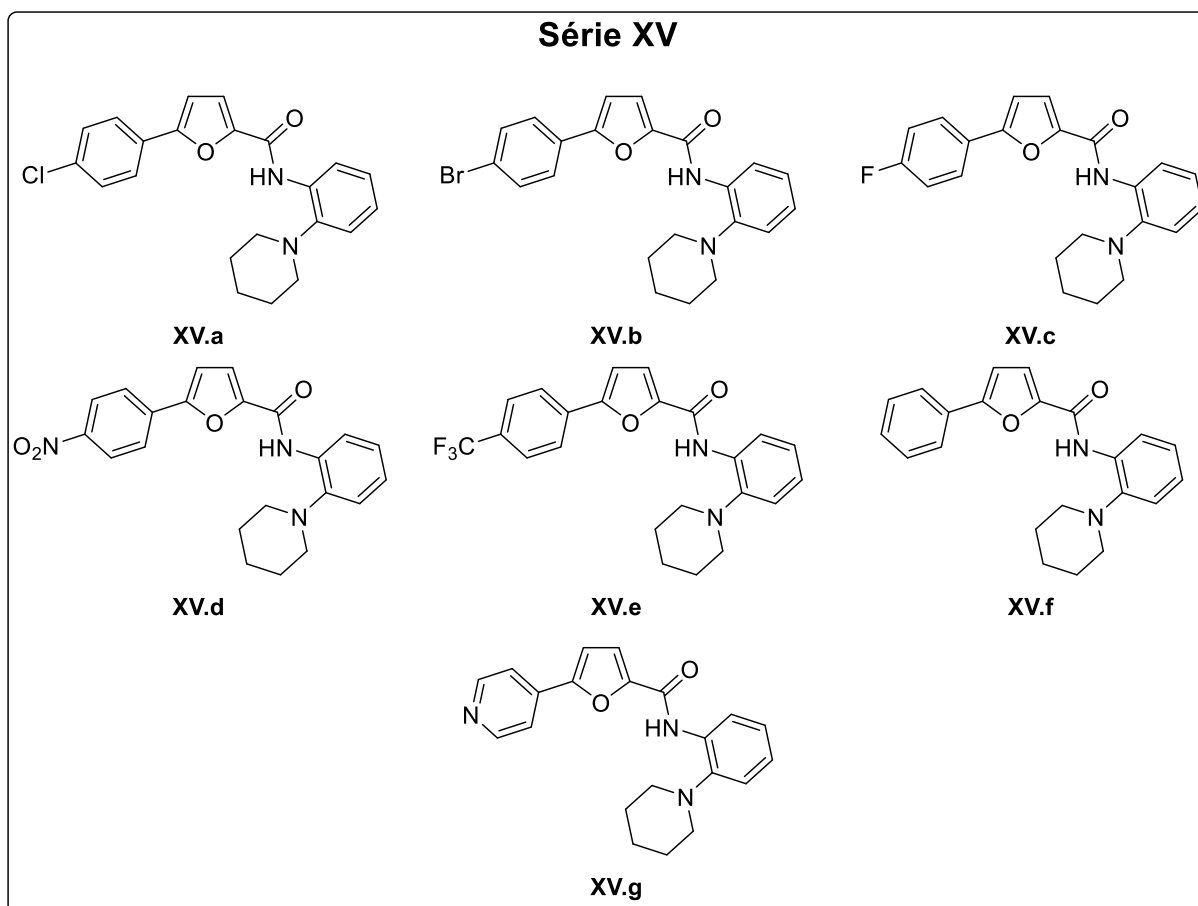
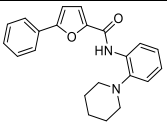
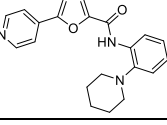


Figure 82 : Structures des produits de la série **XV**.

Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **XV** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XV.a	> 256	> 256	> 256
	XV.b	> 256	> 256	> 256
	XV.c	> 256	> 256	> 256
	XV.d	> 256	> 256	> 256
	XV.e	> 256	> 256	> 256

	XV.f	> 256	> 256	> 256
	XV.g	> 256	> 256	> 256
PC190723		0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

3. Dérivés benzo[*b*]thiophènes (série XVI)

Le composé benzo[*b*]thiophène **CV-4** ayant été identifié par criblage virtuel comme étant un ligand potentiel de FtsZ, des analogues de cette molécule ont été synthétisés. Des dérivés non-halogénés ont dans un premier temps été développés (série XVI, Figure 83), car l'acide benzo[*b*]thiophène-2-carboxylique est commercial et permettait ainsi d'accéder rapidement à une grande variété de dérivés en modulant le noyau aromatique lié à l'hydrazone.

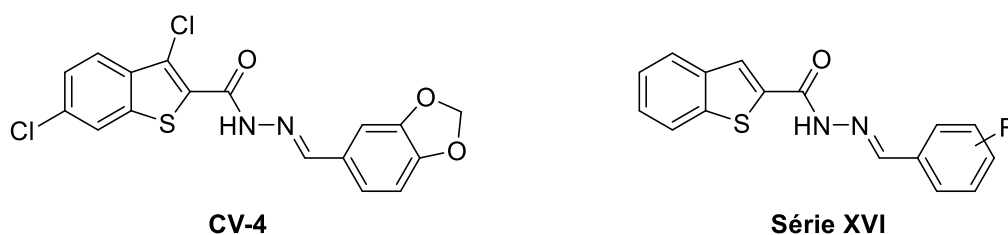


Figure 83 : Structures de **CV-4** et des dérivés benzo[*b*]thiophènes de la série XVI.

3.1. Synthèse

La voie de synthèse des dérivés de la série XVI est décrite dans le Schéma 27. Dans un premier temps, l'acide benzo[*b*]thiophène-2-carboxylique **53a** a été converti en hydrazide en présence d'hydrazine protégée et de DCC comme agent de couplage, comme fait précédemment lors de la synthèse des 1,3,4-oxadiazoles. Cette méthode a été préférée à la substitution du benzo[*b*]thiophène-2-carboxylate de méthyle par de l'hydrazine, qui conduit à un mélange de produits difficiles à purifier²³¹. L'intermédiaire **54a** a ensuite été déprotégé en présence de TFA puis directement condensé avec différents aldéhydes aromatiques à reflux dans le méthanol pour conduire aux acylhydrazones de la série XVI, isolées par simple filtration. Dans le cas des dérivés pyridinyles comme **XVI.c**, un lavage basique de l'intermédiaire hydrazide suivi d'une extraction à l'acétate d'éthyle était nécessaire avant la réaction avec l'aldéhyde.

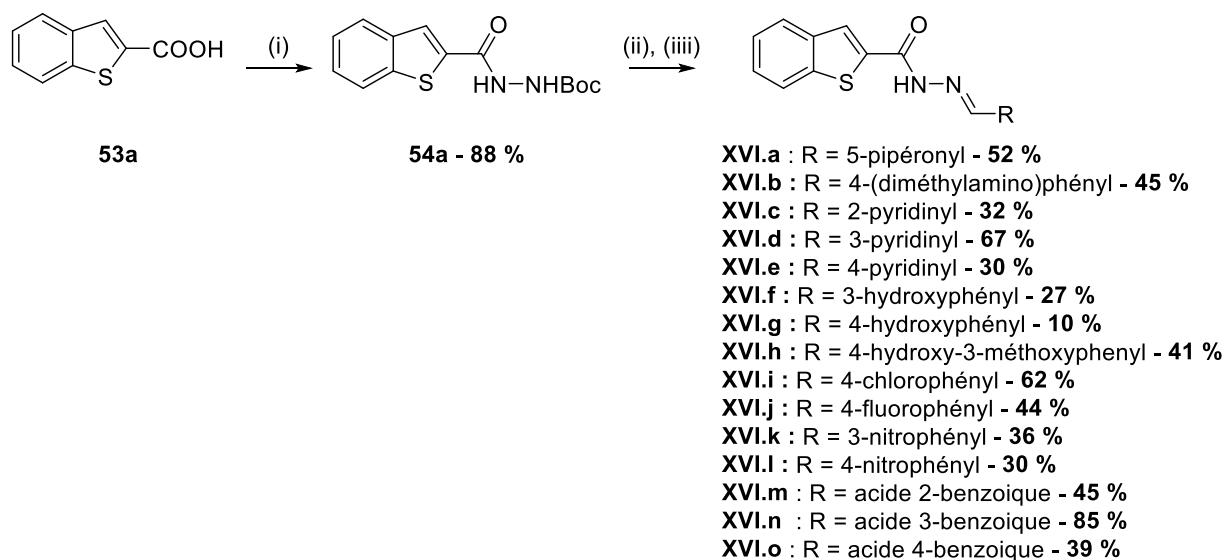


Schéma 27 : Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes de la série **XV**. Réactifs et conditions : (i) H₂N-NHBoc, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h ; (ii) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (iii) aldéhyde, MeOH, reflux, 2 h.

L'analyse structurale des produits finaux a montré la présence d'isomères pour chacun des composés formés, caractérisée par le dédoublement des signaux sur les spectres RMN ¹H et ¹³C. En théorie, chacune des molécules pourrait présenter quatre isomères, dus aux isoméries (*Z*)/(*E*) et *s-cis*/*s-trans*. Cependant, seuls les isomères (*E*) plus stables sont formés en raisons des contraintes stériques et dans ces conditions thermodynamiques (Figure 84), et les isomères *s-cis*- et *s-trans*- sont visibles en RMN ¹H²³²⁻²³⁴.

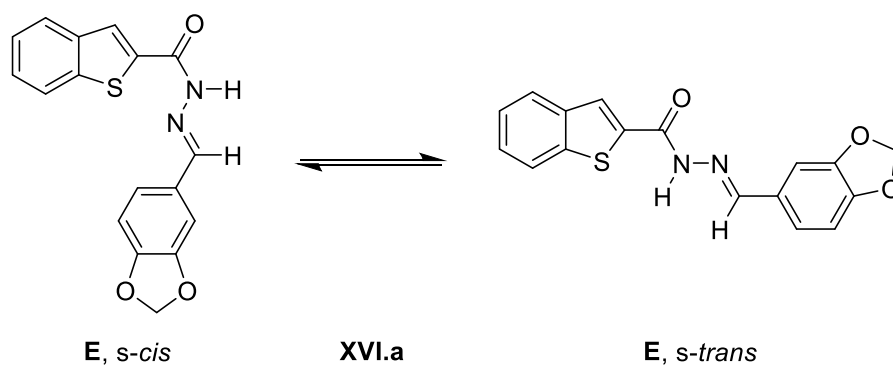


Figure 84 : Isomères *s-cis* et *s-trans* du composé **XVI.a**.

Pour démontrer la présence de rotamères dans le cas du dérivé pipéronyle **XVI.a**, la température d'analyse RMN a été augmentée progressivement et un phénomène de coalescence a été observé à partir de 330 K (Figure 85).

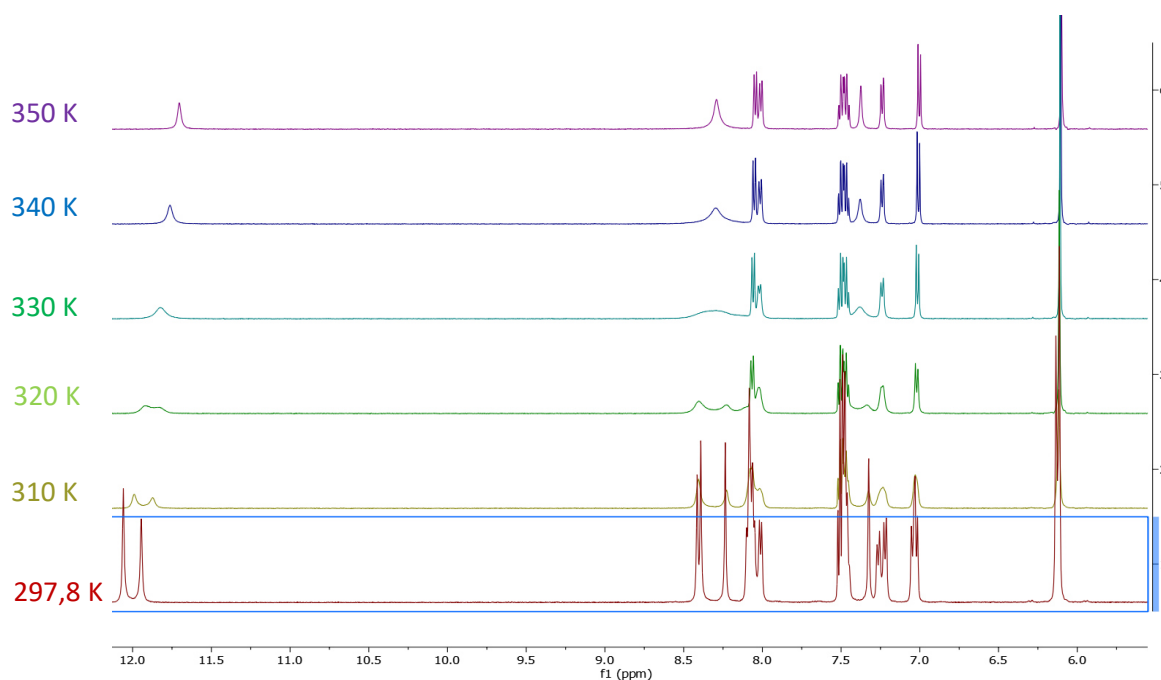


Figure 85 : Spectres RMN ^1H de **XVI.a** à différentes températures.

La synthèse des produits de la série **XVI**, dont les structures sont décrites en Figure 86 ci-contre, a été réalisée par Jérémie Magand dans le cadre de son stage de M2 en 2019.

3.2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

L'évaluation des concentrations minimales inhibitrices des dérivés benzo[*b*]thiophènes contre *S. aureus* a été menée et les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

Au sein de cette série, les deux produits les plus actifs sont les dérivés pipéronyle **XVI.a**, avec une CMI variant de 16 à 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selon la souche, et 2-pyridinyle **XVI.c** qui possède une CMI de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre les trois souches de *S. aureus* testées. Il est intéressant de noter que l'azote en position 2 est important, dans la mesure où les analogues 3- et 4-pyridinyle (**XVI.d** et **XVI.e**) n'ont pas montré d'activité. On peut également noter une légère activité antibactérienne des composés **XVI.i** et **XVI.l**, tous deux substitués en position 4 du phényle, tandis que le reste de la série n'a pas inhibé la croissance des bactéries.

L'évaluation de la CMI des produits de la série **XVI** a été réalisée par Alexia Barbry dans le cadre de son stage de M2 en 2019.

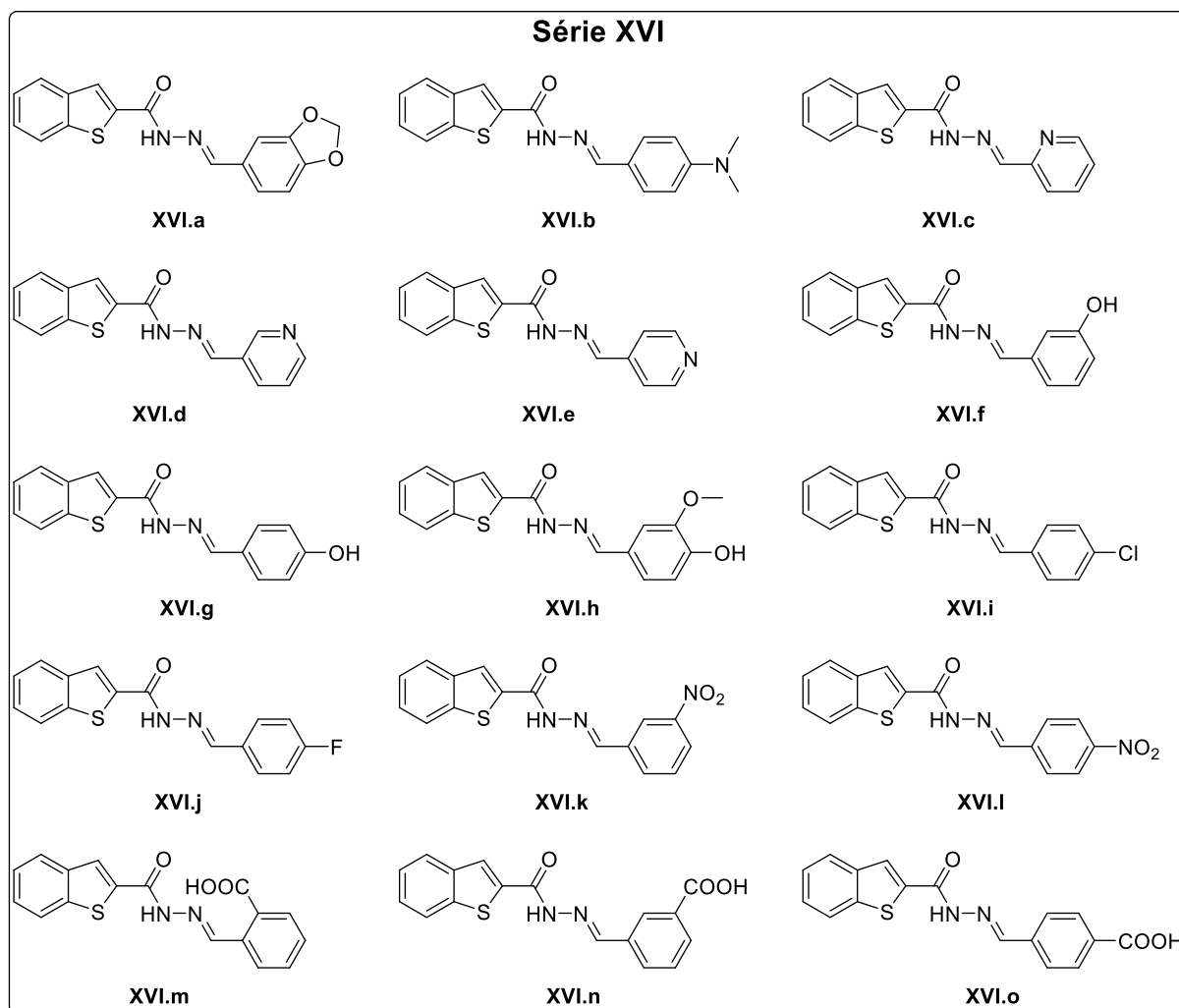
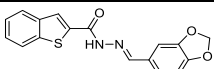
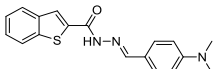
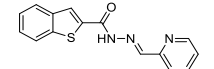
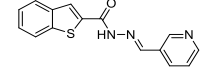
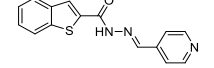
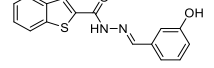
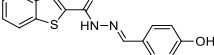


Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **XVI** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	cLogP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
			ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XVI.a	4,20	32	64	16
	XVI.b	4,41	> 256	> 256	> 256
	XVI.c	3,13	16	16	16
	XVI.d	3,07	> 256	> 256	> 256
	XVI.e	3,02	> 256	> 256	> 256
	XVI.f	3,80	> 256	> 256	ND
	XVI.g	3,83	> 256	> 256	> 256

	XVI.h	3,64	> 256	> 256	> 256
	XVI.i	4,98	128	128	128
	XVI.j	4,47	> 256	> 256	128
	XVI.k	4,24	> 256	> 256	ND
	XVI.l	4,26	64	64	32
	XVI.m	3,83	256	> 256	> 256
	XVI.n	4,19	> 256	> 256	256
	XVI.o	4,22	> 256	> 256	256
PC190723			0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la métilcilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la métilcilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD) ; ND : non-déterminé

3.3. Diversifications structurales basées sur **XVI.a** et **XVI.c** (série **XVII**)

Suite aux activités antibactériennes prometteuses montrées par les dérivés benzo[*b*]thiophènes **XVI.a** et **XVI.c**, ces derniers ont été choisis pour être la cible de modifications structurales supplémentaires. Afin de se rapprocher de la structure du *hit* **CV-4** et du **PC190723**, des analogues 6-chloro- et 6-fluorobenzo[*b*]thiophènes ont été synthétisés (dérivés **XVII.a** à **XVII.d**, Figure 87). La conjugaison globale de la molécule et la libre rotation du groupement pyridinyle ont également été étudiées *via* la réduction de l'imine du composé le plus actif **XVI.c**, conduisant au composé **XVII.e**.

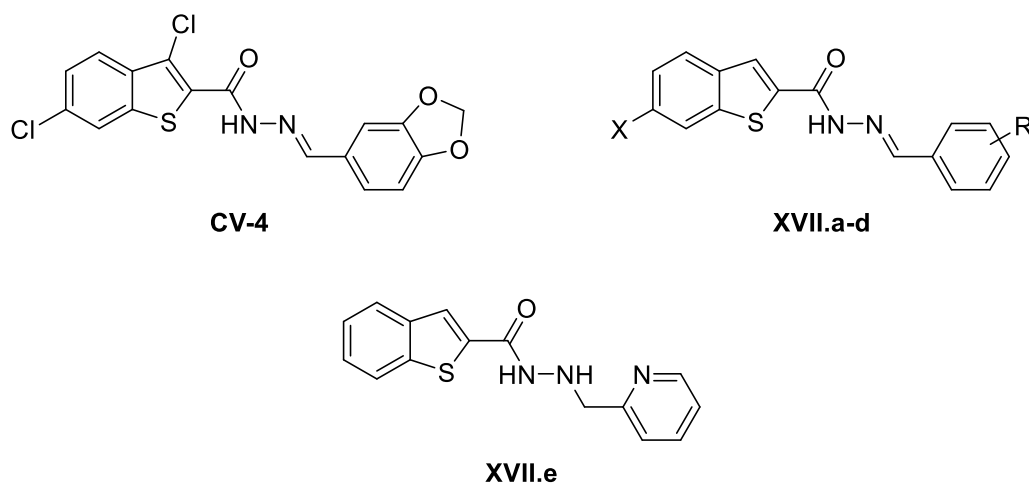


Figure 87 : Structures du *hit* **CV-4**, des dérivés halogénés **XVII.a-d** et du dérivé réduit **XVII.e**.

3.3.1. Synthèse

La synthèse des dérivés 6-halogénobenzo[*b*]thiophènes de la série **XVII** est décrite dans le Schéma 28. Comme pour les acylhydrazones de la série **XVI**, il était nécessaire d'avoir dans un premier temps les acides 6-halogénobenzo[*b*]thiophène-2-carboxyliques **53**. Ces derniers ont été obtenus par substitution nucléophile du 2-fluoro-4-halogénobenzaldéhyde par du thioglycolate d'éthyle, suivie par une cyclisation intramoléculaire et la saponification des esters **56**^{235,236}. Les étapes suivantes étaient les mêmes que pour les composés de la série **XVI** et on conduit aux quatre dérivés halogénés **XVII.a-d**.

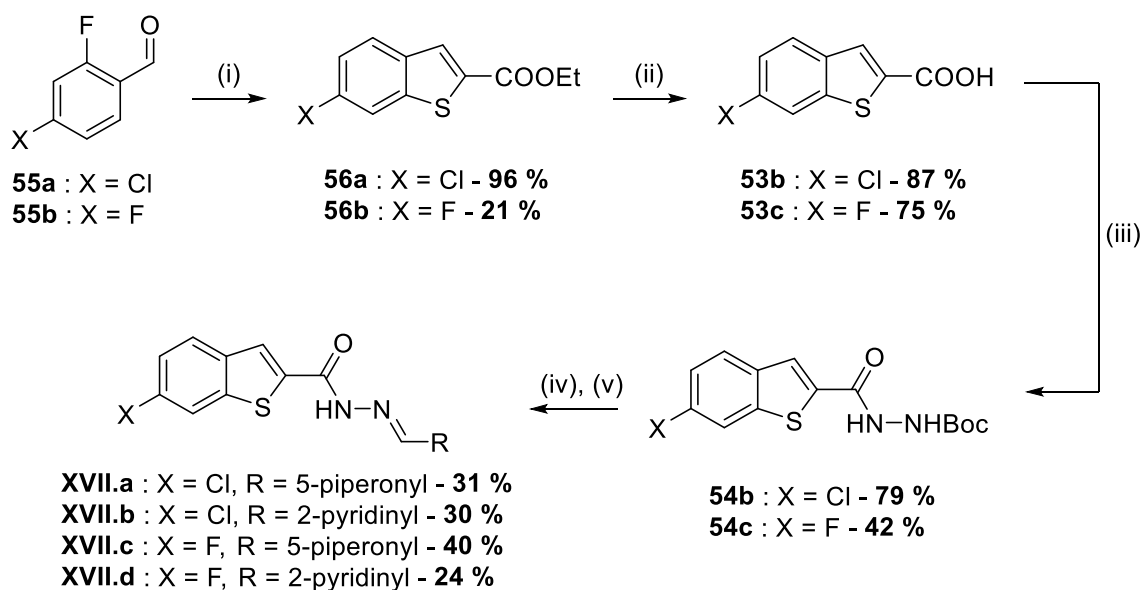


Schéma 28 : Synthèse des 6-halogénobenzo[*b*]thiophènes de la série **XVII**.

Réactifs et conditions : (i) thioglycolate d'éthyle, Et₃N, DMSO, 80 °C, 2 h puis t.a., 16 h ; (ii) NaOH, H₂O, EtOH, t.a., 16 h ; (iii) H₂N-NHBoc, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h ; (iv) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (v) aldéhyde, MeOH, reflux, 2 h.

Par ailleurs, la réduction de l'hydrazone **XVI.c** en présence de palladium sur charbon sous atmosphère de dihydrogène a permis de conduire au composé **XVII.e** avec un rendement de 60 % (Schéma 29)²³⁷.

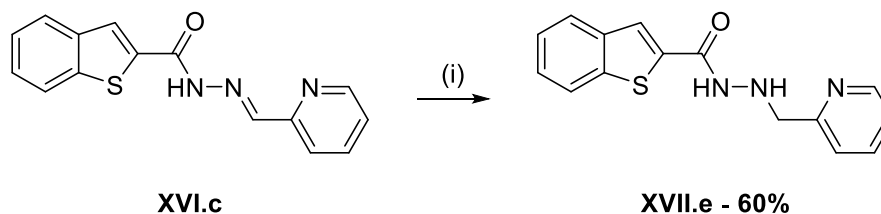


Schéma 29 : Synthèse du dérivé réduit **XVII.e**. Réactifs et conditions : (i) H₂, Pd/C, MeOH, AcOEt, t.a., 7 h.

Les structures des cinq composés de la série **XVII** sont résumées dans la Figure 88 ci-après.

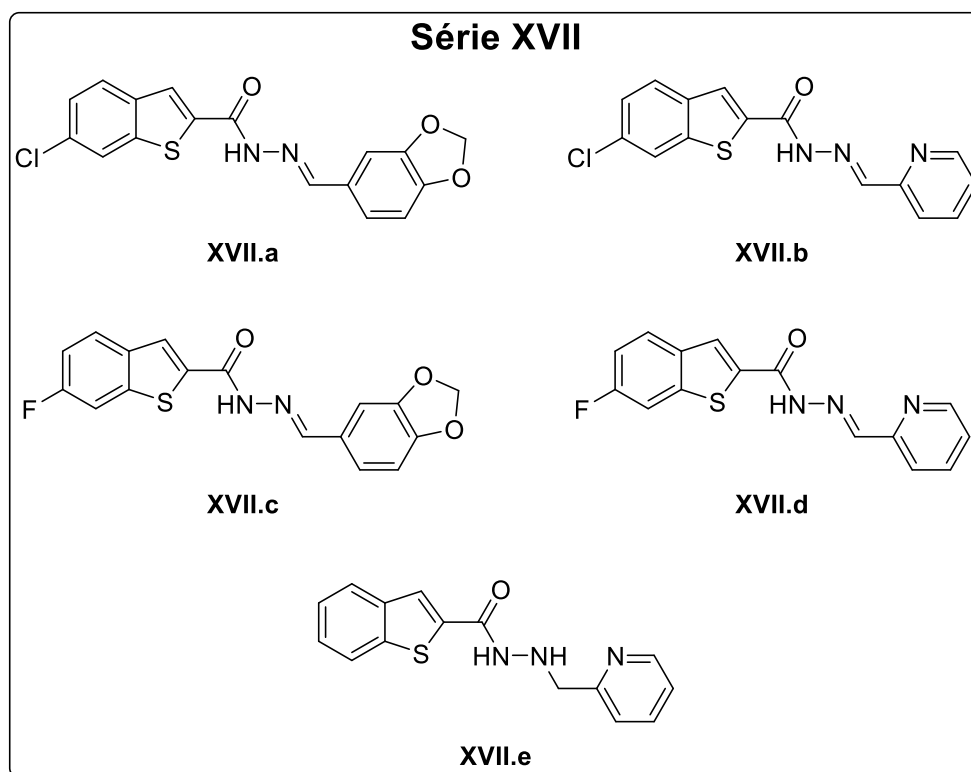
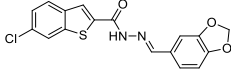
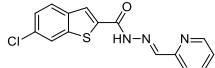
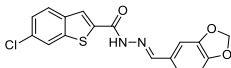
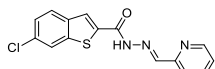
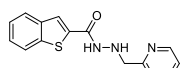


Figure 88 : Structures des composés de la série **XVII**.

3.3.2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

L'activité antibactérienne des cinq nouveaux produits de la série **XVII** a été évaluée et les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **XVII** contre trois souches de *S. aureus*.

Structure	Référence	cLogP	CMI (µg/mL)		
			ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XVII.a	4,85	> 256	> 256	> 256
	XVII.b	3,79	4	4	4
	XVII.c	4,33	> 256	> 256	> 256
	XVII.d	3,27	32	16	16
	XVII.e	2,33	64	64	64
PC190723			0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

Le dérivé pyridinyle chloré **XVII.b** possède une CMI de 4 µg/mL contre *S. aureus*, soit quatre fois moindre que son analogue non-halogéné **XVI.c**. En revanche, la présence d'un atome de fluor sur le dérivé pyridinyle **XVII.d** n'a pas changé la CMI. Les deux pipéronyles halogénés dérivés de **XVI.a** n'ont pas montré d'activité aux concentrations testées, et l'analogue réduit **XVII.e** a une CMI de 64 µg/mL, soit quatre fois plus importante que pour l'acylhydrazone de départ **XVI.c**. Ces résultats suggèrent que l'absence de libre rotation du motif pyridine et la conjugaison globale de la molécule soient importants pour l'activité de la molécule. On peut également noter que cette réduction a un impact sur l'hydrophobicité du composé, le réduisant de 3,13 pour **XVI.c** à 2,33 pour **XVII.e**.

3.4. Diversifications structurales basées sur **XVII.b** (série **XVIII**)

Le composé **XVII.b** ayant une bonne activité anti-staphylococcique, une nouvelle série d'analogues a été synthétisée (Figure 89). Tout d'abord, la taille du cycle porté par l'hydrazone a été réduite, en remplaçant le motif 2-pyridinyle par trois cycles à cinq chaînons (**XVIII.a-c**). Deux modifications structurales ont également été faites sur la fonction acylhydrazone. D'une part, un dérivé acyloxime (**XVIII.d**) a été synthétisé, ce dernier étant plus flexible et n'ayant plus d'isomérisation *s-cis/s-trans* par rapport son analogue acylhydrazone. D'autre part, la longueur de la chaîne a été réduite en remplaçant la fonction par un simple méthylène (**XVIII.e-g**). Enfin, deux modifications sur le noyau benzo[*b*]thiophène ont été testées, à savoir le remplacement du chlore par un motif groupement trifluorométhyle (**XVIII.h**) et du benzo[*b*]thiophène par un noyau benzofurane moins hydrophobe (**XVIII.i**).

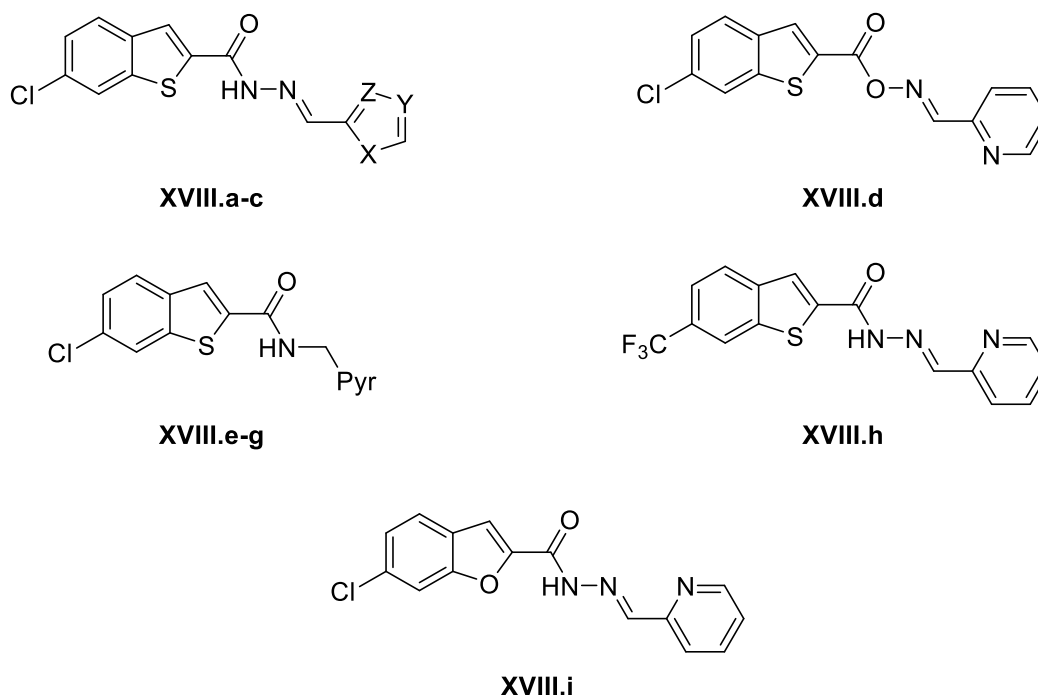


Figure 89 : Structures des dérivés de la série **XVIII**.

3.4.1. Synthèse

La synthèse des dérivés **XVIII.a-c** est la même que celle des acylhydrazones des séries **XVI** et **XVII**. Les produits ont été obtenus en deux étapes depuis l'hydrazide **54b** par déprotection au TFA suivi de la condensation avec les différents aldéhydes (Schéma 30).

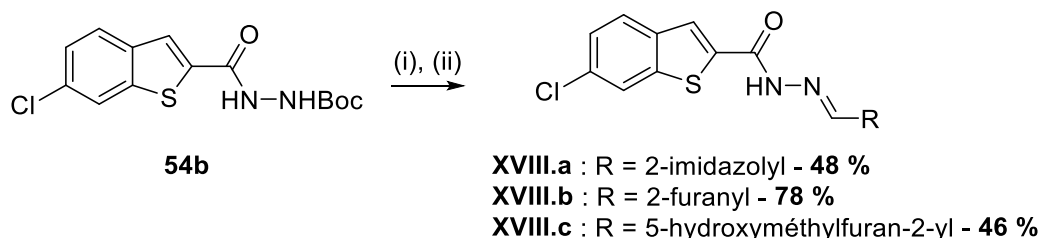


Schéma 30 : Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes **XVIII.a-c**. Réactifs et conditions :
 (i) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (ii) aldéhyde, MeOH, reflux, 2 h.

L'obtention de l'acyloxime **XVIII.d** est décrite dans le Schéma 31. Dans un premier temps, l'oxime **58** a été obtenue depuis le pyridine-2-carboxaldéhyde **57** tel que décrit dans la littérature²³⁸. Cet intermédiaire a ensuite été acylé par l'acide 6-chlorobenzo[*b*]thiophène-2-carboxylique **53b** pour obtenir le produit désiré.

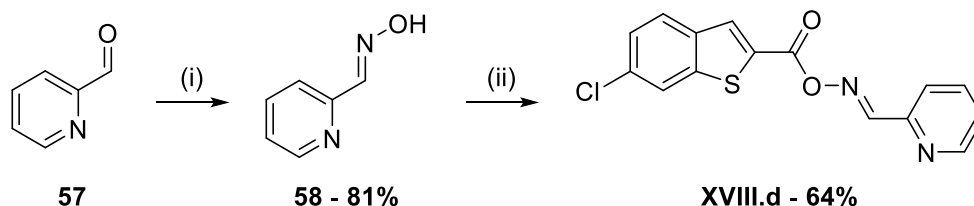


Schéma 31 : Synthèse du dérivé benzo[*b*]thiophène acyloxime **XVIII.d**. Réactifs et conditions :
 (i) HO-NH₂·HCl, NaHCO₃, H₂O, 65 °C, 3 h ; (ii) **53b**, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h.

A la différence des acylhydrazones synthétisées jusqu'à présent, l'acyloxime **XVIII.d** ne présente pas d'isomérisie *s-cis/s-trans*. Au niveau des spectres RMN, cela se traduit par le fait que les pics ne soient pas dédoublés et que l'attribution est désormais possible. Comme on peut le voir sur la Figure 90, on retrouve donc les protons du benzo[*b*]thiophène (H3, H4 et H7, ainsi que H5 au sein d'un multiplet), les quatre protons du noyau pyridine (H3', H4', H5' et H6') et enfin le CH de l'oxime à 8,86 ppm.

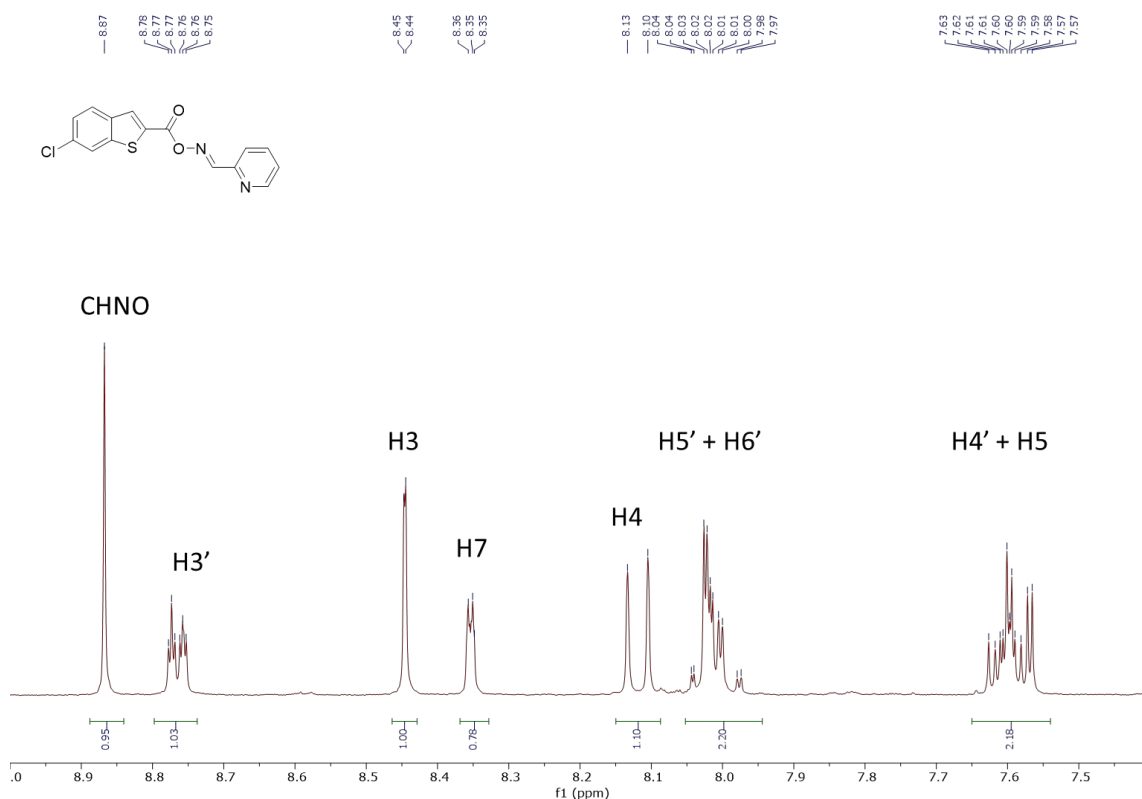


Figure 90 : Spectre RMN ^1H du composé XVIII.d.

L'acylation par l'acide 6-chlorobenzo[*b*]thiophène-2-carboxylique **53b** de 2-, 3- et 4-picolylamine a également permis d'obtenir les dérivés XVIII.e-g comme montré sur le Schéma 32.

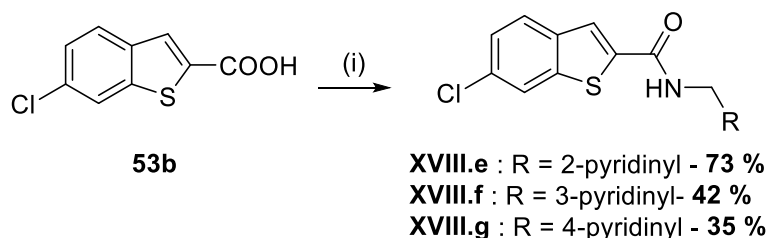


Schéma 32 : Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes amides XVIII.e-g. Réactifs et conditions : (i) picolylamine, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h.

Le dérivé trifluorométhyle XVIII.h a été obtenu de manière similaire aux dérivés halogénés, tel que montré sur le Schéma 33²³⁶. Le noyau benzo[*b*]thiophène a dans un premier temps été formé à partir de 2-fluoro-4-(trifluorométhyl)benzaldéhyde et de thioglycolate d'éthyle pour conduire à l'ester **56c**, qui a ensuite été saponifié en acide **53d**. Les étapes successives d'acylation (iii), de déprotection (iv) et de condensation avec la pyridine-2-carboxaldéhyde (v) ont permis d'obtenir le produit final XVIII.h.

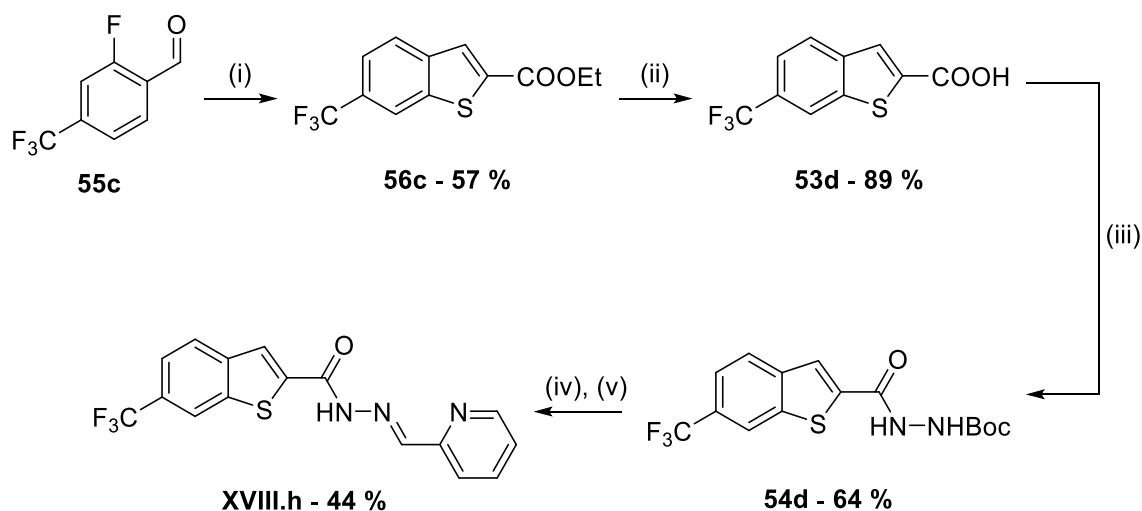


Schéma 33 : Synthèse du dérivé 6-trifluorométhylbenzo[*b*]thiophène **XVIII.h**. Réactifs et conditions : (i) thioglycolate d'éthyle, K_2CO_3 , DMF, 60 °C, 2 h ; (ii) NaOH, H_2O , EtOH, t.a., 16 h ; (iii) $H_2N-NHBoc$, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h ; (iv) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (v) pyridine-2-carboxaldéhyde, MeOH, reflux, 2 h.

Enfin, le dérivé benzofurane **XVIII.i** a été obtenu tel que montré sur le Schéma 34. Tout d'abord, le 4-chlorosalicylaldéhyde a été converti en ester **56d** à l'aide de bromomalonate de diéthyle, tel que décrit dans la littérature²³⁹. Les quatre étapes suivantes, identiques à la synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes, ont alors permis de conduire au produit final **XVIII.i**.

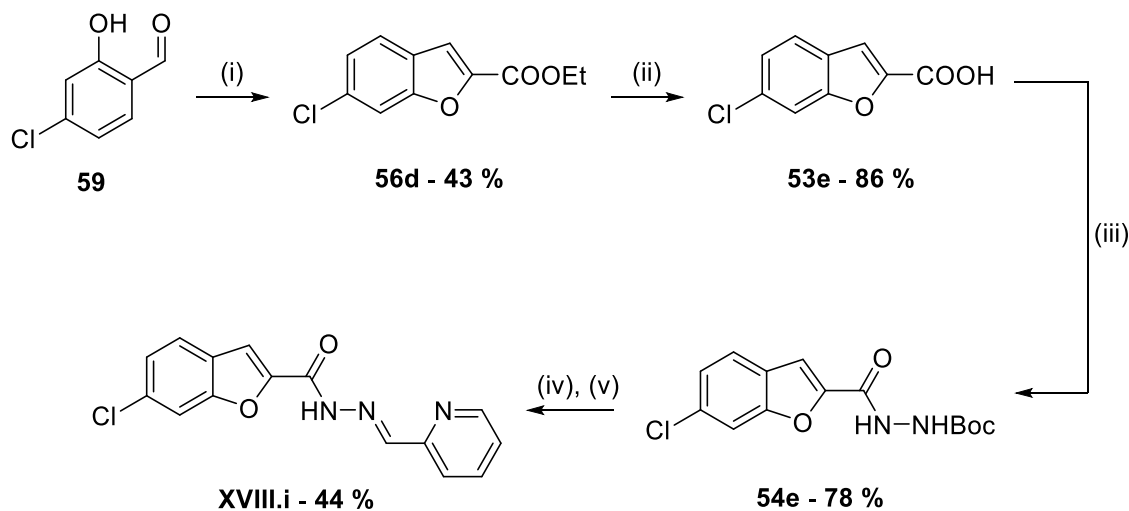
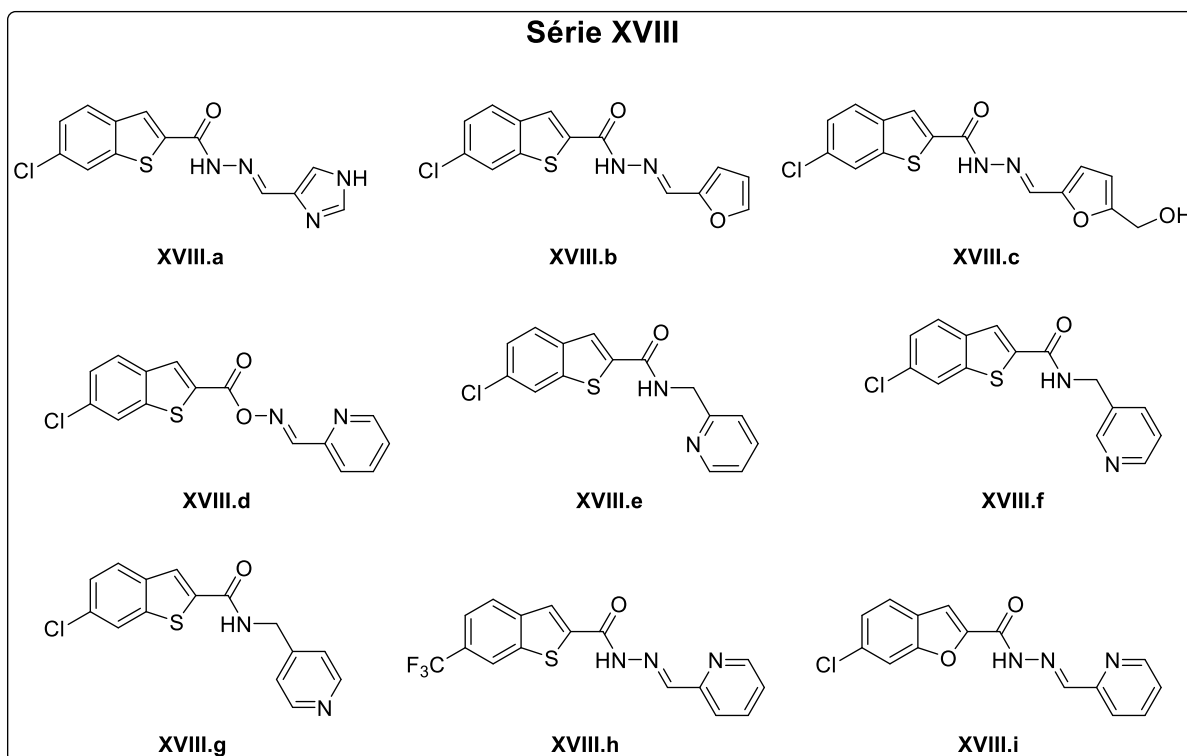


Schéma 34 : Synthèse du dérivé benzofurane **XVIII.i**. Réactifs et conditions : (i) bromomalonate de diéthyle, K_2CO_3 , butan-2-one, 90 °C, 7 h puis t.a., 16 h ; (ii) NaOH, H_2O , EtOH, t.a., 16 h ; (iii) $H_2N-NHBoc$, DCC, DMAP, DCM, 0 °C puis t.a., 24 h ; (iv) TFA, DCM, t.a., 16 h ; (v) pyridine-2-carboxaldéhyde, MeOH, reflux, 2 h.

Les neuf produits de la série **XVIII** ont été obtenus et leurs structures sont rappelées dans la Figure 91.

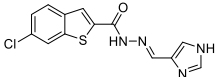
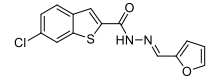
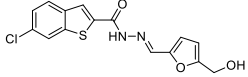
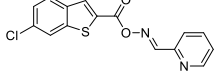
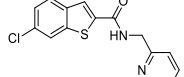
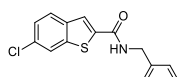
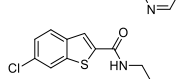
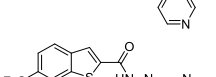
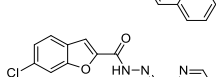


3.4.2. Evaluation biologique sur *S. aureus*

Les concentrations minimales inhibitrices des dérivés de la série **XVIII** sont présentées dans le Tableau 11 ci-après.

Le noyau 2-pyridine reste le pharmacophore le plus actif, les cycles imidazole, furane et 5-hydroxyméthylfuran conduisant à une perte partielle ou totale de l'activité antibactérienne. La rigidité imposée par le motif acylhydrazone est également primordiale, comme le montre l'absence d'activité du dérivé acyloxime **XVIII.d**. La réduction de la taille de la chaîne a également conduit à la perte de l'activité antibactérienne pour les composés **XVIII.e-g**. Le remplacement du chlore par un groupement trifluorométhyle conduit à des CMI intéressantes mais plus élevées que pour **XVII.b**. Enfin, le dérivé benzofurane **XVIII.i** a des CMI supérieures ou égales à 128 µg/mL, montrant ainsi que l'hydrophobicité du noyau benzo[*b*]thiophène est importante pour l'activité.

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de la série **XVIII** contre trois souches de *S. aureus*.

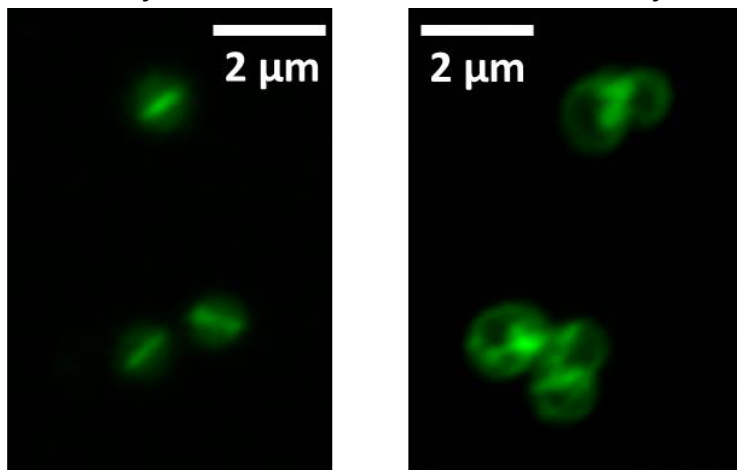
Structure	Référence	cLogP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
			ATCC 29213 ^a	SF8300 ^b	ST20171643 ^c
	XVIII.a	3,19	256	64	64
	XVIII.b	4,22	> 256	256	256
	XVIII.c	3,79	> 256	256	256
	XVIII.d	3,89	> 256	> 256	> 256
	XVIII.e	3,22	> 256	> 256	> 256
	XVIII.f	3,15	> 256	> 256	> 256
	XVIII.g	3,10	> 256	> 256	> 256
	XVIII.h	4,01	32	8	16
	XVIII.i	3,15	> 256	256	128
PC190723			0,5	0,5	0,5

^a : *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) ; ^b : *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ; ^c : *S. aureus* résistant à la daptomycine (SARD)

3.5. Etude du mode d'action de **XVII.b** par microscopie à fluorescence

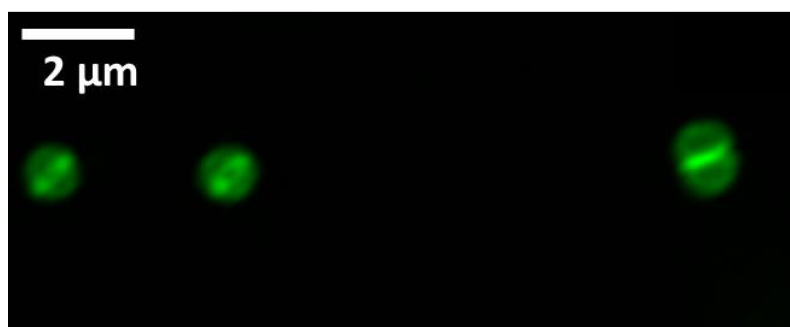
Suite à plusieurs étapes de diversification structurales, le composé **XVII.b** s'est révélé être le benzo[*b*]thiophène le plus actif des séries **XVI**, **XVII** et **XVIII** avec une CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ contre les trois souches de *S. aureus* testées. Son mode d'action a donc été étudié. Sachant que sa structure est analogue de **CV-4**, identifié comme inhibiteur potentiel de FtsZ, l'action de **XVII.b** sur le divisome bactérien a été évaluée comme précédemment. Les bactéries ont donc été incubées en présence du dérivé benzo[*b*]thiophène à la concentration de 4 $\mu\text{g/mL}$, leur paroi marquée par fluorescence

via le conjugué vancomycine-BODIPY et elles ont été analysées par microscopie à



Témoin négatif

Témoin positif
PC190723 (2 µg/mL)



XVII.b (4 µg/mL)

fluorescence (Figure 92).

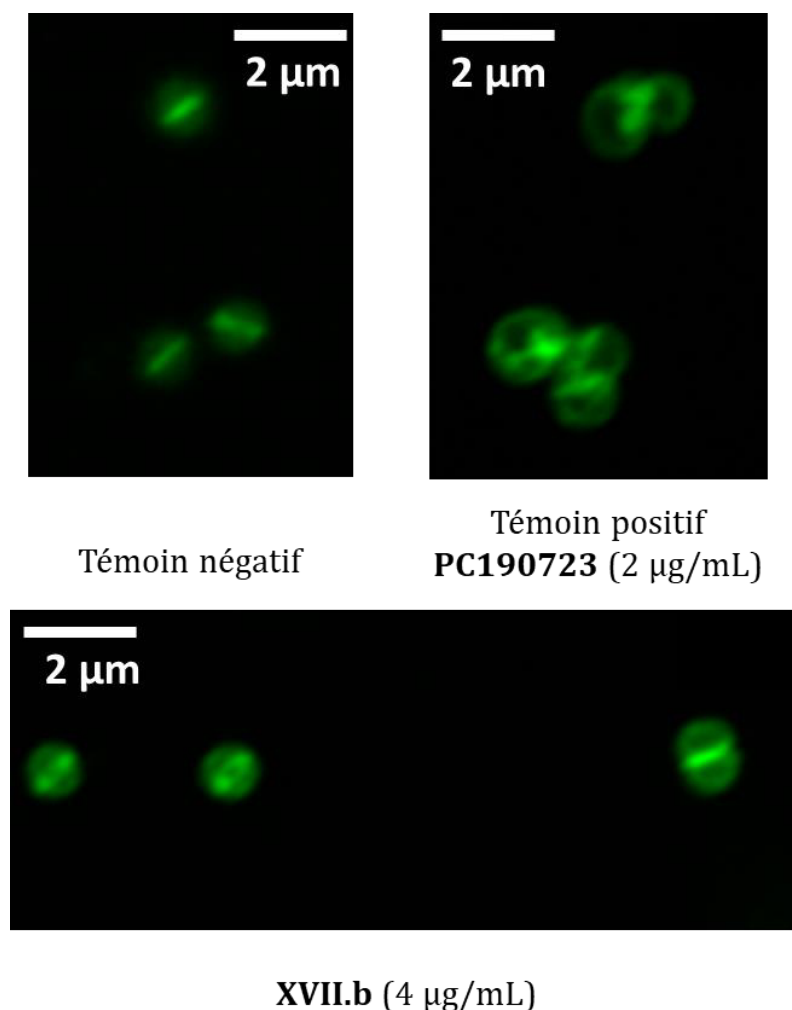


Figure 92 : Image de microscopie à fluorescence de *S. aureus* (souche ATCC 29213) marquées par un conjugué vancomycine-BODIPY en présence ou en absence de composé antimicrobien (PC190723 et XVII.b).

Comme on peut le voir, il n’y a pas de différence de morphologie entre les bactéries témoin et celles incubées avec XVII.b. Par conséquent, le mode d’action de ce composé n’est pas lié au divisome, et *a fortiori* ce n’est pas un inhibiteur de FtsZ. Il serait donc intéressant d’identifier le mécanisme d’action de ce produit. Parmi les hypothèses possibles, on peut par exemple citer l’inhibition de NorA. En effet, il a été démontré dans la littérature que plusieurs dérivés benzo[*b*]thiophènes étaient capables d’inhiber cette pompe d’efflux^{240,241}.

3.6. Etude de la cytotoxicité de XVII.b sur des cellules A549

Nonobstant un mode d’action qui n’est pas le même que celui initialement envisagé, ces travaux ont néanmoins permis l’identification de dérivés benzo[*b*]thiophènes comme de nouveaux antibiotiques actifs sur différentes souches de *S. aureus* résistant. Il était donc intéressant d’étudier une potentielle cytotoxicité de XVII.b. Cette étude était d’autant plus pertinente que les dérivés benzo[*b*]thiophènes synthétisés sont analogues de CV-4, molécule active sur la tubuline.

Le même test de cytotoxicité à l'iodure de propidium que pour **II.b** (page 73) a été réalisé et les résultats sont présentés dans la Figure 93. Pendant 7 h à 128 µg/mL, soit 32 fois la CMI, aucune cytotoxicité n'est observée sur des cellules A549 issue de cancer du poumon. Les différences structurales entre **CV-4** et **XVII.b** ont donc permis d'augmenter l'activité antibactérienne tout en causant la perte de l'activité cytotoxique.

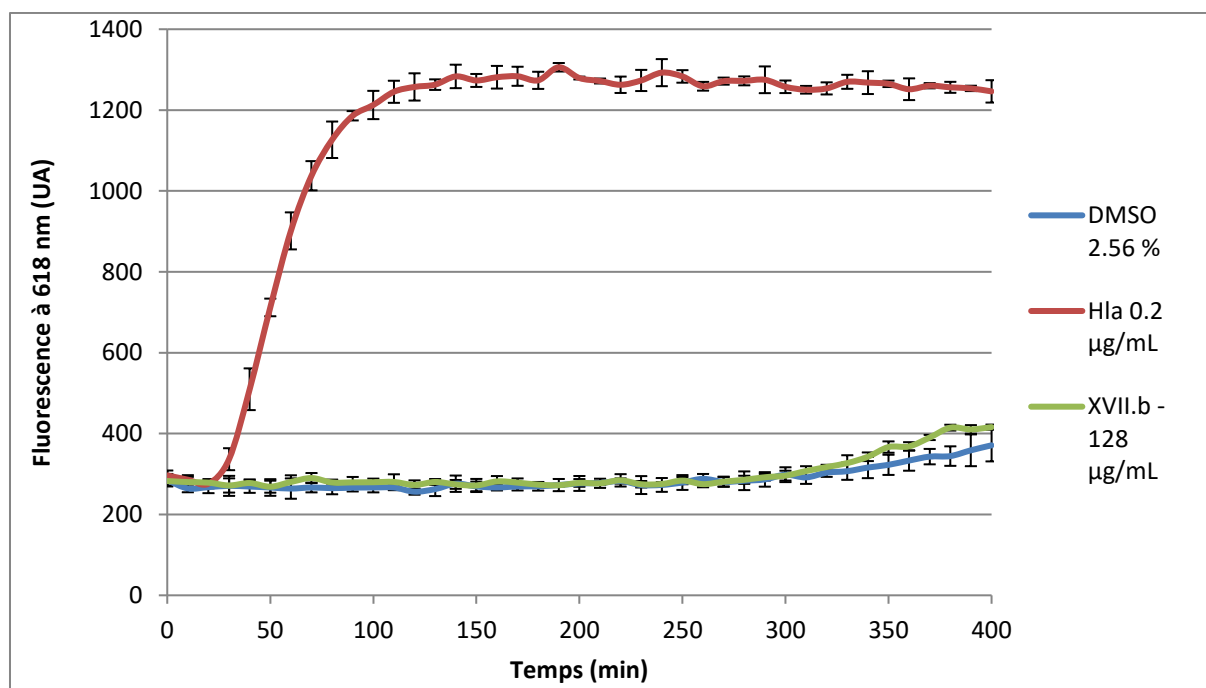


Figure 93 : Courbes de fluorescence montrant l'absence de cytotoxicité de **XVII.b** sur des cellules A549.

IV. Conclusion

Par sérendipité, le composé **XVII.b**, un 6-chlorobenzo[*b*]thiophène relié à un motif 2-pyridinyle par une fonction acylhydrazone a été identifié comme un produit actif sur *S. aureus* avec une bonne CMI de 4 µg/mL et n'étant pas cytotoxique. Même si l'action antibactérienne n'est pas liée au ciblage du divisome, ces travaux nous ont permis de développer un savoir-faire en criblage virtuel que nous avons pu mettre à profit par la suite. Les travaux portant sur la synthèse et l'évaluation biologique des produits des séries **XVI**, **XVII** et **XVIII** ont été publiés en 2022 dans la revue *Biomolécules*²⁴².

Suite à ces résultats prometteurs obtenus sur les séries de benzo[*b*]thiophènes, il serait pertinent d'identifier le mode d'action de ces produits. Ceci permettrait dans un deuxième temps d'optimiser cette nouvelle famille de composés actifs sur des souches antibiorésistantes de *S. aureus*.

Conclusion de la Partie 1

Partie 1 – Conclusion

Le divisome, complexe protéique impliqué dans la cytokinèse bactérienne, est une cible de choix pour concevoir de nouvelles molécules antibactériennes. FtsZ est une des protéines essentielles de ce complexe, et dont l'inhibition est létale pour le micro-organisme. L'objet de la première partie de cette thèse était donc de rechercher de nouvelles molécules prévenant la croissance de *Staphylococcus aureus* par l'inhibition de FtsZ.

Deux démarches ont été appliquées afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de FtsZ. La première a consisté à concevoir par différentes méthodes de nouvelles molécules basées sur le pharmacophore 2,6-difluorobenzamide, à savoir i) en le reliant à différents cycles à cinq chaînons à l'image de molécules tripartites déjà décrites, ii) en remplaçant la fonction amide par des analogues et iii) en synthétisant des molécules dimériques portant deux motifs benzamides. La deuxième démarche a été de réaliser le criblage virtuel de deux chimiothèques au sein de la poche allostérique de la structure cristallisée de FtsZ pour identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels de structures variées.

La première démarche a conduit à l'identification de plusieurs dérivés 1,2,4-oxadiazoles très actifs, à l'instar du 3-((3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide **II.c** ayant une CMI de 0,5 à 1 µg/mL selon la souche de *S. aureus*. Ce produit est en outre non-cytotoxique et son mode d'action visant le divisome bactérien a été mis en évidence. La relation structure – activité des meilleurs produits a également été discutée à la lumière d'études de docking. Les autres modifications structurales examinées n'ont pas permis de trouver des produits ayant des activités significatives, confortant l'importance du motif 2,6-difluorobenzamide et de la présence d'un substituant hydrophobe en position 3 de ce cycle.

La deuxième démarche de criblage virtuel a conduit à la synthèse et à l'évaluation biologique de 39 produits répartis en trois familles. Parmi ceux-ci, le (*E*)-6-chloro-*N'*-(pyridin-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide **XVII.b** a présenté une bonne activité anti-staphylococcique avec une CMI de 4 µg/mL contre les trois souches testées. Cependant, l'étude de son mode d'action a montré de manière surprenante que le divisome bactérien n'était pas ciblé. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude afin de déterminer le mode d'action de ce composé. Il s'agit donc d'un produit identifié par sérendipité, mais dont l'activité significative et la non-cytotoxicité en font un candidat intéressant pour lutter contre le staphylocoque doré antibiorésistant.

Ce travail est donc une contribution à la recherche de nouvelles molécules antibactériennes dans le contexte du développement de souches résistantes par une démarche regroupant chimie, biologie et modélisation moléculaire.

PARTIE 2

—

Identification d'inhibiteurs potentiels de
la protéase majeure de SARS-CoV-2

Chapitre 1

—

Introduction

I. SARS-CoV-2 et la pandémie de COVID-19

1. Introduction

La pandémie de COVID-19 (Coronavirus disease 2019) ayant touché l'ensemble de la planète à partir de l'automne 2019 est causée par le SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Début juillet 2022, deux ans et demi après le début de l'épidémie, plus de 540 millions de cas ont été recensés à travers le monde et 6,3 millions de personnes sont décédées suite à une infection²⁴³. Qui plus est, en raison d'une sous-déclaration du nombre de cas et de décès, ces valeurs sont vraisemblablement sous-estimées²⁴⁴.

Le SARS-CoV-2 est un β -coronavirus à ARN génomique monocaténaire à polarité positive (ARNg+) de la famille des *Coronaviridae*²⁴⁵. Son génome d'environ 30 000 bases code pour quatre protéines structurales, Spike (S), de l'enveloppe (E), de la membrane (M) et de la nucléocapside (N), ainsi que 16 protéines non structurales, (Figure 94)²⁴⁶. Spike est une glycoprotéine de fusion dimérique responsable de la reconnaissance et de l'entrée dans la cellule hôte²⁴⁷. Les protéines de l'enveloppe servent de protection tandis que la membrane relie l'enveloppe au reste du virus. Enfin, les protéines de la nucléocapside servent à empaqueter et protéger l'ARN viral²⁴⁸. Les protéines non structurales, telles que la PL^{Pro} (papain-like protease) ou la RdRp (RNA-dépendant RNA polymérase), sont quant à elles impliquées dans le clivage protéique ou la transcription génomique et la réplication²⁴⁹.

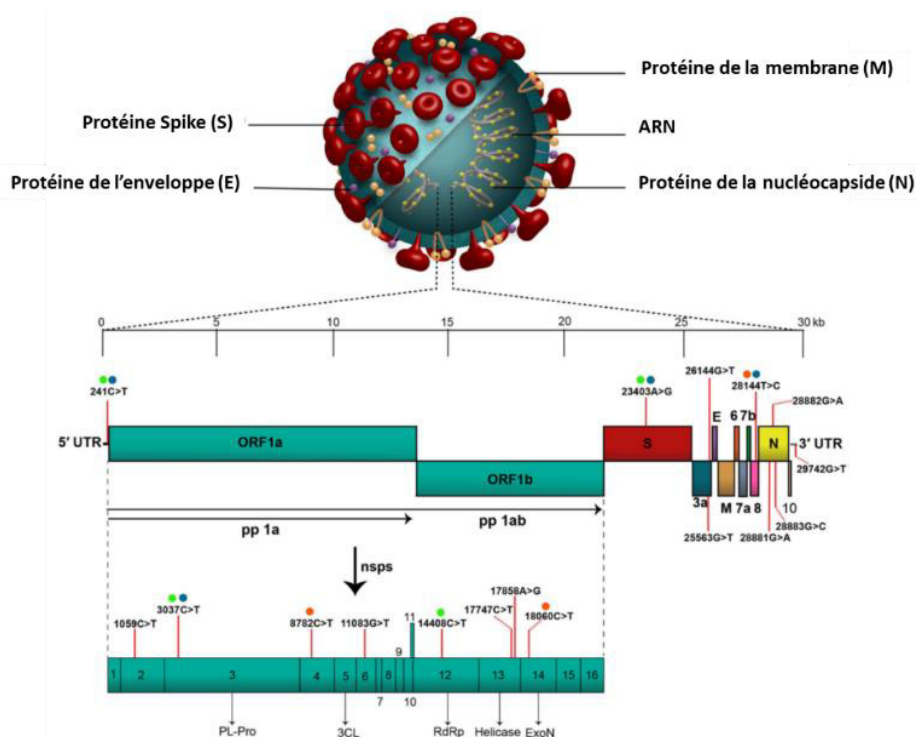


Figure 94 : Structure du génome de SARS-CoV-2 et protéines codées, adapté de Rahimi *et al.* 2021²⁴⁶.

2. Réplication de SARS-CoV-2

La Figure 95 ci-dessous schématise les différentes étapes de la réplication du SARS-CoV-2.

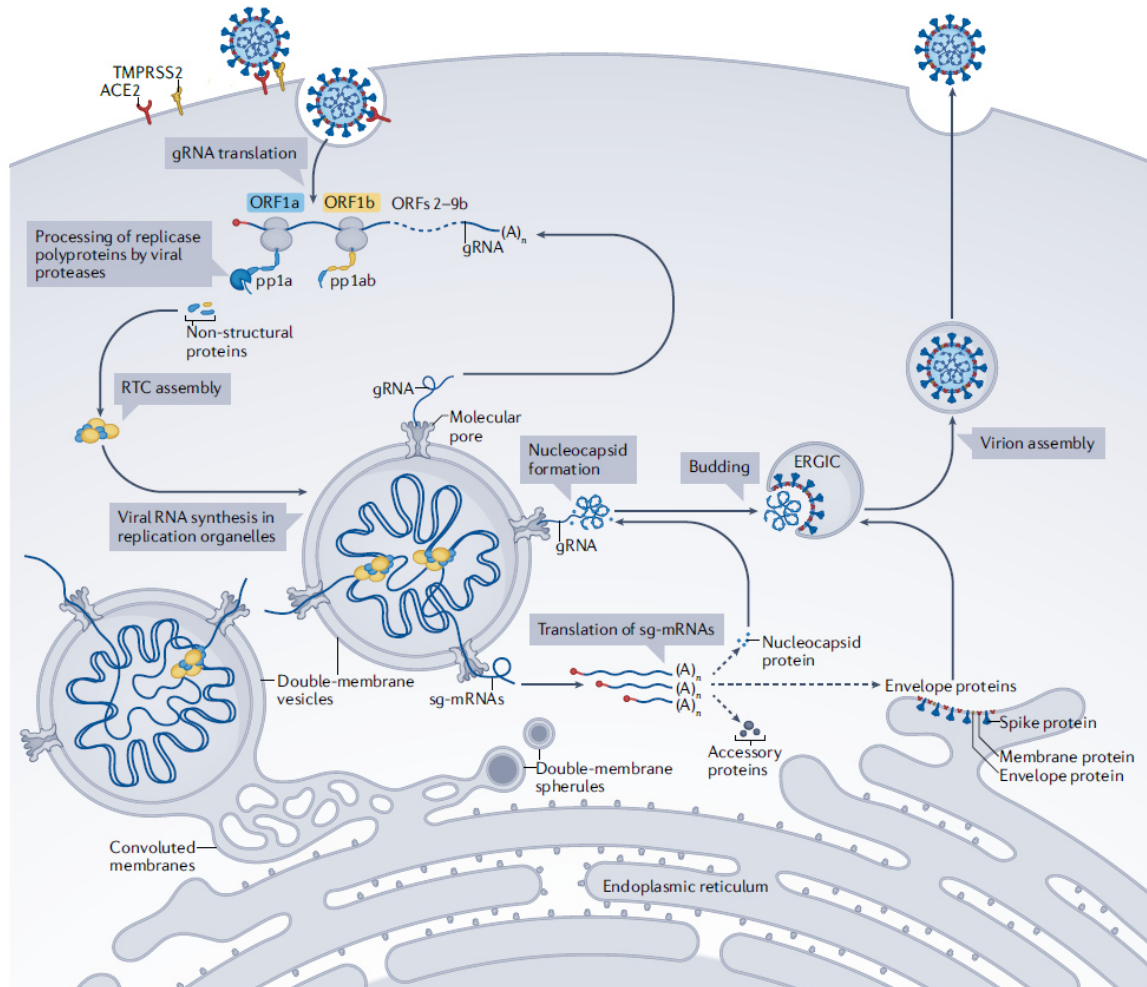


Figure 95 : Cycle de réplication de SARS-CoV-2, issu de Malone *et al.* 2022²⁵⁰.

Tout d'abord, la protéine Spike du virus se lie à l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2, protéine présente à la surface de la cellule hôte²⁵¹. L'entrée du virus au sein de la cellule peut alors suivre deux voies²⁵². Dans la première, le fragment S1 de la protéine Spike est clivé par TMPRSS2 (Transmembrane protease serine 2). Le fragment S2 activé fusionne alors les membranes du virus et de la cellule hôte, libérant l'ARN génomique dans la cellule²⁵³. Dans la deuxième voie d'entrée possible, le virus est endocyté et l'endosome fusionne ensuite avec un lysosome, dont le pH acide entraîne la lyse de la membrane et la libération de l'ARN viral dans la cellule²⁵⁴.

Une fois libéré des protéines de la nucléocapside, l'ARN génomique recrute les ribosomes de la cellule hôte²⁵⁰. A l'instar d'un ARN messager, les deux cadres de lecture ouverts ORF1a et ORF1b (constituants environ 75 % du génome) sont traduits, conduisant à la libération des polyprotéines pp1a et pp1ab contenant les protéines non

structurales décrites précédemment^{255,256}. Au sein de ces deux polyprotéines sont présentes deux protéases, à savoir la PL^{Pro} et la protéase majeure (également appelée M^{Pro}, pour *main protease*), qui sont capables de réaliser dans un premier temps un autoclivage au sein de la polyprotéine²⁵⁷. Au total, 15 clivages protéolytiques conduisent à la libération dans le cytosol de 16 protéines non structurales.

Parmi les protéines synthétisées, plusieurs vont former des complexes de réplication et de transcription comme la RdRp à l'intérieur de vésicules bimembranaires formées depuis le réticulum endoplasmique^{258,259}. Au sein de ces complexes, l'ARNg⁺ est répliqué sous forme d'ARNg à polarité négative qui sert de canevas pour la suite. Ce dernier peut alors être répliqué en ARNg⁺ afin de former de nouveaux virions, ou transcrit en ARNm subgénomique. La traduction de ce dernier conduit à la synthèse des protéines structurales S, M, E et N, ainsi que de protéines accessoires²⁵⁸. Les protéines N se lient à l'ARNg⁺ répliqué pour former des complexes nucléoprotéiques, tandis que les protéines M, E et S s'assemblent sur la paroi du réticulum endoplasmique granuleux.

Le réticulum endoplasmique contenant les protéines structurales migre ensuite sous la forme d'un compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique – Golgi. Le complexe nucléoprotéique bourgeonne au sein du lumen de ce compartiment, où le virion s'assemble et mature avant de quitter la cellule par exocytose.

Afin de lutter contre la pandémie de COVID-19, le ciblage de l'un ou de plusieurs des mécanismes présentés ci-dessus pourrait prévenir le développement du virus chez l'hôte.

3. Exemples de stratégies antivirales pour lutter contre le COVID-19

Si la stratégie vaccinale a fait ses preuves à travers le monde, le développement d'antiviraux reste nécessaire pour compléter l'arsenal thérapeutique²⁶⁰. Compte-tenu de leur importance au sein de la réplication virale, trois mécanismes sont des cibles de choix. D'une part, on retrouve la liaison du virus et l'entrée dans la cellule hôte. Pour ceci, les principales stratégies visent la protéine Spike (à l'aide par exemple d'anticorps monoclonaux), les protéases la clivant comme la TMPRSS2 ou encore l'endocytose du virus (mécanisme supposé de l'hydroxychloroquine, dont l'efficacité a été remise en question par la suite)²⁶¹⁻²⁶⁵. D'autre part, l'inhibition de la protéolyse des polyprotéines et en particulier des deux protéases capables de réaliser le clivage, à savoir PL^{Pro} et M^{Pro}, a également été étudiée²⁶⁶⁻²⁶⁸. Enfin, la transcription et la réplication de l'ARNg sont également ciblées, à l'image de la RdRp^{269,270}. Le travail présenté dans ce manuscrit sera consacré à la protéase majeure de SARS-CoV-2.

II. Protéase majeure de SARS-CoV-2

1. Structure et mécanisme d'action

La protéase majeure de SARS-CoV-2 est une protéine de 33,8 kDa qu'on retrouve sous forme monomérique, mais dont l'activité est plus importante sous forme d'homodimère. Chaque monomère est constitué de trois domaines, comme montré sur la Figure 96A. D'une part, les domaines I et II (respectivement en bleu et jaune) sont formés par six tonneaux β antiparallèles et l'espace entre les deux domaines forme le site catalytique. Le domaine II est relié au domaine III, constitué de cinq hélices α , par une boucle d'une quinzaine d'acides aminés. Lors de la dimérisation, le « doigt » N-terminal s'insère entre les domaines II et III, ce qui forme le reste de la zone catalytique. Les deux monomères sont alors quasiment orthogonaux (Figure 96B)²⁷¹.

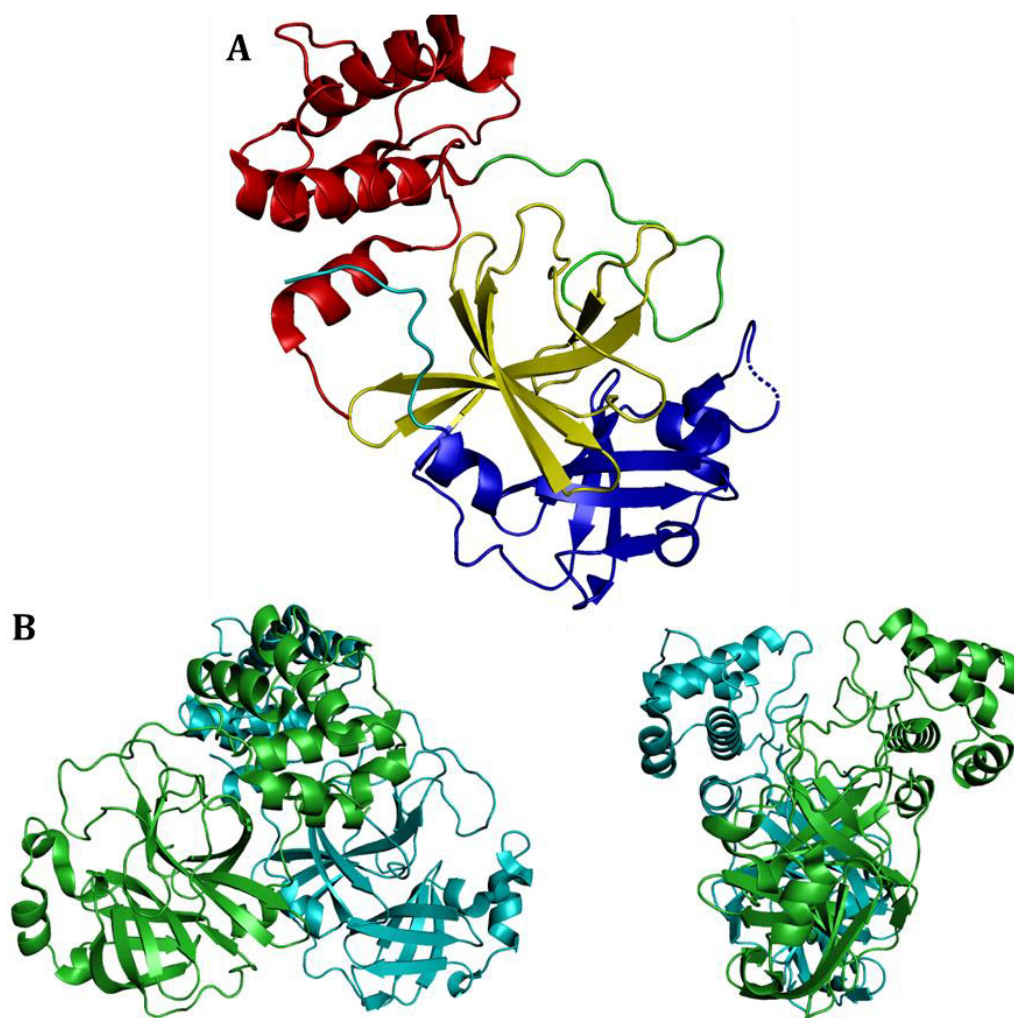


Figure 96 : **A** : Structure de M^{Pro} monomérique (code PDB : 6Y2F)²⁷¹. Cyan : chaîne N-terminale ; bleu : domaine I ; jaune : domaine II ; vert : boucle reliant les domaines II et III ; rouge : domaine III. **B** : Structure de M^{Pro} dimérique (code PDB : 7E08)²⁷² avec les deux monomères respectivement en vert et en cyan.

M^{Pro} est une protéase à cystéine ayant une dyade catalytique formée par les résidus His41 et Cys145. *In cellulo*, l'action de la protéase se fait au niveau d'une séquence Leu-Gln-↓(Ser, Ala ou Gly), à l'instar de SARS-CoV^{273,274}. Le site actif de l'enzyme comporte cinq poches, S1, S2, S3, S4 et S1' (Figure 97). C'est au sein de cette dernière qu'est située la dyade catalytique, et les sous-poches S1 à S4 sont donc les sites où s'insèrent les acides aminés du peptide à cliver²⁵⁷.

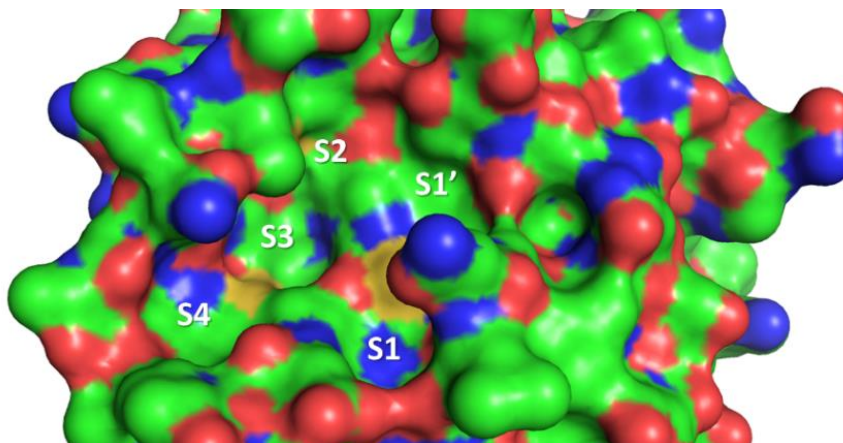


Figure 97 : Sous-poches du site catalytique.

Le cycle catalytique de M^{Pro} est décrit dans la Figure 98. La première étape consiste en la déprotonation du thiol du résidu Cys145 par le noyau imidazole du résidu His41 (I). Le thiolate réalise ensuite une addition nucléophile sur la fonction amide du peptide (II), suivie par la libération du dérivé amine (III). Le thioester nouvellement formé est ensuite hydrolysé (IV) ce qui libère le dérivé acide (V) et permet le captage d'un proton de l'imidazolium par le thiolate pour régénérer le groupement thiol²⁷⁵.

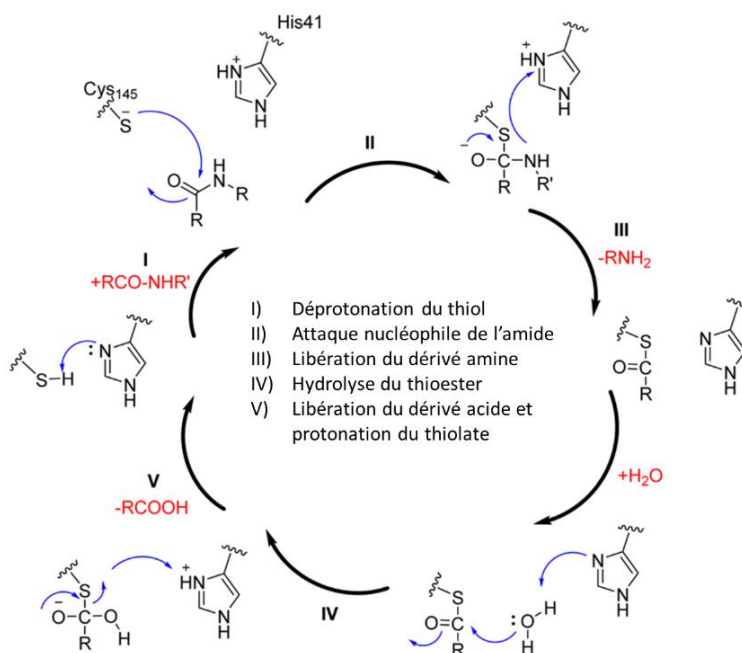


Figure 98 : Cycle catalytique de la dyade Cys – His de M^{Pro} chez SARS-CoV-2 (adapté de Pillaiyar *et al.* 2016)²⁷⁵.

2. Stratégies pour la découverte d'inhibiteurs de M^{Pro}

Compte-tenu de sa structure, deux types d'inhibition sont possibles pour la protéase majeure de SARS-CoV-2, à savoir non-covalente ou covalente²⁶⁰. Dans le premier cas, l'inhibition est causée par des interactions faibles entre le ligand et la cible, telles que des liaisons H, des interactions hydrophobes ou du π -stacking. Les inhibiteurs non-covalents constituent l'immense majorité des médicaments actuellement sur le marché. Cependant, dans le cas de M^{Pro}, le développement d'inhibiteurs covalents est possible. Ces derniers agissent par la formation d'une liaison covalente entre le ligand et la protéine cible²⁷⁶. Pour ceci, le ligand doit posséder une fonction électrophile, capable de réagir avec une fonction nucléophile sur la protéine, à l'instar de la fonction thiol du résidu Cys145.

Suite au début de la pandémie de COVID-19, la recherche d'agents antiviraux ciblant la protéase majeure de SARS-CoV-2 a été entreprise par de nombreux chercheurs. Un aperçu des différentes stratégies qui ont été abordées pour identifier des ligands potentiels est présenté ci-dessous.

2.1. Identification *in vitro*

Afin d'identifier un potentiel effet contre le SARS-CoV-2, l'activité de nombreuses molécules a été évaluée *in vitro*.

2.1.1. Drug repurposing

Le « drug repurposing » (ou repositionnement médicamenteux) est une stratégie rapide et efficace qui consiste à identifier de nouvelles utilités à des médicaments actuellement sur le marché, dont la sûreté a déjà été démontrée. Cette stratégie a été appliquée dans le cas de la crise sanitaire mondiale, afin de trouver rapidement de nouveaux traitements pour les patients²⁷⁷. Le **lopinavir** (Figure 99) a par exemple été identifié comme inhibiteur de M^{Pro}²⁷⁸. Cet inhibiteur de la protéase du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) peut en effet inhiber la protéase du SARS-CoV-2 en raison de sa structure analogue de l'état de transition lors de l'hydrolyse. Cependant, son effet n'est pas suffisant pour une utilisation clinique²⁷⁹. En revanche, le **danoprevir**, inhibant initialement la protéase de VHC (virus de l'hépatite C) a quant à lui montré une activité clinique²⁸⁰. On peut aussi noter le **boceprevir** (Figure 99), un cétoamide actif sur VHC capable de faire une liaison covalente avec le résidu Cys145 chez la protéase majeure de SARS-CoV-2²⁸¹. Une étude publiée dans le journal *Science* en 2021 montre également le résultat du criblage par rayon X d'une chimiothèque de médicaments et de molécules en recherche clinique identifiant sept composés antiviraux et non cytotoxiques²⁸².

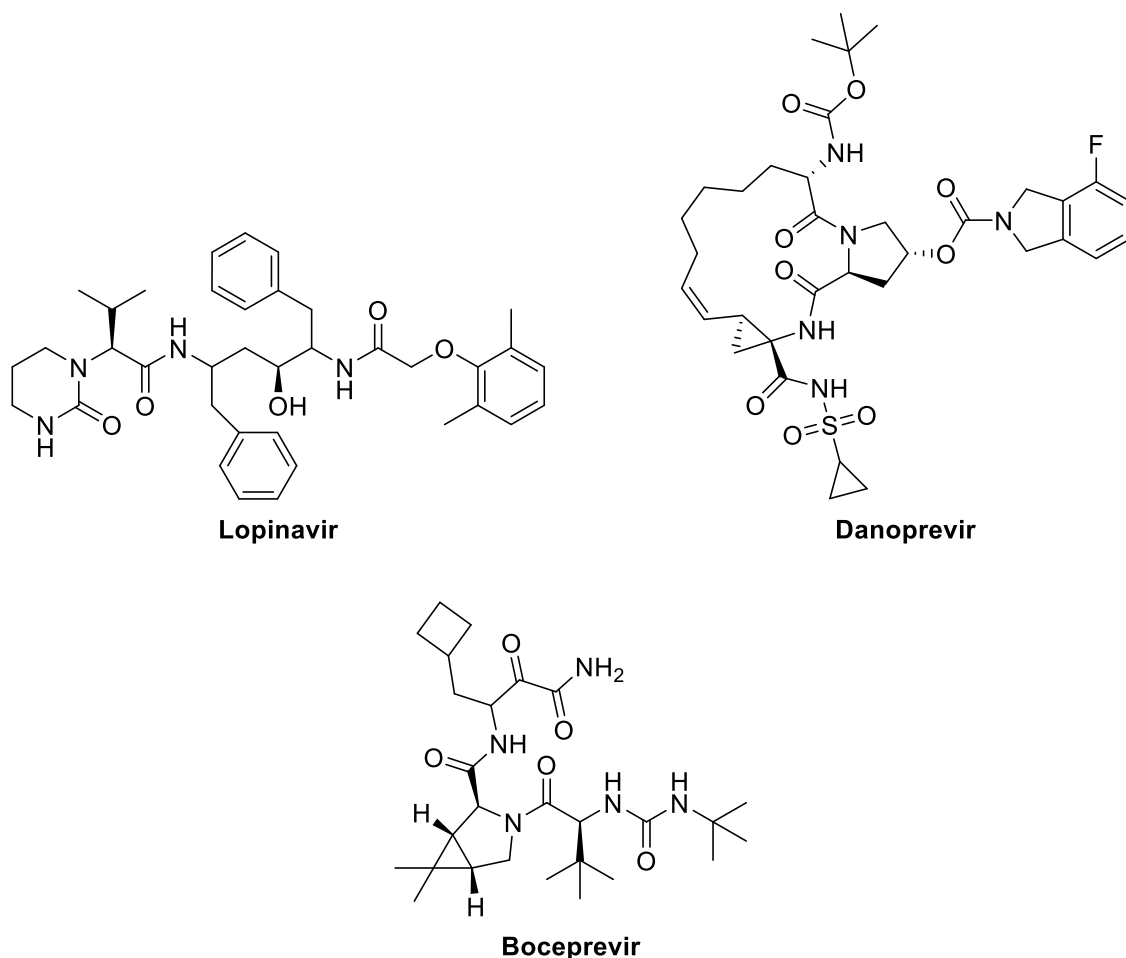


Figure 99 : Structures de trois médicaments identifiés pour un repositionnement médicamenteux contre M^{Pro} de SARS-CoV-2.

2.1.2. Inhibiteurs de la protéase majeure de SARS-CoV

Entre 2002 et 2004, une première épidémie de coronavirus causée alors par SARS-CoV a eu lieu, principalement localisée en Chine²⁸³. La recherche de molécules actives sur plusieurs protéines de ce virus avait été entreprise, dont M^{Pro}. Suite à l'apparition de SARS-CoV-2, les protéases majeures des deux virus ont été étudiées et il a été montré qu'elles partageaient 96 % d'homologie²⁷¹. L'effet des molécules conçues au début des années 2000 a donc logiquement été investigué sur M^{Pro}. C'est par exemple le cas du dérivé **N3** (Figure 100), un analogue de peptide actif sur les deux protéases^{284,285}. Tandis que le motif peptidique permet de bonnes interactions avec la protéine au sein du site catalytique, le motif vinylique situé à proximité du résidu Cys145 est un accepteur de Michael capable de former une liaison covalente irréversible avec le thiol. Le dérivé **Céto-1** est également un dérivé peptidique actif sur les deux protéases²⁷¹. Dans ce cas, c'est la présence d'une fonction α -cétoamide qui peut être convertie en thiocétal qui conduit à l'inhibition de la protéine. Enfin, on peut citer le **nirmatrelvir**, issu de l'optimisation d'un dérivé peptidique actif contre SARS-CoV^{245,267}. Cette molécule est actuellement commercialisée combinée au ritonavir, un inhibiteur de cytochrome P450, sous le nom de Paxlovid®.

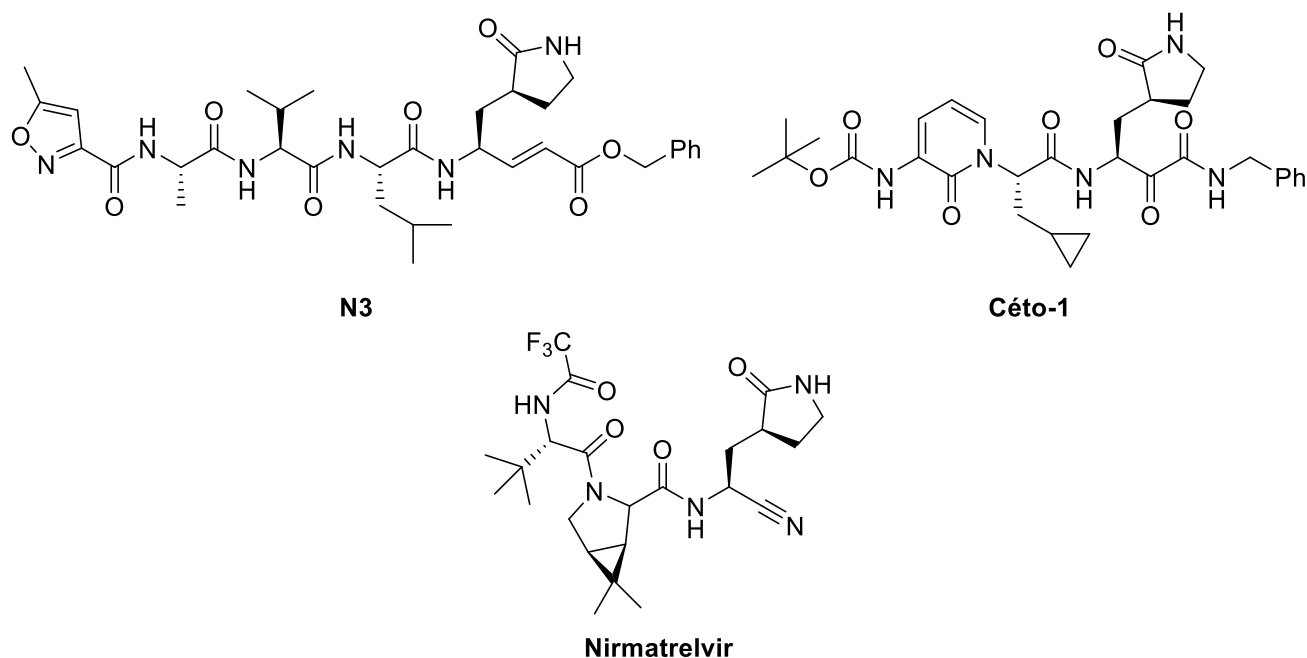


Figure 100 : Structures de dérivés peptidiques actifs sur les protéases majeures de SARS-CoV et de SARS-CoV-2.

2.1.3. Criblage à haut débit

Enfin, de nombreux criblages à haut débit de chimiothèques ont été réalisés afin d'identifier des inhibiteurs de M^{Pro} . On peut citer par exemple une étude sur 10 000 composés en 2020 conduisant à l'identification de l'**ebseen** (Figure 101), molécule anti-inflammatoire portant un atome de sélénium^{285,286}. Un autre criblage sur 10 755 composés a montré une activité de la **Walrycin B**²⁸⁷. Les résultats d'autres criblages sont décrits dans une revue de Dima A. Sabbah et son équipe²⁷³.

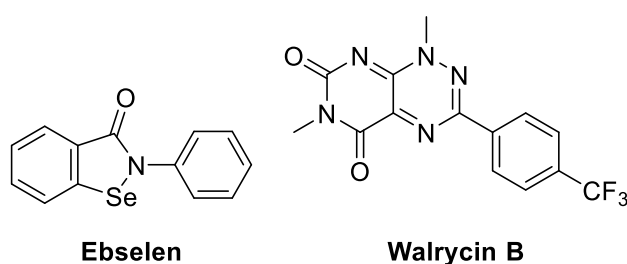


Figure 101 : Structures de deux inhibiteurs de M^{Pro} identifiés par criblage à haut débit.

2.2. Identification *in silico*

L'essor de la bioinformatique a également permis de très nombreuses études cherchant à identifier *in silico* de nouveaux inhibiteurs de M^{Pro} . Il est à noter que certaines études sont purement computationnelles tandis que dans d'autres, l'évaluation biologique des produits identifiés a été réalisée.

2.2.1. [Drug repurposing](#)

De nombreuses études de *drug repurposing* par criblage virtuel ont vu le jour, et les résultats de ces recherches diffèrent grandement d'une étude à l'autre, selon la base de données, la structure PDB de la protéine et l'algorithme de docking utilisé. Début 2022, Kulkarni et Ingale ont compilé les résultats de 52 études de *drug repurposing* par criblage virtuel ciblant M^{Pro}. Parmi celles-ci, trois composés ont été recensés à plus de dix reprises : le **saquinavir** (14), le **ritonavir** (12) et le **lopinavir** (11), dont les structures sont décrites respectivement en Figure 102 et Figure 99²⁸⁸. Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'activité sur M^{Pro} de ces trois produits a été démontrée²⁸⁹. Il est cependant à noter que de nombreux « faux positifs » ont été recensés dans des études de *drug repurposing* par criblage virtuel²⁹⁰.

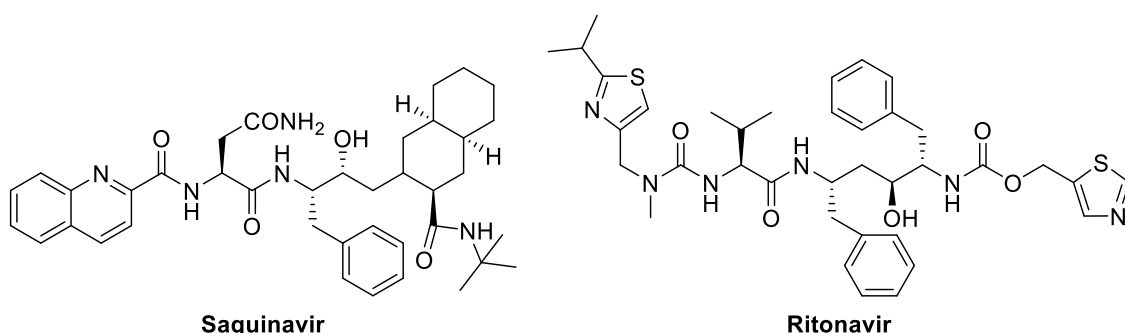


Figure 102 : Structures du **saquinavir** et du **ritonavir** identifiés par criblage virtuel.

2.2.2. [Criblage de substances naturelles](#)

Compte-tenu de l'importance des molécules naturelles au sein de la pharmacopée, de nombreuses chimiothèques de substances naturelles ont été criblées afin d'identifier de potentiels inhibiteurs de M^{Pro}. Certaines chimiothèques étaient très diversifiées (telles que celles utilisées par Kapusta *et al.*, Bernardi *et al.*, Garg *et al.* ou encore El-Ashrey *et al.*) tandis que d'autres se focalisaient sur des métabolites (Padhi *et al.*) ou des molécules marines (Gentile *et al.*)²⁹¹⁻²⁹⁶. Plusieurs composés issus de ces criblages sont présentés en Figure 103, mais il est à noter que les études citées ci-dessus sont purement computationnelles et que l'activité biologique des produits n'a pas été évaluée.

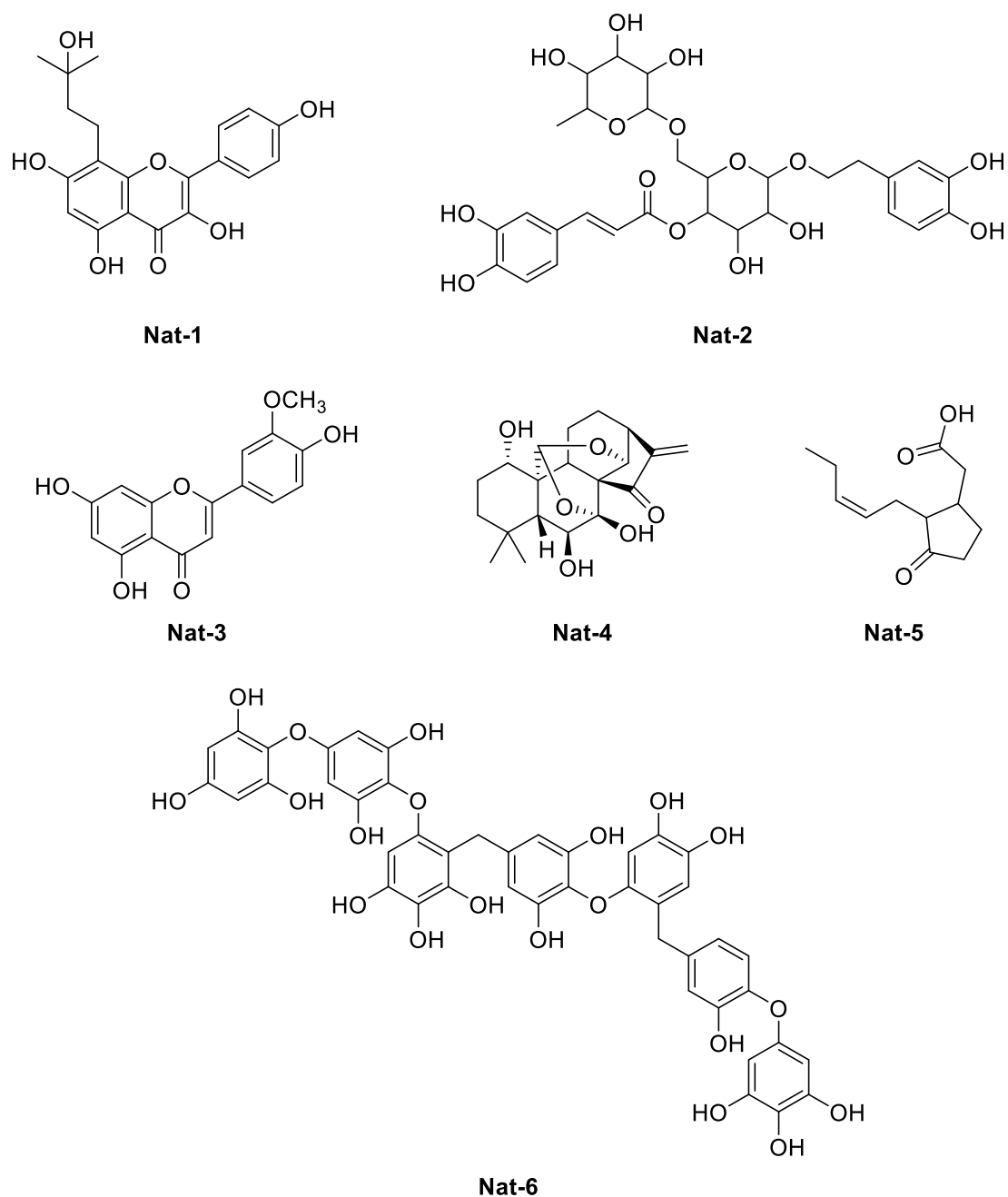


Figure 103 : Exemples de structures de substances naturelles identifiées par criblage virtuel comme inhibiteur potentiel de M^{Pro}.

2.2.3. [Criblage virtuel de larges chimiothèques](#)

Afin de potentialiser les chances d'identifier des inhibiteurs potentiels de M^{Pro}, le criblage virtuel de très grandes bases de données a également été réalisé. On peut citer pour exemple en 2020 le criblage de 1,3 milliard de produits qui a permis d'identifier le dérivé pyrazole **Crib-1** (Figure 104) comme inhibiteur potentiel²⁹⁷. En 2022, le criblage de 235 millions de composés suivi de l'évaluation biologique des meilleurs produits à conduit à l'identification de **Crib-2** ayant une activité de l'ordre de 77 nM contre SARS-CoV-2²⁹⁸.

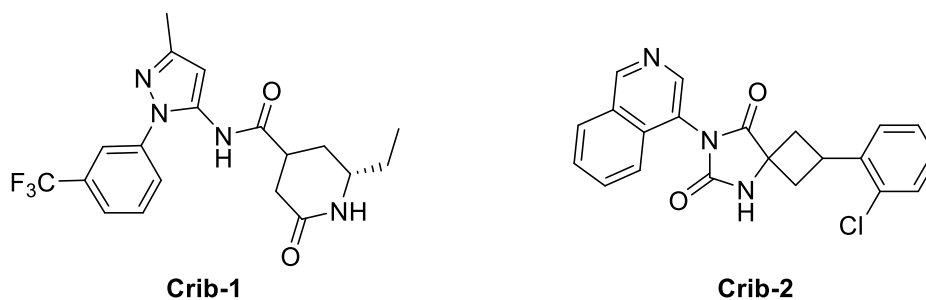


Figure 104 : Structures de deux composés identifiés par criblage virtuel de très larges chimiothèques.

2.2.4. Autres criblages virtuels

De nombreux autres criblages virtuels ont été réalisés au cours des deux dernières années. Ces derniers pouvaient par exemple se baser sur des chimiothèques plus petites concentrées autour d'un squelette général ou se focaliser uniquement sur la recherche d'inhibiteurs covalents²⁹⁹⁻³⁰¹.

3. Conclusion

Compte-tenu de son rôle critique dans la réplication virale, la protéase majeure de SARS-CoV-2 est une cible pharmacologique de choix pour lutter contre le COVID-19. De par la présence d'une cystéine dans sa dyade catalytique, la recherche d'inhibiteurs covalents et non-covalents a été entreprise, à la fois *in vitro* (*drug repurposing*, criblage à haut débit...) et *in silico* (criblage virtuel). A ce jour, un seul inhibiteur de M^{Pro}, le **nirmatrelvir**, est utilisé en clinique. La recherche de nouveaux composés bioactifs sur cette protéase reste donc toujours aussi pertinente.

III. Objectifs du projet

Dans le cadre de la pandémie de COVID-19, les confinements et les restrictions d'accès au laboratoire mis en place pour freiner la progression du SARS-CoV-2 ont logiquement empêché de poursuivre un travail expérimental à la paillasse. Cependant, il nous était possible de réaliser des études de modélisation moléculaires en télétravail. C'est pourquoi nous avons souhaité mettre à profit nos compétences en bioinformatique et en criblage virtuel, acquises entre autres par notre travail sur FtsZ, pour participer à la recherche de composés potentiellement bioactifs.

Nous avons donc réalisé deux études visant à identifier par criblage virtuel de potentiels inhibiteurs de M^{Pro}. Ces travaux ont été réalisés par le docking de différentes chimiothèques au sein du site catalytique de la protéine.

Partie 2 – Chapitre 1

La première étude visait à identifier de potentiels inhibiteurs covalents de M^{Pro}. Pour ceci, deux chimiothèques ont été criblées, constituées respectivement :

- De molécules portant un groupement électrophile mou
- De médicaments covalents actuellement sur le marché

La deuxième étude est basée sur l'homologie entre les protéases majeures de SARS-CoV-2 et du coronavirus aviaire. Une base de données d'inhibiteurs connus de cette dernière a ainsi été criblée au sein du site actif de la protéase majeure de SARS-CoV-2. Par la suite, la stabilité des complexes inhibiteur-protéine a été étudiée par dynamique moléculaire.

Dans ce manuscrit sont présentés les travaux portant sur le criblage virtuel par docking de différentes chimiothèques au sein du site catalytique de la protéase majeure de SARS-CoV-2 afin d'identifier de nouveaux composés antiviraux potentiels.

Chapitre 2

—

Utilisation du criblage virtuel pour
identifier de nouveaux inhibiteurs
covalents potentiels de la protéase
majeure de SARS-CoV-2

I. Introduction et démarche

La protéase majeure de SARS-CoV-2 étant une protéase à cystéine, la recherche d'inhibiteurs covalents est pertinente. En effet, l'atome de soufre de ce résidu est capable de former une liaison covalente avec un groupement électrophile, ce qui bloquerait l'action de l'enzyme. C'est par exemple le cas du **boceprevir** ou du peptide **N3**, vus précédemment (pages 154-155).

Le criblage virtuel de deux chimiothèques (la première étant constituée de plus de 40 000 électrophiles mous et la deuxième formée de 32 médicaments agissant comme des inhibiteurs covalents) a donc été réalisé au sein du site catalytique de M^{Pro}. Le criblage a été réalisé sur la structure cristallisée de M^{Pro} (code PDB 6Y2F)²⁷¹. Suite au docking, les complexes protéine-ligand ont été examinés. Pour que l'inhibition covalente se fasse, il faut que la fonction électrophile soit à proximité de la fonction thiol du résidu Cys145³⁰². Nous avons donc utilisé une valeur de 4 Å comme valeur seuil, ce qui est cohérent avec d'autres études de la littérature^{303,304}. Ainsi, après docking, les ligands formant un complexe stable avec M^{Pro} et dont la fonction électrophile était à moins de 4 Å du groupement thiol de la cystéine sont de potentiels inhibiteurs de la protéine, à l'instar de ce qui est résumé dans la Figure 105.

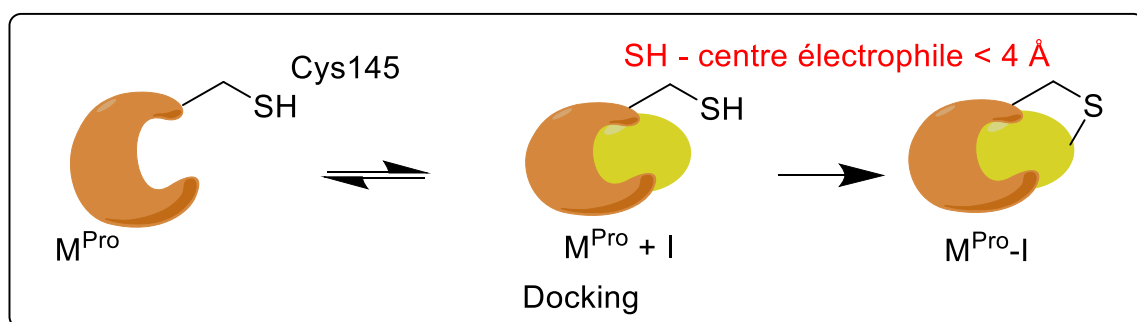


Figure 105 : Etude de docking visant l'inhibition covalente de M^{Pro} par le ciblage du résidu Cys145.

Afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus, la méthode a dans un premier temps été validée *via* le docking d'inhibiteur covalents connus de M^{Pro}.

II. Validation de la démarche de docking

Afin de s'assurer de la fiabilité de la méthode, celle-ci a dans un premier temps été validée. Pour ceci, trois inhibiteurs covalents connus de M^{Pro} (dont les structures sont représentées dans la Figure 106) ont été dockés au sein du site catalytique de la protéine. Les résultats de docking ont ensuite été comparés aux mêmes ligands co-cristallisés avec M^{Pro} et la distance entre le groupement chloroacétamide et le thiol du résidu Cys145 a été mesuré. Les résultats de ce docking sont présentés ci-dessous.

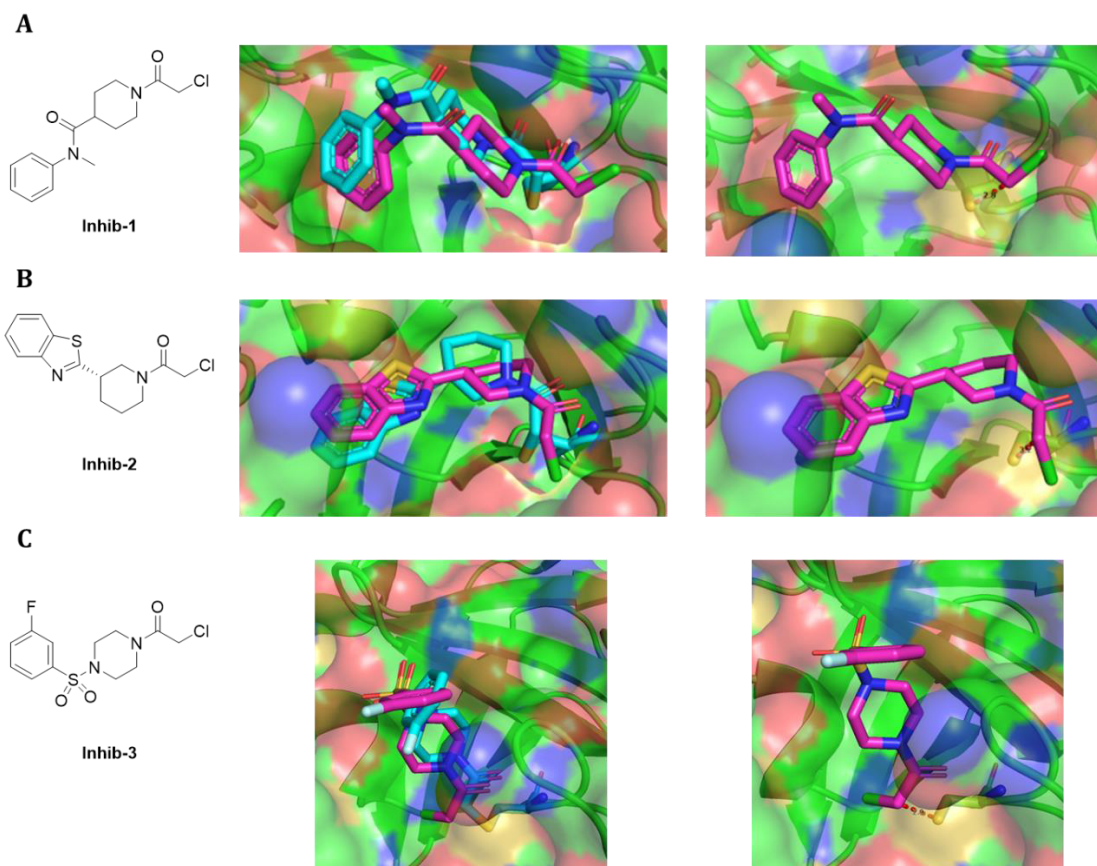


Figure 106 : Structures et résultats de docking des composés de référence (magenta) et superposition avec les inhibiteurs co-cristallisés (en cyan). **A** : **Inhib-1** (code PDB : 5RHF³⁰⁵). **B** : **Inhib-2** (code PDB : 5REN³⁰⁵). **C** : **Inhib-3** (code PDB : 5REK³⁰⁵).

Les molécules dockées **Inhib-1**, **Inhib-2** et **Inhib-3**, en magenta, sont quasiment superposées avec les adduits correspondant co-cristallisés (en cyan). Les légères différences sont dues au fait que les composés dockés possèdent l'atome de chlore, volumineux et nécessaire pour la liaison à la protéine, tandis que les adduits sont liés de manière covalente au résidu Cys145. La proximité entre le méthylène du chloroacétamide et le thiol du résidu Cys145 a également été évaluée. Pour ceci, la distance entre le carbone électrophile portant le chlore et l'atome de soufre a été mesurée, et celle-ci était comprise entre 2,8 et 3,2 Å. La bonne superposition des ligands et la distance méthylène – Cys145 montrent ainsi la fiabilité des résultats de docking et de notre hypothèse de départ.

III. Criblage virtuel d'une chimiothèque d'électrophiles mous

1. Construction de la chimiothèque

La méthode étant validée, une chimiothèque d'électrophiles mous a été construite depuis les bases de données PubChem, Asinex et Enamine. La chimiothèque est constituée de dérivés acrylamides, halogéno- et cyanoacrylamides, vinylsulfonamides ainsi que d'autres composés de structures diverses. Au total, les 41 757 composés ont été répartis selon les huit bases de données d'origine, comme montré dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Bases de données d'inhibiteurs covalents potentiels formant la chimiothèque à cribler.

Base de données	Structure	Nombre de molécules	Réaction possible avec le résidu Cys145
PubChem Acrylamides		3 905	Addition de Michael
PubChem Halogénoacétamides		4 281	Substitution nucléophile
PubChem Cyanoacrylamides		3 356	Addition covalente réversible
PubChem Vinylsulfonamides		1 070	Addition de Michael
Asinex Electrophiles mous	Divers	8 098	Structure-dépendante
Enamine Chimiothèque pour criblage covalent	Divers	15 684	Structure-dépendante
Enamine Acrylamides		3 153	Addition de Michael
Enamine Halogénoacétamides		2 210	Substitution nucléophile

2. Criblage virtuel de la chimiothèque

Le criblage virtuel par docking des 41 757 composés a été réalisé au sein du site catalytique de M^{Pro} (code PDB 6Y2F) par la méthode de complémentarité de forme décrite précédemment dans ce manuscrit²⁷¹. Les molécules ont ensuite été classées selon leur énergie d'interaction et les 20 meilleurs composés issus de chacune des huit bases de données ont été étudiés. Parmi les 160 molécules inspectées visuellement, seules celles dont le motif électrophile était situé à moins de 4 Å du groupement thiol du résidu Cys145 ont été retenues. Les résultats sont présentés dans le Tableau 13 ci-après.

Le criblage virtuel par docking suivi du criblage selon la distance électrophile – soufre a conduit à l'identification de 17 inhibiteurs covalents potentiels, portant tous des noyaux aromatiques et ayant une grande diversité structurale. On recense trois acrylamides, six chloroacétamides, deux cyanoacrylamides, deux vinylsulfonamides, trois nitriles et un alcyne. Les énergies d'interaction variaient entre -10,41 pour le dérivé **1102141** et -7,22 pour le composé **132327024**. Les modes de liaison à la protéine ont également été étudiés selon les composés, concernant les sous-poches ciblées (une à quatre), le nombre de liaisons hydrogène (une à six) et enfin la distance entre le groupement électrophile et le soufre du résidu Cys145 (entre 2,27 et 4,03).

Pour illustrer ces résultats, les modes de liaison de deux de ces composés sont présentés ci-dessous. Ont ainsi été choisis le dérivé cyanoacrylamide **2011299**, ayant un excellent score de docking de -10,32 kcal/mol (Figure 107) et le dérivé vinylsulfonamide **134294169** formant six liaisons hydrogène avec la protéine (Figure 108)

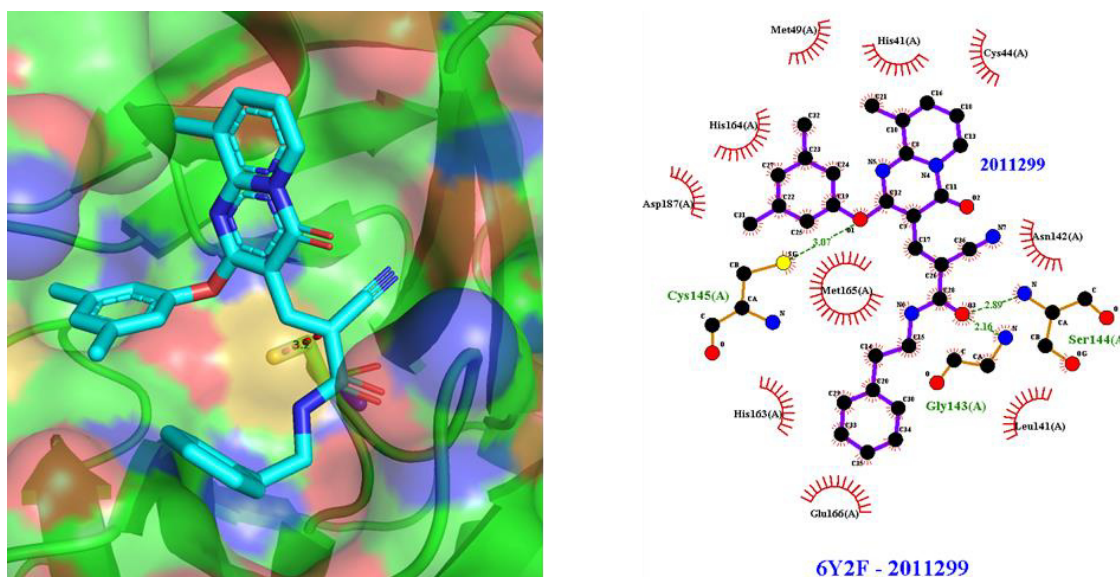


Figure 107 : Mode de liaison et réseau de liaisons hydrogène du dérivé **2011299**.

L'oxygène de la fonction amide fait des liaisons hydrogène avec les résidus Gly143 et Ser144, tandis que l'oxygène de la fonction éther interagit quant à lui avec le résidu Cys145. Le thiol de cette cystéine est également à 3,18 Å de l'atome de carbone du motif cyanoacrylamide.

Le mode de liaison du composé **134294169**, ayant également une bonne énergie d'interaction avec la protéine (-9,43 kcal/mol) est présenté dans la Figure 108.

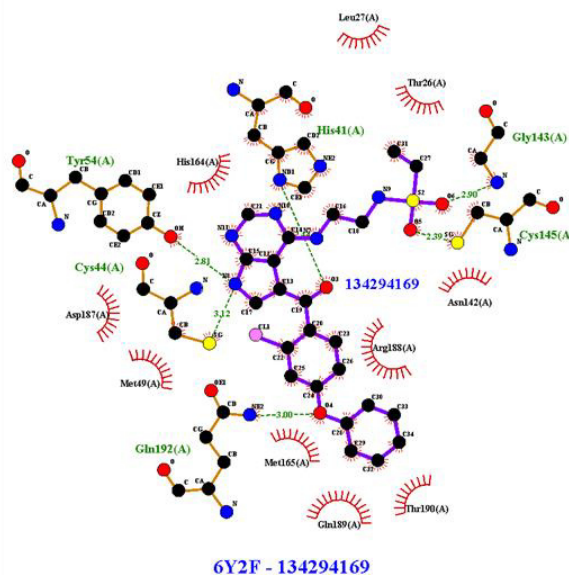
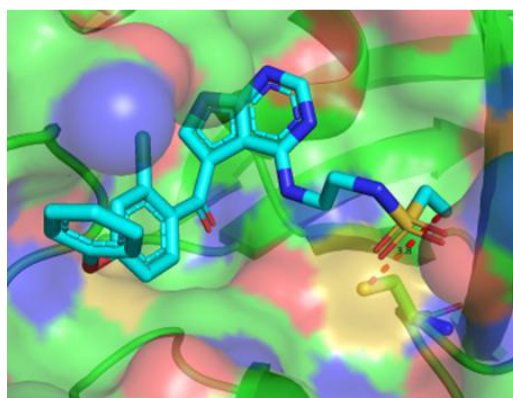
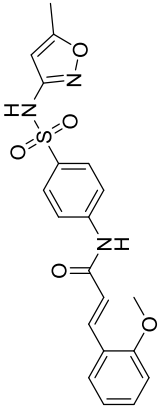
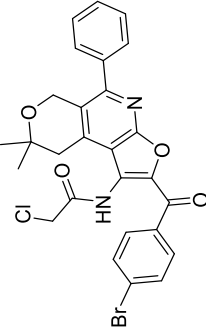
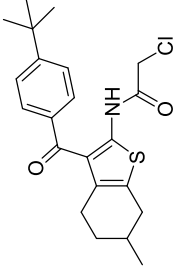
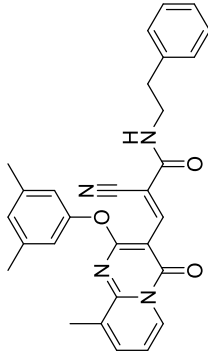


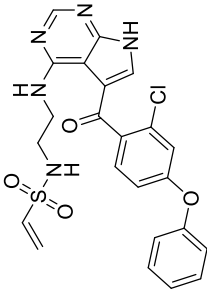
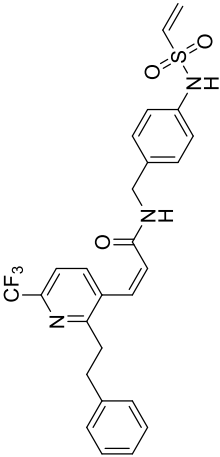
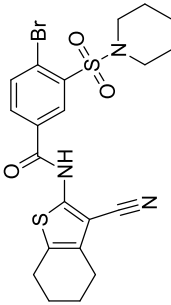
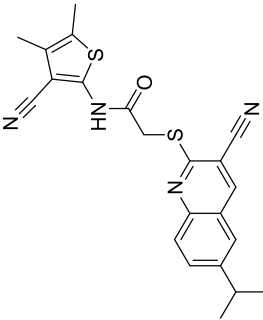
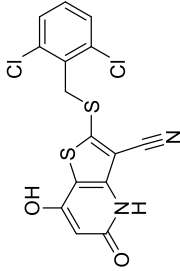
Figure 108 : Mode de liaison et réseau de liaisons hydrogène du dérivé **134294169**.

Ce produit prenant place au sein des quatre sous-poches du site allostérique interagit fortement avec la protéine. On dénombre en effet six liaisons hydrogène, respectivement avec les résidus His41, Cys44, Tyr54, Gly143, Cys145 et Gln192. Le thiol de la cystéine est également à 3,80 Å du motif vinylsulfonamide.

Le composé **1658938**, avec un score de docking de -9,19 kcal/mol et une fonction acrylamide à 3,62 Å du résidu Cys145 est également à noter. En effet, la faible cytotoxicité de ce produit a été démontrée lors de plusieurs tests répertoriés sur PubChem BioAssay³⁰⁶⁻³⁰⁹.

Tableau 13 : Résultats du criblage virtuel de la chimiothèque d'électrophiles mous.

Base de données	Nombre de composés / inhibiteurs potentiels	Références	Structures	Score de docking (kcal/mol)	Nombre de liaisons hydrogène	Sous-poches	Distance soufre – groupement électrophile (Å)
PubChem Acrylamides	3 905 / 1	1658938		-9,19	1	S1, S3, S4	3,62
PubChem Halogénoacétamides	4 281 / 2	1625245		-9,83	3	S1, S3, S4	4,03
		4868406		-9,28	2	S1, S2, S4	3,40
PubChem Cyanoacrylamides	3 356 / 1	2011299		-10,32	3	S1, S2, S4	3,18

PubChem Vinylsulfonamides	1 070 / 2		-9,43	6	S1, S2, S3, S4	3,80
	134294169					
			-9,21	5	S1, S2, S3, S4	3,48
		68782938				
Asinex Electrophiles mous			-10,41	1	S1, S3, S4	3,82
		1102141				
			-10,18	1	S1, S2, S4	3,46
	8 098 / 3	3207595				
			-9,99	3	S1, S2, S3	2,97
		54693381				

Enamine Chimiothèque pour criblage covalent	53520431		-8,81	3	S1, S3	2,27
	91944335		-8,39	4	S1, S2	3,99
Enamine Acrylamides	132349371		-7,35	3	S1, S2, S3	3,76
	132327024		-7,22	3	S1	3,94
Enamine Halogénoacétamides	7788967		-8,49	2	S1, S2, S3	3,89
	2405938		-8,19	3	S1, S2	3,27
	2513345		-7,96	2	S1, S3	3,57
	53520431		-8,81	4	S1, S2	3,99

IV. Criblage virtuel d'une chimiothèque de médicaments actuellement sur le marché

Une stratégie de *drug repurposing* a également été envisagée. Pour ceci, nous avons appliqué la même méthode que précédemment sur une chimiothèque de médicaments covalents.

1. Construction de la chimiothèque.

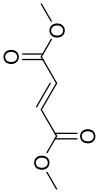
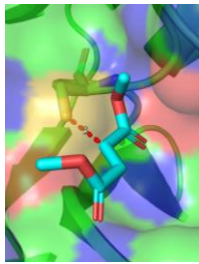
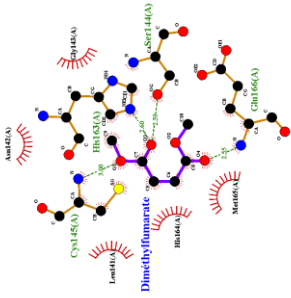
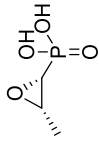
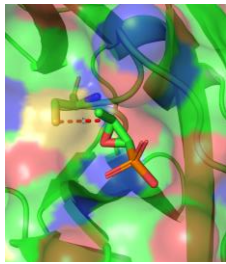
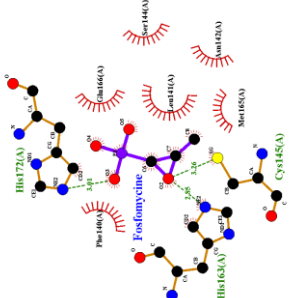
La construction de la chimiothèque s'est faite sur la base d'une liste de 52 médicaments autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) décrite par Anil Vasudevan et son équipe en 2019³¹⁰. Parmi ceux-ci, plusieurs composés ont été exclus de notre étude, tels que des molécules retirées du marché, les β -lactames (connus pour être inactifs sur les virus) et certains dérivés aux mécanismes spécifiques comme des analogues de nucléosides. Dans le cas des inhibiteurs de la pompe à proton, les métabolites actifs sulfénamides et acides sulféniques ont été retenus. Au total, une chimiothèque de 32 composés a été utilisée lors du criblage virtuel avec une forte variabilité structurale. On retrouve entre autres six acrylamides, deux cétones α,β -insaturées ou encore deux cycles époxyde et oxetanone.

2. Criblage virtuel de la chimiothèque

Le criblage virtuel de la chimiothèque de médicaments covalents a été réalisé selon la même méthode que précédemment, à savoir le docking au sein du site actif de M^{Pro} suivi de la mesure de la distance entre le motif électrophile et le soufre du résidu Cys145. Compte-tenu du plus faible nombre de composés présents dans la chimiothèque, la distance soufre – groupement électrophile a été étudiée pour tous les produits. Par cette approche, quatre médicaments ont été identifiés et sont présentés dans le Tableau 14.

Tous les composés interagiraient fortement avec la protéine, formant de trois à cinq liaisons hydrogène (pour la fosfomycine et l'ibrutinib, respectivement). Les motifs électrophiles sont également situés entre 2,98 et 3,78 Å du thiol du résidu Cys145, ce qui fait de ces molécules de potentiels inhibiteurs covalents.

Tableau 14 : Résultats du criblage virtuel de la chimiothèque de médicaments covalents.

Dénomination commune internationale	Groupe électrophile	Structures	Nombre de liaisons hydrogène	Sous-poches	Distance soufre – groupement électrophile (Å)	Mode de liaison	Réseau de liaisons hydrogène
Diméthylfumarate	Ester α,β -insaturé		4	S1	2,98		
Fosfomycine	Epoxyde		3	S1	3,73		

Ces quatre molécules sont des médicaments actuellement sur le marché et approuvés pour des pathologies données (Tableau 15) et l'utilisation de ces traitements sur des patients atteints par le COVID-19 a été documentée.

Tableau 15 : Cibles pharmacologiques et pathologies concernées des médicaments identifiés par docking.

Dénomination commune internationale	Cible pharmacologique	Pathologie visée	Référence
Diméthylfumarate	NF- κ B	Sclérose en plaque	311
Fosfomycine	UDP-N-acetylglucosamine-3-enolpyruvyltransferase	Infection bactérienne	312
Ibrutinib	Tyrosine kinase de Bruton	Cancer	313
Saxagliptine	Dipeptidyl peptidase 4	Diabète	314

Par exemple, l'utilisation du diméthylfumarate sur des patients atteints de sclérose en plaque a eu un effet positif sur le COVID-19^{315,316}. Cependant, les effets anti-inflammatoires de la molécule sont plutôt envisagés comme mode d'action³¹⁷⁻³¹⁹. Il a également été démontré que l'ibrutinib réduisait le nombre et la durée d'hospitalisation, même si là encore l'inhibition de M^{Pro} n'est pas l'hypothèse envisagée^{320,321}. Enfin, il a été démontré début 2021 que la saxagliptine n'était pas active sur M^{Pro}, et aucune publication ne recense d'effet de la fosfomycine contre le SARS-CoV-2³²².

V. Conclusion

La recherche d'inhibiteurs covalents potentiels de la protéase majeure de SARS-CoV-2 a été entreprise par le criblage virtuel de deux chimiothèques au sein du site catalytique de la protéine. La première chimiothèque, constituée de 41 757 électrophiles mous, a permis d'identifier 17 inhibiteurs covalents potentiels avec une grande diversité structurale. Le criblage de la deuxième chimiothèque de médicaments covalents a montré que le diméthylfumarate, la fosfomycine et l'ibrutinib pourraient en théorie se lier à la protéine et réagir avec le résidu Cys145.

Nous n'avons pas été en mesure de tester l'activité biologique des molécules identifiées sur M^{Pro}, mais ce travail pourra ainsi contribuer à apporter de nouvelles pistes dans la recherche de traitements antiviraux contre le COVID-19. Ces travaux ont été publiés en 2021 dans la revue *Computational Biology and Chemistry*³²³.

Chapitre 3

—

Exploitation de l'homologie entre les
protéases majeures du coronavirus
aviaire et de SARS-CoV-2 pour la
recherche d'inhibiteurs potentiels par
criblage virtuel

I. Introduction et démarche

Notre démarche est basée sur l'étude de l'homologie entre les protéases de SARS-CoV-2 et du coronavirus aviaire (également appelé IBV pour *infectious bronchitis virus*), dont une chimiothèque d'inhibiteurs a été décrite. Celle-ci est issue de PubChem BioAssay (AID 1706), et elle est le fruit de l'évaluation de 290 726 molécules sur la protéase majeure de l'IBV, dont 405 se sont montrés actifs³²⁴.

Le criblage virtuel par docking de cette chimiothèque a été réalisé au sein du site catalytique de la protéase majeure de SARS-CoV-2. Parmi les 405 produits, les structures de 388 molécules étaient disponibles. Le docking a été réalisé par la méthode de complémentarité de forme décrite précédemment dans ce manuscrit en suivant deux démarches.

Pour la première, ces composés ont été dockés afin d'identifier d'éventuels inhibiteurs non-covalents. Une étude de dynamique moléculaire a été réalisée sur les meilleurs composés afin de déterminer la stabilité des complexes formés.

Lors de la deuxième démarche, l'analyse visuelle des structures des 388 composés a également permis d'identifier 40 d'entre eux comme ayant une fonction électrophile. Suite au docking, la même méthode que celle présentée dans le chapitre 2 a été appliquée, à savoir l'étude la distance entre la fonction électrophile et le soufre du résidu Cys145 (Figure 105, page 164).

Enfin, une étude de pharmacocinétique prédictive a enfin été réalisée sur l'ensemble des molécules identifiées afin d'estimer le potentiel médicamenteux des produits issus du criblage virtuel. La stratégie est résumée dans la Figure 109 ci-après.

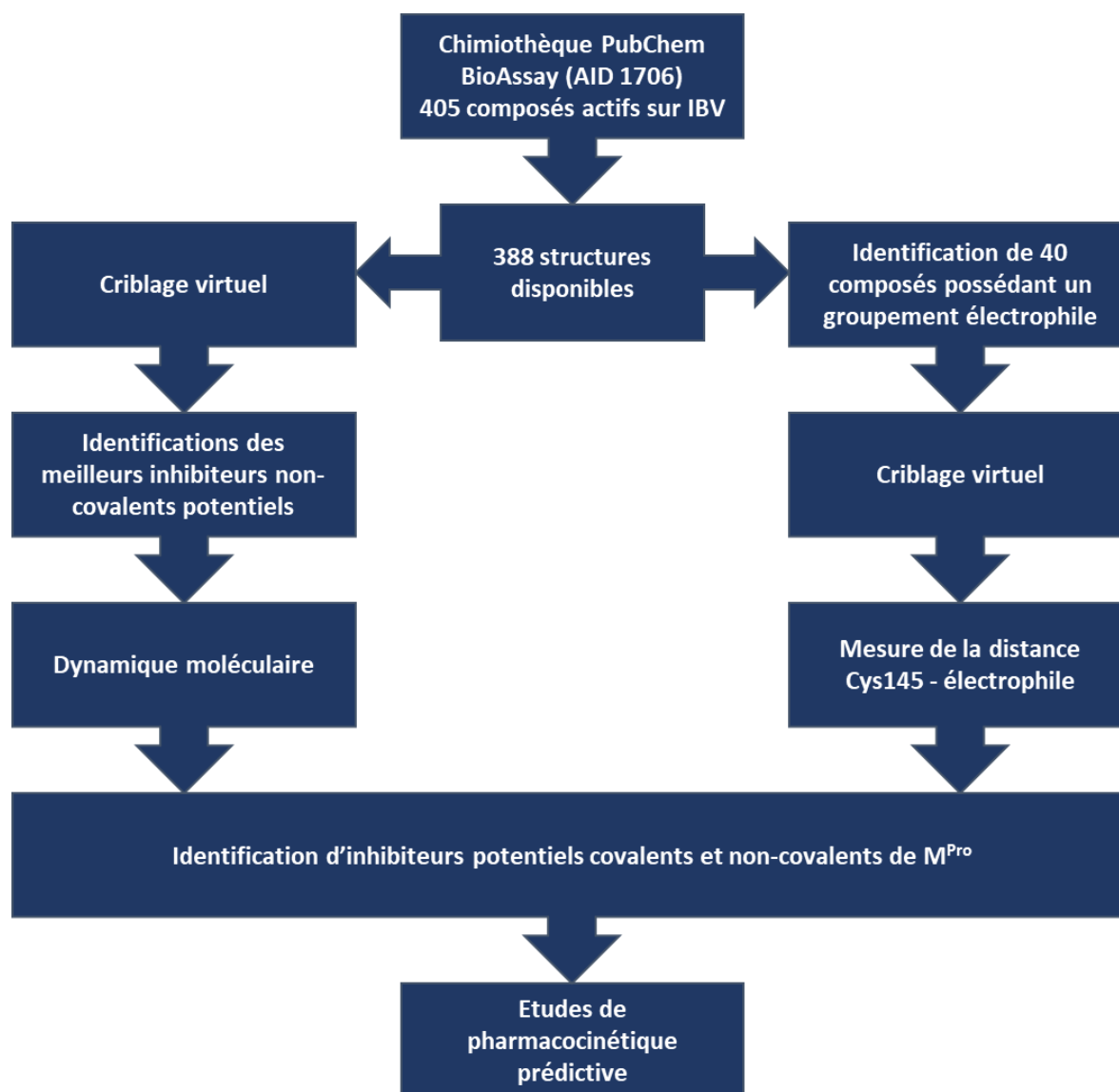


Figure 109 : Stratégie de criblage virtuel d'inhibiteurs de M^{Pro} du coronavirus aviaire pour l'identification d'inhibiteurs potentiels de M^{Pro} de SARS-CoV-2.

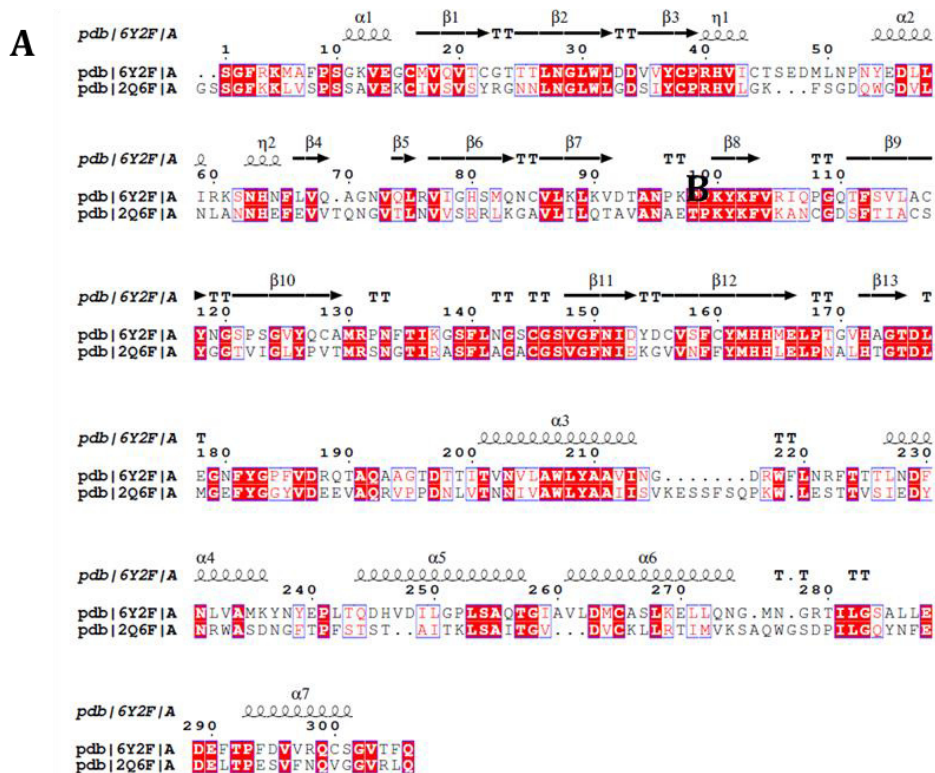
II. Etude d'homologie

L'homologie entre les protéases majeures de SARS-CoV-2 et de l'IBV a été étudiée, ce qui est possible par le fait que les structures cristallines des deux protéines soient disponibles dans la littérature.

Dans un premier temps, les séquences primaires des protéases de SARS-CoV-2 (PDB : 6Y2F) et de l'IBV (PDB : 2Q6F) ont été comparées avec le logiciel ESPript^{271,325,326}. Comme montré sur la Figure 110A, les séquences primaires montrent de nombreuses similarités. Il est également à noter que la dyade catalytique est conservée entre les deux protéines, à savoir les résidus His41 et Cys145 (selon la numérotation des acides aminés de M^{Pro} de SARS-CoV-2). L'étude des structures tridimensionnelles a également été réalisée. Si on observe des différences au niveau des régions non structurées des

Partie 2 – Chapitre 3

protéines, les structures secondaires (hélices α et feuillets β) et les sites catalytiques sont bien superposées, en particulier les résidus de la dyade catalytique (Figure 110B).



B

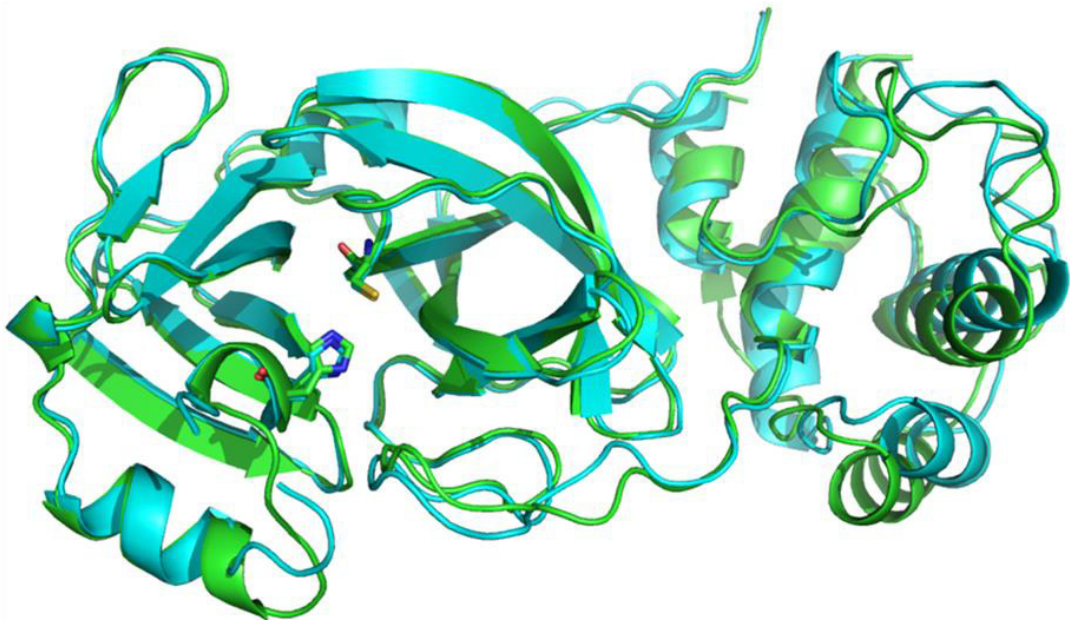


Figure 110 : A : Alignement des séquences des protéases majeures de SARS-CoV-2 et de l'IBV. Les résidus conservés sont encadrés et surligné en rouge (complètement conservés) ou écrits en rouge (partiellement conservés). Les structures secondaires sont également indiquées.

B : Superposition des structures 3D des protéases de l'IBV (vert) et de SARS-CoV-2 (cyan) sur lesquelles les dyades catalytiques sont représentées.

Une étude plus attentive des sites catalytiques des deux protéines montre de nombreuses similarités en termes de séquence et de conformation des acides aminés. Cependant, certains acides aminés de la poche diffèrent (Figure 111). En particulier, les résidus Thr25, Met49, Asn142, Met165 et Gln189 chez SARS-CoV-2 correspondent aux résidus Asn25, Lys45, Ala140, Leu163 et Glu187 chez IBV, dont les chaînes latérales sont à proximité de la dyade catalytique. Ces légères différences justifient donc une étude de criblage virtuel pour trouver de potentiels inhibiteurs de M^{Pro} chez SARS-CoV-2 depuis une chimiothèque de composés biologiquement actifs sur IBV.

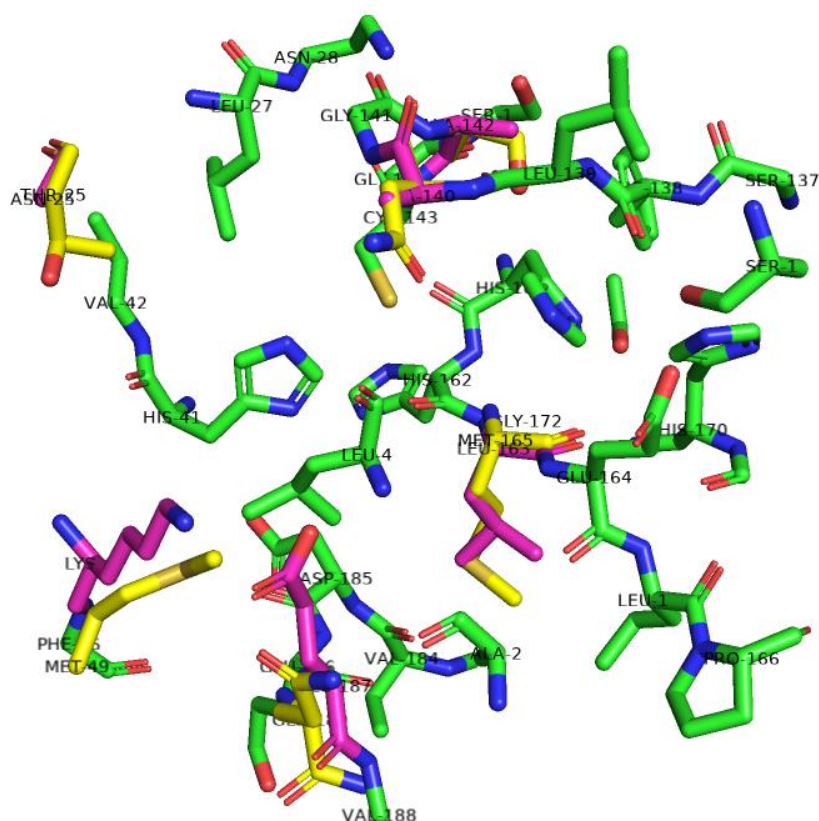


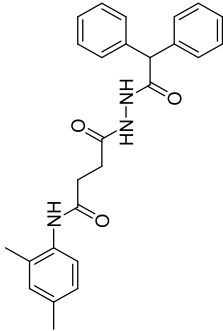
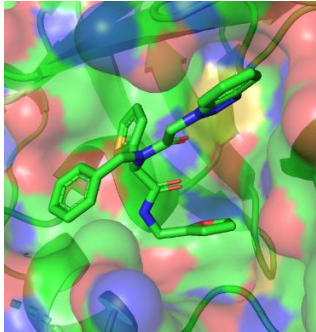
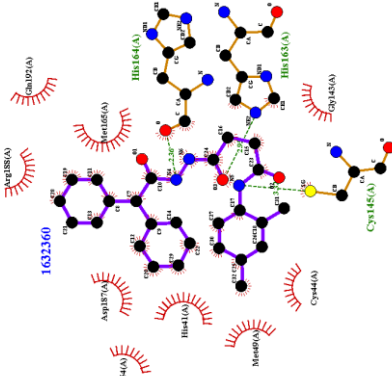
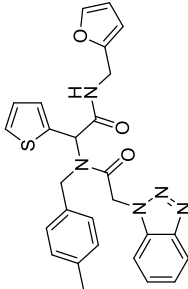
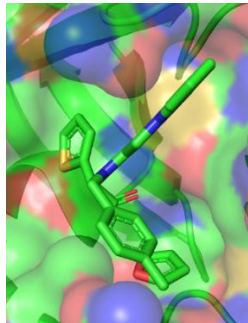
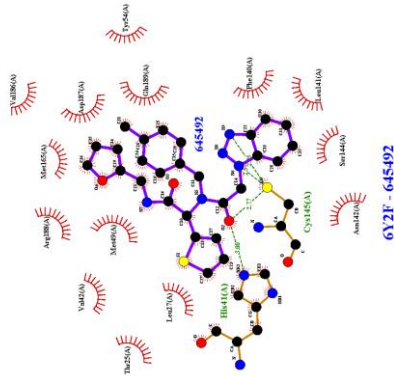
Figure 111 : Superposition des sites catalytiques des protéases de l'IBV (PDB : 2Q6F) et de SARS-CoV-2 (PDB : 6Y2F)^{271,325}. Les acides aminés identiques et superposés sont en vert, ceux différents sont en jaune (SARS-CoV-2) et magenta (IBV).

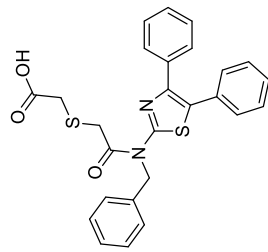
III. Inhibiteurs non-covalents potentiels

1. Criblage virtuel

Le criblage virtuel des 388 composés issus de la base de données PubChem a été réalisé par docking au sein du site actif de la protéase majeure de SARS-CoV-2. Les composés ont été classés selon leurs scores de docking et les cinq meilleurs ont été étudiés attentivement (Tableau 16).

Tableau 16 : Résultats du criblage virtuel des 388 molécules de la chimiothèque PubChem montrant les cinq meilleurs composés en termes d'énergie d'interaction.

Références	Structures	Score de docking (kcal/mol)	Nombre de liaisons hydrogène	Sous-poches	Liaison à la protéine	Réseau de liaisons hydrogène
1632360		-9,92	3	S1, S1' S2, S3		
645492		-9,74	4	S1, S1' S3		

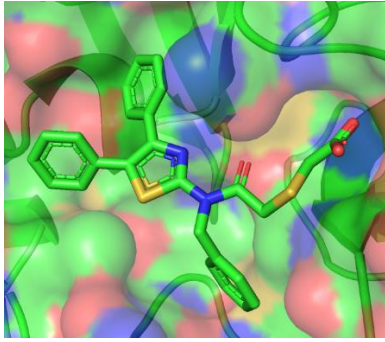


4586109

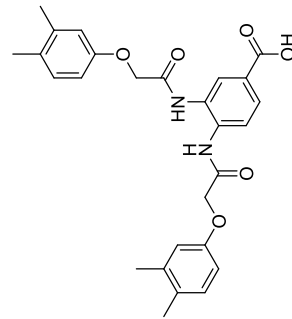
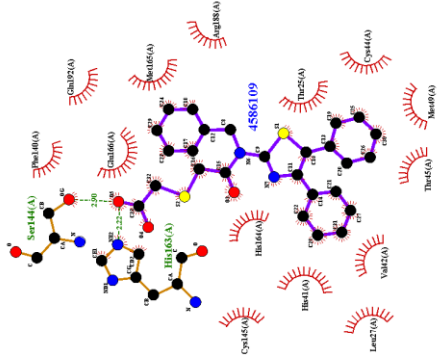
S1, S1'
S2, S4

2

-9,66



6Y2F - 4586109

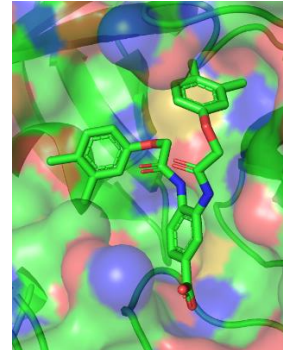


2193552

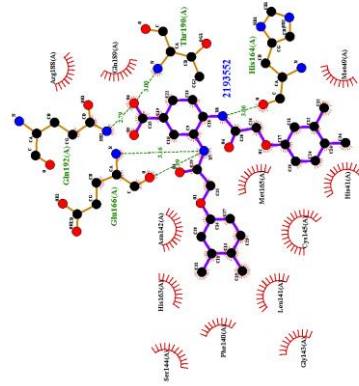
S1, S2, S4

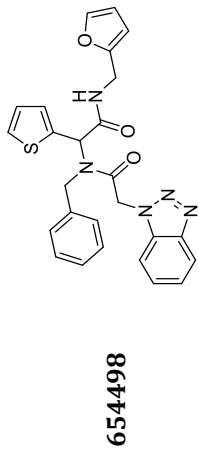
5

-9,59



6Y2F - 2193552

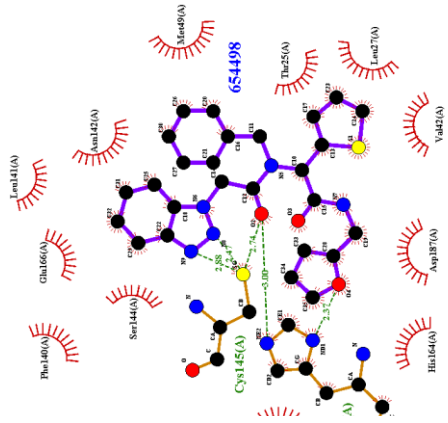
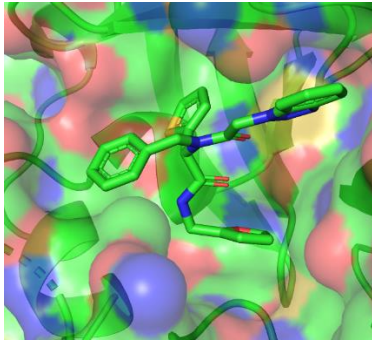




S1, S1',
S2, S3

5

-9,54



6Y2F - 654498

On retrouve ainsi des dérivés hydrazine (**1632360**), benzotriazole (**645492** et **654498**), thiazole (**4586109**) et diaminophényle (**2193552**). Tous les produits interagissent fortement avec la protéine, avec des énergies d'interactions allant de -9,92 kcal/mol pour le dérivé **1632360** à -9,54 kcal/mol pour le dérivé **654498**. Les différentes molécules occupent trois ou quatre des sous-poches du site catalytique et forment entre deux et cinq liaisons hydrogène avec la protéine. Il est par ailleurs à noter que trois des produits interagissent avec le résidu Cys145, dont deux qui font également des interactions avec le résidu His41.

Afin d'étudier la stabilité des complexes entre les inhibiteurs non-covalents potentiels et M^{Pro}, une étude de dynamique moléculaire a été réalisée.

2. Dynamique moléculaire

2.1. Principe de la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une méthode de modélisation moléculaire qui permet de simuler l'évolution d'un système au cours du temps. Dans le cadre de l'étude de complexes protéine-ligand, de l'énergie est apportée au système ce qui permet aux liaisons de la protéine de bouger. Si le complexe est stable, il va atteindre un niveau d'équilibre et les atomes vont rester positionnés plus ou moins au même endroit au cours du temps³²⁷. *A contrario*, si le complexe n'est pas stable, une déformation de la protéine est observée, et le ligand peut être amené à sortir de la poche dans laquelle il était au début de l'expérience. Afin de quantifier cet équilibre, on mesure le RMSD (*root mean square deviation*, soit la déviation de la racine de la moyenne des carrés) des carbones α du squelette de la protéine³²⁸. Cette valeur exprime la distance moyenne de ces carbones par rapport à la conformation initiale : si le complexe est stable, cette valeur est de l'ordre de quelques angströms et varie peu, tandis que si le complexe est instable, le RMSD continue de croître.

2.2. Résultats de l'étude de dynamique

Tout d'abord, l'énergie du complexe a été minimisée, puis les expériences ont été réalisées avec le champ de force AMBER10 et la méthode NPA (Nosé-Poincaré-Andersen) à 300 K. Après une période d'équilibration de 200 ps, la production de donnée a été réalisée pendant 5 ns conduisant à 500 poses pour lesquelles le RMSD des carbones α du squelette de la protéine a été mesuré. Comme montré en Figure 112, le RMSD des carbones α fluctue entre 2,25 Å et 2,75 Å (voire entre 1,5 Å et 2,5 Å pour le composé **645492**) au cours de l'expérience, ce qui montre la stabilité des complexes formés par la protéine et les différents inhibiteurs non-covalents potentiels.

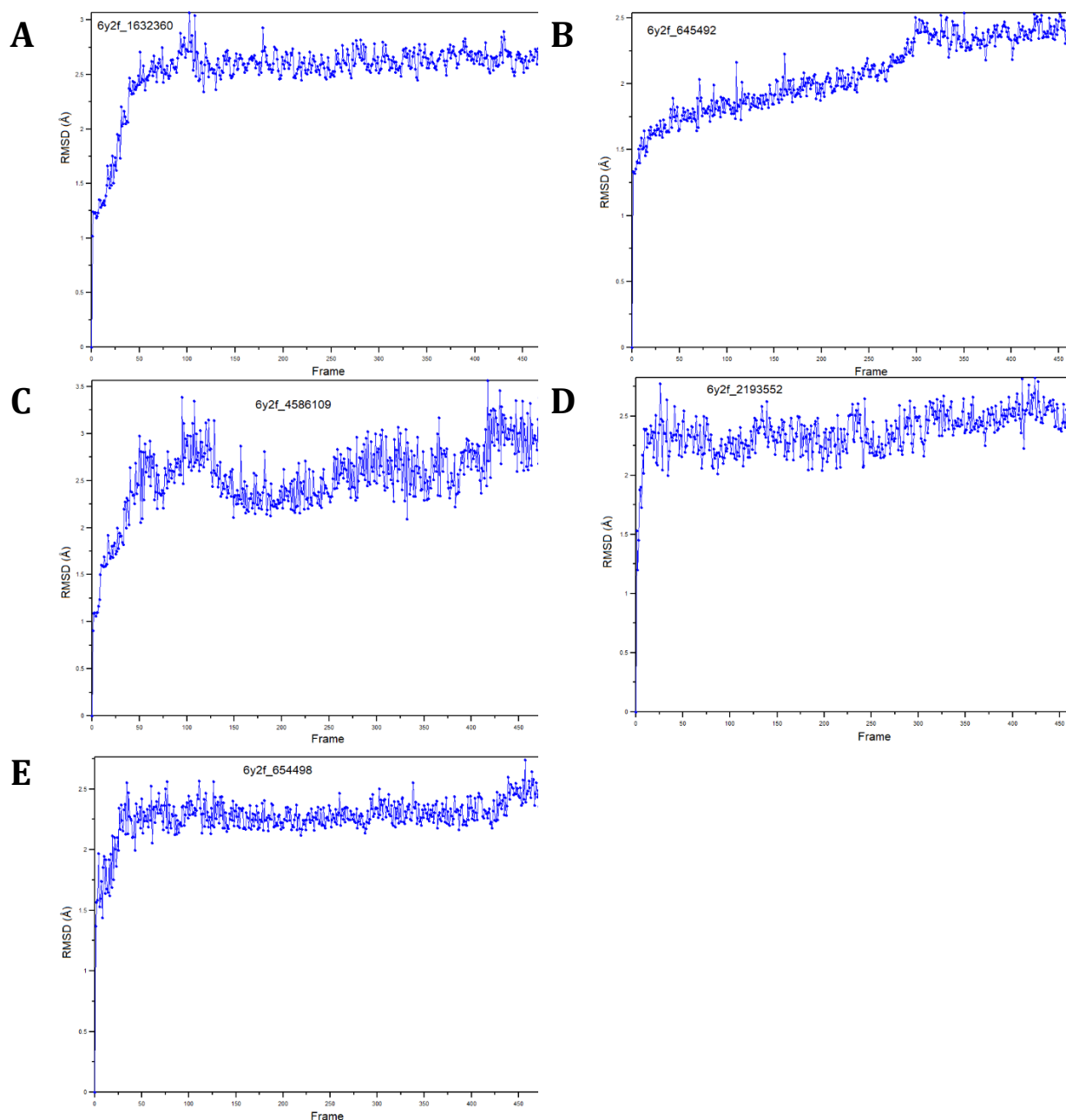
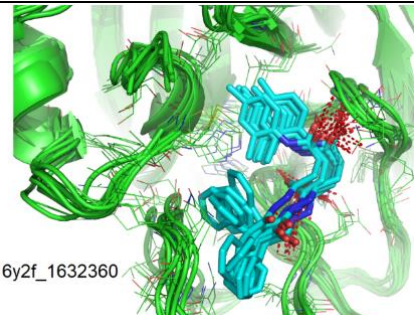
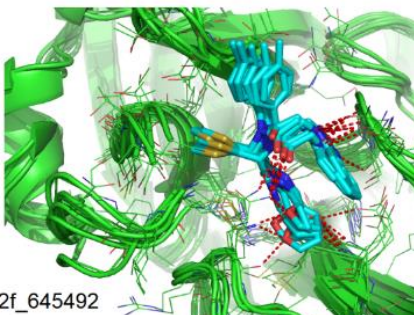
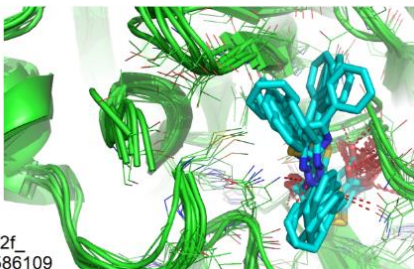
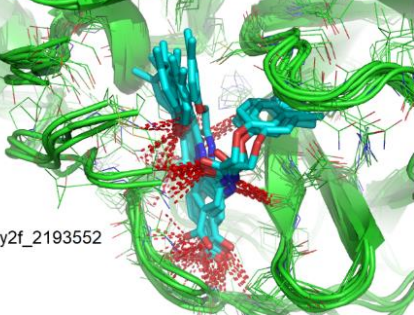
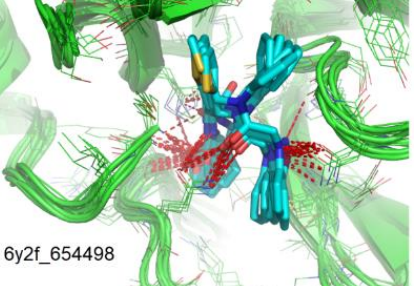


Figure 112 : RMSD des carbones α obtenus par dynamique moléculaire durant 5 ns pour les cinq complexes. **A : 1632360. B : 645492. C : 4586109. D : 2193552. E : 654498.**

Parmi les 500 conformères générés par l'étude de dynamique moléculaire, six ont été échantillonnés (un toutes les 1 000 ps) et superposés, tel que montré dans le Tableau 17. L'étude des interactions ligand – protéine à ces différents moments donnés permet de constater que les ligands restent fortement liés à la protéine au cours du temps. Les liaisons hydrogène générées par chaque échantillon ont également été étudiées, permettant de voir que le nombre d'acides aminés interagissant avec les ligands varie de trois à huit (pour au maximal cinq résidus ciblés simultanément). Certains acides aminés semblent importants pour la liaison à la protéine, tels que le résidu Gln189, interagissant avec quatre des cinq ligands.

Tableau 17 : Superposition des échantillons issus de l'étude de dynamique moléculaire et acides aminés clés identifiés.

Référence	Superposition des échantillons conformationnels	Résidus formant des liaisons hydrogène avec le ligand
1632360		Asn142, Gly143, Glu166
645492		Met49, Ser144, Gln189
4586109		Gly143, Ser144, His163, Glu166, Gln189
2193552		His41, Met49, Asn51, Glu166, Asp187, Thr190, Gln192, Gln189
654498		Met49, Glu166, Gln189

IV. Inhibiteurs covalents potentiels

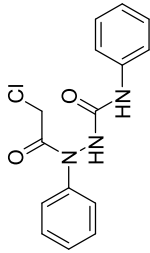
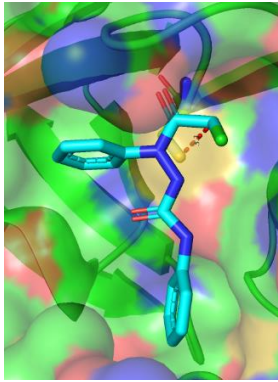
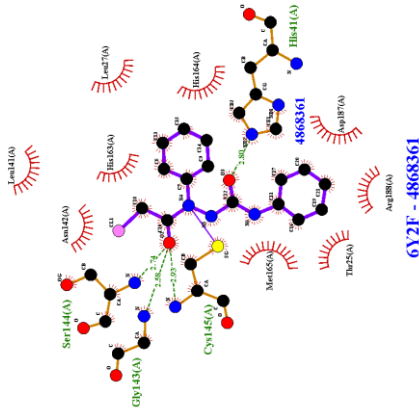
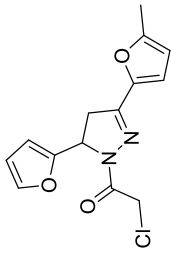
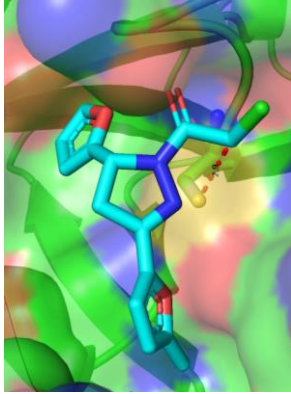
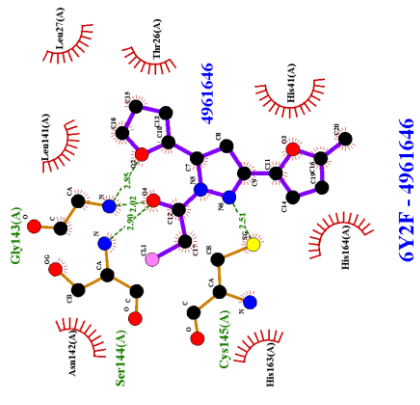
L'analyse visuelle des 388 structures disponibles a permis d'identifier 40 composés comportant un groupement électrophile pouvant en théorie réagir avec le résidu Cys145. Le criblage virtuel de cette chimiothèque ayant une grande diversité structurale (dérivés chloroacétyles, acrylamides, benzonitriles, nitriles et 2-cyanoacétamide) a permis d'identifier quatre inhibiteurs covalents potentiels pouvant en théorie se lier au sein du site actif de M^{Pro} puis réagir avec le soufre du résidu Cys145. Les structures des quatre molécules candidates ainsi que leurs modes de liaison sont décrits dans le Tableau 18. On retrouve ainsi trois chloroacétamides (**4868361**, **4961646** et **1154427**) et un dérivé cyanovinyle (**843322**), faisant entre deux et quatre liaisons hydrogène avec la protéine et ayant leur groupement électrophile entre 2,9 et 3,8 Å du résidu Cys145. Il est intéressant de noter que tous les composés interagissent fortement avec la dyade catalytique, à savoir les résidus Cys145 et His41 (à l'exception du dérivé **4961646**). En revanche, outre Cys145, ce dernier fait également des liaisons hydrogène avec les résidus Gly143 et Ser144, tout comme le composé **4868361**.

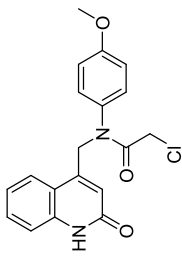
V. Etudes de pharmacocinétique prédictive

Suite aux travaux de docking et de dynamique moléculaire, les propriétés pharmacocinétiques des neuf molécules identifiées par criblage virtuel ont été prédites, afin d'étudier le potentiel médicamenteux de ces produits. Les propriétés relatives à l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'élimination et la toxicité (ADMET) ont donc été calculées par les logiciels SwissADME, pkCSM et ProTox-II^{198,199,329}. Les résultats sont présentés dans le Tableau 19.

Concernant la biodisponibilité orale, tous les produits respectent la « règle des cinq » de Lipinski, et respectent partiellement la règle de Veber^{200,201}. Ils présentent également tous une bonne absorption intestinale prédictive (supérieure à 90 %), à l'exception du dérivé **2193552** (pour lequel l'absorption atteint tout de même 70 %). Bien que les volumes de distribution et la fraction non liée aux protéines soit basse, il est à noter que les produits seraient peu à même de franchir la barrière hématoencéphalique et atteindre le système nerveux central. De plus, la majorité des produits ne seraient vraisemblablement pas métabolisés par les isoformes principales du cytochrome P450. Enfin, les différents composés ne montreraient pas d'hépto-, d'immuno- ou de cytotoxicité. Il n'est en revanche pas surprenant de voir que certains pourraient être carcinogènes, en particulier trois des quatre inhibiteurs covalents potentiels comportant donc des fonctions électrophiles. En résumé, les neuf molécules ont de bonnes propriétés pharmacocinétiques prédictives qui encourageraient un développement médicamenteux par la suite.

Tableau 18 : Résultats du criblage virtuel de la chimiothèque de 40 électrophiles.

Références	Structures	Nombre de liaisons hydrogène	Sous-poches	Distance soufre – groupement électrophile (Å)	Mode de liaison	Réseau de liaisons hydrogène
4868361		4	S1, S2, S3	3,1		
4961646		4	S1, S1', S3	2,9		

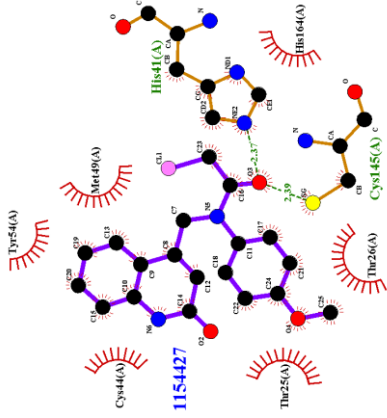
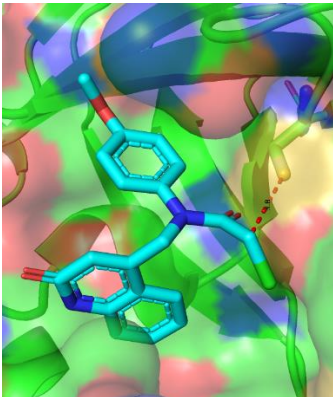


1154427

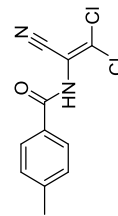
S1',
S2, S3

2

3,8



6Y2F - 1154427

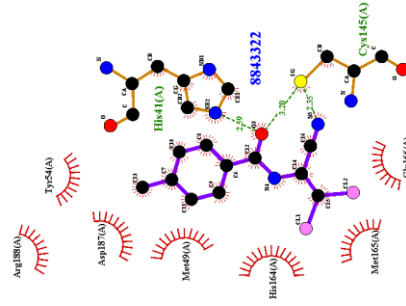
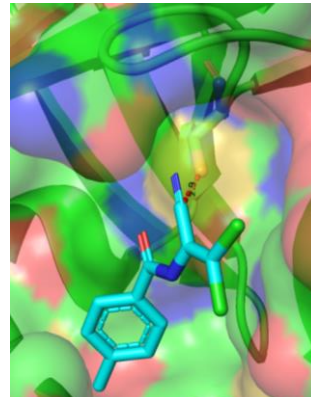


843322

S1, S3

3

2,9



6Y2F - 843322

Tableau 19 : Données d'ADMET prédictives des neuf inhibiteurs potentiels de la protéase majeure de SARS-CoV-2.

Propriété	Unité	Inhibiteur non-covalent					Inhibiteur covalent				
		1632360	645492	4586109	2193552	654498	4868361	4961646	1154427	843322	
Masse molaire	g/mol	429,51	499,58	476,52	474,59	485,56	303,74	292,72	356,80	255,10	
LogP		3,70	3,60	3,92	4,89	3,22	2,32	2,27	2,92	2,55	
Donneur de liaison H	#	3	1	3	1	1	2	0	1	1	
Accepteur de liaison H	#	3	5	6	4	5	2	4	3	2	
Liaisons flexibles	#	11	11	11	10	11	7	4	6	3	
PSA	Å ²	87,30	121,50	113,96	124,04	121,50	61,44	58,95	62,40	52,89	
Perméabilité Caco-2	log Papp en 10 ⁻⁶ cm/s	0,793	0,739	0,626	1,04	0,83	1,307	1,315	1,133	1,324	
Absorption intestinale	% Absorbé	94	94	70	93	94	91	97	97	92	
VDss	log L/kg	-0,24	0,166	-1,842	-0,714	0,117	-0,021	-0,21	-0,076	0,011	
Fraction non liée	Fnl	0,024	0,086	0	0,278	0,072	0	0,34	0,038	0,319	
Perméabilité BHE	log BB	-0,662	-0,429	-1,359	-0,996	-0,435	0,244	0,122	-0,077	0,079	
Perméabilité SNC	log PS	-2,191	-2,239	-2,896	-2,257	-2,308	-2,088	-2,877	-2,35	-2,781	
Inhibiteur CYP2D6	Oui/Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	
Inhibiteur CYP3A4	Oui/Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	
Clairance totale	log ml/min/kg	0,241	0,035	-0,045	0,624	0,091	-0,069	0,189	0,086	-0,054	
Hépatotoxicité	Oui/Non	Non (59)	Non (58)	Non (75)	Non (57)	Non (58)	Non (54)	Oui (51)	Non (71)	Non (61)	
Carcinogénicité	(% proba)	Oui (56)	Oui (52)	Non (69)	Non (53)	Oui (52)	Oui (66)	Oui (66)	Oui (52)	Non (59)	
Immunotoxicité	Oui/Non	Non (99)	Non (99)	Non (99)	Non (99)	Non (99)	Non (99)	Non (98)	Oui (87)	Non (99)	
Mutagenicité	(% proba)	Non (65)	Oui (55)	Non (79)	Non (65)	Oui (56)	Non (55)	Non (57)	Oui (52)	Oui (55)	
Cytotoxicité	Oui/Non	Non (66)	Non (61)	Non (60)	Non (66)	Non (63)	Non (72)	Non (68)	Oui (57)	Non (76)	

VI. Conclusion

Une étude d'homologie entre les structures des protéases majeures de SARS-CoV-2 et du coronavirus aviaire (IBV) a montré que les deux protéines étaient globalement proches, mais que quelques différences subsistaient, en particulier au niveau des régions non structurées et du site actif. Dans l'idée de rechercher des composés actifs sur SARS-CoV-2 parmi ceux connus pour inhiber M^{Pro} chez l'IBV, ces différences structurales ont justifié d'affiner la sélection. Une chimiothèque de 388 molécules actives sur IBV a donc été criblée virtuellement par docking au sein du site catalytique de la protéase de SARS-CoV-2. Neuf inhibiteurs potentiels ont été identifiés. Parmi ceux-ci, quatre seraient en théorie capables de se fixer au sein de la protéine puis de former une liaison covalente avec le soufre de la cystéine catalytique. La stabilité des complexes formés par la protéine et les cinq autres inhibiteurs non-covalents a également été démontrée par dynamique moléculaire. Enfin, d'après les données d'ADMET prédites, les neuf dérivés montrent de bonnes propriétés pharmacocinétiques.

Tout comme pour les produits présentés dans le chapitre 2, il serait pertinent d'obtenir les composés et de tester leur activité *in vitro* contre le SARS-CoV-2. Ces travaux permettent ainsi de découvrir rapidement de nouveaux traitements antiviraux potentiels pour le COVID-19.

Conclusion de la Partie 2

Partie 2 – Conclusion

La protéase majeure (M^{Pro}) est une protéine essentielle de la réplication du SARS-CoV-2, coronavirus responsable de la pandémie de COVID-19. La recherche d'inhibiteurs de M^{Pro} est donc une clé potentielle pour identifier de nouveaux antiviraux. Profitant des confinements successifs, nous avons mis à profit nos compétences en modélisation moléculaire en nous intéressant à cette protéine.

Pour ceci, deux démarches de criblage virtuel par docking ont été réalisées sur la structure cristalline de M^{Pro} . La première a consisté à cribler une chimiothèque d'électrophiles mous afin d'identifier de potentiels inhibiteurs covalents. La deuxième démarche est basée sur l'homologie entre les protéases du SARS-CoV-2 et du coronavirus aviaire pour cribler une chimiothèque de molécules actives sur cette dernière.

La première démarche a permis d'identifier 20 inhibiteurs covalents potentiels de M^{Pro} , dont trois médicaments actuellement sur le marché. La deuxième démarche a permis d'identifier neuf inhibiteurs potentiels ayant de bonnes propriétés pharmacocinétiques prédites, à savoir quatre covalents et cinq non-covalents. Pour ces derniers, la stabilité des complexes avec la protéine a été vérifiée par dynamique moléculaire.

Nos travaux étant purement calculatoires, l'étape suivante serait d'obtenir les produits et d'évaluer leur activité biologique contre SARS-CoV-2. Ces études ouvrent donc la voie à la découverte de nouveaux antiviraux ciblant la protéase majeure.

Conclusion générale

Cette thèse de chimie médicinale a abordé deux grands objectifs de santé publique, à savoir la lutte contre le staphylocoque doré antibiorésistant et la recherche de nouveaux agents antiviraux ciblant le SARS-CoV-2.

Pour la recherche de composés antibactériens, notre stratégie s'est portée sur l'inhibition de FtsZ. Une première démarche a consisté à développer de nouveaux dérivés portant un motif 2,6-difluorobenzamide, pharmacophore récurrent chez des inhibiteurs décrits. L'oxadiazole non-cytotoxique **II.c** a ainsi pu être identifié comme ayant une excellente activité anti-staphylococcique (avec une CMI de 0,5 à 1 µg/mL selon la souche) et ciblant le divisome bactérien. La synthèse d'analogues diversement substitués sur le groupement méthylène et des évaluations biologiques supplémentaires sont prévues (Partie 1, Chapitre 2). L'importance du motif benzamide a également été confortée par le fait, par exemple, que d'autres modifications structurales sur la fonction amide n'ont pas permis d'identifier des produits plus actifs (Partie 1, Chapitre 3). Une deuxième démarche a consisté à cribler virtuellement par docking différentes chimiothèques au sein de la structure cristalline de la protéine, puis à évaluer et tester les *hits* potentiels. Le benzo[*b*]thiophène non-cytotoxique **XVII.b** a montré une bonne activité antibactérienne, mais il s'est avéré qu'il n'était pas actif sur FtsZ. Son mode d'action reste donc encore à être déterminé (Partie 1, Chapitre 4).

Pour le volet COVID-19 de la thèse, nous nous sommes focalisés sur la recherche par criblage virtuel d'inhibiteurs potentiels de la protéase majeure de SARS-CoV-2. Cette stratégie a permis d'identifier 24 inhibiteurs covalents potentiels, dont trois sont des médicaments actuellement sur le marché. Cinq molécules pouvant théoriquement se lier de manière non-covalente ont également été identifiées. L'activité biologique de ces 29 molécules mériterait alors d'être évaluée sur SARS-CoV-2 (Partie 2, Chapitre 2 et 3).

Les résultats obtenus par criblage virtuel nous enjoignent à avoir un regard critique sur cette méthode. En effet, les seuls composés bioactifs identifiés par criblage virtuel sur FtsZ ne ciblent pas le divisome, et il a été montré que la saxagliptine est inactive sur M^{Pro}, pourtant identifiée par plusieurs criblages virtuels dont le nôtre. Si ce dernier est un outil formidable pour accélérer la découverte de nouveaux composés bioactifs, l'obtention d'un nombre conséquent de produits et leurs évaluations biologiques reste donc une condition *sine qua non* pour un développement subséquent.

Au cours de cette thèse, j'ai donc eu l'opportunité de concevoir, synthétiser et évaluer biologiquement différents composés anti-infectieux, ainsi que de réaliser des études de criblage virtuel afin d'identifier d'autres molécules potentiellement bioactives. Ces travaux contribuent ainsi à la recherche hautement nécessaire de nouveaux anti-infectieux, enjeu majeur de santé publique.

PARTIE 3

—

Données expérimentales

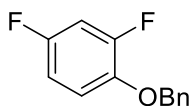
I. Chemistry

All commercial materials were used as received without further purification. Flash chromatography was carried out using Macherey–Nagel Kieselgel 60 M silica. Analytical thin-layer chromatography was realized using aluminum-backed plates coated with Macherey–Nagel Kieselgel 60 XtraSIL G/UV254 and were visualized under UV light (at 254 nm or 365 nm) or stained using ninhydrin. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on Bruker AV300, Bruker AV400 or Bruker AV500 spectrometers, operating at 300 MHz, 400 MHz and 500 MHz, respectively, for the proton (^1H) NMR and at 75 MHz, 100 MHz and 125 MHz, respectively, for the carbon (^{13}C) NMR. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) on a scale relative to residual solvent signals. Multiplicities are abbreviated as: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplets; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; td, triplet of doublets; ddd, doublet of doublet of doublets; m, multiplet. Coupling constants were measured in Hertz (Hz). High-resolution mass spectra (HRMS) and low-resolution mass spectra were obtained by the Centre Commun de Spectrométrie de Masse (CCSM), University of Lyon 1, Lyon, France. LogP calculations were performed using Molinspiration Cheminformatics free web services, <https://www.molinspiration.com>, Slovensky Grob, Slovakia.

1. Part 1 – Chapter 2

1.1. Procedures for 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide

1.1.1. 1-(Benzyloxy)-2,4-difluorobenzene (3)



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}$
Molecular Weight: 220,22

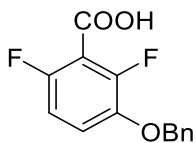
To a solution of 2,4-difluorophenol (38.43 mmol, 1.05 eq.) in acetonitrile (50 mL) were added benzyl bromide (36.60 mmol, 1.0 eq.), K_2CO_3 (60.80 mmol, 1.6 eq.) and NaI (3.84 mmol, 0.10 eq.). The solution was stirred at 70 °C for 16 h. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with water, extracted with Et_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was then purified by recrystallization in *n*-pentane to give the desired product as a white powder (7.221 g, 90% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.49 – 7.19 (m, 7H, ar H), 7.05 – 6.96 (m, 1H, H5), 5.15 (s, 2H, CH_2).

[Spectrum in accordance with Bi *et al.* 2019⁹⁷]

Partie 3 – Données expérimentales

1.1.2. 3-(Benzyloxy)-2,6-difluorobenzoic acid (4)



Chemical Formula: C₁₄H₁₀F₂O₃

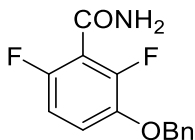
Molecular Weight: 264,23

To a solution of 1-(benzyloxy)-2,4-difluorobenzene (20.4 mmol, 1.0 eq.) in THF (30 mL) under a dried and inert atmosphere (N₂) at -78°C was added dropwise *n*-BuLi (1.6 M in THF, 22.5 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred at -78 °C for 1 h. The mixture was then added dropwise on crushed dry ice, and the solution was stirred at room temperature for 16 h. To the mixture was then added NaOH solution (2 M, 36 mL) and was extracted with Et₂O to remove unreacted reagent. The solution was then acidified with an HCl 2M solution, and the product was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give the desired product as a white powder (3.770 g, 84% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.97 (s, 1H, OH), 7.49 – 7.31 (m, 6H, ar H), 7.13 (td, *J* = 9.2, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.19 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Bi *et al.* 2019⁹⁷]

1.1.3. 3-(Benzyloxy)-2,6-difluorobenzamide (5)



Chemical Formula: C₁₄H₁₁F₂NO₂

Molecular Weight: 263,24

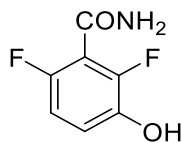
To a solution of 3-(benzyloxy)-2,6-difluorobenzoic acid (3.79 mmol, 1.0 eq.) in DCM (10 mL) were added two drops of DMF and dropwise oxalyl chloride (4.55 mmol, 1.2 eq.). The solution was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was then evaporated under vacuum and the residue was diluted with THF (2 mL) and was added dropwise to a solution of aqueous ammonia (37.9 mmol, 10 eq.) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 16 h. The THF was then evaporated under vacuum and the solution was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give the desired product as a white powder (925 mg, 93% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (s, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, NH), 7.48 – 7.22 (m, 6H, ar H), 7.06 (td, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.18 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Ghone *et al.* 2018³³⁰]

Partie 3 – Données expérimentales

1.1.4. 2,6-Difluoro-3-hydroxybenzamide (6)



Chemical Formula: C₇H₅F₂NO₂

Molecular Weight: 173,12

To a solution of 3-(benzyloxy)-2,6-difluorobenzamide (13.0 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (35 mL) was added ammonium formiate (78.0 mmol, 6.0 eq.) and palladium over activated carbon 10 % (3.25 mmol, 0.25 eq.). The mixture was stirred at 65 °C for 6 h. The solvent was then evaporated and the residue dissolved in MeOH, filtered on Celite® and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 1:1) to give the desired product as a white powder (1.886 g, 84% yield).

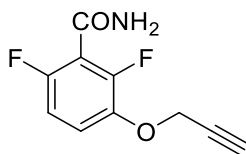
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.78 (s, 1H, OH), 7.42 (s, 1H, NH), 7.16 (s, 1H, NH), 7.02 (ddd, *J* = 9.6, 9.0, 5.4 Hz, 1H, H4), 6.87 (td, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 1H, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3 (CONH₂), 151.1 (dd, *J* = 238.5, 6.4 Hz, C6), 147.4 (dd, *J* = 245.3, 8.4 Hz, C2), 142.0 (dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, C3), 117.9 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, C4), 116.9 (dd, *J* = 24.6, 20.4 Hz, C1), 111.4 (dd, *J* = 22.8, 3.8 Hz, C5).

[Spectrum in accordance with Bi *et al.* 2019⁹⁷]

1.2. Procedures for 1,2,3-triazole derivatives from series I

1.2.1. 2,6-Difluoro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzamide (7)



Chemical Formula: C₁₀H₇F₂NO₂

Molecular Weight: 211,17

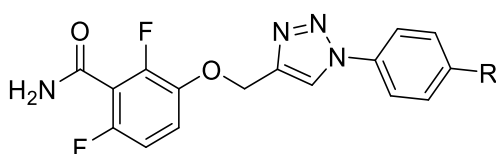
To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DMF (2 mL) was added K₂CO₃ (2.0 mmol, 2.0 eq.), NaI (0.10 mmol, 0.10 eq.) and propargyl bromide (1.3 mmol, 1.3 eq.). The solution was stirred at 35 °C for 3 h. The mixture was then diluted with water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 1:1) to give the desired product as a white powder (161 mg, 76% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.16 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, NH), 7.29 (td, $J = 9.1, 5.3$ Hz, 1H, H4), 7.12 (td, $J = 9.1, 1.9$ Hz, 1H, H5), 4.91 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.65 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH).

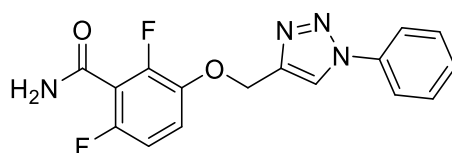
^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.2 (CONH_2), 152.3 (dd, $J = 241.8, 7.0$ Hz, C6), 148.2 (dd, $J = 248.5, 8.2$ Hz, C2), 141.5 (dd, $J = 10.8, 3.1$ Hz, C3), 116.7 (dd, $J = 24.9, 20.6$ Hz, C1), 116.3 (dd, $J = 9.6, 2.2$ Hz, C4), 110.9 (dd, $J = 23.0, 3.9$ Hz, C5), 79.1 (C- CH_2), 78.6 (CH), 57.0 (CH_2).

1.2.2. General procedure for 2,6-difluoro-3-((1-(phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)benzamides



To a solution of 4-substituted aniline (0.24 mmol, 1.0 eq.) in ACN (1 mL) at 0 °C was added dropwise tert-butyl nitrite (0.36 mmol, 1.5 eq.) and trimethylsilyl azide (0.28 mmol, 1.2 eq.). The solution was then stirred at room temperature for 3 h. Were then added to the solution 2,6-difluoro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzamide (0.24 mmol, 1.0 eq.) CuI (0.012 mmol, 0.05 eq.) and three drops of DIPEA. The mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was then evaporated, and the residue was purified by chromatography (eluent pentane/EtOAc 1:1).

2,6-Difluoro-3-((1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)benzamide (I.a)



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$

Molecular Weight: 330,29

White powder (69 mg, 70% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{Acetone-}d_6$) δ 8.71 (s, 1H, H5''), 7.97 – 7.87 (m, 2H, H2'), 7.69 – 7.56 (m, 2H, H3'), 7.55 – 7.48 (m, 1H, H4'), 7.47 – 7.38 (m, 2H, H4 + NH), 7.18 (s, 1H, NH), 6.99 (td, $J = 8.9, 1.9$ Hz, 1H, H5), 5.37 (s, 2H, CH_2).

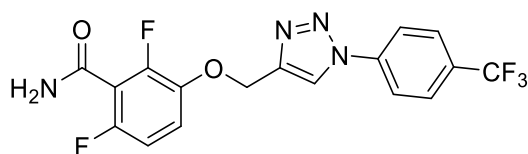
^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.4 (CONH_2), 152.1 (dd, $J = 241.5, 6.7$ Hz, C6), 148.1 (dd, $J = 248.6, 8.3$ Hz, C2), 143.2 (C4'), 142.5 (dd, $J = 10.9, 3.2$ Hz, C3), 136.6 (C4''), 130.0

Partie 3 – Données expérimentales

(C5''), 128.9 (C1'), 123.3 (C2'), 120.3 (C3'), 116.7 (dd, $J = 24.7, 20.6$ Hz, C1), 116.1 (d, $J = 9.2$ Hz, C4), 111.0 (dd, $J = 22.9, 3.9$ Hz, C5), 62.6 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₆H₁₃F₂N₄O₂ [M+H]⁺ 331.1001, found 331.0996.

2,6-Difluoro-3-((1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)benzamide (**I.b**)



Chemical Formula: C₁₇H₁₁F₅N₄O₂
Molecular Weight: 398,29

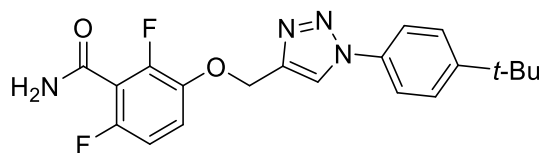
White powder (63 mg, 66% yield).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.87 (s, 1H, H5''), 8.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3'), 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2'), 7.48 (s, 1H, NH), 7.42 (td, $J = 9.1, 5.2$ Hz, 1H, H4), 7.21 (s, 1H, NH), 6.99 (td, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.39 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 162.2 (CONH₂), 153.9 (dd, $J = 242.8, 6.6$ Hz, C6), 150.0 (dd, $J = 250.2, 8.1$ Hz, C2), 145.1 (C4''), 143.8 (dd, $J = 11.1, 3.6$ Hz, C3), 140.7 (C1'), 130.7 (q, $J = 32.5$ Hz, C4'), 128.0 (q, $J = 3.9$ Hz, C3'), 125.3 (q, $J = 271.7$ Hz, CF₃), 123.5 (C5''), 121.6 (C2'), 117.6 (dd, $J = 9.5, 2.9$ Hz, C4), 117.8 – 117.1 (m, C1), 111.6 (dd, $J = 23.4, 4.3$ Hz, C5), 64.0 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₇H₁₁F₅N₄NaO₂ [M+Na]⁺ 421.0694, found 421.0681.

3-((1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide (**I.c**)



Chemical Formula: C₂₀H₂₀F₂N₄O₂
Molecular Weight: 386,40

Yellow powder (48 mg, 52% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

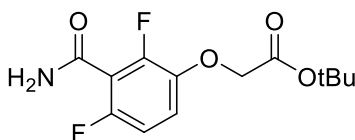
^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 8.67 (s, 1H, H5''), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H3'), 7.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H2'), 7.47 (s, 1H, NH), 7.42 (td, J = 9.1, 5.2 Hz, 1H, H4), 7.20 (s, 1H, NH), 6.99 (td, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.36 (s, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 162.2 (CONH₂), 153.9 (dd, J = 242.7, 6.5 Hz, C6), 152.7 (C4'), 150.0 (dd, J = 250.1, 8.2 Hz, C2), 144.5 (C4''), 143.9 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, C3), 135.7 (C1'), 127.5 (C3'), 123.2 (C5''), 120.9 (C2'), 117.5 (dd, J = 9.5, 2.8 Hz, C4), 117.6 – 117.3 (m, C1), 111.5 (dd, J = 23.2, 4.1 Hz, C5), 64.1 (CH₂), 35.3 (C *t*-Bu), 31.5 (CH₃).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₀H₂₁F₂N₄O₂ [M+H]⁺ 387.1627, found 387.1644.

1.3. Procedures for 1,2,4-oxadiazoles derivatives from series II

1.3.1. *Tert*-butyl 2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetate (9)



Chemical Formula: C₁₃H₁₅F₂NO₄
Molecular Weight: 287,26

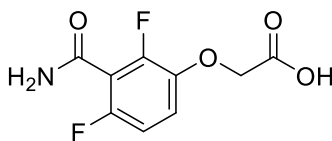
To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (2.2 mmol, 1.0 eq.) in acetone (4 mL) was added K₂CO₃ (4.4 mmol, 2.0 eq.) and *tert*-butyl bromoacetate (2.9 mmol, 1.3 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h, then the solvent was removed under vacuum. The crude material was retaken in water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 3:2) to give desired product as a white powder (760 mg, 78 % yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.48 (s, 1H, NH), 7.20 (s, 1H, NH), 7.13 (td, J = 9.2, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.95 (ddd, J = 9.2, 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.70 (s, 2H, CH₂), 1.46 (s, 9H, CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 167.3 (COO), 161.3 (CONH₂), 153.0 (dd, J = 242.7, 6.6 Hz, C6), 148.9 (dd, J = 250.2, 8.0 Hz, C2), 142.9 (dd, J = 11.0, 3.3 Hz, C3), 116.6 (dd, J = 24.3, 19.9 Hz, C1), 116.0 (dd, J = 9.4, 2.7 Hz, C4), 110.5 (dd, J = 23.5, 4.3 Hz, C5), 81.7 (CH₂), 66.5 (C *t*-Bu), 27.3 (CH₃).

Partie 3 – Données expérimentales

1.3.2. 2-(3-Carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetic acid (10)



Chemical Formula: C₉H₇F₂NO₄

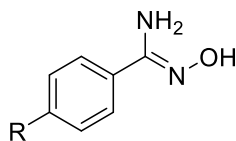
Molecular Weight: 231,15

To a solution of *tert*-butyl 2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetate (2.6 mmol, 1.0 eq.) in DCM (6 mL) was added TFA (210 mmol, 80 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 16 h, then co-evaporated under vacuum with toluene to give desired product as a white powder (607 mg, quantitative yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.13 (s, 1H, OH), 8.15 (s, 1H, NH), 7.85 (s, 1H, NH), 7.14 (td, *J* = 9.3, 5.3 Hz, 1H, H4), 7.04 (td, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H, H5), 4.79 (s, 2H, CH₂).

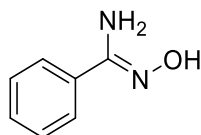
[Spectrum in accordance with Bi *et al.* 2019⁹⁷]

1.3.3. General procedure for *N'*-hydroxybenzimidamides



To a solution of 4-substituted benzonitrile (2.0 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (4 mL) was added triethylamine (3.0 mmol, 1.5 eq.) and hydroxylamine hydrochloride (3.0 mmol, 1.5 eq.). The solution was stirred at reflux for 2 h, and the solvent was then evaporated. The residue was dissolved in water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent pentane/EtOAc 2:1).

(Z)-*N'*-hydroxybenzimidamide (12a)



Chemical Formula: C₇H₈N₂O

Molecular Weight: 136,15

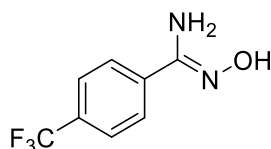
White powder (192 mg, 70% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 8.94 (s, 1H, OH), 7.77 – 7.68 (m, 2H, H2), 7.41 – 7.31 (m, 3H, H3 + H4), 5.47 (s, 2H, NH₂).

[Spectrum in accordance with Lin *et al.* 2014³³¹]

(Z)-N'-hydroxy-4-(trifluoromethyl)benzimidamide (12b)



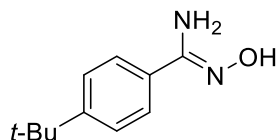
Chemical Formula: C₈H₇F₃N₂O
Molecular Weight: 204,15

White powder (338 mg, 83% yield).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.93 (s, 1H, OH), 7.90 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H2), 7.74 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H3), 5.99 (s, 2H, NH₂).

[Spectrum in accordance with Lin *et al.* 2014³³¹]

(Z)-4-(Tert-butyl)-N'-hydroxybenzimidamide (12c)



Chemical Formula: C₁₁H₁₆N₂O
Molecular Weight: 192,26

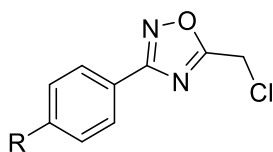
White powder (503 mg, 65%).

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 9.08 (s, 1H, OH), 7.66 (dt, J = 8.7, 1.9 Hz, 2H, H2), 7.42 (dt, J = 8.7, 1.9 Hz, 2H, H3), 5.47 (s, 2H, NH₂), 1.31 (s, 9H, *t*-Bu).

[Spectrum in accordance with Xu *et al.* 2018³³²]

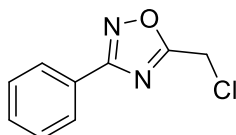
Partie 3 – Données expérimentales

1.3.4. General procedure for 5-(chloromethyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazoles



To a solution of 4-substituted *N'*-hydroxybenzimidamide (0.49 mmol, 1.03 eq.) and triethylamine (0.47 mmol, 1.0 eq.) in toluene (1 mL) at 0 °C was added dropwise chloroacetyl chloride (0.47 mmol, 1.0 eq.) diluted in toluene (1 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 min, and then at 110 °C for 4 h. The mixture was then cooled to room temperature, extracted with toluene, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give the desired product which was used without further purification.

5-(Chloromethyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazole (13a)



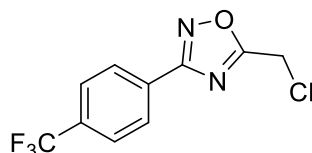
Chemical Formula: C₉H₇ClN₂O
Molecular Weight: 194,62

Translucent oil (93 mg, 65% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.13 – 8.02 (m, 2H, H₂), 7.62 – 7.41 (m, 3H, H₃ + H₄), 4.75 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Cai *et al.* 2015³³³]

5-(Chloromethyl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole (13b)



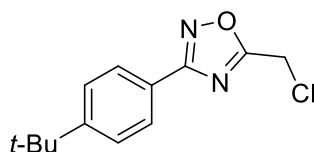
Chemical Formula: C₁₀H₆ClF₃N₂O
Molecular Weight: 262,62

Translucent oil (121 mg, 98% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.22 (dt, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H₂), 7.77 (dt, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H₃), 4.77 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Cai *et al.* 2015³³³]

3-(4-(Tert-butyl)phenyl)-5-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazole (13c)



Chemical Formula: C₁₃H₁₅ClN₂O

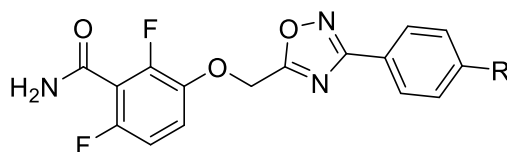
Molecular Weight: 250,73

Translucent oil (117 mg, 91% yield).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.01 (dt, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H₂), 7.51 (dt, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H₃), 4.74 (s, 2H, CH₂), 1.36 (s, 9H, *t*-Bu).

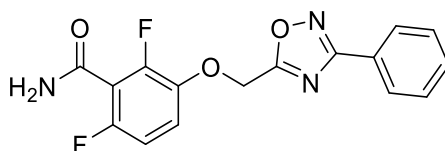
¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 174.3 (C5'), 168.9 (C3'), 155.2 (C1), 127.4 (C2), 126.0 (C3), 123.4 (C4), 35.1 (C *t*-Bu), 33.5 (CH₂), 31.3 (CH₃).

1.3.5. General procedure for 2,6-difluoro-3-((3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy)benzamides



To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.20 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1 mL) was added K₂CO₃ (0.40 mmol, 2.0 eq.) and 3-substituted-5-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazole (0.20 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at 35 °C for 3 h. The solution was extracted with EtOAc, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 1:1).

2,6-Difluoro-3-((3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy)benzamide (II.a)



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₂N₃O₃

Molecular Weight: 331,28

Orange powder (66 mg, 77% yield).

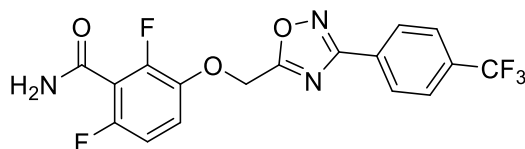
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 8.14 – 7.99 (m, 2H, H3'), 7.63 – 7.53 (m, 3H, H1' + H2'), 7.51 (s, 1H, NH), 7.42 (td, J = 9.2, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.21 (s, 1H, NH), 7.03 (ddd, J = 9.2, 8.6, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.65 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 176.0 (C5''), 169.3 (C3''), 161.8 (CONH₂), 154.6 (dd, J = 244.2, 6.6 Hz, C6), 150.2 (dd, J = 250.8, 8.3 Hz, C2), 143.3 (dd, J = 11.3, 3.4 Hz, C3), 132.5 (C1'), 130.0 (C2'), 128.1 (C3'), 127.3 (C4'), 118.1 (dd, J = 9.5, 2.2 Hz, C4), 117.8 (dd, J = 24.3, 20.1 Hz, C1), 111.9 (dd, J = 23.6, 4.1 Hz, C5), 63.7 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₆H₁₂F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 332.0841, found 332.0837.

2,6-Difluoro-3-((3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy)benzamide (II.b)



Chemical Formula: C₁₇H₁₀F₅N₃O₃

Molecular Weight: 399,28

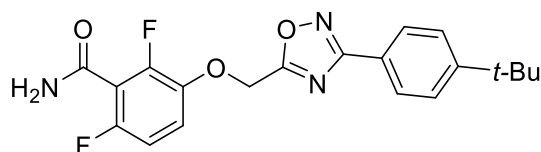
White powder (43 mg, 63% yield).

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 8.29 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H3'), 7.93 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H2'), 7.52 (s, 1H, NH), 7.43 (td, J = 9.0, 5.0 Hz, 1H, H4), 7.25 (s, 1H, NH), 7.03 (td, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.68 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 176.6 (C5''), 168.3 (C3''), 161.9 (CONH₂), 154.7 (dd, J = 244.2, 6.7 Hz, C6), 150.2 (dd, J = 251.0, 8.3 Hz, C2), 143.2 (dd, J = 11.4, 3.4 Hz, C3), 133.4 (q, J = 32.5 Hz, C4'), 131.1 (C1'), 128.9 (C2'), 127.0 (q, J = 3.8 Hz, C3'), 124.9 (q, J = 271.7 Hz, CF₃), 118.2 (dd, J = 9.6, 2.3 Hz, C4), 117.7 (dd, J = 24.5, 20.0 Hz, C1), 111.9 (dd, J = 23.6, 4.1 Hz, C5), 63.7 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₇H₁₁F₅N₃O₃ [M+H]⁺ 400.0715, found 400.0716.

3-((3-(4-(Tert-butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide (II.c)



Chemical Formula: C₂₀H₁₉F₂N₃O₃

Molecular Weight: 387,39

Partie 3 – Données expérimentales

White powder (60 mg, 78% yield).

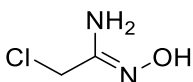
^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 8.03 – 7.97 (m, 2H, H3'), 7.65 – 7.59 (m, 2H, H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.41 (td, J = 9.3, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.21 (s, 1H, NH), 7.03 (ddd, J = 9.2, 8.6, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.63 (s, 2H, CH₂), 1.36 (s, 9H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 175.8 (C5''), 169.2 (C3''), 162.0 (CONH₂), 155.8 (C4'), 154.2 (dd, J = 244.2, 6.9 Hz, C6), 150.2 (dd, J = 250.9, 8.3 Hz, C2), 143.3 (dd, J = 11.1, 3.6 Hz, C3), 128.0 (C3'), 126.9 (C2'), 124.5 (C1'), 118.1 (dd, J = 9.6, 2.2 Hz, C4), 117.7 (d, J = 20.4 Hz, C1), 111.9 (dd, J = 23.7, 4.1 Hz, C5), 63.7 (CH₂), 35.5 (C *t*-Bu), 31.4 (CH₃).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₀H₂₀F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 388.1467, found 388.1473.

1.4. [Procedures for 1,2,4-oxadiazoles derivatives from series III](#)

1.4.1. [\(Z\)-2-Chloro-*N'*-hydroxyacetimidamide \(15\)](#)



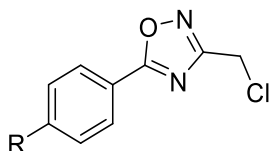
Chemical Formula: C₂H₅ClN₂O
Molecular Weight: 108,53

To a solution of hydroxylamine hydrochloride (20.0 mmol, 1.0 eq.) and Na₂CO₃ (10 mmol, 0.5 eq.) in water (6 mL) at 0 °C was added dropwise chloroacetonitrile (20.0 mmol, 1.0 eq.) over 2 h. The mixture was then stirred for two additional hours. The mixture was then extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 3:2) to give desired product as a white powder (713 mg, 33% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 6.29 (s, 1H, OH), 4.78 (s, 2H, NH₂), 4.05 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with McLeod *et al.* 2004³³⁴]

1.4.2. [General procedure for 3-\(chloromethyl\)-5-phenyl-1,2,4-oxadiazoles](#)

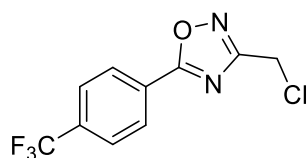


To a solution of 4-substituted benzoic acid (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DCM (4 mL) at 0 °C were added two drops of DMF and dropwise oxalyl chloride (1.2 mmol, 1.2 eq.). The solution was stirred at room temperature for 2 h, and the solvent was evaporated. The

Partie 3 – Données expérimentales

residue was dissolved in toluene (2 mL) and added dropwise to a solution of (*Z*)-2-chloro-*N'*-hydroxyacetimidamide (1.03 mmol, 1.03 eq.) and triethylamine (1.0 mmol, 1.0 eq.) in toluene (2 mL) at 0 °C. The solution was stirred at 0 °C for 15 min and then at 110 °C for 4 h. The mixture was then cooled to room temperature, extracted with toluene, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/ Et₂O 95:5).

3-(Chloromethyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole (16b)



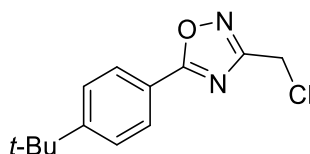
Chemical Formula: C₁₀H₆ClF₃N₂O
Molecular Weight: 262,62

Translucent oil (64 mg, 24% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.28 (dt, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 2H, H₂), 7.81 (dt, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 2H, H₃), 4.69 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Ye *et al.* 2019¹⁸⁷]

5-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazole (16c)



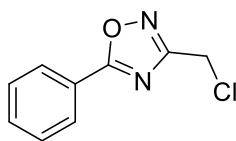
Chemical Formula: C₁₃H₁₅ClN₂O
Molecular Weight: 250,73

Translucent oil (29 mg, 12% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.09 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H₂), 7.69 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H₃), 4.84 (s, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 177.3 (C₅), 169.0 (C₃), 157.9 (C_{4'}), 128.7 (C_{2'}), 127.3 (C_{3'}), 121.9 (C_{1'}), 35.8 (C *t*-Bu), 35.5 (CH₂), 31.3 (CH₃).

3-(Chloromethyl)-5-phenyl-1,2,4-oxadiazole (16a)



Chemical Formula: C₉H₇ClN₂O

Molecular Weight: 194,62

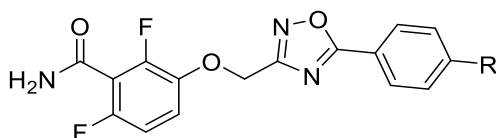
The first step consisted in adding benzoyl chloride (2.0 mmol, 1.0 eq.) dropwise to a solution of (*Z*)-2-chloro-*N'*-hydroxyacetimidamide (2.0 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (2.0 mmol, 1.0 eq.) in toluene (2 mL) at 0°C. The mixture was stirred at 0 °C for 15 min and then at 110 °C for 4 h. The next steps were as described before.

Translucent oil (183 mg, 48% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.20 – 8.11 (m, 2H, H2), 7.67 – 7.48 (m, 3H, H3 + H4), 4.68 (s, 2H, CH₂).

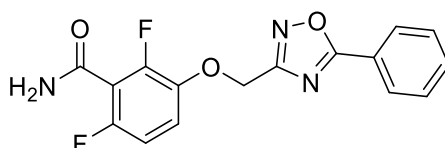
[Spectrum in accordance with Ye *et al.* 2019¹⁸⁷]

1.4.3. General procedure for 2,6-difluoro-3-((5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy)benzamides



To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.16 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1 mL) was added K₂CO₃ (0.32 mmol, 2.0 eq.) and 5-substituted-3-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazole (0.16 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at 35 °C for 3 h. The solution was extracted with EtOAc, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 1:1).

2,6-Difluoro-3-((5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy)benzamide (III.a)



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₂N₃O₃

Molecular Weight: 331,28

Partie 3 – Données expérimentales

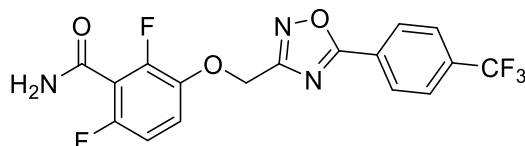
White powder (121 mg, 89% yield).

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 8.21 – 8.14 (m, 2H, H3'), 7.73 (tt, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, H1'), 7.65 (tt, J = 7.5, 1.4 Hz, 2H, H2'), 7.48 (s, 1H, NH), 7.41 (td, J = 9.0, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.18 (s, 1H, NH), 7.02 (td, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.42 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 177.2 (C5''), 168.2 (C3''), 162.0 (CONH₂), 154.4 (dd, J = 243.5, 6.5 Hz, C6), 150.2 (dd, J = 250.7, 8.2 Hz, C2), 143.6 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, C3), 134.2 (C1'), 130.6 (C2'), 128.9 (C3'), 124.7 (C4'), 117.9 (dd, J = 9.6, 2.3 Hz, C4), 117.7 (dd, J = 24.6, 20.2 Hz, C1), 111.7 (dd, J = 23.4, 4.2 Hz, C5), 63.7 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₆H₁₂F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 332.0841, found 332.0842.

2,6-Difluoro-3-((5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy)benzamide (III.b)



Chemical Formula: C₁₇H₁₀F₅N₃O₃

Molecular Weight: 399,28

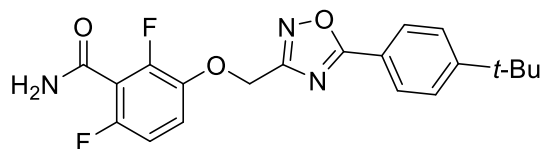
White powder (43 mg, 63% yield).

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 8.39 (dt, J = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H3'), 8.00 (dt, J = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.41 (td, J = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.23 (s, 1H, NH), 7.02 (td, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.46 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 175.9 (C5''), 168.4 (C3''), 162.0 (CONH₂), 154.4 (dd, J = 243.6, 6.5 Hz, C6), 150.2 (dd, J = 250.7, 8.2 Hz, C2), 143.5 (dd, J = 11.3, 3.6 Hz, C3), 134.6 (q, J = 32.6 Hz, C1'), 129.7 (C4'), 128.2 (C3'), 127.3 (q, J = 3.8 Hz, C2'), 124.7 (q, J = 272.0 Hz, CF₃), 118.0 (dd, J = 9.7, 2.4 Hz, C4), 117.6 (dd, J = 24.5, 20.0 Hz, C1), 111.7 (dd, J = 23.5, 4.2 Hz, C5), 63.7 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₇H₁₁F₅N₃O₃ [M+H]⁺ 400.0715, found 400.0709.

3-((5-(4-(Tert-butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide
(III.c)



Chemical Formula: C₂₀H₁₉F₂N₃O₃
 Molecular Weight: 387,39

White powder (28 mg, 62%).

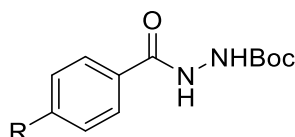
¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.09 (dt, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H3'), 7.69 (dt, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H2'), 7.48 (s, 1H, NH), 7.40 (td, *J* = 9.3, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.20 (s, 1H, NH), 7.01 (ddd, *J* = 9.3, 8.7, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.41 (s, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 177.2 (C5''), 168.1 (C3''), 162.0 (CONH₂), 157.8 (C4'), 154.3 (dd, *J* = 243.5, 6.5 Hz, C6), 150.2 (dd, *J* = 250.7, 8.2 Hz, C2), 143.6 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, C3), 128.7 (C2'), 127.3 (C3'), 122.0 (C1'), 117.9 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, C4), 117.6 (dd, *J* = 24.5, 20.0 Hz, C1), 111.7 (dd, *J* = 23.4, 4.2 Hz, C5), 63.8 (CH₂), 35.8 (C *t*-Bu), 31.3 (CH₃).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₀F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 388.1467, found 388.1473.

1.5. Procedures for 1,3,4-oxadiazoles derivatives from series IV

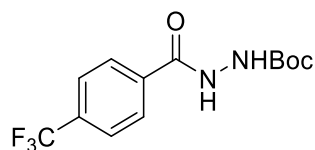
1.5.1. General procedure for *tert*-butyl 2-benzoylhydrazine-1-carboxylates



To a solution of 4-substituted benzoic acid (1.1 mmol, 1.1 eq.) and *tert*-butyl carbazate (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DCM (4 mL) at 0 °C were added gradually DMAP (0.13 mmol, 0.13 eq.) and DCC (1.2 mmol, 1.2 eq.). The solution was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was then filtered on Celite® and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 5:1).

Partie 3 – Données expérimentales

Tert-butyl 2-(4-(trifluoromethyl)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate (18b)



Chemical Formula: C₁₃H₁₅F₃N₂O₃

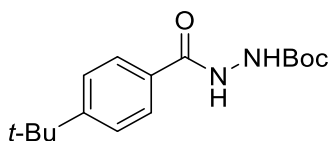
Molecular Weight: 304,27

White powder (216 mg, 71% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (s, 1H, NHCO), 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₂), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₃), 6.76 (s, 1H, NHBoc), 1.50 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.7 (CONH), 156.7 (CO Boc), 134.6 (C₁), 133.8 (q, *J* = 32.9 Hz, C₄), 127.9 (C₂), 125.6 (q, *J* = 3.7 Hz, C₃), 123.6 (q, *J* = 272.5 Hz, CF₃), 82.6 (C *t*-Bu), 28.2 (CH₃).

Tert-butyl 2-(4-(tert-butyl)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate (18c)



Chemical Formula: C₁₆H₂₄N₂O₃

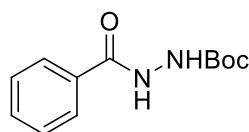
Molecular Weight: 292,38

White powder (205 mg, 70% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 9.35 (s, 1H, NHCO), 7.92 (s, 1H, NHBoc), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₂), 7.53 (dt, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H₃), 1.44 (s, 9H, *t*-Bu Boc), 1.34 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 166.4 (CONH), 155.8 (CO Boc), 155.0 (C₁), 130.3 (C₄), 127.3 (C₂), 125.3 (C₃), 79.5 (C *t*-Bu Boc), 34.6 (C *t*-Bu), 30.5 (CH₃ *t*-Bu), 27.6 (CH₃ Boc).

Tert-butyl 2-benzoylhydrazine-1-carboxylate (18a)



Chemical Formula: C₁₂H₁₆N₂O₃

Molecular Weight: 236,27

Partie 3 – Données expérimentales

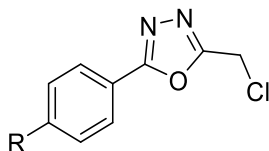
The first step consisted in adding benzoyl chloride (2.2 mmol, 1.1 eq.) dropwise to a solution of *tert*-butyl carbazate (2.0 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (4.4 mmol, 2.2 eq.) in DCM (3 mL) at 0°C. The mixture was stirred at room temperature for 6 h, and then washed with water, extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The purification was as described before.

White powder (321 mg, 68% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 9.49 (s, 1H, NHCO), 8.00 (s, 1H, NHBoc), 7.99 – 7.83 (m, 2H, H₂), 7.65 – 7.40 (m, 3H, H₃ + H₄), 1.44 (s, 9H, *t*-Bu).

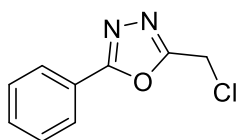
¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 167.4 (CONH), 156.6 (CO Boc), 133.9 (C₁), 132.5 (C₂), 129.3 (C₃), 128.2 (C₄), 80.4 (C *t*-Bu), 28.4 (CH₃).

1.5.2. [General procedure for 2-\(chloromethyl\)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazoles](#)



To a solution of 4-substituted *tert*-butyl 2-benzoylhydrazine-1-carboxylate (0.33 mmol, 1.0 eq.) in DCM (2 mL) was added trifluoroacetic acid (26.3 mmol, 80 eq.). The solution was stirred at room temperature for 16 h, and the TFA was then co-evaporated with toluene. The residue was then dissolved in toluene (2 mL) at 0 °C, and were then added triethylamine (0.72 mmol, 2.2 eq.) and dropwise chloroacetyl chloride (0.33 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at 0 °C for 15 min. Was then added POCl₃ (0.33 mmol, 1.0 eq.) and the solution was stirred at 110 °C for 4 h. The mixture was then cooled to room temperature, extracted with toluene, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/ Et₂O 4:1).

2-(Chloromethyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole (19a)



Chemical Formula: C₉H₇ClN₂O
Molecular Weight: 194,62

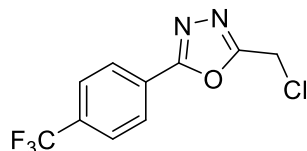
Translucent oil (24 mg, 15%).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 8.14 – 8.01 (m, 2H, H2), 7.68 – 7.54 (m, 3H, H3 + H4), 5.04 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Sharma *et al.* 2019³³⁵]

2-(Chloromethyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazole (19b)



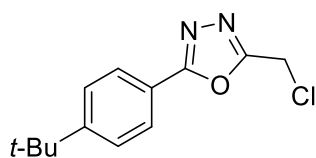
Chemical Formula: C₁₀H₆ClF₃N₂O
Molecular Weight: 262,62

Yellow oil (26 mg, 30% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.21 (dt, J = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H3), 7.80 (dt, J = 8.1, 0.8 Hz, 2H, H2), 4.81 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Sharma *et al.* 2019³³⁵]

2-(4-(Tert-butyl)phenyl)-5-(chloromethyl)-1,3,4-oxadiazole (19c)

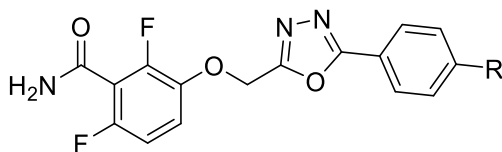


Chemical Formula: C₁₃H₁₅ClN₂O
Molecular Weight: 250,73

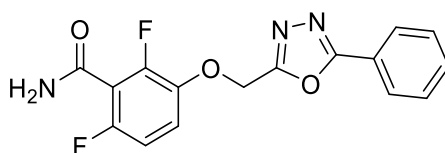
Orange oil (28 mg, 22% yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H2), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H3), 5.03 (s, 2H, CH₂), 1.36 (s, 9H, t -Bu).

[Spectrum in accordance with Natero *et al.* 2004³³⁶]

1.5.3. General procedure for 2,6-difluoro-3-((5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy)benzamides

To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.15 mmol, 1.3 eq.) in DMF (1 mL) was added K_2CO_3 (0.22 mmol, 2.0 eq.) and 5-substituted-2-(chloromethyl)-1,3,4-oxadiazole (0.11 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at 35 °C for 3 h. The solution was extracted with EtOAc, washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 1:1).

2,6-Difluoro-3-((5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy)benzamide (IV.a)

Chemical Formula: $C_{16}H_{11}F_2N_3O_3$
Molecular Weight: 331,28

White powder (19 mg, 48% yield).

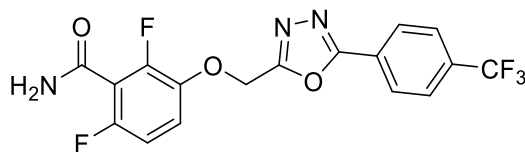
1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.10 – 8.04 (m, 2H, H3'), 7.68 – 7.58 (m, 3H, H1' + H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.46 (td, $J = 9.1, 5.1$ Hz, 1H, H4), 7.19 (s, 1H, NH), 7.04 (td, $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.56 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 166.4 (C4''), 163.1 (C2''), 161.9 (CONH₂), 155.1 (d, $J = 203.1$ Hz, C6), 150.3 (d, $J = 251.0$ Hz, C2), 143.3 (dd, $J = 11.6, 3.8$ Hz, C3), 133.0 (C1'), 130.2 (C2'), 127.7 (C3'), 124.6 (C4'), 118.5 (d, $J = 10.5$ Hz, C4), 118.1 – 117.4 (m, C1), 111.9 (dd, $J = 23.4, 4.4$ Hz, C5), 62.8 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{16}H_{12}F_2N_3O_3$ [M+H]⁺ 332.0841, found 332.0840.

Partie 3 – Données expérimentales

2,6-Difluoro-3-((5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy)benzamide (IV.b)



Chemical Formula: C₁₇H₁₀F₅N₃O₃

Molecular Weight: 399,28

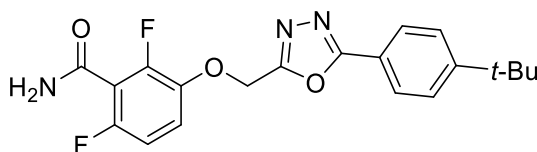
White powder (21 mg, 63% yield).

¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H3'), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H2'), 7.51 (s, 1H, NH), 7.46 (td, *J* = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.25 (s, 1H, NH), 7.04 (td, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.59 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 165.3 (C4''), 163.8 (C2''), 161.9 (CONH₂), 154.7 (dd, *J* = 244.2, 6.7 Hz, C6), 150.4 (dd, *J* = 250.7, 8.1 Hz, C2), 143.2 (dd, *J* = 11.5, 3.4 Hz, C3), 133.7 (q, *J* = 32.5 Hz, C4'), 128.5 (C2'), 128.3 (C1'), 127.2 (q, *J* = 3.8 Hz, C3'), 124.8 (q, *J* = 271.7 Hz, CF₃), 118.6 (dd, *J* = 9.6, 2.0 Hz, C4), 117.7 (dd, *J* = 24.3, 20.1 Hz, C1), 111.9 (dd, *J* = 23.5, 4.3 Hz, C5), 62.8 (CH₂).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₇H₁₁F₅N₃O₃ [M+H]⁺ 400.0715, found 400.0723.

3-((5-(4-(Tert-butyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide (IV.c)



Chemical Formula: C₂₀H₁₉F₂N₃O₃

Molecular Weight: 387,39

White powder (27 mg, 63% yield).

¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.99 (dt, *J* = 8.7, 1.9 Hz, 2H, H3'), 7.66 (dt, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 2H, H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.45 (td, *J* = 9.2, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.21 (s, 1H, NH), 7.04 (ddd, *J* = 9.2, 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.54 (s, 2H, CH₂), 1.36 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 166.4 (C4''), 162.8 (C2''), 161.9 (CONH₂), 156.5 (C4'), 154.6 (dd, *J* = 244.1, 6.6 Hz, C6), 150.4 (dd, *J* = 250.7, 8.2 Hz, C2), 143.2 (dd, *J* = 11.4, 3.5

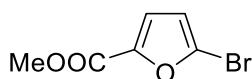
Partie 3 – Données expérimentales

Hz, C3), 127.6 (C3'), 127.2 (C2'), 121.8 (C1'), 118.5 (dd, $J = 9.6, 2.3$ Hz, C4), 117.7 (dd, $J = 24.6, 20.1$ Hz, C1), 111.9 (dd, $J = 23.6, 4.1$ Hz, C5), 62.7 (CH₂), 35.7 (C *t*-Bu), 31.3 (CH₃).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₀H₂₀F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 388.1467, found 388.1448.

1.6. [Procedures for furans from series V](#)

1.6.1. [Methyl 5-bromofuran-2-carboxylate \(21\)](#)



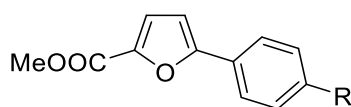
Chemical Formula: C₆H₅BrO₃
Molecular Weight: 205,01

To a solution of 5-bromo-2-furoic acid (15.0 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (20 mL) at 0 °C was added dropwise thionyl chloride (83 mmol, 5.5 eq.). The solution was stirred at 65 °C for 3 h and then cooled to room temperature. The solvent was evaporated and the residue retaken in saturated NaHCO₃ solution, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a white powder (2.864 g, 93% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.13 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H4), 6.46 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H3), 3.89 (s, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Zhu *et al.* 2013³³⁷]

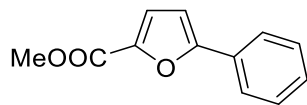
1.6.2. [General procedure for methyl 5-phenylfuran-2-carboxylates](#)



To a solution of methyl 5-bromofuran-2-carboxylate (1.0 mmol, 1.0 eq.), Na₂CO₃ (5.0 mmol, 5.0 eq.) and bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (0.03 mmol, 3.0 mol%) in isopropanol (8 mL) and water (2.5 mL) was added substituted boronic acid (1.25 mmol, 1.25 eq.) and was stirred at 80 °C for 4 h. The mixture was then diluted with water and extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 98:2).

Partie 3 – Données expérimentales

Methyl 5-phenylfuran-2-carboxylate (22a)



Chemical Formula: C₁₂H₁₀O₃

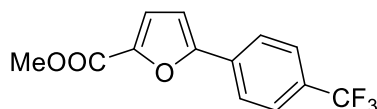
Molecular Weight: 202,21

White powder (349 mg, 86% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.82 – 7.76 (m, 2H, H2'), 7.48 – 7.39 (m, 2H, H3'), 7.38 – 7.31 (m, 1H, H4'), 7.25 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H4), 6.74 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H3), 3.92 (s, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Luo *et al.* 2020³³⁸]

Methyl 5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-carboxylate (22b)



Chemical Formula: C₁₃H₉F₃O₃

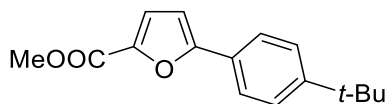
Molecular Weight: 270,21

White powder (424 mg, 79% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3'), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H2'), 7.27 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H4), 6.85 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H3), 3.93 (s, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Chiarelli *et al.* 2018³³⁹]

Methyl 5-(4-(tert-butyl)phenyl)furan-2-carboxylate (22c)



Chemical Formula: C₁₆H₁₈O₃

Molecular Weight: 258,32

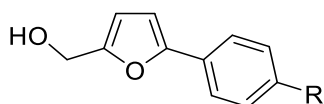
White powder (377 mg, 73% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.72 (dt, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 2H, H2'), 7.44 (dt, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 2H, H3'), 7.24 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H4), 6.69 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H3), 3.91 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 9H, *t*-Bu).

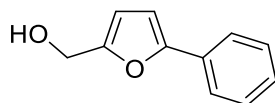
[Spectrum in accordance with Fu *et al.* 2011³⁴⁰]

1.6.3. General procedure for (5-phenylfuran-2-yl)methanol derivatives



To a solution of methyl 5-phenylfuran-2-carboxylate (0.42 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (3 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of 1 M lithium triethylborohydride (3.4 mmol, 8.0 eq.) and was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was then quenched with NH₄Cl, the solvent was evaporated and the residue was retaken in water, extracted with Et₂O, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 2:1).

(5-Phenylfuran-2-yl)methanol (23a)



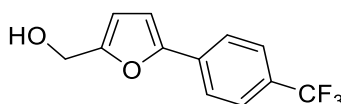
Chemical Formula: C₁₁H₁₀O₂
Molecular Weight: 174,20

Yellow powder (62 mg, 85% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.72 – 7.63 (m, 2H, H2'), 7.44 – 7.34 (m, 2H, H3'), 7.31 – 7.22 (m, 1H, H4'), 6.60 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H4), 6.38 (dt, $J = 3.3, 0.6$ Hz, 1H, H3), 4.67 (s, 2H, CH₂).

[Spectrum in accordance with Chacón-Huete *et al.* 2021³⁴¹]

(5-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)furan-2-yl)methanol (23b)



Chemical Formula: C₁₂H₉F₃O₂
Molecular Weight: 242,20

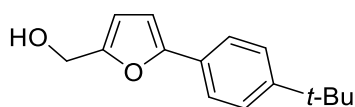
Orange powder (247 mg, 66% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.91 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H2'), 7.74 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H3'), 6.99 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H4), 6.45 (dt, J = 3.4, 0.7 Hz, 1H, H3), 4.62 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.39 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OH).

[Spectrum in accordance with Chacón-Huete *et al.* 2021³⁴¹]

(5-(4-(Tert-butyl)phenyl)furan-2-yl)methanol (23c)



Chemical Formula: C₁₅H₁₈O₂

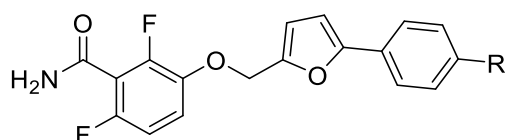
Molecular Weight: 230,31

White powder (273 mg, 82% yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.63 (dt, J = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H2'), 7.45 (dt, J = 8.8, 2.1 Hz, 2H, H3'), 6.70 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H4), 6.36 (dt, J = 3.3, 0.6 Hz, 1H, H3), 4.58 (dt, J = 5.9, 0.6 Hz, 2H, CH₂), 4.25 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OH), 1.32 (s, 9H, *t*-Bu).

[Spectrum in accordance with Li *et al.* 2016³⁴²]

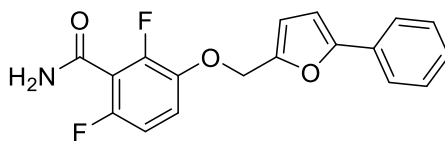
1.6.4. General procedure for 2,6-difluoro-3-((5-phenylfuran-2-yl)methoxy)benzamides



To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.40 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were added (5-phenylfuran-2-yl)methanol (0.50 mmol, 1.25 eq.), triphenylphosphine (0.56 mmol, 1.4 eq.) and DIAD (0.56 mmol, 1.4 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 4 h. The mixture was then washed with NaHCO₃ sat, extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 3:2).

Partie 3 – Données expérimentales

2,6-Difluoro-3-((5-phenylfuran-2-yl)methoxy)benzamide (V.a)



Chemical Formula: C₁₈H₁₃F₂NO₃

Molecular Weight: 329,30

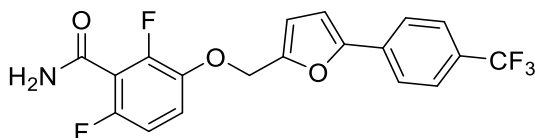
Orange powder (34 mg, 43% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.71 – 7.59 (m, 2H, H2'), 7.36 – 7.17 (m, 5H, H3' + H4' + H4 + NH), 7.08 (s, 1H, NH), 6.89 (ddd, *J* = 9.2, 8.7, 2.1 Hz, 1H, H5), 6.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H4''), 6.58 (dt, *J* = 3.3, 0.5 Hz, 1H, H3''), 5.12 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 162.2 (CONH₂), 155.4 (C2''), 154.0 (dd, *J* = 242.9, 6.5 Hz, C6), 150.5 (C5''), 150.3 (dd, *J* = 250.1, 8.2 Hz, C2), 143.8 (dd, *J* = 11.3, 3.5 Hz, C3), 131.4 (C4'), 129.7 (C3'), 128.6 (C1'), 124.6 (C2'), 118.0 (dd, *J* = 9.4, 2.9 Hz, C4), 117.5 (dd, *J* = 24.3, 20.2 Hz, C1), 114.0 (C3''), 111.5 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz, C5), 107.0 (C4''), 64.8 (CH₂).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₈H₁₄F₂NO₃ [M+H]⁺ 303.0936, found 330.0937.

2,6-Difluoro-3-((5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-yl)methoxy)benzamide (V.b)



Chemical Formula: C₁₉H₁₂F₅NO₃

Molecular Weight: 397,30

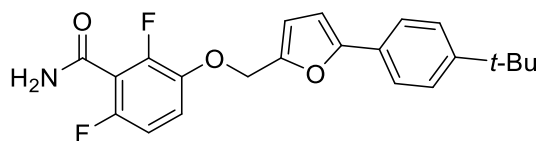
Yellow powder (67 mg, 42% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H2'), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3'), 7.44 (s, 1H, NH), 7.38 (td, *J* = 9.2, 5.2 Hz, 1H, H4), 7.16 (s, 1H, NH), 7.07 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H4''), 7.00 (ddd, *J* = 9.2, 8.7, 2.1 Hz, 1H, H5), 6.74 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H3''), 5.26 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 162.1 (CONH₂), 154.1 (dd, *J* = 242.5, 5.8 Hz, C6), 153.8 (C2''), 151.9 (C5''), 150.3 (dd, *J* = 250.1, 8.2 Hz, C2), 143.7 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, C3), 134.9 (C1'), 129.4 (q, *J* = 32.3 Hz, C4'), 126.7 (q, *J* = 4.0 Hz, C3'), 125.0 (C2'), 118.7 – 117.4 (m, C4 + C1), 114.2 (C3''), 111.6 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz, C5), 109.4 (C4''), 64.8 (CH₂).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₉H₁₃F₅NO₃ [M+H]⁺ 398.0810, found 398.0813.

3-((5-(4-(Tert-butyl)phenyl)furan-2-yl)methoxy)-2,6-difluorobenzamide (V.c)



Chemical Formula: C₂₂H₂₁F₂NO₃

Molecular Weight: 385,41

Yellow powder (46 mg, 30% yield).

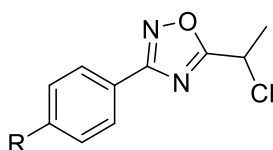
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.66 (dt, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 2H, H2'), 7.48 (dt, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 2H, H3'), 7.42 (s, 1H, NH), 7.37 (td, *J* = 9.2, 5.2 Hz, 1H, H4), 7.13 (s, 1H, NH), 7.00 (ddd, *J* = 9.2, 8.7, 2.1 Hz, 1H, H5), 6.79 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H4), 6.66 (dt, *J* = 3.4, 0.5 Hz, 1H, H3), 5.22 (s, 2H, CH₂), 1.33 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (126 MHz, Acetone-*d*₆) δ 162.2 (CONH₂), 155.6 (C2''), 154.0 (dd, *J* = 242.8, 6.7 Hz, C6), 151.6 (C5''), 150.3 (dd, *J* = 250.0, 8.2 Hz, C2), 150.2 (C1'), 143.7 (dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, C3), 128.7 (C4'), 126.5 (C3'), 124.5 (C2'), 118.0 (dd, *J* = 9.4, 2.9 Hz, C4), 117.5 (dd, *J* = 24.5, 20.3 Hz, C1), 114.0 (C3''), 111.5 (dd, *J* = 23.2, 4.1 Hz, C5), 106.3 (C4''), 64.8 (CH₂), 35.2 (C *t*-Bu), 31.5 (CH₃).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₂₂H₂₂F₂NO₃ [M+H]⁺ 386.1562, found 386.1560.

1.7. [Procedures for 1,2,4-oxadiazoles from series VI](#)

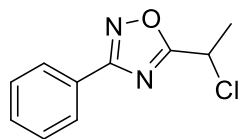
1.7.1. [General procedure for 5-\(1-chloroethyl\)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazoles](#)



To a solution of 4-substituted hydroxybenzimidamide (0.40 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (0.48 mmol, 1.2 eq.) in toluene (3 mL) at 0 °C was added dropwise chloropropionyl chloride (0.48 mmol, 1.2 eq.) diluted in toluene (1 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 min, and then at 110 °C for 4 h. The mixture was then cooled to room temperature, extracted with toluene, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 98:2).

Partie 3 – Données expérimentales

5-(1-Chloroethyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazole (24a)



Chemical Formula: C₁₀H₉ClN₂O

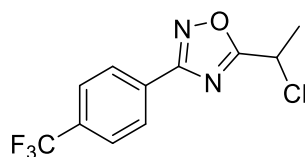
Molecular Weight: 208,65

Translucent oil (51 mg, 61% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.13 – 8.06 (m, 2H, H₂), 7.55 – 7.45 (m, 3H, H₃ + H₄), 5.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 2.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 177.8 (C5'), 168.8 (C3'), 131.6 (C1), 129.0 (C2), 127.6 (C3), 126.4 (C4), 45.9 (CH), 22.7 (CH₃).

5-(1-Chloroethyl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole (24b)



Chemical Formula: C₁₁H₈ClF₃N₂O

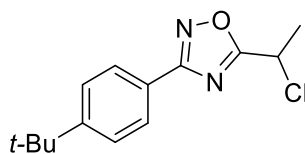
Molecular Weight: 276,64

Translucent oil (61 mg, 55% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.22 (dt, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 2H, H₂), 7.75 (dt, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 2H, H₃), 5.24 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 2.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 178.4 (C5'), 167.8 (C3'), 133.3 (q, *J* = 32.7 Hz, C4), 129.8 (C1), 128.0 (C2), 126.1 (q, *J* = 3.9 Hz, C3), 122.5 (q, *J* = 272.2 Hz, CF₃), 45.8 (CH), 22.6 (CH₃).

3-(4-(Tert-butyl)phenyl)-5-(1-chloroethyl)-1,2,4-oxadiazole (24c)



Chemical Formula: C₁₄H₁₇ClN₂O

Molecular Weight: 264,75

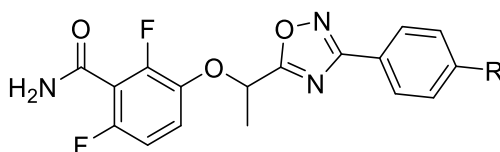
Partie 3 – Données expérimentales

Translucent oil (70 mg, 66% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02 (dt, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 2H, H2), 7.51 (dt, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 2H, H3), 5.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH), 2.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.36 (s, 9H, *t*-Bu).

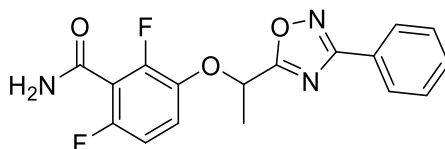
^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 177.6 (C5'), 168.7 (C3'), 155.1 (C4), 127.4 (C2), 126.0 (C3), 123.6 (C1), 45.9 (CH), 35.1 (C *t*-Bu), 31.3 (CH₃ *t*-Bu), 22.7 (CH₃).

1.7.2. General procedure for 2,6-difluoro-3-(1-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethoxy)benzamides



To a solution of 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.27 mmol, 1.1 eq.) in DMF (1 mL) was added K₂CO₃ (0.50 mmol, 2.0 eq.) and 3-substituted-5-(1-chloroethyl)-1,2,4-oxadiazole (0.25 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at 35 °C for 3 h. The solution was extracted with EtOAc, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 2:1).

2,6-Difluoro-3-(1-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethoxy)benzamide (VI.a)



Chemical Formula: C₁₇H₁₃F₂N₃O₃
Molecular Weight: 345,31

White powder (34 mg, 56% yield).

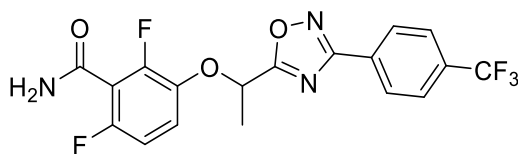
^1H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.11 – 8.03 (m, 2H, H3'), 7.65 – 7.50 (m, 4H, H1' + H2' + NH), 7.35 (td, $J = 9.2, 5.2$ Hz, 1H, H4), 7.30 (s, 1H, NH), 6.99 (td, $J = 9.0, 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.84 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH), 1.90 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 179.0 (C5''), 169.1 (C4''), 162.0 (CONH₂), 154.9 (dd, $J = 245.0, 6.6$ Hz, C6), 150.9 (dd, $J = 250.9, 8.6$ Hz, C2), 142.5 (dd, $J = 11.7, 3.6$ Hz, C3), 132.4 (C1'), 129.9 (C2'), 128.1 (C3'), 127.3 (C4'), 120.2 (dd, $J = 9.5, 2.2$ Hz, C4), 117.6 (dd, $J = 24.4, 20.3$ Hz, C1), 112.0 (dd, $J = 23.6, 4.0$ Hz, C5), 71.9 (CH), 19.6 (CH₃).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₇H₁₄F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 346.0998, found 346.0995.

Partie 3 – Données expérimentales

2,6-Difluoro-3-(1-(3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethoxy)benzamide (VI.b)



Chemical Formula: C₁₈H₁₂F₅N₃O₃
Molecular Weight: 413,30

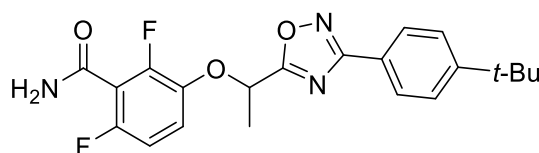
White powder (27 mg, 39% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.29 (m, 2H, H3'), 7.93 (m, 2H, H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.37 (td, *J* = 9.2, 5.2 Hz, 1H, H4), 7.21 (s, 1H, NH), 6.99 (ddd, *J* = 9.2, 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.88 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 1.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 179.6 (C5''), 168.2 (C4''), 162.0 (CONH₂), 155.0 (dd, *J* = 245.0, 6.6 Hz, C6), 151.0 (dd, *J* = 250.9, 8.6 Hz, C2), 142.5 (dd, *J* = 11.7, 3.6 Hz, C3), 133.4 (q, *J* = 32.3 Hz, C1'), 131.1 (C4'), 128.9 (C3'), 127.0 (q, *J* = 3.8 Hz, C2'), 123.6 (q, *J* = 271.4 Hz, CF₃), 120.4 (dd, *J* = 9.9, 2.5 Hz, C4), 117.7 (dd, *J* = 24.3, 20.4 Hz, C1), 112.0 (dd, *J* = 23.5, 4.3 Hz, C5), 72.0 (CH), 19.5 (CH₃).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₈H₁₃F₅N₃O₃ [M+H]⁺ 414.0872, found 414.0864.

3-(1-(3-(4-(Tert-butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethoxy)-2,6-difluorobenzamide (VI.c)



Chemical Formula: C₂₁H₂₁F₂N₃O₃
Molecular Weight: 401,41

White powder (67 mg, 66% yield).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.99 (dt, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H3'), 7.61 (dt, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H2'), 7.50 (s, 1H, NH), 7.34 (td, *J* = 9.1, 5.3 Hz, 1H, H4), 7.22 (s, 1H, NH), 6.99 (td, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H, H5), 5.83 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 1.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.36 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 178.9 (C5''), 169.0 (C4''), 161.9 (CONH₂), 155.8 (C4'), 154.9 (dd, *J* = 244.4, 6.6 Hz, C6), 151.0 (dd, *J* = 250.8, 8.3 Hz, C2), 142.5 (dd, *J* = 11.1, 3.7

Partie 3 – Données expérimentales

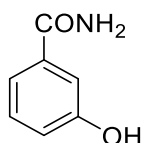
Hz, C3), 128.0 (C3'), 126.9 (C2'), 124.6 (C1'), 120.2 (dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz, C4), 117.7 (dd, $J = 24.5, 20.2$ Hz, C1), 111.9 (dd, $J = 23.9, 4.2$ Hz, C5), 71.9 (CH), 35.5 (C *t*-Bu), 31.4 (CH₃ *t*-Bu), 19.6 (CH₃).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₁H₂₂F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 402.1624, found 402.1616.

2. [Part 1 – Chapter 3](#)

2.1. [Procedures for benzamides from series VII](#)

2.1.1. [3-Hydroxybenzamide \(30\)](#)



Chemical Formula: C₇H₇NO₂

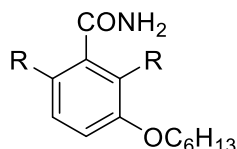
Molecular Weight: 137,14

To a solution of 3-hydroxybenzoic acid (36.2 mmol, 1.0 eq.) in thionyl chloride (480 mmol, 13.3 eq.) was added two drops of DMF and the solution was stirred at 70 °C for 4 h. Thionyl chloride was then evaporated under vacuum and the residue was retaken in THF (4 mL) and added dropwise to a 25 % aqueous ammonia solution (362 mmol, 10.0 eq.) at 0 °C. Mixture was stirred at room temperature for 16 h then extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a white powder (4.366 g, 88% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.49 (s, 1H, OH), 7.88 (s, 1H, NH), 7.32 – 7.25 (m, 3H, NH + H₂ + H₆), 7.22 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H₅), 6.90 (ddd, $J = 7.8, 2.5, 1.2$ Hz, 1H, H₄).

[Spectrum in accordance with Kim *et al.* 2018³⁴³]

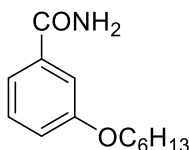
2.1.2. [General procedure for 3-\(hexyloxy\)benzamides](#)



To a solution of 1-bromohexane (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 3-hydroxybenzamide (1.1 mmol, 1.1 eq.) and K₂CO₃ (2.0 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in water, filtered, washed with saturated Na₂CO₃ solution and dried by suction to give desired product.

Partie 3 – Données expérimentales

3-(Hexyloxy)benzamide (VII.a)



Chemical Formula: C₁₃H₁₉NO₂

Molecular Weight: 221,30

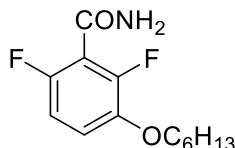
White powder (215 mg, 97% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.42 – 7.28 (m, 3H, H2 + H5 + H6), 7.06 (dt, *J* = 7.3, 2.4 Hz, 1H, H4), 6.04 (s, 1H, NH), 5.70 (s, 1H, NH), 4.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H1'), 1.79 (dq, *J* = 8.2, 6.6 Hz, 2H, H2'), 1.52 – 1.39 (m, 2H, H3'), 1.39 – 1.28 (m, 4H, H4' + H5'), 0.97 – 0.83 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.8 (CONH₂), 159.5 (C3), 134.9 (C1), 129.7 (C5), 119.2 (C6), 118.8 (C4), 113.3 (C2), 68.3 (C1'), 31.7 (C2'), 29.3 (C3'), 25.8 (C4'), 22.7 (C5'), 14.1 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₂₀NO₂ [M+H]⁺ 222.1489, found 222.1489.

2,6-Difluoro-3-(hexyloxy)benzamide (VII.b)



Chemical Formula: C₁₃H₁₇F₂NO₂

Molecular Weight: 257,28

White powder (196 mg, 95% yield).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.96 (td, *J* = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.83 (td, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H, H5), 6.71 (s, 1H, NH), 6.15 (s, 1H, NH), 3.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H1'), 1.84 – 1.72 (m, 2H, H2'), 1.50 – 1.37 (m, 2H, H3'), 1.36 – 1.28 (m, 4H, H4' + H5'), 0.94 – 0.86 (m, 3H, H6').

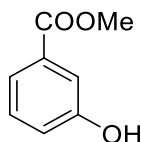
¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.8 (CONH₂), 153.4 (dd, *J* = 246.2, 5.4 Hz, C6), 150.1 (dd, *J* = 253.8, 6.9 Hz, C2), 144.1 (dd, *J* = 11.2, 3.4 Hz, C3), 117.1 (dd, *J* = 9.7, 3.5 Hz, C4), 114.1 (dd, *J* = 20.4, 16.6 Hz, C1), 111.1 (dd, *J* = 23.5, 4.2 Hz, C5), 70.6 (C1'), 31.6 (C2'), 29.2 (C3'), 25.6 (C4'), 22.6 (C5'), 14.1 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₁₈F₂NO₂ [M+H]⁺ 258.1300, found 258.1299.

2.2. Procedures for 3-(hexyloxy)benzoic acids

2.2.1. Procedures for 3-(hexyloxy)benzoic acid

Methyl 3-hydroxybenzoate (31)



Chemical Formula: C₈H₈O₃

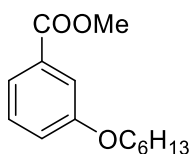
Molecular Weight: 152,15

To a solution of 3-hydroxybenzoic acid (15.0 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (20 mL) at 0 °C was added dropwise thionyl chloride (75.0 mmol, 5.0 eq.). The solution was stirred at 65 °C for 3 h and then cooled to room temperature. The solvent was evaporated and the residue retaken in saturated NaHCO₃ solution, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a white powder (2.014 g, 88 % yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.67 (s, 1H, OH), 7.52 – 7.46 (m, 2H, H2 + H6), 7.33 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 0.9 Hz, 1H, H5), 7.09 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 1.3 Hz, 1H, H4), 3.86 (s, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Gill *et al.* 2021³⁴⁴]

Methyl 3-(hexyloxy)benzoate (32)



Chemical Formula: C₁₄H₂₀O₃

Molecular Weight: 236,31

To a solution of methyl 3-hydroxybenzoate (13.2 mmol, 1.1 eq.) in acetonitrile (15 mL) were added 1-bromohexane (1.6 mmol, 1.0 eq.), K₂CO₃ (20.1 mmol, 1.6 eq.) and NaI (1.3 mmol, 0.10 eq.). The solution was stirred at 70 °C for 7 h. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with water, extracted with Et₂O, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a translucent oil (1.719 g, 58% yield).

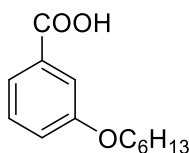
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.57 (ddd, *J* = 7.6, 1.6, 1.1 Hz, 1H, H6), 7.52 – 7.50 (m, 1H, H2), 7.40 (ddd, *J* = 8.2, 7.6, 0.5 Hz, 1H, H5), 7.18 (ddd, *J* = 8.2, 2.7, 1.1 Hz, 1H, H4),

Partie 3 – Données expérimentales

4.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H1'), 3.87 (s, 3H, CH₃), 1.86 – 1.72 (m, 2H, H2'), 1.56 – 1.43 (m, 2H, H3'), 1.40 – 1.32 (m, 4H, H4' + H5'), 0.95 – 0.87 (m, 3H, H6').

[Spectrum in accordance with Cavedon *et al.* 2019³⁴⁵]

3-(Hexyloxy)benzoic acid (33)



Chemical Formula: C₁₃H₁₈O₃

Molecular Weight: 222,28

To a solution of methyl 3-(hexyloxy)benzoate (6.9 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (10 mL) was added a solution of NaOH 2N (13.9 mmol, 2.0 eq.). The solution was stirred at room temperature for 16 h, concentrated under vacuum, diluted with H₂O, acidified with HCl 1 N, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a white powder (1.437 g, 93% yield).

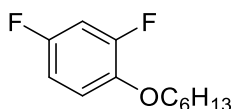
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 11.22 (s, 1H, OH), 7.61 (ddd, $J = 7.6, 1.5, 1.0$ Hz, 1H, H6), 7.55 (dd, $J = 2.7, 1.5$ Hz, 1H, H2), 7.41 (ddd, $J = 8.2, 7.6, 0.4$ Hz, 1H, H5), 7.18 (ddd, $J = 8.2, 2.7, 1.0$ Hz, 1H, H4), 4.06 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H1'), 1.86 – 1.74 (m, 2H, H2'), 1.56 – 1.43 (m, 2H, H3'), 1.40 – 1.29 (m, 4H, H4' + H5'), 0.95 – 0.85 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 167.6 (COOH), 160.2 (C3), 132.8 (C1), 130.4 (C5), 122.6 (C6), 120.3 (C4), 115.8 (C2), 68.8 (C1'), 32.3 (C2'), 29.9 (C3'), 26.4 (C4'), 23.3 (C5'), 14.3 (C6').

MS (ESI) $m/z = 223.3$ [M+H]⁺, 245.2 [M+Na]⁺.

2.2.2. Procedures for 2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzoic acid

2,4-Difluoro-1-(hexyloxy)benzene (34)



Chemical Formula: C₁₂H₁₆F₂O

Molecular Weight: 214,26

See procedure for methyl 3-(hexyloxy)benzoate (32), paragraph 2.2.1.

Translucent oil (1.648 g, 77% yield).

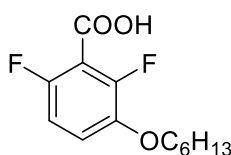
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.14 (td, $J = 9.3, 5.4$ Hz, 1H, H4), 7.04 (ddd, $J = 11.5, 8.7, 3.0$ Hz, 1H, H1), 6.96 – 6.86 (m, 1H, H5), 4.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H1'), 1.86 – 1.70 (m, 2H, H2'), 1.55 – 1.42 (m, 2H, H3'), 1.39 – 1.29 (m, 4H, H4' + H5'), 0.94 – 0.86 (m, 3H, H6').

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 157.0 (dd, $J = 239.3, 10.5$ Hz, C6), 153.2 (dd, $J = 247.5, 12.2$ Hz, C2), 144.8 (dd, $J = 10.7, 3.4$ Hz, C3), 116.6 (dd, $J = 9.5, 3.1$ Hz, C4), 111.3 (dd, $J = 22.3, 4.1$ Hz, C5), 105.3 (dd, $J = 27.2, 22.4$ Hz, C1), 70.6 (C1'), 32.3 (C2'), 30.0 (C3'), 26.3 (C4'), 23.3 (C5'), 14.3 (C6').

HRMS (EI) m/z : calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{O}$ $[\text{M}]^+$ 258.1300, found 258.1299.

2,6-Difluoro-3-(hexyloxy)benzoic acid (35)



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{O}_3$

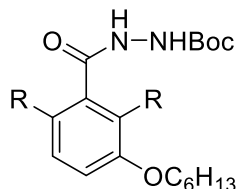
Molecular Weight: 258,26

To a solution of 2,4-difluoro-1-(hexyloxy)benzene (7.4 mmol, 1.0 eq.) in THF (15 mL) under a dried and inert atmosphere (N_2) at -78°C was added dropwise $n\text{-BuLi}$ (1.6 M in THF, 8.1 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred at -78°C for 1 h. The mixture was then added dropwise on crushed dry ice, and the solution was stirred at room temperature for 2 h. To the mixture was then added NaOH solution (2 M, 11 mL) and was extracted with Et_2O to remove unreacted reagent. The solution was then acidified with an HCl 2 M solution, and the product was extracted with EtOAc , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to give the desired product as an orange oil (1.096 g, 58% yield).

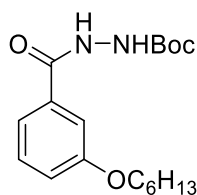
^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 10.34 (s, 1H, OH), 7.24 (td, $J = 9.2, 5.2$ Hz, 1H, H4), 6.99 (td, $J = 9.2, 2.0$ Hz, 1H, H5), 4.06 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H1'), 1.77 (dq, $J = 8.2, 6.5$ Hz, 2H, H2'), 1.52 – 1.40 (m, 2H, H3'), 1.36 – 1.27 (m, 4H, H4' + H5'), 0.92 – 0.82 (m, 3H, H6').

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 162.5 (COOH), 153.6 (dd, $J = 245.9, 5.5$ Hz, C6), 150.0 (dd, $J = 254.1, 6.9$ Hz, C2), 144.9 (dd, $J = 10.7, 3.3$ Hz, C3), 117.9 (dd, $J = 9.6, 3.3$ Hz, C4), 113.4 (dd, $J = 21.3, 16.9$ Hz, C1), 111.8 (dd, $J = 22.8, 4.3$ Hz, C5), 70.7 (C1'), 32.2 (C2'), 29.9 (C3'), 26.3 (C4'), 23.3 (C5'), 14.3 (C6').

MS (ESI) $m/z = 259.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 281.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3. Procedures for hydrazides from series VIII2.3.1. General procedure for *tert*-butyl 2-(3-(hexyloxy)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate

To a solution of *tert*-butyl carbazate (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DCM (10 mL) at 0 °C was added 3-(hexyloxy)benzoic acid (1.1 mmol, 1.1 eq.), DMAP (0.13 mmol, 0.13 eq.) and progressively DCC (1.2 mmol, 1.2 eq.). The mixture was then stirred at room temperature for 16 h, filtered on Celite® and washed with DCM. The filtrate was then concentrated and the residue purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 2:1).

Tert-butyl 2-(3-(hexyloxy)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate (36a)

Chemical Formula: C₁₈H₂₈N₂O₄
Molecular Weight: 336,43

White powder (214 mg, 64% yield).

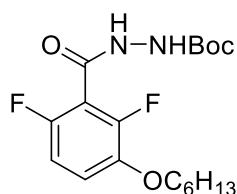
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 9.41 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, NHBoc), 7.51 – 7.44 (m, 2H H₂ + H₆), 7.38 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, 0.7 Hz, 1H, H₅), 7.11 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 1.1 Hz, 1H, H₄), 4.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H₁'), 1.85 – 1.72 (m, 2H, H₂'), 1.44 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.40 – 1.32 (m, 6H, H₃' + H₄' + H₅'), 0.94 – 0.86 (m, 3H, H₆').

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 167.2 (CONH), 160.0 (C₃), 156.7 (CO Boc), 134.8 (C₁), 130.2 (C₅), 120.1 (C₆), 119.1 (C₄), 113.6 (C₂), 80.5 (C *t*-Bu), 68.6 (C₁'), 32.2 (C₂'), 29.8 (CH₃ *t*-Bu), 28.4 (C₃'), 26.3 (C₄'), 23.2 (C₅'), 14.3 (C₆').

MS (ESI) *m/z* = 337.3 [M+H]⁺, 359.3 [M+Na]⁺.

Partie 3 – Données expérimentales

Tert-butyl 2-(2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate (36b)



Chemical Formula: C₁₈H₂₆F₂N₂O₄
Molecular Weight: 372,41

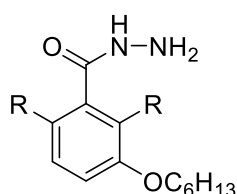
White powder (136 mg, 52% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 9.39 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, NHBoc), 7.24 (td, *J* = 9.3, 5.2 Hz, 1H, H4), 6.98 (td, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H, H5), 4.08 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H1'), 1.84 – 1.72 (m, 2H, H2'), 1.46 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.40 – 1.27 (m, 6H, H3' + H4' + H5'), 0.96 – 0.86 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 160.5 (CONH), 155.9 (COBoc), 153.7 (dd, *J* = 243.6, 6.0 Hz, C6), 150.2 (dd, *J* = 251.5, 7.7 Hz, C2), 144.8 (dd, *J* = 10.8, 3.4 Hz, C3), 117.4 (dd, *J* = 9.3, 3.0 Hz, C4), 115.1 (dd, *J* = 23.9, 19.5 Hz, C1), 111.6 (dd, *J* = 22.8, 4.2 Hz, C5), 80.7 (C *t*-Bu), 70.7 (C1'), 32.2 (C2'), 29.6 (CH₃ *t*-Bu), 28.4 (C3'), 26.3 (C4'), 23.2 (C5'), 14.3 (C6').

MS (ESI) *m/z* = 395.1 [M+Na]⁺.

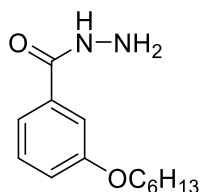
2.3.2. General procedure for 3-(hexyloxy)benzohydrazides



To a solution of tert-butyl 2-(3-(hexyloxy)benzoyl)hydrazine-1-carboxylate (0.30 mmol, 1.0 eq.) in DCM (3 mL) was added TFA (12.0 mmol, 40 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h and then co-evaporated with toluene. The residue was retaken in sat. NaHCO₃ solution, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄, concentrated and purified by chromatography (eluent: EtOAc 100%).

Partie 3 – Données expérimentales

3-(Hexyloxy)benzohydrazide (VIII.a)



Chemical Formula: C₁₃H₂₀N₂O₂
Molecular Weight: 236,32

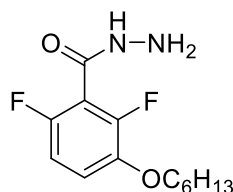
White powder (29 mg, 41% yield).

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.37 – 7.29 (m, 3H, H2 + H5 + H6), 7.08 – 7.02 (m, 1H, H4), 4.00 (td, *J* = 6.5, 1.3 Hz, 2H, H1'), 1.83 – 1.68 (m, 2H, H2'), 1.54 – 1.41 (m, 2H, H3'), 1.40 – 1.33 (m, 4H, H4'+H5'), 0.96 – 0.88 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169.5 (CONH), 160.7 (C3), 135.5 (C1), 130.7 (C5), 120.1 (C6), 119.1 (C4), 114.0 (C2), 69.2 (C1'), 32.7 (C2'), 30.3 (C3'), 26.8 (C4'), 23.7 (C5'), 14.4 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₂₁N₂O₂ [M+H]⁺ 237.1598, found 237.1600.

2,6-Difluoro-3-(hexyloxy)benzohydrazide (VIII.b)



Chemical Formula: C₁₃H₁₈F₂N₂O₂
Molecular Weight: 272,30

White powder (51 mg, 94% yield).

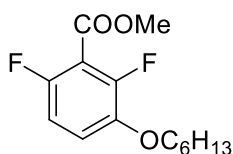
¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.17 (tdd, *J* = 9.2, 5.2, 2.0 Hz, 1H, H4), 6.95 (ddd, *J* = 9.2, 8.7, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.04 (td, *J* = 6.4, 2.4 Hz, 2H, H1'), 1.84 – 1.72 (m, 2H, H2'), 1.56 – 1.43 (m, 2H, H3'), 1.41 – 1.28 (m, 4H, H4' + H5'), 1.00 – 0.86 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 162.3 (CONH), 154.1 (dd, *J* = 243.2, 5.7 Hz, C6), 150.7 (dd, *J* = 251.2, 7.5 Hz, C2), 145.2 (dd, *J* = 10.8, 3.2 Hz, C3), 117.8 (dd, *J* = 9.4, 3.1 Hz, C4), 115.2 (dd, *J* = 23.7, 19.1 Hz, C1), 111.8 (dd, *J* = 22.9, 4.2 Hz, C5), 71.3 (C1'), 32.7 (C2'), 30.3 (C3'), 26.7 (C4'), 23.7 (C5'), 14.4 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₁₉F₂N₂O₂ [M+H]⁺ 273.1409, found 273.1411.

2.4. Procedures for hydroxamic acids from series IX

2.4.1. Methyl 2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzoate (37)



Chemical Formula: C₁₄H₁₈F₂O₃
Molecular Weight: 272,29

See procedure for methyl 3-hydroxybenzoate (31), paragraph 2.2.1.

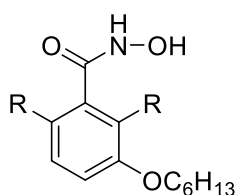
Orange oil (387 mg, 84% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.99 (td, *J* = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.82 (td, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H, H5), 3.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H1'), 3.93 (s, 3H, CH₃), 1.82 – 1.69 (m, 2H, H2'), 1.50 – 1.36 (m, 2H, H3'), 1.36 – 1.24 (m, 4H, H4' + H5'), 0.93 – 0.81 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.1 (COO), 153.8 (dd, *J* = 249.0, 4.9 Hz, C6), 150.7 (dd, *J* = 257.2, 6.4 Hz, C2), 144.1 (dd, *J* = 10.8, 3.5 Hz, C3), 117.8 (dd, *J* = 9.6, 3.5 Hz, C4), 111.8 (dd, *J* = 19.8, 15.9 Hz, C1), 110.9 (dd, *J* = 22.9, 4.4 Hz, C5), 70.6 (C1'), 52.9 (CH₃), 31.6 (C2'), 29.2 (C3'), 25.6 (C4'), 22.6 (C5'), 14.0 (C6').

MS (ESI) *m/z* = 273.1 [M+H]⁺, 295.1 [M+Na]⁺.

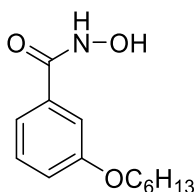
2.4.2. General procedure for 3-(hexyloxy)-*N*-hydroxybenzamide



To a solution of hydroxylamine hydrochloride (1.7 mmol, 2.0 eq.) in water (3 mL) at 0 °C was added NaOH (4.25 mmol, 5.0 eq.) and dropwise methyl 3-(hexyloxy)benzoate (0.85 mmol, 1.0 eq.) dissolved in 1,4-dioxane (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 16 h. 1,4-dioxane is then removed under vacuum and the mixture is diluted with water, acidified to pH 6 with HCl 2 M and filtered. The obtained solid is then purified by chromatography (eluent: EtOAc/pentane 3:1).

Partie 3 – Données expérimentales

3-(Hexyloxy)-N-hydroxybenzamide (IX.a)



Chemical Formula: C₁₃H₁₉NO₃
Molecular Weight: 237,30

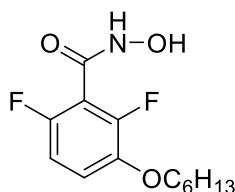
Orange powder (72 mg, 36% yield).

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.38 – 7.25 (m, 3H, H2 + H5 + H6), 7.08 – 7.02 (m, 1H, H4), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H1'), 1.81 – 1.71 (m, 2H, H2'), 1.52 – 1.42 (m, 2H, H3'), 1.42 – 1.30 (m, 4H, H4' + H5'), 0.95 – 0.88 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 168.0 (CONH), 160.7 (C3), 134.7 (C1), 130.7 (C5), 120.0 (C6), 119.2 (C4), 113.9 (C2), 69.2 (C1'), 32.7 (C2'), 30.3 (C3'), 26.8 (C4'), 23.7 (C5'), 14.4 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₂₀NO₃ [M+H]⁺ 238.1438, found 238.1438.

2,6-Difluoro-3-(hexyloxy)-N-hydroxybenzamide (IX.b)



Chemical Formula: C₁₃H₁₇F₂NO₃
Molecular Weight: 273,28

Orange powder (77 mg, 47% yield).

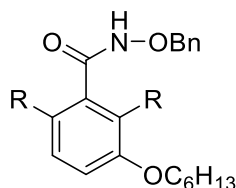
¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.18 (td, *J* = 9.3, 5.2 Hz, 1H, H4), 6.95 (td, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H1'), 1.86 – 1.70 (m, 2H, H2'), 1.54 – 1.43 (m, 2H, H3'), 1.43 – 1.26 (m, 4H, H4' + H5'), 0.96 – 0.88 (m, 3H, H6').

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 160.0 (CONH), 154.2 (dd, *J* = 243.3, 5.7 Hz, C6), 150.8 (dd, *J* = 251.5, 7.3 Hz, C2), 145.2 (dd, *J* = 10.8, 3.3 Hz, C3), 118.0 (dd, *J* = 9.2, 3.0 Hz, C4), 114.0 (dd, *J* = 23.9, 19.5 Hz, C1), 111.8 (dd, *J* = 22.8, 4.1 Hz, C5), 71.2 (C1'), 32.7 (C2'), 30.23 (C3'), 26.7 (C4'), 23.6 (C5'), 14.4 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₃H₁₈F₂NO₃ [M+H]⁺ 274.1249, found 274.1253.

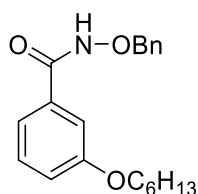
Partie 3 – Données expérimentales

2.4.3. General procedures for *N*-(benzyloxy)-3-(hexyloxy)benzamide



To a solution of *O*-benzylhydroxylamine hydrochloride (1.0 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) at 0 °C was added 3-(hexyloxy)benzoic acid (1.0 mmol, 1.0 eq.), DMAP (1.13 mmol, 1.13 eq.) and progressively DCC (1.2 mmol, 1.2 eq.). The mixture was then stirred at room temperature for 16 h, filtered on Celite® and washed with DCM. The filtrate was then concentrated and the residue purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 9:1).

N-(benzyloxy)-3-(hexyloxy)benzamide (38a)



Chemical Formula: C₂₀H₂₅NO₃
Molecular Weight: 327,42

White powder (244 mg, 75 % yield).

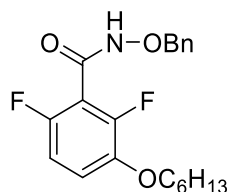
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 10.77 (s, 1H, NH), 7.53 – 7.45 (m, 2H, H₂+H₆), 7.43 – 7.29 (m, 6H, H₅ + H_{Benzyle}), 7.09 (dt, *J* = 6.0, 2.9 Hz, 1H, H₄), 5.01 (s, 2H, CH₂), 4.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H_{1'}), 1.84 – 1.70 (m, 2H, H_{2'}), 1.55 – 1.42 (m, 2H, H_{3'}), 1.40 – 1.30 (m, 4H, H_{4'} + H_{5'}), 0.97 – 0.80 (m, 3H, H_{6'}).

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 165.8 (CONH), 160.0 (C₃), 136.9 (C₁_{Benzyle}), 134.7 (C₁), 130.3 (C₅), 129.8 (C₂_{Benzyle}), 129.0 (C₃_{Benzyle} + C₄_{Benzyle}), 119.9 (C₆), 118.8 (C₄), 113.6 (C₂), 78.3 (CH_z), 68.6 (C_{1'}), 32.2 (C_{2'}), 29.8 (C_{3'}), 26.3 (C_{4'}), 23.2 (C_{5'}), 14.3 (C_{6'}).

MS (ESI) *m/z* = 328.3 [M+H]⁺, 350.2 [M+Na]⁺.

Partie 3 – Données expérimentales

N-(benzyloxy)-2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzamide (**38b**)



Chemical Formula: C₂₀H₂₃F₂NO₃
Molecular Weight: 363,40

White powder (85 mg, 60 % yield).

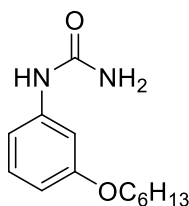
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 10.76 (s, 1H, NH), 7.54 – 7.46 (m, 2H, H_{Benzyle}), 7.44 – 7.31 (m, 3H, H_{Benzyle}), 7.22 (td, *J* = 9.3, 5.2 Hz, 1H, H₄), 6.97 (td, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, H₅), 5.05 (s, 2H, CH₂), 4.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H_{1'}), 1.78 (dq, *J* = 8.3, 6.3 Hz, 2H, H_{2'}), 1.54 – 1.42 (m, 2H, H_{3'}), 1.39 – 1.29 (m, 4H, H_{4'} + H_{5'}), 0.96 – 0.86 (m, 3H, H_{6'}).

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 157.1 (CONH), 152.8 (dd, *J* = 242.6, 6.0 Hz, C₆), 149.3 (dd, *J* = 250.5, 7.8 Hz, C₂), 143.9 (dd, *J* = 10.8, 3.3 Hz, C₃), 135.9 (C₁_{Benzyle}), 129.2 (C₂_{Benzyle}), 128.5 (C₃_{Benzyle}), 128.3 (C₄_{Benzyle}), 116.5 (dd, *J* = 9.3, 3.1 Hz, C₄), 113.4 (dd, *J* = 24.3, 20.0 Hz, C₁), 110.7 (dd, *J* = 22.8, 4.2 Hz, C₅), 77.8 (CH₂), 69.8 (C_{1'}), 31.4 (C_{2'}), 29.0 (C_{3'}), 25.4 (C_{4'}), 22.4 (C_{5'}), 13.4 (C_{6'}).

MS (ESI) *m/z* = 364.2 [M+H]⁺, 386.2 [M+Na]⁺.

2.5. Procedures for ureas from series X

2.5.1. 1-(3-(Hexyloxy)phenyl)urea (**X.a**)



Chemical Formula: C₁₃H₂₀N₂O₂
Molecular Weight: 236,32

See procedure for 3-(hexyloxy)benzamide (**VII.a**), paragraph 2.1.2.

White powder (174 mg, 74% yield).

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.03 (s, 1H, NH), 7.31 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₂), 7.08 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 6.90 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 0.9 Hz, 1H, H₆), 6.49 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 0.9 Hz, 1H,

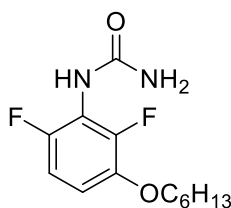
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 5.43 (s, 2H, NH₂), 3.93 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H1'), 1.89 – 1.65 (m, 2H, H2'), 1.55 – 1.41 (m, 2H, H3'), 1.41 – 1.26 (m, 4H, H4' + H5'), 1.03 – 0.80 (m, 3H, H6').

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 160.6 (C3), 156.9 (CO), 142.6 (C1), 130.0 (C5), 111.2 (C6), 108.5 (C4), 105.5 (C2), 68.3 (C1'), 32.3 (C2'), 30.0 (C3'), 26.5 (C4'), 23.3 (C5'), 14.3 (C6').

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₃H₂₁N₂O₂ [M+H]⁺ 237.1598, found 237.1598.

2.5.2. 1-(2,6-Difluoro-3-(hexyloxy)phenyl)urea (X.b)



Chemical Formula: C₁₃H₁₈F₂N₂O₂
Molecular Weight: 272,30

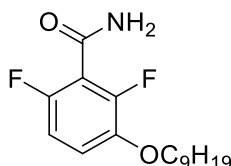
To a solution of 2,6-difluoro-3-(hexyloxy)benzoic acid (1.0 mmol, 1.0 eq.) in toluene (5 mL) was added triethylamine (1.1 mmol, 1.1 eq.) and DPPA (1.1 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at 100 °C for 1 h, then cooled to r.t.. Ammonia (25% in dioxane, 2.0 mmol, 2.0 eq.) was then added and the mixture was stirred at r.t. for 16 h. The solution was then concentrated and the residue purified by chromatography (eluent: EtOAc/pentane 3:2).

White powder (90 mg, 33% yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.57 (s, 1H, NH), 7.03 – 6.78 (m, 2H, H4 + H5), 5.81 (s, 2H, NH₂), 4.01 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H1'), 1.83 – 1.66 (m, 2H, H2'), 1.54 – 1.39 (m, 2H, H3'), 1.39 – 1.27 (m, 4H, H4' + H5'), 0.96 – 0.84 (m, 3H, H6').

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 157.0 (CO), 153.1 (dd, J = 240.5, 3.3 Hz, C6), 149.3 (dd, J = 248.0, 5.1 Hz, C2), 144.9 (dd, J = 10.3, 3.0 Hz, C3), 117.7 (dd, J = 17.8, 14.0 Hz, C1), 112.1 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, C4), 110.2 (dd, J = 21.7, 4.3 Hz, C5), 70.5 (C1'), 32.3 (C2'), 29.9 (C3'), 26.3 (C4'), 23.2 (C5'), 14.3 (C6').

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₃H₁₉F₂N₂O₂ [M+H]⁺ 273.1409, found 273.1410.

2.6. Procedures for ethers from series XI2.6.1. 2,6-Difluoro-3-(nonyloxy)benzamide (XI.a)

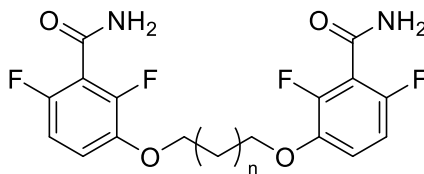
Chemical Formula: C₁₆H₂₃F₂NO₂
Molecular Weight: 299,36

To a solution of 1-bromononane (0.80 mmol, 1.0 eq.) in DMF (4 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.88 mmol, 1.1 eq.) and K₂CO₃ (1.6 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 3:1) to give desired product as a white powder (156 mg, 65% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.96 (td, *J* = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.83 (td, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H, H5), 6.66 (s, 1H, NH), 6.14 (s, 1H, NH), 3.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, O-CH₂), 1.77 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂), 1.49 – 1.38 (m, 2H, O-(CH₂)₂-CH₂), 1.35 – 1.23 (m, 10H, CH₃-(CH₂)₅), 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7 (CONH₂), 153.4 (dd, *J* = 246.3, 5.3 Hz, C6), 150.1 (dd, *J* = 254.0, 7.0 Hz, C2), 144.1 (dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, C3), 117.1 (dd, *J* = 9.8, 3.3 Hz, C4), 114.1 (dd, *J* = 20.5, 16.2 Hz, C1), 111.1 (dd, *J* = 23.5, 4.3 Hz, C5), 70.6 (C1'), 32.0 (C2'), 29.6 (C3'), 29.4 (C4'), 29.3 (C5'), 29.3 (C6'), 25.9 (C7'), 22.8 (C8'), 14.2 (C9').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₆H₂₄F₂NO₂ [M+H]⁺ 300.1770, found 300.1770.

2.6.2. General procedure for 3,3'-(alkane- α,ω -diylbis(oxy))bis(2,6-difluorobenzamides)

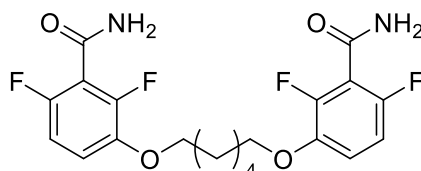
Chemical Formula: C₁₇H₁₄F₄N₂O₄
Molecular Weight: 386,30

To a solution of α,ω -dibromoalkane (0.30 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.75 mmol, 2.5 eq.) and K₂CO₃ (0.75 mmol, 2.5 eq.). The

Partie 3 – Données expérimentales

mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in water, filtered and washed with saturated Na₂CO₃ solution to give the desired product.

3,3'-(Hexane-1,6-diylbis(oxy))bis(2,6-difluorobenzamide) (XI.b)



Chemical Formula: C₁₇H₁₄F₄N₂O₄

Molecular Weight: 386,30

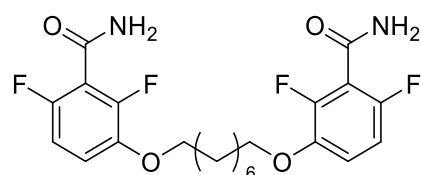
White powder (125 mg, 97% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.11 (s, 2H, NH), 7.83 (s, 2H, NH), 7.20 (td, *J* = 9.1, 5.3 Hz, 2H, H₄), 7.04 (td, *J* = 9.1, 1.9 Hz, 2H, H₅), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂), 1.74 (p, *J* = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂-CH₂), 1.57 – 1.39 (m, 4H, O-(CH₂)₂-CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.4 (CONH₂), 151.7 (dd, *J* = 240.8, 6.9 Hz, C₆), 147.9 (dd, *J* = 248.2, 8.4 Hz, C₂), 143.2 (dd, *J* = 10.9, 3.0 Hz, C₃), 116.6 (dd, *J* = 25.0, 20.5 Hz, C₁), 115.4 (dd, *J* = 9.4, 2.1 Hz, C₄), 110.9 (dd, *J* = 22.7, 3.9 Hz, C₅), 69.3 (O-CH₂), 28.5 (O-CH₂-CH₂), 25.1 (O-(CH₂)₂-CH₂).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₂₀H₂₁F₄N₂O₄ [M+H]⁺ 429.1432, found 429.1422.

3,3'-(Octane-1,8-diylbis(oxy))bis(2,6-difluorobenzamide) (XI.c)



Chemical Formula: C₁₇H₁₄F₄N₂O₄

Molecular Weight: 386,30

White powder (134 mg, 98% yield).

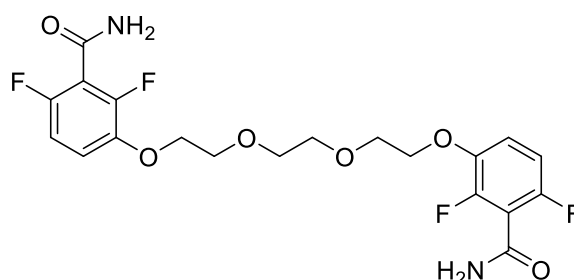
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (s, 2H, NH), 7.81 (s, 2H, NH), 7.20 (td, *J* = 9.3, 5.3 Hz, 2H, H₄), 7.04 (td, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 2H, H₅), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, O-CH₂), 1.71 (p, *J* = 6.9, 6.1 Hz, 4H O-CH₂-CH₂), 1.50 – 1.29 (m, 8H, O-(CH₂)₂-(CH₂)₂).

Partie 3 – Données expérimentales

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.4 (CONH₂), 151.7 (dd, J = 240.7, 6.7 Hz, C6), 147.9 (dd, J = 248.2, 8.5 Hz, C2), 143.2 (dd, J = 10.8, 3.1 Hz, C3), 116.6 (dd, J = 25.1, 20.6 Hz, C1), 115.3 (dd, J = 9.4, 2.5 Hz, C4), 110.9 (dd, J = 22.8, 3.9 Hz, C5), 69.4 (O-CH₂), 28.7 (O-CH₂-CH₂), 28.6 (O-(CH₂)₂-CH₂), 25.3 (O-(CH₂)₃-CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₂H₂₅F₄N₂O₄ [M+H]⁺ 457.1745, found 457.1748.

3,3'-(((Ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(2,6-difluorobenzamide) (XI.d)



Chemical Formula: C₂₀H₂₀F₄N₂O₆

Molecular Weight: 460,38

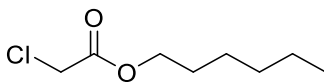
To a solution of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane (0.30 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.75 mmol, 2.5 eq.) and K₂CO₃ (0.75 mmol, 2.5 eq.). The mixture was stirred at 150 °C for 2 h then 100 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: EtOAc/pentane 9:1).

White powder (27 mg, 20% yield).

^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 7.45 (s, 2H, NH), 7.20 (dd, J = 9.3, 5.2 Hz, 2H, H4), 7.17 (s, 2H, NH), 6.94 (td, J = 9.0, 2.1 Hz, 2H, H5), 4.23 – 4.18 (m, 4H, O-CH₂), 3.86 – 3.81 (m, 4H, O-CH₂-CH₂), 3.68 (s, 4H, O-(CH₂)₂-O-CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, Acetone- d_6) δ 161.4 (CONH₂), 152.7 (dd, J = 242.2, 6.6 Hz, C6), 149.0 (dd, J = 249.9, 8.2 Hz, C2), 143.7 (dd, J = 11.1, 3.4 Hz, C3), 116.4 (dd, J = 24.2, 20.1 Hz, C1), 116.1 (dd, J = 9.4, 2.9 Hz, C4), 110.6 (dd, J = 23.2, 4.2 Hz, C5), 70.6 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.4 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₂₀H₂₁F₄N₂O₆ [M+H]⁺ 461.1330, found 461.1332.

2.7. Procedures for esters from series XII2.7.1. Hexyl 2-chloroacetate (41a)

Chemical Formula: C₈H₁₅ClO₂
Molecular Weight: 178,66

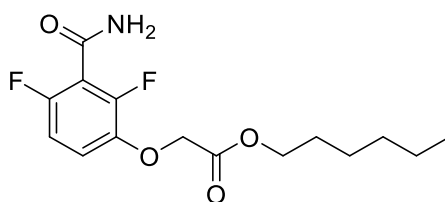
To a solution of 1-hexanol (1.0 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (1.2 mmol, 1.2 eq.) in DCM (3 mL) at was added dropwise chloroacetyl chloride (1.2 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h 30. The solvent was then evaporated and the residue retaken in Et₂O, washed with saturated NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum.

Orange oil (160 mg, 90% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, O-CH₂), 4.04 (s, 2H, Cl-CH₂), 1.75 – 1.57 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 1.41 – 1.22 (m, 6H, CH₃-(CH₂)₃), 0.93 – 0.81 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 167.5 (CO), 66.5 (Cl-CH₂), 41.0 (C1), 31.4 (C2), 28.5 (C3), 25.1 (C4), 22.6 (C5), 14.0 (C6).

MS (ESI) *m/z* = 201.1 [M+Na]⁺.

2.7.2. Hexyl 2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetate (XII.a)

Chemical Formula: C₁₅H₁₉F₂NO₄
Molecular Weight: 315,32

To a solution of hexyl 2-chloroacetate (0.36 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.40 mmol, 1.1 eq.) and K₂CO₃ (0.73 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in water, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 2:1) to give desired product as a white powder (71 mg, 63% yield).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.47 (s, 1H, NH), 7.19 (s, 1H, NH), 7.16 (td, *J* = 9.3, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.95 (td, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H, H5), 4.83 (s, 2H, CO-CH₂), 4.17 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H,

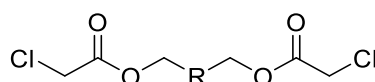
Partie 3 – Données expérimentales

O-CH₂), 1.71 – 1.57 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 1.40 – 1.24 (m, 6H, CH₃-(CH₂)₃), 0.89 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 169.1 (COO), 162.1 (CONH₂), 154.0 (dd, *J* = 242.9, 6.6 Hz, C6), 149.8 (dd, *J* = 250.6, 8.3 Hz, C2), 143.7 (dd, *J* = 11.0, 3.6 Hz, C3), 117.5 (dd, *J* = 24.2, 19.8 Hz, C1), 116.9 (dd, *J* = 9.5, 2.6 Hz, C4), 111.4 (dd, *J* = 23.4, 3.9 Hz, C5), 67.0 (CO-CH₂), 65.7 (C1'), 32.1 (C2'), 29.3 (C3'), 26.2 (C4'), 23.2 (C5'), 14.2 (C6').

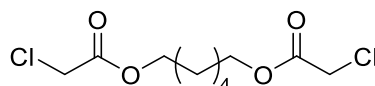
HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₅H₂₀F₂NO₄ [M+H]⁺ 316.1355, found 316.1347.

2.7.3. [General procedure for alkane- α,ω- diyl bis\(2-chloroacetates\)](#)



To a solution of α,ω-alkanediol (1.0 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (4.0 mmol, 4.0 eq.) in DCM (3 mL) at was added dropwise chloroacetyl chloride (4.0 mmol, 4.0 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h 30. The solvent was then evaporated and the residue retaken in Et₂O, washed with saturated NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum.

Hexane-1,6-diyl bis(2-chloroacetate) (42a)



Chemical Formula: C₇H₁₀Cl₂O₄
Molecular Weight: 229,05

Orange oil (237 mg, 87% yield).

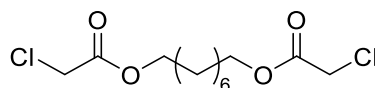
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.16 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, O-CH₂), 4.03 (s, 4H, Cl-CH₂), 1.75 – 1.58 (m, 4H, O-CH₂-CH₂), 1.46 – 1.33 (m, 4H, O-(CH₂)₂-CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 167.5 (CO), 66.1 (Cl-CH₂), 41.0 (O-CH₂), 28.3 (O-CH₂-CH₂), 25.4 (O-(CH₂)₂-CH₂).

MS (ESI) *m/z* = 271.1 [M+H]⁺, 298.1 [M+Na]⁺.

Partie 3 – Données expérimentales

Octane-1,8-diyl bis(2-chloroacetate) (42b)



Chemical Formula: C₇H₁₀Cl₂O₄

Molecular Weight: 229,05

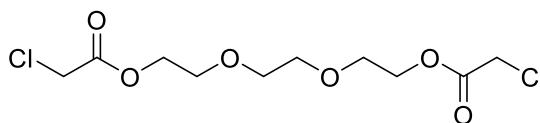
Orange oil (244 mg, 81% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.14 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, O-CH₂), 4.02 (s, 4H Cl-CH₂), 1.67 – 1.55 (m, 4H, O-CH₂-CH₂), 1.35 – 1.26 (m, 8H, O-(CH₂)₂-(CH₂)₂).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 167.4 (CO), 66.3 (Cl-CH₂), 41.0 (O-CH₂), 29.0 (O-CH₂-CH₂), 28.4 (O-(CH₂)₂-CH₂), 25.6 (O-(CH₂)₃-CH₂).

MS (ESI) *m/z* = 299.1 [M+H]⁺, 321.1 [M+Na]⁺.

(Ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(2-chloroacetate) (42c)



Chemical Formula: C₁₀H₁₆Cl₂O₆

Molecular Weight: 303,13

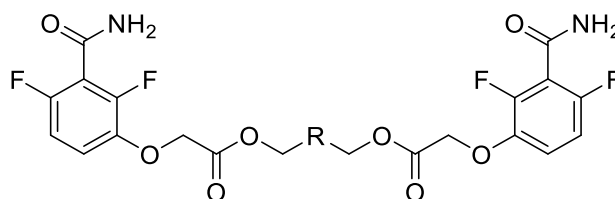
Triethyleneglycol was used as diol.

Orange oil (263 mg, 87% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.39 – 4.28 (m, 4H, O-CH₂), 4.10 (s, 4H, Cl-CH₂), 3.78 – 3.71 (m, 4H, O-CH₂-CH₂), 3.66 (s, 4H, O-(CH₂)₂-O-CH₂).

[Spectrum in accordance with Guo *et al.* 2014³⁴⁶]

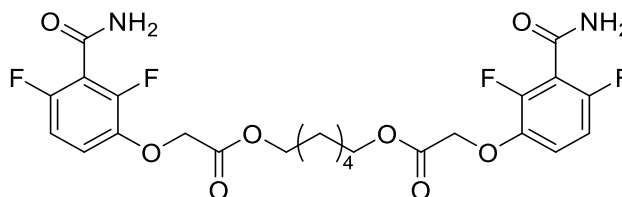
2.7.4. General procedure for alkane- α,ω -diyl bis(2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetates)



Partie 3 – Données expérimentales

To a solution of alkane- α,ω -diyl bis(2-chloroacetate) (0.36 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.75 mmol, 2.2 eq.) and K_2CO_3 (0.75 mmol, 2.2 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in saturated Na_2CO_3 solution, filtered and dried by suction.

Hexane-1,6-diyl bis(2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetate) (XII.b)



Chemical Formula: $C_{21}H_{18}F_4N_2O_8$
Molecular Weight: 502,37

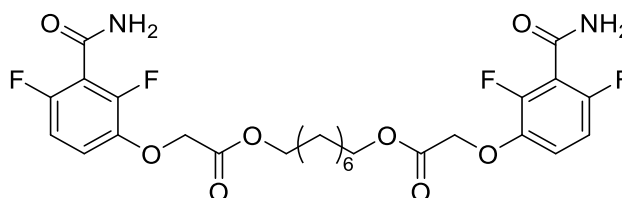
Brown powder (127 mg, 63% yield).

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.14 (s, 2H, NH), 7.85 (s, 2H, NH), 7.16 (td, $J = 9.3, 5.2$ Hz, 2H, H4), 7.04 (td, $J = 8.9, 1.8$ Hz, 2H, H5), 4.90 (s, 4H, CO- CH_2), 4.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H, O- CH_2), 1.57 (p, $J = 6.4$ Hz, 4H, O- $(CH_2)_2-CH_2$), 1.33 – 1.25 (m, 4H, O- $(CH_2)_2-CH_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 168.4 (COO), 161.3 (CONH₂), 152.2 (dd, $J = 241.5, 6.8$ Hz, C6), 147.8 (dd, $J = 248.9, 8.4$ Hz, C2), 142.2 (dd, $J = 10.8, 3.2$ Hz, C3), 116.7 (dd, $J = 25.0, 20.4$ Hz, C1), 115.4 (dd, $J = 8.9, 1.6$ Hz, C4), 110.8 (dd, $J = 23.1, 4.0$ Hz, C5), 65.7 (CO- CH_2), 64.6 (O- CH_2), 27.9 (O- CH_2-CH_2), 24.9 (O- $(CH_2)_2-CH_2$).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{24}H_{25}F_4N_2O_8$ $[M+H]^+$ 545.1542, found 545.1533.

Octane-1,8-diyl bis(2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy)acetate) (XII.c)



Chemical Formula: $C_{21}H_{18}F_4N_2O_8$
Molecular Weight: 502,37

Brown powder (169 mg, 82% yield).

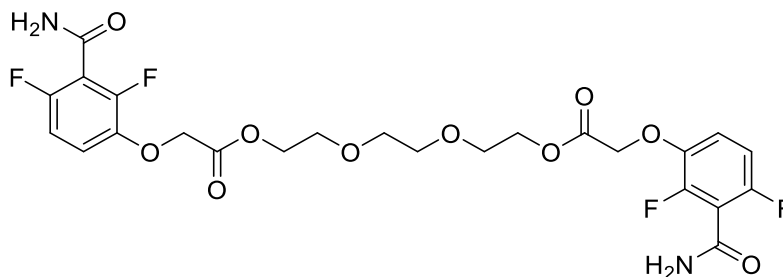
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.14 (s, 2H, NH), 7.84 (s, 2H, NH), 7.16 (td, $J = 9.3, 5.2$ Hz, 2H, H4), 7.04 (td, $J = 8.9, 1.8$ Hz, 2H, H5), 4.90 (s, 4H, CO- CH_2), 4.11 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H, O- CH_2), 1.68 – 1.48 (m, 4H, O- CH_2 - CH_2), 1.25 (m, 8H, O-(CH_2) $_2$ -(CH_2) $_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.4 (COO), 161.2 (CONH $_2$), 152.2 (dd, $J = 241.6, 6.7$ Hz, C6), 147.8 (dd, $J = 249.0, 8.4$ Hz, C2), 142.2 (dd, $J = 10.8, 3.3$ Hz, C3), 116.7 (dd, $J = 25.0, 20.5$ Hz, C1), 115.4 (dd, $J = 9.2, 1.8$ Hz, C4), 110.8 (dd, $J = 23.1, 3.9$ Hz, C5), 65.7 (CO- CH_2), 64.7 (O- CH_2), 28.5 (O- CH_2 - CH_2), 28.0 (O-(CH_2) $_2$ - CH_2), 25.2 (O-(CH_2) $_3$ - CH_2).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 573.1855, found 573.1844.

(Ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(2-(3-carbamoyl-2,4-difluorophenoxy) acetate) (XII.d)



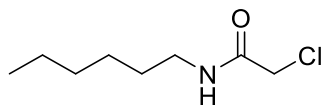
Chemical Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_{10}$
Molecular Weight: 576,45

To a solution of (ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(2-chloroacetate) (0.37 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.81 mmol, 2.2 eq.) and K_2CO_3 (0.81 mmol, 2.2 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in EtOAc, washed with H_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: EtOAc/pentane 9:1) to give desired product as a white powder (111 mg, 52% yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ 7.52 (s, 2H, NH), 7.25 (s, 2H, NH), 7.17 (td, $J = 9.3, 5.1$ Hz, 2H, H4), 6.95 (td, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 2H, H5), 4.85 (s, 4H, CO- CH_2), 4.37 – 4.25 (m, 4H, O- CH_2), 3.77 – 3.65 (m, 4H, O- CH_2 - CH_2), 3.60 (s, 4H, O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 169.1 (COO), 162.1 (CONH $_2$), 154.0 (dd, $J = 242.9, 6.4$ Hz, C6), 149.8 (dd, $J = 250.5, 8.1$ Hz, C2), 143.7 (dd, $J = 11.1, 3.5$ Hz, C3), 117.5 (dd, $J = 24.4, 20.1$ Hz, C1), 117.1 (dd, $J = 9.5, 2.6$ Hz, C4), 111.5 (dd, $J = 23.5, 4.1$ Hz, C5), 71.1 (CO- CH_2), 69.5 (O- CH_2), 67.1 (O- CH_2 - CH_2), 65.0 (O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 577.1440, found 577.1435.

2.8. Procedures for amides from series XIII2.8.1. 2-Chloro-N-hexylacetamide (41b)

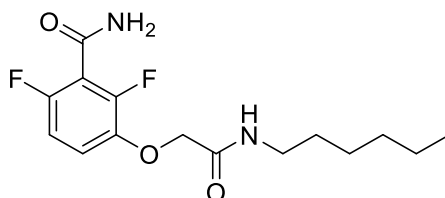
Chemical Formula: $C_8H_{16}ClNO$
Molecular Weight: 177,67

To a solution of hexylamine (1.15 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (1.65 mmol, 1.1 eq.) in DCM (2 mL) at 0 °C was added dropwise chloroacetyl chloride (1.65 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h 30, then washed with H_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum.

Orange powder (204 mg, quantitative yield).

1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 6.56 (s, 1H, NH), 4.05 (s, 2H, Cl- CH_2), 3.30 (q, J = 6.6 Hz, 2H, NH- CH_2), 1.56 – 1.49 (m, 2H, NH- CH_2 - CH_2), 1.40 – 1.23 (m, 6H, CH_3 -(CH_2) $_3$), 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3).

[Spectrum in accordance with Huigens *et al.* 2010³⁴⁷]

2.8.2. 2,6-Difluoro-3-(2-(hexylamino)-2-oxoethoxy)benzamide (XIII.a)

Chemical Formula: $C_{15}H_{20}F_2N_2O_3$
Molecular Weight: 314,33

To a solution of 2-chloro-N-hexylacetamide (0.56 mmol, 1.0 eq.) in DMF (2 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.62 mmol, 1.1 eq.) and K_2CO_3 (1.13 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in EtOAc, washed with H_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: EtOAc/pentane 3:1) to give desired product as a white powder (104 mg, 59% yield).

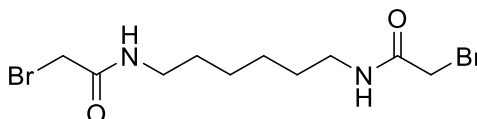
1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.50 (s, 2H, NH), 7.25 (s, 1H, NH), 7.18 (td, J = 9.2, 5.1 Hz, 1H, H4), 6.98 (td, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H, H5), 4.54 (s, 2H, O- CH_2), 3.27 (q, J = 6.6 Hz, 2H, NH- CH_2), 1.59 – 1.43 (m, 2H, NH- CH_2 - CH_2), 1.37 – 1.22 (m, 6H, CH_3 -(CH_2) $_3$), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3).

Partie 3 – Données expérimentales

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 167.8 (CONH), 162.2 (CONH₂), 154.1 (dd, J = 243.1, 6.4 Hz, C6), 149.8 (dd, J = 250.5, 8.3 Hz, C2), 143.6 (dd, J = 11.1, 3.6 Hz, C3), 117.5 (dd, J = 25.0, 19.4 Hz, C1), 117.2 (dd, J = 9.5, 2.3 Hz, C4), 111.7 (dd, J = 23.5, 3.9 Hz, C5), 69.8 (CO-CH₂), 39.5 (C1'), 32.2 (C2'), 30.3 (C3'), 27.2 (C4'), 23.2 (C5'), 14.3 (C6').

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₅H₂₁F₂N₂O₃ [M+H]⁺ 315.1515, found 315.1520.

2.8.3. *N,N'*-(hexane-1,6-diyl)bis(2-bromoacetamide) (44)



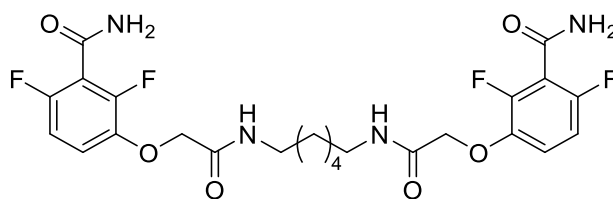
Chemical Formula: C₁₀H₁₈Br₂N₂O₂
Molecular Weight: 358,07

To a solution of 1,6-hexanediamine (2.0 mmol, 1.0 eq.) and K₂CO₃ (6.0 mmol, 3.0 eq.) in CHCl₃ (2.5 mL) and H₂O (1.5 mL) at 0 °C was added dropwise bromoacetyl bromide (6.0 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h, then diluted with H₂O, extracted with CHCl₃, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. White powder (543 mg, 76% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 6.53 (s, 2H, NH), 3.88 (s, 4H, Br-CH₂), 3.29 (q, J = 6.7 Hz, 4H, NH-CH₂), 1.67 – 1.46 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂), 1.45 – 1.26 (m, 4H, NH-(CH₂)₂-CH₂).

[Spectrum in accordance with Hoque *et al.* 2015²¹¹]

2.8.4. 3,3'-(((Hexane-1,6-diyl)bis(azanediyl))bis(2-oxoethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(2,6-difluorobenzamide) (XII.b)



Chemical Formula: C₂₄H₂₆F₄N₄O₆
Molecular Weight: 542,49

To a solution of *N,N'*-(hexane-1,6-diyl)bis(2-bromoacetamide) (0.30 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3 mL) were added 2,6-difluoro-3-hydroxybenzamide (0.75 mmol, 2.5 eq.) and K₂CO₃ (0.75 mmol, 2.5 eq.). The mixture was stirred at 35 °C for 16 h. The solvent was then evaporated and the residue retaken in saturated Na₂CO₃ solution, filtered and dried by suction to give desired product as a white powder (136 mg, 83%).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.14 (s, 2H, NH), 8.08 (t, J = 5.7 Hz, 2H, NH), 7.85 (s, 2H, NH), 7.18 – 7.00 (m, 4H, H' + H5), 4.56 (s, 4H, CO- CH_2), 3.10 (q, J = 6.6 Hz, 4H, NH- CH_2), 1.45 – 1.33 (m, 4H, NH- CH_2 - CH_2), 1.32 – 1.11 (m, 4H, NH-(CH_2) $_2$ - CH_2).

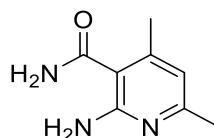
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167.4 (CONH), 161.8 (CONH $_2$), 152.6 (dd, J = 241.3, 6.4 Hz, C6), 148.4 (dd, J = 248.9, 8.8 Hz, C2), 143.0 (dd, J = 11.1, 3.1 Hz, C3), 117.1 (dd, J = 24.9, 20.6 Hz, C1), 116.2 (d, J = 9.6 Hz, C4), 111.3 (dd, J = 23.0, 3.9 Hz, C5), 68.8 (CO- CH_2), 38.7 (NH- CH_2), 29.4 (NH- CH_2 - CH_2), 26.4 (NH-(CH_2) $_2$ - CH_2).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 543.1861, found 543.1858.

3. Part 1 – Chapter 4

3.1. Procedures for biphenyls from series XIV

3.1.1. 2-Amino-4,6-dimethylnicotinamide (45c)

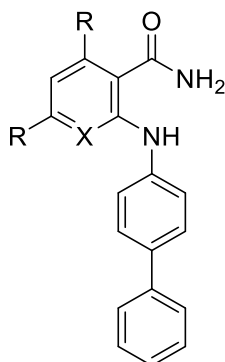


Chemical Formula: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$
Molecular Weight: 165,20

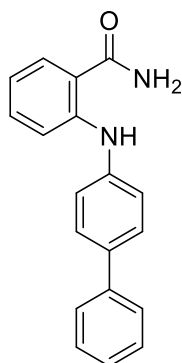
To a solution of malonamidine hydrochloride (5.0 mmol, 1.0 eq.) and KOH (6.0 mmol, 1.2 eq.) in MeOH (35 mL) was added acetylacetone (5.0 mmol, 1.0 eq.). The solution was stirred at room temperature for 24 h then concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: EtOAc/MeOH 95:5) to give desired product as a white powder (385 mg, 47% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 6.37 (s, 1H, H5), 6.02 (s, 1H, NH), 5.78 (s, 1H, NH), 5.23 (s, 2H, NH $_2$), 2.35 (s, 3H, CH $_3$), 2.32 (s, 3H, CH $_3$).

[Spectrum in accordance with Lakshmi Narayana *et al.* 2009³⁴⁸]

3.1.2. General procedure for 2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)benzamides

To a solution of amino derivative (1.0 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (20 mL) was added biphenyl boronic acid (1.5 mmol, 1.5 eq.), CuCl (0.15 mmol, 15 mol%) and triethylamine (0.50 mmol, 0.5 eq.). The solution was stirred at room temperature for 24 h, filtered and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography.

2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)benzamide (XIV.a)

Chemical Formula: C₁₉H₁₆N₂O
Molecular Weight: 288,35

Chromatography eluent: pentane/EtOAc 3:1.

Yellow powder (155 mg, 54% yield).

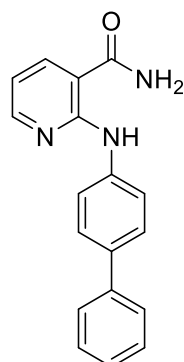
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.64 – 7.53 (m, 4H, H_{ar} + NH), 7.49 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.47 – 7.39 (m, 3H, H_{ar}), 7.36 – 7.27 (m, 4H, H_{ar}), 6.79 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.4 Hz, 1H, H₅), 5.83 (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.0 (CONH₂), 146.3 (C₂), 140.9 (C_{4'}), 140.8 (C_{1''}), 135.7 (C_{1'}), 133.1 (C₄), 128.9 (C_{3''}), 128.5 (C₆), 128.1 (C_{2''}), 127.0 (C_{4''}), 126.8 (C_{2'}), 121.5 (C_{3'}), 118.0 (C₅), 116.4 (C₁), 115.8 (C₃).

MS (ESI) *m/z* = 289.1 [M+H]⁺, 311.1 [M+Na]⁺

Partie 3 – Données expérimentales

2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)nicotinamide (XIV.b)



Chemical Formula: C₁₈H₁₅N₃O
Molecular Weight: 289,34

Chromatography eluent: pentane/Et₂O 2:1.

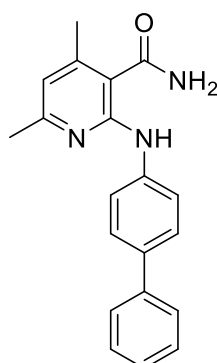
Yellow powder (92 mg, 44% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.62 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, *J* = 4.5, 1.1 Hz, 1H, H₆), 7.80 – 7.72 (m, 3H, H₄ + H_{3'}), 7.64 – 7.53 (m, 4H, H_{2'} + H_{2''}), 7.46 – 7.38 (m, 2H, H_{3''}), 7.35 – 7.27 (m, 1H, H_{4''}), 6.72 (dd, *J* = 7.7, 4.7 Hz, 1H, H₅), 5.87 (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.06 (CONH₂), 154.8 (C₂), 150.9 (C₆), 139.9 (C_{4'}), 139.8 (C_{1''}), 137.6 (C₄), 133.2 (C_{1'}), 128.9 (C_{3''}), 126.9 (C_{2''}), 126.7 (C_{4''}), 126.1 (C_{2'}), 119.7 (C_{3'}), 113.5 (C₅), 110.5 (C₃).

MS (ESI) *m/z* = 290.1 [M+H]⁺

2-([1,1'-Biphenyl]-4-ylamino)-4,6-dimethylnicotinamide (XIV.c)



Chemical Formula: C₂₀H₁₉N₃O
Molecular Weight: 317,39

Chromatography eluent: pentane/EtOAc 1:1.

Partie 3 – Données expérimentales

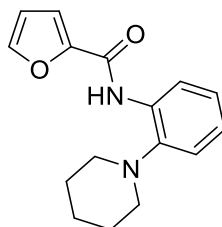
White powder. (43 mg, 14% yield). ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (s, 1H, NH), 7.75 – 7.51 (m, 6H, H3' + H2' + H2''), 7.46 – 7.37 (m, 2H, H3''), 7.33 – 7.28 (m, 1H, H4''), 6.50 (s, 1H, H5), 5.89 (s, 1H, NH), 5.77 (s, 1H, NH), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.4 (CONH₂), 157.9 (C2), 152.9 (C6), 146.4 (C1''), 141.1 (C4'), 139.9 (C4'), 134.9 (C1'), 128.8 (C3''), 127.5 (C2''), 126.8 (C2'), 126.8 (C4''), 120.0 (C3'), 116.7 (C5), 113.0 (C3), 24.2 (CH₃), 21.0 (CH₃).

MS (ESI) m/z = 318.1 [M+H]⁺

3.2. Procedures for furans from series XV

3.2.1. *N*-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (50)

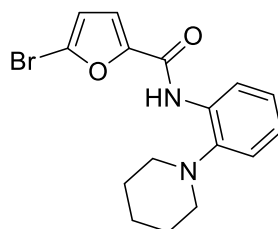


Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₂O₂
Molecular Weight: 270,33

To a solution of 2-(piperidin-2-yl)aniline (1.1 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were added triethylamine (1.4 mmol, 1.2 eq.) and dropwise furoyl chloride (1.1 mmol, 1.0 eq.). The mixture was stirred at room temperature for two days, then washed with saturated NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a translucent oil (274 mg, 90 % yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.50 (s, 1H, NH), 8.28 – 8.17 (m, 1H, H6'), 8.00 (dd, J = 1.8, 0.8 Hz, 1H, H5), 7.31 – 7.22 (m, 2H, H3 + H3'), 7.18 – 7.04 (m, 2H, H4' + H5'), 6.74 (dd, J = 3.5, 1.7 Hz, 1H, H4), 2.80 (t, J = 5.3 Hz, 4H, CH₂-N), 1.73 (p, J = 5.3 Hz, 4H, CH₂-CH₂-N), 1.62 – 1.53 (m, 2H, CH₂-(CH₂)₂-N).

3.2.2. 5-Bromo-*N*-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (52)



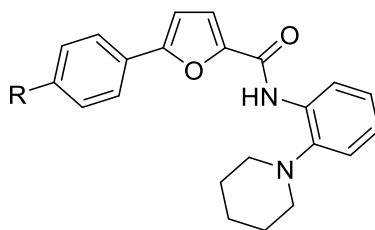
Chemical Formula: C₁₆H₁₇BrN₂O₂
Molecular Weight: 349,23

Partie 3 – Données expérimentales

To a solution of 5-bromofuroic acid (7.85 mmol, 1.0 eq.) in DCM (15 mL) at 0 °C were added DMF (3 drops) and dropwise oxalyl chloride (9.4 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then concentrated under vacuum. To a solution of 2-(1-piperidinyl)aniline (2.4 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (2.9 mmol, 1.2 eq.) in DCM (5 mL) at 0 °C was added dropwise 5-bromofuroyl chloride (2.9 mmol, 1.2 eq.) previously synthesized. The mixture was stirred at room temperature for 16 h. Saturated solution of NaHCO₃ was added to the mixture, and the product was extracted with DCM, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 7:1). To give desired product as a white powder (803 mg, 96 % yield).

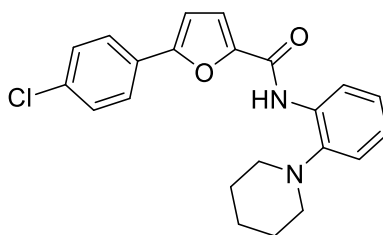
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 9.70 (s, 1H, NH), 8.44 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, H6'), 7.21 – 7.04 (m, 4H, H3 + H3' + H4' + H5'), 6.50 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H4), 2.85 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-N), 1.83 (p, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-CH₂-N), 1.65 (m, 2H, CH₂-(CH₂)₂-N).

3.2.3. [General procedure for 5-phenyl-N-\(2-\(piperidin-1-yl\)phenyl\)furan-2-carboxamides](#)



To a solution of 5-bromofuroic amide (0.57 mmol, 1.0 eq.), sodium carbonate (2.86 mmol, 5.0 eq.) and bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (0.017 mmol, 3 mol %) in isopropanol (8 mL) and water (2.5 mL) was added substituted boronic acid (0.72 mmol, 1.25 eq.). The mixture was stirred at 80 °C for 4 h, then extracted with EtOAc, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O 3:1).

5-(4-Chlorophenyl)-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.a)



Chemical Formula: C₂₂H₂₁ClN₂O₂
Molecular Weight: 380,87

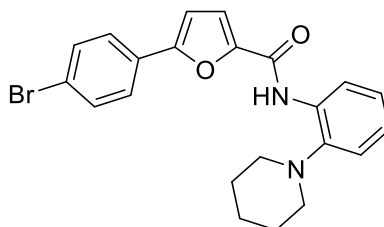
Partie 3 – Données expérimentales

White powder (85 mg, 39% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.78 (s, 1H, NH), 8.26 (dd, J = 7.5, 2.1 Hz, 1H, H6'), 7.93 (dt, J = 8.7, 2.1 Hz, 2H, H2''), 7.60 (dt, J = 8.7, 2.1 Hz, 2H, H3''), 7.39 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H3), 7.34 - 7.26 (m, 2H, H4 + H3'), 7.20 - 7.07 (m, 2H, H4' + H5'), 2.82 (t, J = 5.4 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 1.77 (p, J = 5.7 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.65 - 1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-N}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.0 (CONH), 153.8 (C5), 147.1 (C2), 143.2 (C2'), 133.6 (C4''), 132.7 (C1'), 129.2 (C3''), 128.0 (C1''), 126.0 (C2''), 124.8 (C5'), 124.2 (C4'), 121.1 (C6'), 119.0 (C3), 117.2 (C3'), 109.3 (C4), 53.3 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 26.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 23.5 ($\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-N}$).

5-(4-Bromophenyl)-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.b)



Chemical Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_2$

Molecular Weight: 425,33

After the chromatography, the product was repurified by preparative TLC (eluent: pentane/THF 8:1).

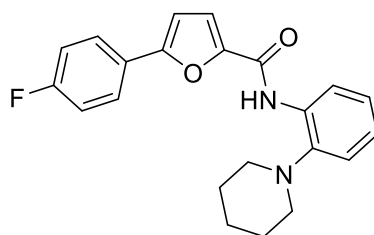
Yellow powder (29 mg, 16% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 9.87 (s, 1H, NH), 8.52 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H2''), 7.57 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H3''), 7.30 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H3), 7.24 - 7.14 (m, 2H, H4' + H5'), 7.10 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H, H3'), 6.81 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H4), 2.88 (t, J = 5.5 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 1.85 (p, J = 5.5 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.67 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-N}$).

MS (ESI) m/z = 425.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Partie 3 – Données expérimentales

5-(4-Fluorophenyl)-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.c)



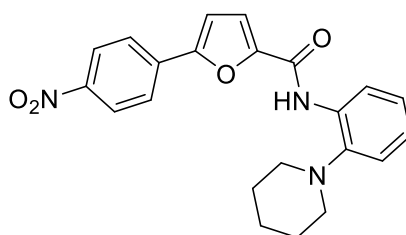
Chemical Formula: C₂₂H₂₁FN₂O₂
Molecular Weight: 364,42

Yellow powder (143 mg, 69% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.78 (s, 1H, NH), 8.27 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H6'), 7.99 – 7.91 (m, 2H, H2''), 7.42 – 7.35 (m, 3H, H3'' + H3), 7.30 (dd, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 1H, H3'), 7.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H4), 7.20 – 7.08 (m, 2H, H4' + H5'), 2.82 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-N), 1.77 (p, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-CH₂-N), 1.67 – 1.56 (m, 2H, CH₂-(CH₂)₂-N).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.4 (d, *J* = 247.1 Hz, C4''), 155.0 (CONH), 154.1 (C5), 146.8 (C2), 143.2 (C2'), 132.7 (C1'), 126.5 (d, *J* = 8.6 Hz, C2''), 125.8 (d, *J* = 3.2 Hz, C1''), 124.8 (C5'), 124.1 (C4'), 121.1 (C6'), 118.9 (C3), 117.2 (C3'), 116.2 (d, *J* = 22.2 Hz, C3''), 108.5 (C4), 53.2 (CH₂-N), 26.6 (CH₂-CH₂-N), 23.4 (CH₂-(CH₂)₂-N).

5-(4-Nitrophenyl)-N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.d)



Chemical Formula: C₂₂H₂₁N₃O₄
Molecular Weight: 391,43

Yellow powder (71 mg, 32% yield).

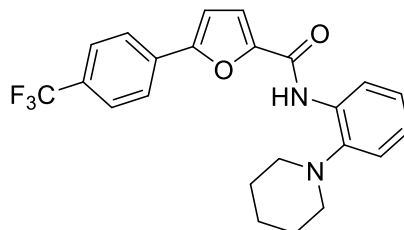
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.81 (s, 1H, NH), 8.36 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H3''), 8.26 – 8.19 (m, 1H, H6'), 8.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H2''), 7.55 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H3), 7.46 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H4), 7.35 – 7.27 (m, 1H, H3'), 7.20 – 7.10 (m, 2H, H4' + H5'), 2.84 (t, *J* = 5.3 Hz, 4H, CH₂-N), 1.77 (p, *J* = 5.3 Hz, 4H, CH₂-CH₂-N), 1.65 – 1.56 (m, 2H, CH₂-(CH₂)₂-N).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8 (CONH), 152.6 (C5), 148.4 (C4''), 147.0 (C2), 143.6 (C2'), 134.9 (C1''), 132.4 (C1'), 126.2 (C2''), 125.0 (C5'), 124.6 (C4'), 124.5 (C3''),

Partie 3 – Données expérimentales

121.0 (C6'), 119.6 (C3), 117.3 (C3'), 112.4 (C4), 53.2 (CH₂-N), 26.6 (CH₂-CH₂-N), 23.5 (CH₂-(CH₂)₂-N).

N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.e)



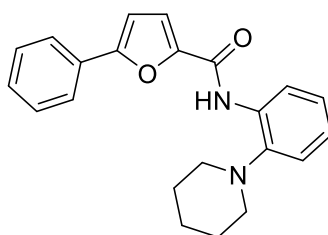
Chemical Formula: C₂₃H₂₁F₃N₂O₂
Molecular Weight: 414,43

Yellow powder (96 mg, 41% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.80 (s, 1H, NH), 8.28 – 8.22 (m, 1H, H6'), 8.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3''), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H2''), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H3), 7.43 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H4), 7.34 – 7.27 (m, 1H, H3'), 7.21 – 7.07 (m, 2H, H4' + H5'), 2.83 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-N), 1.78 (p, *J* = 5.5 Hz, 4H, CH₂-CH₂-N), 1.67 – 1.54 (m, 2H, CH₂-(CH₂)₂-N).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.3 (CONH), 153.7 (C5), 148.2 (C2), 143.8 (C2'), 133.2 (C1''), 133.0 (C1'), 129.2 (q, *J* = 32.2 Hz, C4''), 126.5 (q, *J* = 3.4 Hz, C3''), 125.2 (C2''), 125.2 (C5'), 124.7 (C4'), 124.5 (q, *J* = 272.2 Hz, CF₃), 121.5 (C6'), 119.7 (C3), 117.6 (C3'), 111.3 (C4), 53.7 (CH₂-N), 27.0 (CH₂-CH₂-N), 23.9 (CH₂-(CH₂)₂-N).

5-Phenyl-*N*-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (XV.f)



Chemical Formula: C₂₂H₂₂N₂O₂
Molecular Weight: 346,43

Yellow powder (146 mg, 74% yield).

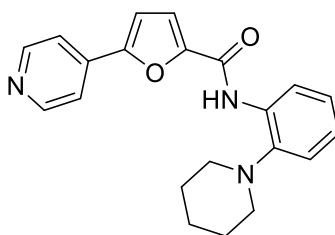
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.83 (s, 1H, NH), 8.30 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H6'), 7.95 – 7.90 (m, 2H, H2''), 7.56 – 7.48 (m, 2H, H3''), 7.47 – 7.39 (m, 1H, H4''), 7.38 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H3), 7.34 – 7.28 (m, 1H, H3'), 7.24 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H4), 7.21 – 7.08 (m, 2H, H4' +

Partie 3 – Données expérimentales

H5'), 2.83 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H, CH_2-N), 1.79 (p, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.66 – 1.55 (m, 2H, $CH_2-(CH_2)_2-N$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 154.93 (CONH), 154.85 (C5), 146.8 (C2), 143.0 (C2'), 132.8 (C1'), 129.1 (C1''), 129.0 (C4''), 129.0 (C3''), 124.9 (C5'), 124.2 (C2''), 124.0 (C4'), 121.1 (C6'), 118.6 (C3), 117.1 (C3'), 108.6 (C4), 53.3 (CH_2-N), 26.5 (CH_2-CH_2-N), 23.5 ($CH_2-(CH_2)_2-N$).

N-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)-5-(pyridin-4-yl)furan-2-carboxamide (XV.g)



Chemical Formula: $C_{21}H_{21}N_3O_2$
Molecular Weight: 347,42

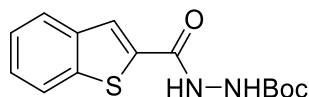
White powder (81 mg, 41%).

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.83 (s, 1H, NH), 8.71 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H, H3''), 8.30 – 8.19 (m, 1H, H6'), 7.84 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H, H2''), 7.53 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H4), 7.44 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H3), 7.35 – 7.25 (m, 1H, H3'), 7.22 – 7.07 (m, 2H, H4' + H5'), 2.83 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H, CH_2-N), 1.78 (p, $J = 5.6$ Hz, 4H, CH_2-CH_2-N), 1.66 – 1.55 (m, 2H, $CH_2-(CH_2)_2-N$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8 (CONH), 152.2 (C5), 150.5 (C3''), 148.2 (C2), 143.4 (C2'), 135.7 (C1''), 132.5 (C1'), 124.7 (C5'), 124.4 (C4'), 121.1 (C6'), 119.3 (C3), 118.1 (C2''), 117.0 (C3'), 112.2 (C4), 53.2 (CH_2-N), 26.6 (CH_2-CH_2-N), 23.5 ($CH_2-(CH_2)_2-N$).

3.3. Procedures for benzo[*b*]thiophenes from series XVI

3.3.1. *Tert*-butyl 2-(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54a)



Chemical Formula: $C_{14}H_{16}N_2O_3S$
Molecular Weight: 292,35

To a solution of benzothiophene-2-carboxylic acid (11 mmol, 1.1 eq.) and *tert*-butyl carbazate (10 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (40 mL) at 0 °C were added DMAP (1.3

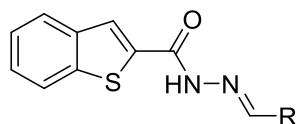
Partie 3 – Données expérimentales

mmol, 0.13 eq.) and dropwise DCC (12 mmol, 1.2 eq.) dissolved in DCM (10 mL). The mixture was then stirred at room temperature for 24 h, filtered on Celite® and washed with DCM. The filtrate was then concentrated, and residue was purified by chromatography (eluent: pentane/Et₂O, 1:1) to give desired product as a white powder (533 mg, 68% yield).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.77 (s, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, H3), 7.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H4 + H7), 7.47–7.31 (m, 2H, H5 + H6), 6.82 (s, 1H, NHBoc), 1.50 (s, 9H, *t*-Bu).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5 (CONH), 156.4 (CO Boc), 141.3 (C7a), 139.0 (C3a), 135.4 (C2), 126.7 (C6), 126.6 (C5), 125.5 (C3), 124.9 (C4), 122.5 (C7), 82.4 (C Boc), 28.2 (CH₃ Boc).

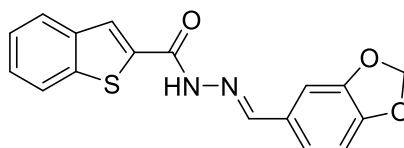
3.3.2. General procedure for *N*-acylhydrazones derivatives from series XVI



Step 1: To a solution of *tert*-butyl 2-(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (1.0 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (3 mL) was added TFA (20.0 mmol, 20.0 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 16 h, then co-evaporated with toluene to produce a white solid, which was engaged as crude material in the next step.

Step 2: The crude material was diluted in MeOH (10 mL) before the addition of the corresponding substituted benzaldehyde (2 mmol, 2 eq.) at room temperature. Reflux for 2 h was performed, and the final compound crystallized from the reaction mixture. Then, the reaction mixture was cooled to 0 °C, and the solid was filtered off and washed with cold MeOH.

(E)-N'-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.a)



Chemical Formula: C₁₇H₁₂N₂O₃S

Molecular Weight: 324,35

Light-yellow solid (127 mg, 52% yield).

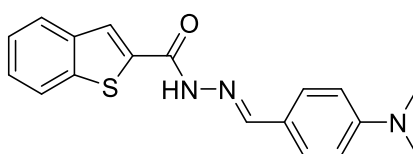
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.05 (s, 0.5H), 11.94 (s, 0.5H), 8.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.23 (s, 0.5H), 8.16–7.97 (m, 2.5H), 7.69–7.37 (m, 2.5H), 7.32 (s, 0.5H), 7.28–7.18 (m, 1H), 7.03 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.11 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.9, 158.5, 149.7, 149.6, 148.5, 148.4, 145.0, 143.5, 140.8, 139.5, 138.9, 137.7, 133.7, 132.3, 129.0, 128.8, 127.2, 127.0, 126.0, 125.8, 125.5, 125.2, 124.2, 124.0, 123.3, 123.1, 109.1, 109.0, 106.0, 105.7, 102.1.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 325.0641, found 325.0641.

(E)-*N'*-(4-(Dimethylamino)benzylidene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.b)



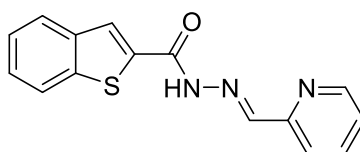
Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 323,41

Yellow solid (99 mg, 45% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.85 (s, 0.5H), 11.78 (s, 0.5H), 8.40 (s, 0.5H), 8.32 (s, 0.5H), 8.20 (s, 0.5H), 8.13–7.94 (m, 2.5H), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.52–7.41 (m, 2H), 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.99 (s, 3H).

MS (ESI) $m/z = 324.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 346.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-*N'*-(Pyridin-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.c)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 281,33

Intermediate **54a** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to produce, after an aqueous workup with NaHCO_3 and extractions with EtOAc, a white solid, which was directly engaged in the presence of 2-pyridinecarboxaldehyde in MeOH (20 mL). After 2 h reflux, the reaction mixture was concentrated in vacuo to give a brown viscous oil, which was purified by recrystallization in EtOAc to give desired product as white powder (292 mg, 32% yield).

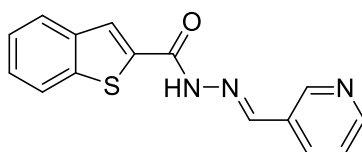
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.34 (s, 1H, 0.5H), 12.26 (s, 0.5H), 8.65 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 8.29 (s, 0.5H), 8.23 (s, 1H), 8.16–7.85 (m, 3.5H), 7.61–7.37 (m, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 162.3, 158.9, 153.5, 153.4, 150.1, 148.7, 145.6, 143.4, 140.9, 139.5, 138.4, 137.8, 137.6, 137.4, 133.5, 132.6, 127.3, 127.2, 126.6, 126.1, 126.0, 125.6, 125.3, 125.0, 123.3, 123.1, 120.8, 120.5.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.0696, found 282.0682.

(E)-*N'*-(Pyridin-3-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (**XVI.d**)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 281,33

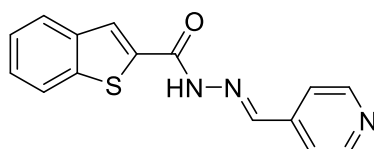
White powder (129 mg, 67% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.32 (s, 0.5H), 12.21 (s, 0.5H), 8.99 (s, 0.5H), 8.89 (s, 0.5H), 8.74–8.60 (m, 1H), 8.52 (s, 0.5H), 8.44 (s, 0.5H), 8.27 (s, 1H), 8.24–8.14 (m, 1H), 8.13–7.98 (m, 2H), 7.59–7.39 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.9, 161.4, 158.4, 150.9, 150.7, 148.9, 145.4, 143.1, 142.1, 140.5, 140.4, 139.1, 138.1, 137.4, 137.1, 134.1, 133.6, 132.2, 130.1, 130.1, 126.9, 126.7, 126.1, 126.0, 125.7, 125.6, 125.2, 124.9, 124.1, 122.9, 122.7.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.0696, found 282.0694.

(E)-*N'*-(Pyridin-4-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (**XVI.e**)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 281,33

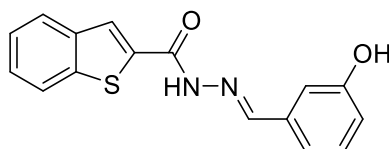
Crystallized very slowly in the reaction mixture after the reflux. The mixture was concentrated and then engaged in recrystallization with MeOH and EtOAc to give desired product as a light-yellow powder (92 mg, 30% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.41 (s, 0.5H), 12.32 (s, 0.5H), 8.70 (s, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.29 (s, 0.5H), 8.20–7.98 (m, 2.5H), 7.80 z(s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.58–7.43 (m, 2H).

MS (ESI) m/z = 282.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 304.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(3-Hydroxybenzylidene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.f)



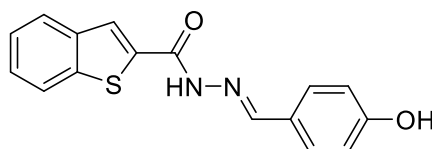
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
Molecular Weight: 296,34

Did not crystallize in the reaction mixture after the reflux. The mixture was concentrated and then engaged in recrystallization with MeOH and EtOAc (8:2) to give desired product as a light-brown powder (47 mg, 27% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.10 (s, 0.5H), 11.99 (s, 0.5H), 9.75 (s, 0.5H), 9.67 (s, 0.5H), 8.41 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 8.25 (s, 0.5H), 8.14–7.95 (m, 2.5H), 7.57–7.44 (m, 2H), 7.38–7.21 (m, 2.5H), 7.14 (d, J = 7.7 Hz, 0.5H), 6.88 (s, 1H).

MS (ESI) m/z = 297.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 319.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(4-Hydroxybenzylidene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.g)



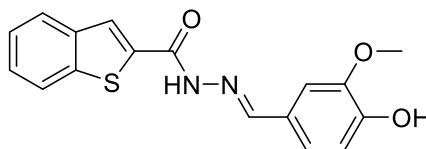
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
Molecular Weight: 296,34

White powder (32 mg, 10% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (s, 0.5H), 11.85 (s, 0.5H), 10.00 (s, 0.5H), 9.97 (s, 0.5H), 8.41 (s, 0.5H), 8.36 (s, 0.5H), 8.22 (s, 0.5H), 8.11–7.96 (m, 2.5H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.55–7.39 (m, 2H), 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H).

MS (ESI) m/z = 297.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 319.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(4-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)benzo[b]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.h)



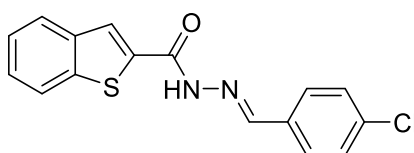
Chemical Formula: C₁₇H₁₄N₂O₃S
Molecular Weight: 326,37

White powder (141 mg, 41% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.97 (s, 0.5H), 11.93 (s, 0.5H), 9.62 (s, 0.5H), 9.60 (s, 0.5H), 8.42 (s, 0.5H), 8.36 (s, 0.5H), 8.22 (s, 0.5H), 8.10–7.96 (m, 2.5H), 7.58–7.41 (m, 2.5H), 7.33 (s, 0.5H), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.5H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.5H), 6.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.92 (s, 1.5H), 3.84 (s, 1.5H).

MS (ESI) *m/z* = 327.1 [M+H]⁺, 349.0 [M+Na]⁺.

(E)-N'-(4-Chlorobenzylidene)benzo[b]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.i)



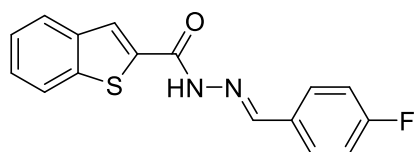
Chemical Formula: C₁₆H₁₁ClN₂OS
Molecular Weight: 314,79

White solid (216 mg, 62% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.22 (s, 0.5H), 12.10 (s, 0.5H), 8.44 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 8.26 (s, 0.5H), 8.16 (s, 0.5H), 8.10–7.97 (m, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.63–7.39 (m, 4H).

MS (ESI) *m/z* = 315.0 [M+H]⁺, 337.0 [M+Na]⁺.

(E)-N'-(4-Fluorobenzylidene)benzo[b]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.j)



Chemical Formula: C₁₆H₁₁FN₂OS
Molecular Weight: 298,34

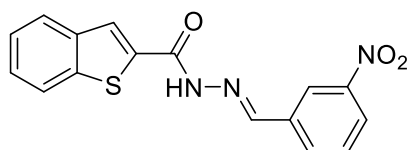
Partie 3 – Données expérimentales

White solid (173 mg, 44% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.17 (s, 0.5H), 12.06 (s, 0.5H), 8.45 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 8.25 (s, 0.5H), 8.17 (s, 0.5H), 8.13–7.99 (m, 2H), 7.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.56–7.42 (m, 2H), 7.40–7.27 (m, 2H).

MS (ESI) $m/z = 299.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 321.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(3-Nitrobenzylidene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.k)



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

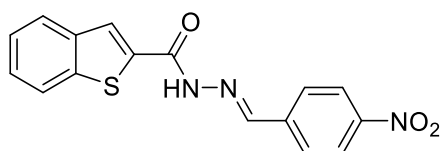
Molecular Weight: 325,34

Yellowish solid (111 mg, 36% yield).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.41 (s, 0.5H), 12.30 (s, 0.5H), 8.68 (s, 0.5H), 8.58 (s, 1H), 8.44 (s, 0.5H), 8.36–8.16 (m, 3H), 8.05 (s, 2H), 7.87–7.68 (m, 1H), 7.58–7.41 (m, 2H).

MS (ESI) $m/z = 326.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 348.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(4-Nitrobenzylidene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVI.l)



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

Molecular Weight: 325,34

Yellowish solid (110 mg, 30% yield).

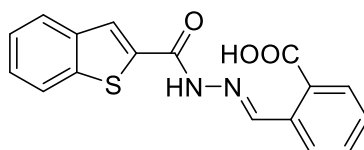
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.43 (s, 0.5H), 12.35 (s, 0.5H), 8.56 (s, 0.5H), 8.44 (s, 0.5H), 8.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H), 8.18–7.94 (m, 4H), 7.59–7.39 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.0, 158.5, 147.9, 145.5, 142.4, 140.4, 139.0, 137.9, 137.3, 132.2, 128.4, 128.1, 126.3, 125.6, 125.2, 124.9, 124.1, 122.9, 122.7.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 324.0448, found 324.0449.

Partie 3 – Données expérimentales

(E)-2-((2-(Benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazono)methyl)benzoic acid (XVI.m)



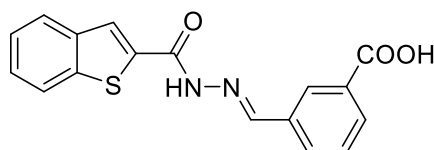
Chemical Formula: C₁₇H₁₂N₂O₃S
Molecular Weight: 324,35

White solid (88 mg, 45% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.40 (s, 1H), 12.37 (s, 0.5H), 12.18 (s, 0.5H), 9.23 (s, 0.5H), 8.94 (s, 0.5H), 8.42 (s, 0.5H), 8.32 (s, 0.5H), 8.28–7.97 (m, 3H), 7.93 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.81–7.61 (m, 1H), 7.61–7.42 (m, 3H).

MS (ESI) *m/z* = 325.1 [M+H]⁺, 347.0 [M+Na]⁺.

(E)-3-((2-(Benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazineylidene)methyl)benzoic acid (XVI.n)



Chemical Formula: C₁₇H₁₂N₂O₃S
Molecular Weight: 324,35

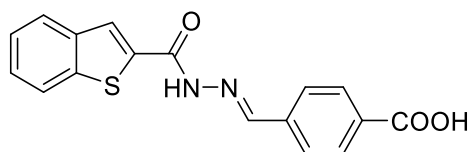
White powder (188 mg, 85% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.29 (s, 0.5H), 12.16 (s, 0.5H), 8.52 (s, 0.5H), 8.49–8.30 (m, 1.5H), 8.32–7.91 (m, 5H), 7.71–7.57 (m, 1H), 7.57–7.41 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.0, 161.8, 161.4, 158.4, 147.2, 143.9, 143.0, 140.5, 139.1, 138.2, 137.4, 134.7, 132.0, 131.7, 131.5, 131.1, 130.8, 129.4, 128.5, 127.5, 126.9, 126.7, 126.0, 125.6, 125.2, 125.0, 122.9, 122.5.

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₇H₁₃N₂O₃S [M+H]⁺ 325.0641, found 325.0626.

(E)-4-((2-(Benzo[b]thiophene-2-carbonyl)hydrazono)methyl)benzoic acid (XVI.o)



Chemical Formula: C₁₇H₁₂N₂O₃S

Molecular Weight: 324,35

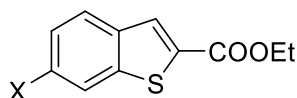
White solid (92 mg, 39% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.14 (s, 1H), 12.30 (s, 0.5H), 12.19 (s, 0.5H), 8.53 (s, 0.5H), 8.44 (s, 0.5H), 8.28 (s, 0.5H), 8.23 (s, 0.5H), 8.13–7.81 (m, 6H), 7.57–7.40 (m, 2H).

MS (ESI) m/z = 325.1 [M+H]⁺, 347.0 [M+Na]⁺.

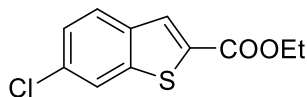
3.4. Procedures for benzo[b]thiophenes from series XVII

3.4.1. General procedure for ethyl 6-halogenobenzo[b]thiophene-2-carboxylates



To a solution of 4-halogeno-2-fluorobenzaldehyde (14.9 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (45 mmol, 3.0 eq.) in anhydrous DMSO (20 mL) was added ethyl thioglycolate (16.5 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at 80 °C for 2 h and at room temperature for 16 h, then poured into 800 mL of ice/water and stirred vigorously. After 1 h of digestion, the formed solid was filtered, washed with water, and dried by suction.

Ethyl 6-chlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylate (56a)



Chemical Formula: C₁₁H₉ClO₂S

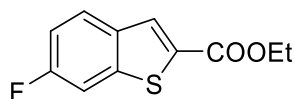
Molecular Weight: 240,70

Yellow crystals (3.446 g, 96% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H7), 8.21 (s, 1H, H3), 8.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.52 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with patent WO2018/122232³⁴⁹]

Ethyl 6-fluorobenzo[b]thiophene-2-carboxylate (56b)



Chemical Formula: C₁₁H₉FO₂S

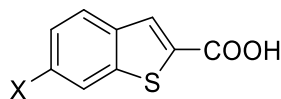
Molecular Weight: 224,25

No crystallisation occurred in water, and the residue was purified by chromatography (eluent: pentane / Et₂O 10:1) to give desired product as a white powder (710 mg, 21% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (s, 1H, H3), 8.07 (dd, *J* = 9.1, 5.4 Hz, 1H, H4), 7.99 (dd, *J* = 9.1, 2.4 Hz, 1H, H7), 7.37 (td, *J* = 9.1, 2.4 Hz, 1H, H5), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

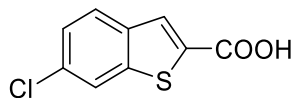
[Spectrum in accordance with Cheng *et al.* 2011³⁵⁰]

3.4.2. General procedure for 6-halogenobenzo[b]thiophene carboxylic acids



To a solution of ethyl 6-chlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylate (14.1 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (15 mL) was added a solution of NaOH 3N (28.2 mmol, 2.0 eq.). The solution was stirred at room temperature for 16 h, concentrated under vacuum, diluted with H₂O, acidified with HCl 1 N, extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum.

6-Chlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid (53b)



Chemical Formula: C₉H₅ClO₂S

Molecular Weight: 212,65

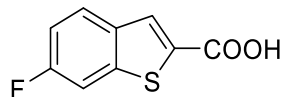
White powder (2.616 g, 87% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.57 (bs, 1H, OH), 8.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H7), 8.12 (s, 1H, H3), 8.02 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.50 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5).

Partie 3 – Données expérimentales

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.5 (COOH), 142.6 (C7a), 137.6 (C3a), 135.8 (C6), 132.1 (C2), 129.9 (C3), 127.2 (C4), 125.8 (C5), 122.6 (C7).

6-Fluorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid (53c)



Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_5\text{FO}_2\text{S}$

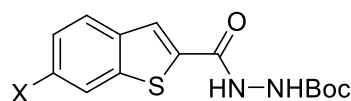
Molecular Weight: 196,20

Yellowish powder (294.9 mg, 75% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.46 (s, 1H, OH), 8.12 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H3), 8.05 (dd, $J = 9.0, 5.4$ Hz, 1H, H4), 7.98 (dd, $J = 9.4, 2.6$ Hz, 1H, H7), 7.35 (td, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H, H5).

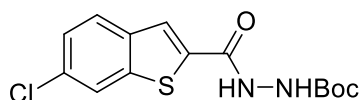
[Spectrum in accordance with Cai *et al.* 2019³⁵¹]

3.4.3. General procedure for *tert*-butyl 2-(6-halogenobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylates



See procedure for *tert*-butyl 2-(benzo[b]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (**54a**), paragraph 3.3.1.

Tert-butyl 2-(6-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54b)



Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$

Molecular Weight: 326,80

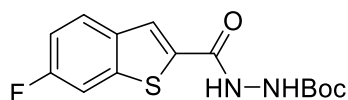
White powder (1.435 g, 79% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.73 (s, 1H, NHCO), 7.75 (s, 1H, H7), 7.71 (s, 1H, H3), 7.67 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H4), 7.33 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, 1H, H5), 6.72 (s, 1H, NHBoc), 1.51 (s, 9H, *t*-Bu).

Partie 3 – Données expérimentales

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6) δ 162.4 (CONH), 156.5 (CO Boc), 143.0 (C7a), 139.2 (C3a), 138.9 (C6), 133.0 (C2), 127.4 (C3), 126.6 (C4), 125.8 (C5), 123.0 (C7), 80.8 (C Boc), 28.4 (CH₃ Boc).

Tert-butyl 2-(6-fluorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54c)



Chemical Formula: C₁₄H₁₅FN₂O₃S

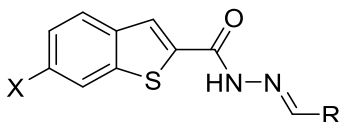
Molecular Weight: 310,34

White powder (305 mg, 42% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (s, 1H, NHCO), 7.78 (s, 1H, H3), 7.71 (dd, J = 8.9, 5.1 Hz, 1H, H4), 7.41 (dd, J = 8.9, 1.6 Hz, 1H, H7), 7.12 (td, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H5), 6.74 (s, 1H, NHBoc), 1.51 (s, 9H, *t*-Bu).

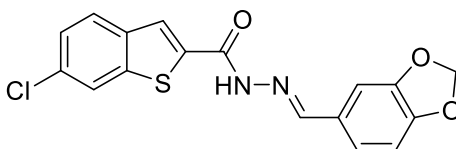
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.2 (CONH), 160.5 (d, J = 153.3 Hz, C6), 155.4 (CO Boc), 141.5 (d, J = 10.8 Hz, C7a), 137.5 (d, J = 3.0 Hz, C3a), 135.9 (C2), 127.2 (d, J = 9.4 Hz, C4), 125.1 (C3), 114.3 (d, J = 24.4 Hz, C5), 109.0 (d, J = 26.2 Hz, C7), 79.5 (C Boc), 28.1 (CH₃ Boc).

3.4.4. General procedure for *N*-acylhydrazones derivatives from series XVII



See procedure for *N*-acylhydrazones derivatives from series XVI, paragraph 3.3.2.

(*E*)-*N'*-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-6-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbohydrazide (XVII.a)



Chemical Formula: C₁₇H₁₁ClN₂O₃S

Molecular Weight: 358,80

White powder (75 mg, 31% yield).

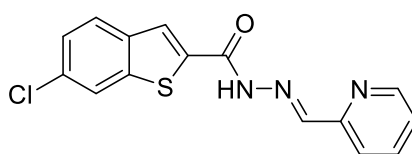
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.08 (s, 0.5H), 11.97 (s, 0.5H), 8.39 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.33–7.97 (m, 3H), 7.48 (d, J = 9.3 Hz, 1.5H), 7.31 (s, 0.5H), 7.23 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 7.10–6.97 (m, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.11 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.2, 157.9, 149.3, 148.2, 144.9, 144.4, 141.6, 139.4, 137.9, 136.0, 134.2, 131.4, 128.5, 128.3, 127.0, 126.8, 125.8, 125.5, 125.1, 124.0, 123.7, 122.5, 122.2, 108.7, 105.6, 105.3, 101.7.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 359.0252, found 359.0254.

(E)-6-Chloro-*N'*-(pyridin-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVII.b)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 315,78

Intermediate **54b** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to afford, after an aqueous workup with NaHCO_3 and extractions with EtOAc, a white solid.

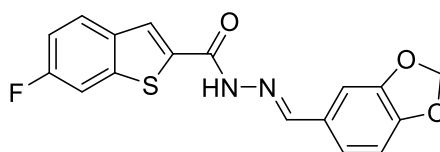
White powder (52 mg, 30% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.08 (s, 0.5H), 11.97 (s, 0.5H), 8.39 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.33–7.97 (m, 3H), 7.48 (d, J = 9.3 Hz, 1.5H), 7.31 (s, 0.5H), 7.23 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 7.10–6.97 (m, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.11 (s, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.5, 158.2, 153.0, 152.8, 149.7, 148.5, 145.4, 144.3, 141.7, 138.9, 137.8, 137.1, 136.1, 134.0, 131.7, 127.2, 127.0, 125.9, 125.7, 125.6, 124.6, 122.5, 122.2, 120.5, 120.2.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 316.0306, found 316.0315.

(E)-*N'*-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-6-fluorobenzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVII.c)



Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}$
Molecular Weight: 342,34

Partie 3 – Données expérimentales

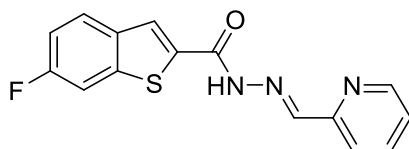
White powder (44 mg, 40% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.05 (s, 0.5H), 11.93 (s, 0.5H), 8.38 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.21 (s, 0.5H), 8.16–7.89 (m, 2.5H), 7.46 (s, 0.5H), 7.41–7.28 (m, 1.5H), 7.23 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.11–6.92 (m, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.11 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157.9, 149.3, 149.2, 148.1, 148.1, 148.1, 148.0, 144.8, 138.6, 138.6, 136.0, 134.2, 133.4, 131.5, 128.6, 128.3, 127.5, 125.1, 123.9, 123.6, 114.2, 109.2, 108.7, 108.6, 108.6, 108.5, 105.6, 105.3, 101.7.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 343.0547, found 343.0550.

(E)-6-Fluoro-*N'*-(pyridin-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVII.d)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{OS}$

Molecular Weight: 299,32

Intermediate **54c** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to afford, after an aqueous workup with NaHCO_3 and extractions with EtOAc, a white solid.

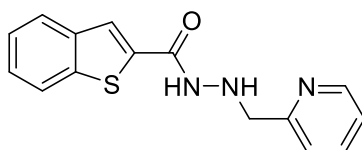
White powder (23 mg, 24% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.31 (s, 1H), 8.64 (s, 0.5H), 8.54–7.71 (m, 6.5H), 7.59–7.14 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.0, 160.1, 158.8, 150.1, 145.8, 144.7, 144.6, 141.4, 141.3, 140.5, 137.5, 137.0, 136.8, 136.3, 135.0, 132.2, 129.7, 127.8, 127.3, 127.2, 127.2, 127.1, 126.2, 125.0, 123.4, 120.9, 120.6, 118.7, 114.8, 114.4, 114.2, 114.0, 113.8, 109.4, 109.2, 108.8, 108.6.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 300.0601, found 300.0603.

N'-(Pyridin-2-ylmethyl)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVII.e)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}$

Molecular Weight: 283,35

Partie 3 – Données expérimentales

To a solution of (*E*)-*N'*-(pyridin-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (0.12 mmol, 1.0 eq.) in 5 mL of EtOAc and 1 mL of MeOH was added palladium on carbon 10% (0.019 mmol, 15 mol%). The mixture was stirred at room temperature for 7 h, then filtered on Celite®, washed with EtOAc and the residue was concentrated under vacuum and purified by chromatography (eluent: EtOAc/MeOH 98:2) to give desired product as a white powder (30 mg, 60% yield).

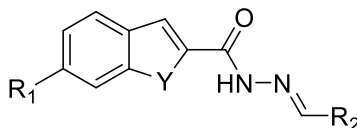
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.34 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, NHCO), 8.63 – 8.40 (m, 1H, H3'), 8.04 – 7.98 (m, 2H, H3 + H7), 7.95 – 7.88 (m, 1H, H4), 7.78 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H5'), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H6'), 7.49 – 7.38 (m, 2H, H5 + H6), 7.32 – 7.21 (m, 1H, H4'), 5.76 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH-CH₂), 4.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.0 (CONH), 158.2 (C1'), 148.9 (C3'), 140.0 (C7a), 139.1 (C3a), 138.2 (C6), 136.6 (C5'), 126.3 (C2), 125.2 (C5), 125.0 (C3), 124.7 (C4), 122.8 (C4'), 122.4 (C7), 122.3 (C6'), 56.2 (CH₂).

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₅H₁₄N₃OS [M+H]⁺ 284.0852, found 284.0858.

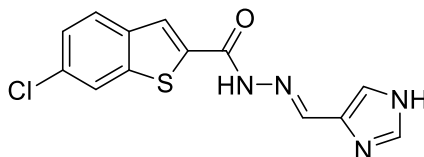
3.5. [Procedures for benzo\[*b*\]thiophenes from series XVIII](#)

3.5.1. [General procedure for *N*-acylhydrazones derivatives from series XVIII](#)



See procedure for *N*-acylhydrazones derivatives from series **XVI**, paragraph 3.3.2.

(*E*)-*N'*-((1*H*-Imidazol-4-yl)methylene)-6-chlorobenzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVIII.a)



Chemical Formula: C₁₃H₉ClN₄OS
Molecular Weight: 304,75

Intermediate **54b** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to afford, after an aqueous workup with NaHCO₃ and extractions with EtOAc, a white solid.

Beige powder (90 mg, 48% yield).

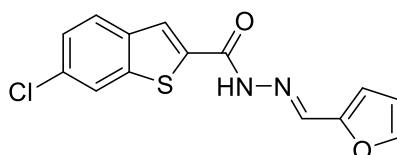
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.92 (s, 0.5H), 12.52 (s, 0.5H), 11.92 (s, 0.5H), 11.85 (s, 0.5H), 8.53–8.35 (m, 1H), 8.31–8.13 (m, 1.5H), 8.13–7.96 (m, 1.5H), 7.90–7.67 (m, 1.5H), 7.67–7.40 (m, 1.5H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157.7, 144.2, 141.5, 139.6, 137.9, 136.7, 131.4, 130.9, 126.8, 125.8, 125.3, 124.9, 122.5, 122.1.

MS (ESI) m/z = 305.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 327.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-6-Chloro-*N'*-(furan-2-ylmethylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVIII.b)



Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$
Molecular Weight: 304,75

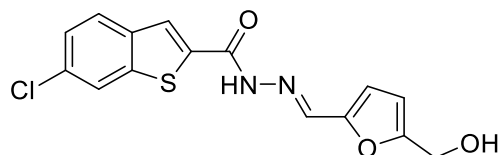
Beige powder (145 mg, 78% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.12 (s, 0.5H), 12.04 (s, 0.5H), 8.43 (s, 0.5H), 8.34 (s, 0.5H), 8.30–8.12 (m, 1.5H), 8.12–7.96 (m, 1.5H), 7.88 (s, 1H), 7.57–7.41 (m, 1H), 7.06 (s, 0.5H), 6.99 (s, 0.5H), 6.67 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.3, 149.7, 145.9, 142.0, 139.7, 138.4, 138.3, 135.3, 134.7, 132.0, 131.7, 127.5, 127.3, 126.2, 125.9, 125.6, 123.0, 122.6, 114.7, 114.2, 112.8.

MS (ESI) m/z = 305.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 327.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-6-Chloro-*N'*-((5-(hydroxymethyl)furan-2-yl)methylene)benzo[*b*]thiophene-2-carbohydrazide (XVIII.c)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$
Molecular Weight: 334,77

Beige powder (73 mg, 36% yield).

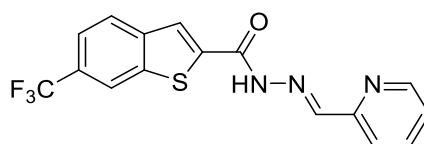
Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.09 (s, 0.5H), 12.03 (s, 0.5H), 8.44 (s, 0.5H), 8.36–8.15 (m, 2H), 8.12–7.94 (m, 1.5H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.15–6.85 (m, 1H), 6.47 (s, 1H), 5.44 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.63–4.29 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.2, 157.9, 148.4, 141.6, 139.3, 137.9, 136.5, 135.2, 134.3, 131.5, 131.2, 127.1, 126.9, 125.8, 125.5, 125.2, 122.5, 122.1, 115.5, 114.3, 109.4, 55.8.

MS (ESI) m/z = 335.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 357.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(E)-N'-(Pyridin-2-ylmethylene)-6-(trifluoromethyl)benzo[b]thiophene-2-carbohydrazide (XVIII.h)



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$
Molecular Weight: 349,33

Intermediate **54d** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to afford, after an aqueous workup with NaHCO_3 and extractions with EtOAc, a white solid.

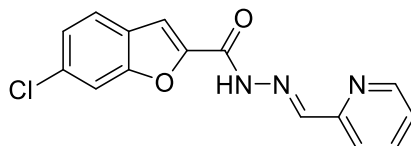
White powder (64 mg, 44% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.42 (s, 1H), 8.70–8.59 (m, 2H), 8.52 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 8.39–8.18 (m, 3H), 8.07–7.85 (m, 2H), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 6.5 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.4, 158.0, 153.0, 152.8, 149.7, 148.8, 145.6, 142.9, 141.9, 141.7, 140.3, 139.9, 137.1, 137.0, 136.7, 131.5, 126.7, 126.5, 125.6, 124.7, 124.6, 121.5, 121.1, 120.9, 120.8, 120.8, 120.7, 120.7, 120.6, 120.2.

HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 350.0569, found 350.0572.

(E)-6-Chloro-N'-(pyridin-2-ylmethylene)benzofuran-2-carbohydrazide (XVIII.i)



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2$
Molecular Weight: 299,71

Partie 3 – Données expérimentales

Intermediate **54e** was deprotected under the reported acidic conditions (TFA) to afford, after an aqueous workup with NaHCO₃ and extractions with EtOAc, a white solid.

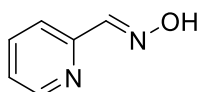
White powder (63 mg, 44% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.45 (s, 1H), 8.63 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.03–7.73 (m, 5H), 7.49–7.41 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.6, 153.1, 149.1, 148.6, 137.0, 131.9, 126.0, 124.7, 124.7, 120.7, 112.3, 111.2.

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₅H₁₁ClN₃O₂ [M+H]⁺ 300.0534, found 300.0533.

3.5.2. [Pyridine 2-aldoxime \(58\)](#)



Chemical Formula: C₆H₆N₂O

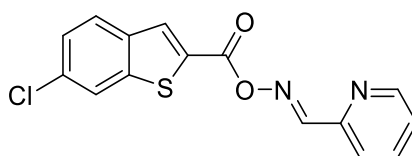
Molecular Weight: 122,13

To a solution of pyridine-2-carboxaldehyde (1.9 mmol, 1.0 eq.) and hydroxylamine hydrochloride (2.3 mmol, 1.25 eq.) in water (5 mL) was added dropwise a solution of sodium bicarbonate (2.3 mmol, 1.25 eq.) in water (10 mL) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solution was then extracted with EtOAc and the organic layer dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give desired product as a white powder (186 mg, 81%).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.99 (s, 1H, OH), 8.63 (ddd, *J* = 4.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H, H6), 8.31 (s, 1H, CHN), 7.82 (dt, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H, H4), 7.72 (td, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H3), 7.29 (ddd, *J* = 8.1, 4.9, 1.0 Hz, 1H, H5).

[Spectrum in accordance with Zhang *et al.* 2013³⁵²]

3.5.3. [\(E\)-Picolinaldehyde O-\(6-chlorobenzo\[b\]thiophene-2-carbonyl\) oxime \(XVIII.d\)](#)



Chemical Formula: C₁₅H₉ClN₂O₂S

Molecular Weight: 316,76

Partie 3 – Données expérimentales

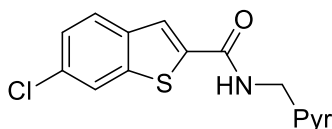
To a solution of 6-chlorobenzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid (1.1 mmol, 1.3 eq.) and pyridine 2-aldoxime (0.82 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (3 mL) at 0 °C were added DMAP (0.12 mmol, 0.15 eq.) and gradually DCC (1.1 mmol, 1.3 eq.). The mixture was stirred at room temperature overnight and then filtered on Celite® and washed with DCM. The filtrate was then concentrated, and the residue was purified by chromatography (eluent: pentane/EtOAc 2:1) to give desired product as an orange powder (166 mg, 64% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.85 (s, 1H, CH-NO), 8.77 – 8.73 (m, 1H, H3'), 8.43 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, H3), 8.33 (dt, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H, H7), 8.10 (dd, *J* = 8.5, 0.7 Hz, 1H, H4), 8.04 – 7.95 (m, 2H, H5' + H6'), 7.62 – 7.54 (m, 2H, H4' + H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0 (CONH), 158.4 (CHN), 150.1 (C3'), 148.9 (C1'), 142.7 (C7a), 137.3 (C3a), 137.0 (C3), 132.6 (C6), 131.6 (C5'), 131.0 (C2), 127.4 (C4), 126.1 (2C, C5 + C4'), 122.6 (C7), 122.5 (C6').

HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₅H₁₀ClN₂O₂S [M+H]⁺ 317.0146, found 317.0136.

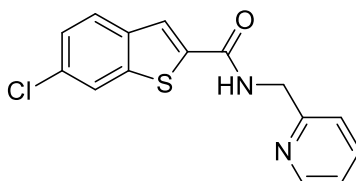
3.5.4. [General procedure for 6-chloro-*N*-\(pyridinylmethyl\)benzo\[*b*\]thiophene-2-carboxamides](#)



Chemical Formula: C₁₅H₁₃ClN₂O₃S
Molecular Weight: 336,79

To a solution of 6-chlorobenzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid (0.55 mmol, 1.1 eq.) and picolylamine (0.50 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (3 mL) at 0 °C were added DMAP (0.065 mmol, 0.13 eq.) and gradually DCC (0.60 mmol, 1.2 eq.). The mixture was then stirred at room temperature for 16 h and then filtered on Celite® and washed with DCM. The filtrate was then concentrated, and the residue was purified by chromatography (EtOAc 100%).

6-Chloro-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)benzo[*b*]thiophene-2-carboxamide (XVIII.e)



Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS
Molecular Weight: 302,78

Partie 3 – Données expérimentales

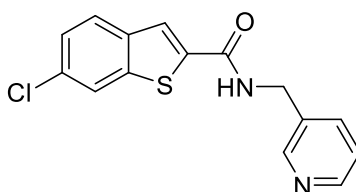
White powder (110 mg, 73% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.44 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.53 (ddd, J = 4.9, 1.9, 0.8 Hz, 1H, H6'), 8.21 (dt, J = 1.9, 0.8 Hz, 1H, H7), 8.17 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H3), 7.98 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.78 (td, J = 7.8, 1.9 Hz, 1H, H4'), 7.48 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 1H, H5), 7.37 (dt, J = 7.8, 1.1 Hz, 1H, H3'), 7.29 (ddd, J = 7.7, 4.9, 1.1 Hz, 1H, H5'), 4.59 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.6 (CONH), 158.3 (C1'), 149.0 (C3'), 141.5 (C7a), 140.7 (C3a), 138.0 (C6), 136.9 (C5'), 131.2 (C2), 126.7 (C3), 125.7 (C4), 124.6 (C5), 122.5 (C7), 122.4 (C6'), 121.2 (C4'), 44.8 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₅H₁₂ClN₂OS [M+H]⁺ 303.0353, found 303.0354.

6-Chloro-N-(pyridin-3-ylmethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide (XVIII.f)



Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS
Molecular Weight: 302,78

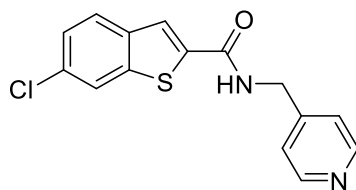
White powder (64 mg, 42% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.40 (t, J = 5.9 Hz, 1H, NH), 8.57 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H2'), 8.48 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H6'), 8.20 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H7), 8.11 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H3), 7.96 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.75 (dt, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H4'), 7.47 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H5), 7.37 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H5'), 4.51 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.5 (CONH), 149.0 (C2'), 148.3 (C6'), 141.5 (C7a), 140.5 (C3a), 137.9 (C6), 135.3 (C4'), 134.6 (C3'), 131.2 (C2), 126.7 (C3), 125.6 (C4), 124.6 (C5), 123.6 (C5'), 122.5 (C7a), 40.5 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₅H₁₂ClN₂OS [M+H]⁺ 303.0353, found 303.0347.

6-Chloro-N-(pyridin-4-ylmethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide (XVIII.g)



Chemical Formula: C₁₅H₁₁ClN₂OS
Molecular Weight: 302,78

Partie 3 – Données expérimentales

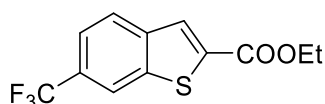
White powder (52 mg, 35% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.45 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.52 (dd, J = 4.4, 1.7 Hz, 2H, H2'), 8.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H7), 8.15 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H3), 7.98 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H4), 7.48 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 7.33 (dd, J = 4.4, 1.7 Hz, 2H, H3'), 4.51 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.6 (CONH), 149.7 (C2'), 148.1 (C4'), 141.5 (C7a), 140.4 (C3a), 137.9 (C6), 131.2 (C2), 126.7 (C3), 125.7 (C4), 124.7 (C5), 122.5 (C7), 122.2 (C3'), 41.8 (CH₂).

HRMS (ESI) m/z : calcd. for C₁₅H₁₂ClN₂O₂S [M+H]⁺ 303.0353, found 303.0358.

3.5.5. [Ethyl 6-\(trifluoromethyl\)benzo\[*b*\]thiophene-2-carboxylate \(56c\)](#)



Chemical Formula: C₁₂H₉F₃O₂S

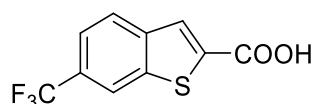
Molecular Weight: 274,26

To a solution of 2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (5.2 mmol, 1.0 eq.) and K₂CO₃ (5.7 mmol, 1.1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL) was added ethyl thioglycolate (6.2 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at 60 °C for 2 h, then diluted with water, extracted with Et₂O, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then recrystallized in MeOH and filtered to give desired product as a white powder (814 mg, 57% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 8.16 (q, J = 0.8 Hz, 1H, H7), 8.10 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H3), 7.98 (dt, J = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H4), 7.63 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H, H5), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Tan *et al.* 2021³⁵³]

3.5.6. [6-\(Trifluoromethyl\)benzo\[*b*\]thiophene-2-carboxylic acid \(53d\)](#)



Chemical Formula: C₁₀H₅F₃O₂S

Molecular Weight: 246,20

See procedure for 6-halogenobenzo[*b*]thiophene carboxylic acids, paragraph 3.4.2.

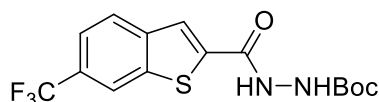
Partie 3 – Données expérimentales

White powder (400 mg, 89% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.59 (q, J = 0.8 Hz, 1H, H7), 8.10 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H3), 7.98 (dt, J = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H4), 7.75 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 1H, H5).

[Spectrum in accordance with Tan *et al.* 2021³⁵³]

3.5.7. Tert-butyl 2-(6-(trifluoromethyl)benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54d)



Chemical Formula: C₁₅H₁₅F₃N₂O₃S

Molecular Weight: 360,35

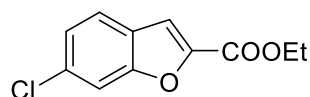
See procedure for *tert*-butyl 2-(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54a), paragraph 3.3.1.

White powder (213 mg, 64% yield).

^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 9.11 (s, 1H, CONH), 7.94 (s, 1H, H7), 7.82 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H4), 7.80 (s, 1H, H3), 7.56 (dd, J = 8.7, 1.7 Hz, 1H, H4), 6.76 (s, 1H, NHBoc), 1.53 (s, 9H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) δ 162.2 (CONH), 156.5 (CO Boc), 142.9 (C7a), 142.1 (C3a), 141.6 (C2), 128.5 (q, J = 32.3 Hz, C6), 127.1 (C4), 125.8 (C3), 125.4 (q, J = 271.5 Hz, CF₃), 122.2 (q, J = 3.5 Hz, C5), 121.2 (q, J = 4.5 Hz, C7), 80.9 (C Boc), 28.4 (CH₃ Boc).

3.5.8. Ethyl 6-chlorobenzofuran-2-carboxylate (56d)



Chemical Formula: C₁₁H₉ClO₃

Molecular Weight: 224,64

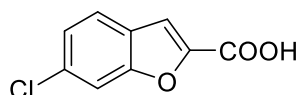
To a solution of 4-chlorosalicylaldehyde (6.4 mmol, 1.0 eq.) and K₂CO₃ (19.7 mmol, 3.1 eq.) in 2-butanone (6 mL) was added ethyl bromomalonate (13.0 mmol, 2.0 eq.) The mixture was stirred at 90 °C for 7 h and at room temperature for 16 h, then diluted with EtOAc, neutralized with HCl 1 N and extracted. The organic phase was washed with sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was then purified by chromatography (eluent: pentane / Et₂O 9:1) to give desired product as a white powder (611 mg, 43% yield).

Partie 3 – Données expérimentales

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.62 – 7.57 (m, 2H, H4 + H7), 7.49 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.29 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 1H, H5), 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

[Spectrum in accordance with Chen *et al.* 2017³⁵⁴]

3.5.9. 6-Chlorobenzofuran-2-carboxylic acid (53e)



Chemical Formula: C₉H₅ClO₃
Molecular Weight: 196,59

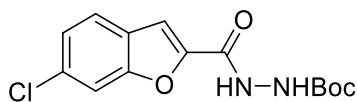
See procedure for 6-halogenobenzo[*b*]thiophene carboxylic acids, paragraph 3.4.2.

White powder (378 mg, 86% yield).

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.90 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H7), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H4), 7.68 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H3), 7.40 (dd, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H4).

[Spectrum in accordance with Gensini *et al.* 2010³⁵⁵]

3.5.10. *Tert*-butyl 2-(6-chlorobenzofuran-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (54e)



Chemical Formula: C₁₄H₁₅ClN₂O₄
Molecular Weight: 310,73

See procedure for *tert*-butyl 2-(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (**54a**), paragraph 3.3.1.

White powder (281 mg, 78% yield).

^1H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 9.74 (s, 1H, CONH), 8.17 (s, 1H, NHBoc), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H4), 7.65–7.53 (m, 2H, H3 + H7), 7.35 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H5), 1.45 (s, 9H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) δ 158.8 (CONH), 156.3 (COBoc), 155.8 (C7a), 149.8 (C3a), 133.2 (C6), 127.1 (C2), 125.4 (C3), 124.7 (C4), 113.0 (C5), 111.3 (C7), 80.8 (C Boc), 28.4 (CH₃ Boc).

II. Biology

1. Minimum inhibitory concentration evaluation

MICs were evaluated in CaMHB (cation-adjusted Mueller-Hinton broth) by the method of microdilution in liquid medium which follows the CLSI recommendations¹⁹⁵. Evaluated compounds were diluted in DMSO at a concentration of 5 mg/mL and then further diluted in CaMHB to reach 1 mg/mL. The 0.5 MacFarland bacterial suspensions were made from colonies previously grown on blood agar plate (COS, Biomérieux) in a saline solution (0.45% NaCl), they were diluted in CaMHB (1/100) before addition into 96-well microplates. MICs were done in triplicate and determined after 18 h of incubation at 37 °C. The median values were reported.

2. Divisome inhibition assay

Bacteria were grown for 18 h in BHI (Brain Heart Infusion) with 0.125 M of D-serine, to promote the incorporation of this amino acid into the cell wall. The culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 into the same medium containing either the tested compound (concentration equal to the MIC), **PC190723** (2 µg/mL) or nothing (negative control) and grown in a 96-well plate with agitation at 37 °C for 4 h. Bacteria were then centrifuged and resuspended in the same volume of BHI without D-serine nor antibiotic. The bacteria were then incubated for 15 min at room temperature, to allow the incorporation of D-alanine into the cell wall and then labeled with a mixture of equal amounts of vancomycin (Sigma) and a BODIPY FL conjugate of vancomycin (Van-FL, Molecular Probes) at the final concentration of 1 µg/ml, for 5 min at room temperature with agitation. Bacteria were then analyzed by fluorescence microscopy using a Zeiss LSM 880 Airyscan confocal microscope.

3. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated using a propidium iodide assay. Human lung adenocarcinomic A549 cells were plated on black flat 96-well plates (Greiner) at a concentration of 0.5 x 10⁶ cells/mL in DMEM GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum for 24 h in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. The medium was then removed and fresh medium with 2.5 µg/mL of propidium iodide and cytotoxic agent (recombinant H1a at 0.2 µg/mL or tested compounds at 32 or 64 times the MIC) were added. Plates were incubated for 7 h at 37°C and cytotoxicity induced was evaluated by measuring propidium iodide (PI) incorporation into cells exposed to toxin or compounds using a fluorescence cell sorter (Spark R, TECAN, Zürich, Switzerland). Each concentration was made as a triplicate and mean values are displayed with standard deviation.

III. Molecular modeling

1. Part 1 – Chapter 2

Docking studies of benzamide inhibitors in the allosteric pocket of FtsZ

The compounds were drawn on Chem3D (PerkinElmer Informatics), minimized with MM2 forcefield and saved as pdb files. The files were then converted to pdbqt format using OpenBabel³⁵⁶. Docking was then performed on rigid SaFtsZ (PDB: 6KVP) centered on the allosteric ligand site with Vina¹⁹⁷. The side chain of amino acids Met98, Val129, Ile197, Leu200, Val203, Asn208, Leu209, Val214, Met218, Ile228, Asn263, Val297 and Thr309 was set as flexible. Visualization was performed with PyMOL and hydrogen bond network was generated using LigPlot +³⁵⁷.

2. Part 1 – Chapter 3

Docking studies of hydroxamic acid **XI.a** in the allosteric pocket of FtsZ

The compound was drawn on Chem3D (PerkinElmer Informatics), minimized with MM2 forcefield and saved as pdb file. The file was then converted to pdbqt format using OpenBabel³⁵⁶. Docking was then performed on rigid SaFtsZ (PDB: 4DXD) centered on the allosteric ligand site with Vina¹⁹⁷. Visualization was performed with PyMOL and hydrogen bond network was generated using LigPlot +³⁵⁷.

3. Part 1 – Chapter 4

Docking-based virtual screening of the PubChem BioAssay database in the allosteric pocket of FtsZ

The chemical library of compounds identified as tubulin stabilizers was obtained from PubChem Bioassay (code AID 2205) and 1 625 structures were downloaded as sdf files.

3.1. Shape-based method

Hydrogen atoms were added and sdf files using OpenBabel³⁵⁶. Docking was performed on rigid SaFtsZ (PDB: 4DXD) centered on the allosteric ligand site with Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. Compounds were then ranked according to their docking score and the compounds in the top 10 were examined.

3.2. Stochastic method

Hydrogen atoms were added and sdf files were then converted to pdbqt format using OpenBabel³⁵⁶. Docking was performed on rigid SaFtsZ (PDB: 4DXD) centered on the allosteric ligand site with Vina using PyRX as a graphical user interface^{197,359}. Compounds were then ranked according to their docking score and the compounds in the top 10 were examined.

4. Part 2 – Chapter 2

4.1. Docking studies of known main protease inhibitors in the catalytic site

Compounds **Inhib-1**, **-2** and **-3** were generated as 3D mol file using Arguslab and they were then docked within the M^{Pro} active site (PDB codes 5RHF, 5REN, 5REK respectively) using Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. The obtained binding modes were compared to crystallographic data to validate the method. The distance between the sulfur and the methylene group of the chloroacetamide group was monitored to establish the structural bases of the M^{Pro} covalent inhibition (distance < 4 Å).

4.2. Docking-based virtual screening of potential covalent inhibitors

Compounds libraries were obtained from PubChem using structure search of acrylamide, halogenoacetamide, cyanoacrylamide and vinylsulfonamide. Asinex and Enamine soft electrophilic compounds libraries were obtained from the corresponding website and hydrogen atoms were added using OpenBabel³⁵⁶. Each compound from the different libraries (SDF file) were then docked within the M^{Pro} active site centered on the β -keto amide co-crystallized in the catalytic site using Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. Based on their docking score, binding modes were analyzed for the 20 best compounds of each library. The distance between the sulfur and the electrophilic center was monitored and compounds were selected when a distance < 4 Å was measured. Binding modes were examined with PyMOL and hydrogen bonds networks were generated using LigPlot +³⁵⁷.

4.3. Docking-based virtual screening of approved covalent drugs

The library was constructed based on the list of covalent drugs established by Vasudevan and co-workers, from which β -lactam derivatives, drugs withdrawn from market and mechanism based covalent drugs were excluded³¹⁰. For five of the 29 remaining compounds, their metabolites which are the active covalent binders were used in the library³⁶⁰. Overall, 32 compounds were used for the docking studies. When available, the SDF file for each compound was obtained from PubChem and was

converted to pdb file using Accelrys Visualizer 2.0. For omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and rabeprazole active metabolites, they were drawn using Vega ZZ and were saved as pdb files^{361,362}. The 32 compounds were then docked within the M^{Pro} active site centered on the β -keto amide co-crystallized in the catalytic site using Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. The distance between the sulfur and the electrophilic center was monitored and compounds were selected when a distance $< 4 \text{ \AA}$ was measured. Binding modes were examined with PyMOL and hydrogen bonds networks were generated using LigPlot +³⁵⁷.

5. [Part 2 – Chapter 3](#)

5.1. [Homology studies](#)

The PDB structures of main proteases from avian infectious bronchitis virus (PDB code 2Q6F) and from SARS-CoV-2 (PDB code 6Y2F) were downloaded from the PDB database. The multiple sequence alignment was obtained using the T-COFFEE server with the corresponding FASTA file retrieved in the NCBI database³⁶³. The ESPript server was used with the clustal W file to generate the multiple sequence alignment³²⁶. The 3D-structural alignment between the two proteins was obtained using PyMOL and the comparison of the two active sites was performed with this software.

5.2. [Docking-based virtual screening of IBV main protease inhibitors for the reversible inhibition of SARS-CoV-2's main protease](#)

Each 388 compounds from the SDF library were docked within the M^{Pro} active site of SARS-CoV-2 centered on the β -keto amide co-crystallized in the catalytic site using Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. Compounds were then ranked according to their docking score and the compounds in the top 5 were examined. Binding modes were examined with PyMOL and hydrogen bonds networks were generated using LigPlot +³⁵⁷.

5.3. [Molecular dynamics studies](#)

For all five best non-covalent inhibitors identified by flexible docking, the protein-ligand complexes were minimized using the minimization module of MOE 2019 with default parameters and then molecular dynamics simulations were performed in triplicate on the complexes using the dynamics module of MOE with the AMBER10 force field. The Nosé-Poincaré-Andersen (NPA) method was used, at the temperature of 300 K with 100 ps equilibration and 5000 ps production³⁶⁴. Conformational sampling was set each 10 ps leading to 500 frames. Trajectories were visualized with VMD and Calpha RMSD fluctuations were analyzed. To determine important amino acids bound with each ligand via hydrogen bonds, conformational samples each 1000 ps were superimposed to

provide an overview of the binding modes. Hydrogen bonds networks with distances of each sample were generated and examined and using LigPlot +³⁵⁷.

5.4. Docking-based virtual screening of IBV main protease inhibitors for the covalent inhibition of SARS-CoV-2's main protease

The chemical library of bioactive compounds on the main protease of the avian infectious bronchitis virus was obtained from PubChem Bioassay (code AID 1706). 388 compounds out of 405 were available and were downloaded as SDF file. The chemical library was then inspected to search for compounds bearing a soft electrophilic moiety. 40 compounds were obtained and each was then docked within the M^{Pro} active site of SARS-CoV-2 centered on the β -keto amide co-crystallized in the catalytic site using Arguslab software with the Argusdock engine with default parameters³⁵⁸. The docking results of all 40 compounds was analyzed and the distance between the sulfur and the electrophilic center was monitored. Four compounds were selected when a distance $< 4 \text{ \AA}$ was measured. Binding modes were examined with PyMOL and hydrogen bonds networks were generated using LigPlot +³⁵⁷.

PARTIE 4

—

Références bibliographiques

Partie 4 – Références bibliographiques

- (1) Antimicrobial resistance : tackling a crisis for the health and wealth of nations / the Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill. Wellcome Collection. <https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v/items> (accessed 2021-12-03).
- (2) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 2022-04-27).
- (3) Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* **2021**, *10* (10), 1310.
- (4) Ogston, A. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* **1882**, *17* (Pt 1), 24–58.
- (5) Marshall, J. H.; Wilmoth, G. J. Pigments of Staphylococcus Aureus, a Series of Triterpenoid Carotenoids. *J. Bacteriol.* **1981**, *147* (3), 900–913.
- (6) Lowy, F. D. Staphylococcus Aureus Infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339* (8), 520–532.
- (7) Tong, S. Y. C.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. Staphylococcus Aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (3), 603–661.
- (8) Fowler, V. G.; Miro, J. M.; Hoen, B.; Cabell, C. H.; Abrutyn, E.; Rubinstein, E.; Corey, G. R.; Spelman, D.; Bradley, S. F.; Barsic, B.; Pappas, P. A.; Anstrom, K. J.; Wray, D.; Fortes, C. Q.; Anguera, I.; Athan, E.; Jones, P.; van der Meer, J. T. M.; Elliott, T. S. J.; Levine, D. P.; Bayer, A. S. Staphylococcus Aureus Endocarditis: A Consequence of Medical Progress. *JAMA* **2005**, *293* (24), 3012–3021.
- (9) Cahill, T. J.; Prendergast, B. D. Infective Endocarditis. *The Lancet* **2016**, *387* (10021), 882–893.
- (10) McNeil, J. C.; Fritz, S. A. Prevention Strategies for Recurrent Community-Associated Staphylococcus Aureus Skin and Soft Tissue Infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2019**, *21* (4), 12.
- (11) Sheehy, S. H.; Atkins, B. A.; Bejon, P.; Byren, I.; Wyllie, D.; Athanasou, N. A.; Berendt, A. R.; McNally, M. A. The Microbiology of Chronic Osteomyelitis: Prevalence of Resistance to Common Empirical Anti-Microbial Regimens. *J. Infect.* **2010**, *60* (5), 338–343.
- (12) Guo, Y.; Song, G.; Sun, M.; Wang, J.; Wang, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus Aureus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 107.
- (13) Turner, N. A.; Sharma-Kuinkel, B. K.; Maskarinec, S. A.; Eichenberger, E. M.; Shah, P. P.; Carugati, M.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: An Overview of Basic and Clinical Research. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (4), 203–218.
- (14) Moraly, J.; Dahoumane, R.; Dubée, V.; Preda, G.; Baudel, J.-L.; Joffre, J.; Bigé, N.; Ait-Oufella, H.; Maury, E. Penicillin G Susceptibility in Staphylococcus Aureus Is Not so Infrequent. *Minerva Anesthesiol.* **2018**, *84* (1), 123–124.
- (15) Jevons, M. P. “Celbenin” - Resistant Staphylococci. *Br. Med. J.* **1961**, *1* (5219), 124–125.
- (16) Hartman, B. J.; Tomasz, A. Low-Affinity Penicillin-Binding Protein Associated with Beta-Lactam Resistance in Staphylococcus Aureus. *J. Bacteriol.* **1984**, *158* (2), 513–516.
- (17) Mühlberg, E.; Umstätter, F.; Kleist, C.; Domhan, C.; Mier, W.; Uhl, P. Renaissance of Vancomycin: Approaches for Breaking Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant Bacteria. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66* (1), 11–16.

Partie 4 – Références bibliographiques

- (18) Uttley, A. H. C.; George, R. C.; Naidoo, J.; Woodford, N.; Johnson, A. P.; Collins, C. H.; Morrison, D.; Gilfillan, A. J.; Fitch, L. E.; Heptonstall, J. High-Level Vancomycin-Resistant Enterococci Causing Hospital Infections. *Epidemiol. Infect.* **1989**, 103 (1), 173–181.
- (19) Chang, S.; Sievert, D. M.; Hageman, J. C.; Boulton, M. L.; Tenover, F. C.; Downes, F. P.; Shah, S.; Rudrik, J. T.; Pupp, G. R.; Brown, W. J.; Cardo, D.; Fridkin, S. K. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Containing the VanA Resistance Gene. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348 (14), 1342–1347.
- (20) Gardete, S.; Tomasz, A. Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *J. Clin. Invest.* **2014**, 124 (7), 2836–2840.
- (21) Cong, Y.; Yang, S.; Rao, X. Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections: A Review of Case Updating and Clinical Features. *J. Adv. Res.* **2020**, 21, 169–176.
- (22) Wu, Q.; Sabokroo, N.; Wang, Y.; Hashemian, M.; Karamollahi, S.; Kouhsari, E. Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Resistance *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2021**, 10 (1), 101.
- (23) Fowler, V. G.; Boucher, H. W.; Corey, G. R.; Abrutyn, E.; Karchmer, A. W.; Rupp, M. E.; Levine, D. P.; Chambers, H. F.; Tally, F. P.; Vigliani, G. A.; Cabell, C. H.; Link, A. S.; DeMeyer, I.; Filler, S. G.; Zervos, M.; Cook, P.; Parsonnet, J.; Bernstein, J. M.; Price, C. S.; Forrest, G. N.; Fätkenheuer, G.; Gareca, M.; Rehm, S. J.; Brodt, H. R.; Tice, A.; Cosgrove, S. E. Daptomycin versus Standard Therapy for Bacteremia and Endocarditis Caused by *Staphylococcus Aureus*. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 355 (7), 653–665.
- (24) Wunderink, R. G.; Niederman, M. S.; Kollef, M. H.; Shorr, A. F.; Kunkel, M. J.; Baruch, A.; McGee, W. T.; Reisman, A.; Chastre, J. Linezolid in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Nosocomial Pneumonia: A Randomized, Controlled Study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2012**, 54 (5), 621–629.
- (25) Boucher, H. W.; Wilcox, M.; Talbot, G. H.; Puttagunta, S.; Das, A. F.; Dunne, M. W. Once-Weekly Dalbavancin versus Daily Conventional Therapy for Skin Infection. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370 (23), 2169–2179.
- (26) Corey, G. R.; Kabler, H.; Mehra, P.; Gupta, S.; Overcash, J. S.; Porwal, A.; Giordano, P.; Lucasti, C.; Perez, A.; Good, S.; Jiang, H.; Moeck, G.; O’Riordan, W.; SOLO I Investigators. Single-Dose Oritavancin in the Treatment of Acute Bacterial Skin Infections. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370 (23), 2180–2190.
- (27) Chambers, H. F.; DeLeo, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus Aureus* in the Antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7 (9), 629–641.
- (28) Voss, A.; Loeffen, F.; Bakker, J.; Klaassen, C.; Wulf, M. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Pig Farming. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, 11 (12), 1965–1966.
- (29) Lee, A. S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2018**, 4 (1), 1–23.
- (30) Álvarez, A.; Fernández, L.; Gutiérrez, D.; Iglesias, B.; Rodríguez, A.; García, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Hospitals: Latest Trends and Treatments Based on Bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, 57 (12), e01006-19.
- (31) Liu, S.; Zhao, Y.; Hayes, A.; Hon, K.; Zhang, G.; Bennett, C.; Hu, H.; Finnie, J.; Morales, S.; Shearwin, L.; Psaltis, A. J.; Shearwin, K.; Wormald, P.-J.; Vreugde, S. Overcoming Bacteriophage Insensitivity in *Staphylococcus Aureus* Using Clindamycin and Azithromycin at Subinhibitory Concentrations. *Allergy* **2021**, 76 (11), 3446–3458.

- (32) Saraiva, F. B.; de Araújo, A. C. C.; de Araújo, A. É. V.; Senna, J. P. M. Monoclonal Antibody Anti-PBP2a Protects Mice against MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) Infections. *PLoS ONE* **2019**, 14 (11), e0225752.
- (33) Kobayashi, S. D.; DeLeo, F. R. Towards a Monoclonal Antibody-Based Therapy for Prevention and Treatment of *Staphylococcus Aureus* Infections. *J. Infect. Dis.* **2019**, 219 (6), 848–850.
- (34) Egan, A. J. F.; Vollmer, W. The Physiology of Bacterial Cell Division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, 1277 (1), 8–28.
- (35) Lutkenhaus, J. F.; Wolf-Watz, H.; Donachie, W. D. Organization of Genes in the FtsA-EnvA Region of the *Escherichia Coli* Genetic Map and Identification of a New Fts Locus (FtsZ). *J. Bacteriol.* **1980**, 142 (2), 615–620.
- (36) Nogales, E.; Downing, K. H.; Amos, L. A.; Löwe, J. Tubulin and FtsZ Form a Distinct Family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (6), 451–458.
- (37) Erickson, H. P. FtsZ, a Tubulin Homologue in Prokaryote Cell Division. *Trends Cell Biol.* **1997**, 7 (9), 362–367.
- (38) Löwe, J.; Amos, L. A. Crystal Structure of the Bacterial Cell-Division Protein FtsZ. *Nature* **1998**, 391 (6663), 203–206.
- (39) Matsui, T.; Yamane, J.; Mogi, N.; Yamaguchi, H.; Takemoto, H.; Yao, M.; Tanaka, I. Structural Reorganization of the Bacterial Cell-Division Protein FtsZ from *Staphylococcus Aureus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, 68 (Pt 9), 1175–1188.
- (40) Huecas, S.; Canosa-Valls, A. J.; Araújo-Bazán, L.; Ruiz, F. M.; Laurents, D. V.; Fernández-Tornero, C.; Andreu, J. M. Nucleotide-Induced Folding of Cell Division Protein FtsZ from *Staphylococcus Aureus*. *FEBS J.* **2020**, 287 (18), 4048–4067.
- (41) Mukherjee, A.; Lutkenhaus, J. Guanine Nucleotide-Dependent Assembly of FtsZ into Filaments. *J. Bacteriol.* **1994**, 176 (9), 2754–2758.
- (42) Wagstaff, J. M.; Tsim, M.; Oliva, M. A.; García-Sánchez, A.; Kureisaite-Ciziene, D.; Andreu, J. M.; Löwe, J. A Polymerization-Associated Structural Switch in FtsZ That Enables Treadmilling of Model Filaments. *mBio* **2017**, 8 (3), e00254-17.
- (43) Oliva, M. A.; Trambaiolo, D.; Löwe, J. Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. *J. Mol. Biol.* **2007**, 373 (5), 1229–1242.
- (44) Erickson, H. P.; Anderson, D. E.; Osawa, M. FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74 (4), 504–528.
- (45) Stricker, J.; Maddox, P.; Salmon, E. D.; Erickson, H. P. Rapid Assembly Dynamics of the *Escherichia Coli* FtsZ-Ring Demonstrated by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (5), 3171–3175.
- (46) Yang, X.; Lyu, Z.; Miguel, A.; McQuillen, R.; Huang, K. C.; Xiao, J. GTPase Activity-Coupled Treadmilling of the Bacterial Tubulin FtsZ Organizes Septal Cell Wall Synthesis. *Science* **2017**, 355 (6326), 744–747.
- (47) Steele, V. R.; Bottomley, A. L.; Garcia-Lara, J.; Kasturiarachchi, J.; Foster, S. J. Multiple Essential Roles for EzrA in Cell Division of *Staphylococcus Aureus*. *Mol. Microbiol.* **2011**, 80 (2), 542–555.
- (48) Pichoff, S.; Lutkenhaus, J. Unique and Overlapping Roles for ZipA and FtsA in Septal Ring Assembly in *Escherichia Coli*. *EMBO J.* **2002**, 21 (4), 685–693.
- (49) Mosyak, L.; Zhang, Y.; Glasfeld, E.; Haney, S.; Stahl, M.; Sehra, J.; Somers, W. S. The Bacterial Cell-Division Protein ZipA and Its Interaction with an FtsZ Fragment Revealed by X-Ray Crystallography. *EMBO J.* **2000**, 19 (13), 3179–3191.

Partie 4 – Références bibliographiques

- (50) Hale, C. A.; de Boer, P. A. Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure That Mediates Cell Division in *E. Coli*. *Cell* **1997**, 88 (2), 175–185.
- (51) Allard, J. F.; Cytrynbaum, E. N. Force Generation by a Dynamic Z-Ring in *Escherichia Coli* Cell Division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106 (1), 145–150.
- (52) Hsin, J.; Gopinathan, A.; Huang, K. C. Nucleotide-Dependent Conformations of FtsZ Dimers and Force Generation Observed through Molecular Dynamics Simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (24), 9432–9437.
- (53) Addinall, S. G.; Bi, E.; Lutkenhaus, J. FtsZ Ring Formation in Fts Mutants. *J. Bacteriol.* **1996**, 178 (13), 3877–3884.
- (54) Margolin, W. Themes and Variations in Prokaryotic Cell Division. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24 (4), 531–548.
- (55) Haydon, D. J.; Stokes, N. R.; Ure, R.; Galbraith, G.; Bennett, J. M.; Brown, D. R.; Baker, P. J.; Barynin, V. V.; Rice, D. W.; Sedelnikova, S. E.; Heal, J. R.; Sheridan, J. M.; Aiwale, S. T.; Chauhan, P. K.; Srivastava, A.; Taneja, A.; Collins, I.; Errington, J.; Czaplowski, L. G. An Inhibitor of FtsZ with Potent and Selective Anti-Staphylococcal Activity. *Science* **2008**, 321 (5896), 1673–1675.
- (56) Haranahalli, K.; Tong, S.; Ojima, I. Recent Advances in the Discovery and Development of Antibacterial Agents Targeting the Cell-Division Protein FtsZ. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24 (24), 6354–6369.
- (57) Tripathy, S.; Sahu, S. K. FtsZ Inhibitors as a New Genera of Antibacterial Agents. *Bioorganic Chem.* **2019**, 91, 103169.
- (58) Carro, L. Recent Progress in the Development of Small-Molecule FtsZ Inhibitors as Chemical Tools for the Development of Novel Antibiotics. *Antibiotics* **2019**, 8 (4), 217.
- (59) Pradhan, P.; Margolin, W.; Beuria, T. K. Targeting the Achilles Heel of FtsZ: The Interdomain Cleft. *Front. Microbiol.* **2021**, 12, 2579.
- (60) Gurnani, M.; Chauhan, A.; Ranjan, A.; Tuli, H. S.; Alkhanani, M. F.; Haque, S.; Dhama, K.; Lal, R.; Jindal, T. Filamentous Thermosensitive Mutant Z: An Appealing Target for Emerging Pathogens and a Trek on Its Natural Inhibitors. *Biology* **2022**, 11 (5), 624.
- (61) Tan, C. M.; Therien, A. G.; Lu, J.; Lee, S. H.; Caron, A.; Gill, C. J.; Lebeau-Jacob, C.; Benton-Perdomo, L.; Monteiro, J. M.; Pereira, P. M.; Elsen, N. L.; Wu, J.; Deschamps, K.; Petcu, M.; Wong, S.; Daigneault, E.; Kramer, S.; Liang, L.; Maxwell, E.; Claveau, D.; Vaillancourt, J.; Skorey, K.; Tam, J.; Wang, H.; Meredith, T. C.; Sillaots, S.; Wang-Jarantow, L.; Ramtohul, Y.; Langlois, E.; Landry, F.; Reid, J. C.; Parthasarathy, G.; Sharma, S.; Baryshnikova, A.; Lumb, K. J.; Pinho, M. G.; Soisson, S. M.; Roemer, T. Restoring Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Susceptibility to β -Lactam Antibiotics. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4 (126), 126ra35-126ra35.
- (62) Rai, D.; Singh, J. K.; Roy, N.; Panda, D. Curcumin Inhibits FtsZ Assembly: An Attractive Mechanism for Its Antibacterial Activity. *Biochem. J.* **2008**, 410 (1), 147–155.
- (63) Gupta, K. K.; Bharne, S. S.; Rathinasamy, K.; Naik, N. R.; Panda, D. Dietary Antioxidant Curcumin Inhibits Microtubule Assembly through Tubulin Binding. *FEBS J.* **2006**, 273 (23), 5320–5332.
- (64) Plaza, A.; Keffer, J. L.; Bifulco, G.; Lloyd, J. R.; Bewley, C. A. Chrysopaentins A–H, Antibacterial Bisdiarylbutene Macrocycles That Inhibit the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (26), 9069–9077.

Partie 4 – Références bibliographiques

- (65) Keffer, J. L.; Huecas, S.; Hammill, J. T.; Wipf, P.; Andreu, J. M.; Bewley, C. A. Chrysopaentins Are Competitive Inhibitors of FtsZ and Inhibit Z-Ring Formation in Live Bacteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (18), 5673–5678.
- (66) Mahanty, S.; Rathinasamy, K. The Natural Anthraquinone Dye Purpurin Exerts Antibacterial Activity by Perturbing the FtsZ Assembly. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 50, 116463.
- (67) Läppchen, T.; Hartog, A. F.; Pinas, V. A.; Koomen, G.-J.; den Blaauwen, T. GTP Analogue Inhibits Polymerization and GTPase Activity of the Bacterial Protein FtsZ without Affecting Its Eukaryotic Homologue Tubulin. *Biochemistry* **2005**, 44 (21), 7879–7884.
- (68) Läppchen, T.; Pinas, V. A.; Hartog, A. F.; Koomen, G.-J.; Schaffner-Barbero, C.; Andreu, J. M.; Trambaiolo, D.; Löwe, J.; Juhem, A.; Popov, A. V.; den Blaauwen, T. Probing FtsZ and Tubulin with C8-Substituted GTP Analogs Reveals Differences in Their Nucleotide Binding Sites. *Chem. Biol.* **2008**, 15 (2), 189–199.
- (69) Ruiz-Avila, L. B.; Huecas, S.; Artola, M.; Vergoñós, A.; Ramírez-Aportela, E.; Cercenado, E.; Barasoain, I.; Vázquez-Villa, H.; Martín-Fontecha, M.; Chacón, P.; López-Rodríguez, M. L.; Andreu, J. M. Synthetic Inhibitors of Bacterial Cell Division Targeting the GTP-Binding Site of FtsZ. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8 (9), 2072–2083.
- (70) Artola, M.; Ruiz-Avila, L. B.; Vergoñós, A.; Huecas, S.; Araujo-Bazán, L.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Turrado, C.; Ramírez-Aportela, E.; Hoegl, A.; Nodwell, M.; Barasoain, I.; Chacón, P.; Sieber, S. A.; Andreu, J. M.; López-Rodríguez, M. L. Effective GTP-Replacing FtsZ Inhibitors and Antibacterial Mechanism of Action. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10 (3), 834–843.
- (71) Margalit, D. N.; Romberg, L.; Mets, R. B.; Hebert, A. M.; Mitchison, T. J.; Kirschner, M. W.; RayChaudhuri, D. Targeting Cell Division: Small-Molecule Inhibitors of FtsZ GTPase Perturb Cytokinetic Ring Assembly and Induce Bacterial Lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101 (32), 11821–11826.
- (72) Nepomuceno, G. M.; Chan, K. M.; Huynh, V.; Martin, K. S.; Moore, J. T.; O'Brien, T. E.; Pollo, L. A. E.; Sarabia, F. J.; Tadeus, C.; Yao, Z.; Anderson, D. E.; Ames, J. B.; Shaw, J. T. Synthesis and Evaluation of Quinazolines as Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (3), 308–312.
- (73) Yamamoto, S.; Saito, R.; Nakamura, S.; Sogawa, H.; Karpov, P.; Shulga, S.; Blume, Y.; Kurita, N. Proposal of Potent Inhibitors for a Bacterial Cell Division Protein FtsZ: Molecular Simulations Based on Molecular Docking and Ab Initio Molecular Orbital Calculations. *Antibiotics* **2020**, 9 (12), 846.
- (74) Huecas, S.; Araújo-Bazán, L.; Ruiz, F. M.; Ruiz-Ávila, L. B.; Martínez, R. F.; Escobar-Peña, A.; Artola, M.; Vázquez-Villa, H.; Martín-Fontecha, M.; Fernández-Tornero, C.; López-Rodríguez, M. L.; Andreu, J. M. Targeting the FtsZ Allosteric Binding Site with a Novel Fluorescence Polarization Screen, Cytological and Structural Approaches for Antibacterial Discovery. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (9), 5730–5745.
- (75) Chan, F.-Y.; Sun, N.; Neves, M. A. C.; Lam, P. C.-H.; Chung, W.-H.; Wong, L.-K.; Chow, H.-Y.; Ma, D.-L.; Chan, P.-H.; Leung, Y.-C.; Chan, T.-H.; Abagyan, R.; Wong, K.-Y. Identification of a New Class of FtsZ Inhibitors by Structure-Based Design and in Vitro Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (8), 2131–2140.
- (76) Chan, K.-F.; Sun, N.; Yan, S.-C.; Wong, I. L. K.; Lui, H.-K.; Cheung, K.-C.; Yuan, J.; Chan, F.-Y.; Zheng, Z.; Chan, E. W. C.; Chen, S.; Leung, Y.-C.; Chan, T. H.; Wong, K.-Y. Efficient Synthesis of Amine-Linked 2,4,6-Trisubstituted Pyrimidines as a New Class of Bacterial FtsZ Inhibitors. *ACS Omega* **2017**, 2 (10), 7281–7292.

- (77) Fang, Z.; Zheng, S.; Chan, K.-F.; Yuan, W.; Guo, Q.; Wu, W.; Lui, H.-K.; Lu, Y.; Leung, Y.-C.; Chan, T.-H.; Wong, K.-Y.; Sun, N. Design, Synthesis and Antibacterial Evaluation of 2,4-Disubstituted-6-Thiophenyl-Pyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 141–153.
- (78) Fang, Z.; Li, Y.; Zheng, Y.; Li, X.; Lu, Y.-J.; Yan, S.-C.; Wong, W.-L.; Chan, K.-F.; Wong, K.; Sun, N. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of a Thiophenyl Substituted Pyrimidine Derivative. *RSC Adv.* **2019**, *9* (19), 10739–10744.
- (79) Sun, J.; Li, M.-H.; Wang, X.-Y.; Zhang, Y.; Yuan, R.-J.; Liu, H.-Y.; Zhu, H.-L. Vanillin Derivatives as the Selective Small Molecule Inhibitors of FtsZ. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23* (6), 2985–2994.
- (80) Chakraborti, S.; Das, L.; Kapoor, N.; Das, A.; Dwivedi, V.; Poddar, A.; Chakraborti, G.; Janik, M.; Basu, G.; Panda, D.; Chakraborti, P.; Surolia, A.; Bhattacharyya, B. Curcumin Recognizes a Unique Binding Site of Tubulin. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (18), 6183–6196.
- (81) Kusuma, K. D.; Griffith, R.; Harry, E. J.; Bottomley, A. L.; Ung, A. T. In Silico Analysis of FtsZ Crystal Structures Towards a New Target for Antibiotics. *Aust. J. Chem.* **2018**, *72* (3), 184.
- (82) Ohashi, Y.; Chijiwa, Y.; Suzuki, K.; Takahashi, K.; Nanamiya, H.; Sato, T.; Hosoya, Y.; Ochi, K.; Kawamura, F. The Lethal Effect of a Benzamide Derivative, 3-Methoxybenzamide, Can Be Suppressed by Mutations within a Cell Division Gene, FtsZ, in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (4), 1348–1351.
- (83) Czaplewski, L. G.; Collins, I.; Boyd, E. A.; Brown, D.; East, S. P.; Gardiner, M.; Fletcher, R.; Haydon, D. J.; Henstock, V.; Ingram, P.; Jones, C.; Noula, C.; Kennison, L.; Rockley, C.; Rose, V.; Thomaidis-Brears, H. B.; Ure, R.; Whittaker, M.; Stokes, N. R. Antibacterial Alkoxybenzamide Inhibitors of the Essential Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (2), 524–527.
- (84) Haydon, D. J.; Bennett, J. M.; Brown, D.; Collins, I.; Galbraith, G.; Lancett, P.; Macdonald, R.; Stokes, N. R.; Chauhan, P. K.; Sutariya, J. K.; Nayal, N.; Srivastava, A.; Beanland, J.; Hall, R.; Henstock, V.; Noula, C.; Rockley, C.; Czaplewski, L. Creating an Antibacterial with in Vivo Efficacy: Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Improved Pharmaceutical Properties. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (10), 3927–3936.
- (85) Kaul, M.; Zhang, Y.; Parhi, A. K.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S. Inhibition of RND-Type Efflux Pumps Confers the FtsZ-Directed Prodrug TXY436 with Activity against Gram-Negative Bacteria. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89* (3), 321–328.
- (86) Kaul, M.; Mark, L.; Zhang, Y.; Parhi, A. K.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S. Pharmacokinetics and in Vivo Antistaphylococcal Efficacy of TXY541, a 1-Methylpiperidine-4-Carboxamide Prodrug of PC190723. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86* (12), 1699–1707.
- (87) Kaul, M.; Mark, L.; Zhang, Y.; Parhi, A. K.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S. An FtsZ-Targeting Prodrug with Oral Antistaphylococcal Efficacy In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (12), 5860–5869.
- (88) Kaul, M.; Mark, L.; Zhang, Y.; Parhi, A. K.; Lyu, Y. L.; Pawlak, J.; Saravolatz, S.; Saravolatz, L. D.; Weinstein, M. P.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S. TXA709, an FtsZ-Targeting Benzamide Prodrug with Improved Pharmacokinetics and Enhanced In Vivo Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (8), 4845–4855.

- (89) 2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240021303> (accessed 2022-05-12).
- (90) Fujita, J.; Maeda, Y.; Mizohata, E.; Inoue, T.; Kaul, M.; Parhi, A. K.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S.; Matsumura, H. Structural Flexibility of an Inhibitor Overcomes Drug Resistance Mutations in *Staphylococcus Aureus* FtsZ. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (7), 1947–1955.
- (91) Haydon, D.; Czaplewski, L.; Stokes, N.; Davies, D.; Collins, I.; Palmer, J.; Mitchell, J.; Pitt, G. R. W.; Offermann, D. Aromatic Amides and Uses Thereof, October 26, 2012.
- (92) Stokes, N. R.; Baker, N.; Bennett, J. M.; Berry, J.; Collins, I.; Czaplewski, L. G.; Logan, A.; Macdonald, R.; MacLeod, L.; Peasley, H.; Mitchell, J. P.; Nayal, N.; Yadav, A.; Srivastava, A.; Haydon, D. J. An Improved Small-Molecule Inhibitor of FtsZ with Superior In Vitro Potency, Drug-Like Properties, and In Vivo Efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (1), 317–325.
- (93) Stokes, N. R.; Baker, N.; Bennett, J. M.; Chauhan, P. K.; Collins, I.; Davies, D. T.; Gavade, M.; Kumar, D.; Lancett, P.; Macdonald, R.; MacLeod, L.; Mahajan, A.; Mitchell, J. P.; Nayal, N.; Nayal, Y. N.; Pitt, G. R. W.; Singh, M.; Yadav, A.; Srivastava, A.; Czaplewski, L. G.; Haydon, D. J. Design, Synthesis and Structure–Activity Relationships of Substituted Oxazole–Benzamide Antibacterial Inhibitors of FtsZ. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (1), 353–359.
- (94) Kumar, M.; Mathur, T.; Barman, T. K.; Chaira, T.; Kumar, R.; Joshi, V.; Pandya, M.; Sharma, L.; Fujii, K.; Bandgar, M.; Jadhav, B.; Bambal, R.; Upadhyay, D.; Masuda, N.; Verma, A. K.; Bhatnagar, P. K. Novel FtsZ Inhibitor with Potent Activity against *Staphylococcus Aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76* (11), 2867–2874.
- (95) Bi, F.; Song, D.; Zhang, N.; Liu, Z.; Gu, X.; Hu, C.; Cai, X.; Venter, H.; Ma, S. Design, Synthesis and Structure-Based Optimization of Novel Isoxazole-Containing Benzamide Derivatives as FtsZ Modulators. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 90–103.
- (96) Song, D.; Bi, F.; Zhang, N.; Qin, Y.; Liu, X.; Teng, Y.; Ma, S. Design, Synthesis of Novel 4,5-Dihydroisoxazole-Containing Benzamide Derivatives as Highly Potent FtsZ Inhibitors Capable of Killing a Variety of MDR *Staphylococcus Aureus*. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (21), 115729.
- (97) Bi, F.; Song, D.; Qin, Y.; Liu, X.; Teng, Y.; Zhang, N.; Zhang, P.; Zhang, N.; Ma, S. Discovery of 1,3,4-Oxadiazol-2-One-Containing Benzamide Derivatives Targeting FtsZ as Highly Potent Agents of Killing a Variety of MDR Bacteria Strains. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (14), 3179–3193.
- (98) Chiodini, G.; Pallavicini, M.; Zanotto, C.; Bissa, M.; Radaelli, A.; Straniero, V.; Bolchi, C.; Fumagalli, L.; Ruggeri, P.; De Giuli Morghen, C.; Valoti, E. Benzodioxane–Benzamides as New Bacterial Cell Division Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 252–265.
- (99) Straniero, V.; Pallavicini, M.; Chiodini, G.; Zanotto, C.; Volontè, L.; Radaelli, A.; Bolchi, C.; Fumagalli, L.; Sanguinetti, M.; Menchinelli, G.; Delogu, G.; Battah, B.; De Giuli Morghen, C.; Valoti, E. 3-(Benzodioxan-2-Ylmethoxy)-2,6-Difluorobenzamides Bearing Hydrophobic Substituents at the 7-Position of the Benzodioxane Nucleus Potently Inhibit Methicillin-Resistant Sa and Mtb Cell Division. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 227–243.
- (100) Straniero, V.; Sebastián-Pérez, V.; Hrast, M.; Zanotto, C.; Casiraghi, A.; Suigo, L.; Zdovc, I.; Radaelli, A.; De Giuli Morghen, C.; Valoti, E. Benzodioxane-Benzamides as Antibacterial Agents: Computational and SAR Studies to Evaluate the Influence of the 7-Substitution in FtsZ Interaction. *ChemMedChem* **2020**, *15* (2), 195–209.

- (101) Straniero, V.; Sebastián-Pérez, V.; Suigo, L.; Margolin, W.; Casiraghi, A.; Hrast, M.; Zanotto, C.; Zdovc, I.; Radaelli, A.; Valoti, E. Computational Design and Development of Benzodioxane-Benzamides as Potent Inhibitors of FtsZ by Exploring the Hydrophobic Subpocket. *Antibiotics* **2021**, 10 (4), 442.
- (102) Qiang, S.; Wang, C.; Venter, H.; Li, X.; Wang, Y.; Guo, L.; Ma, R.; Ma, S. Synthesis and Biological Evaluation of Novel FtsZ-Targeted 3-Arylalkoxy-2,6-Difluorobenzamides as Potential Antimicrobial Agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, 87 (2), 257–264.
- (103) Bi, F.; Guo, L.; Wang, Y.; Venter, H.; Semple, S. J.; Liu, F.; Ma, S. Design, Synthesis and Biological Activity Evaluation of Novel 2,6-Difluorobenzamide Derivatives through FtsZ Inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (4), 958–962.
- (104) Lui, H. K.; Gao, W.; Cheung, K. C.; Jin, W. B.; Sun, N.; Kan, J. W. Y.; Wong, I. L. K.; Chiou, J.; Lin, D.; Chan, E. W. C.; Leung, Y.-C.; Chan, T. H.; Chen, S.; Chan, K.-F.; Wong, K.-Y. Boosting the Efficacy of Anti-MRSA β -Lactam Antibiotics via an Easily Accessible, Non-Cytotoxic and Orally Bioavailable FtsZ Inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 163, 95–115.
- (105) Bi, F.; Ji, S.; Venter, H.; Liu, J.; Semple, S. J.; Ma, S. Substitution of Terminal Amide with 1H-1,2,3-Triazole: Identification of Unexpected Class of Potent Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28 (5), 884–891.
- (106) Artola, M.; Ruíz-Avila, L. B.; Ramírez-Aportela, E.; Martínez, R. F.; Araujo-Bazán, L.; Vázquez-Villa, H.; Martín-Fontecha, M.; Oliva, M. A.; Martín-Galiano, A. J.; Chacón, P.; López-Rodríguez, M. L.; Andreu, J. M.; Huecas, S. The Structural Assembly Switch of Cell Division Protein FtsZ Probed with Fluorescent Allosteric Inhibitors. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (2), 1525–1534.
- (107) Ferrer-González, E.; Fujita, J.; Yoshizawa, T.; Nelson, J. M.; Pilch, A. J.; Hillman, E.; Ozawa, M.; Kuroda, N.; Al-Tameemi, H. M.; Boyd, J. M.; LaVoie, E. J.; Matsumura, H.; Pilch, D. S. Structure-Guided Design of a Fluorescent Probe for the Visualization of FtsZ in Clinically Important Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 20092.
- (108) Yu, H.-H.; Kim, K.-J.; Cha, J.-D.; Kim, H.-K.; Lee, Y.-E.; Choi, N.-Y.; You, Y.-O. Antimicrobial Activity of Berberine Alone and in Combination with Ampicillin or Oxacillin Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J. Med. Food* **2005**, 8 (4), 454–461.
- (109) Domadia, P. N.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Swarup, S.; Dasgupta, D. Berberine Targets Assembly of *Escherichia Coli* Cell Division Protein FtsZ. *Biochemistry* **2008**, 47 (10), 3225–3234.
- (110) Sun, N.; Chan, F.-Y.; Lu, Y.-J.; Neves, M. A. C.; Lui, H.-K.; Wang, Y.; Chow, K.-Y.; Chan, K.-F.; Yan, S.-C.; Leung, Y.-C.; Abagyan, R.; Chan, T.-H.; Wong, K.-Y. Rational Design of Berberine-Based FtsZ Inhibitors with Broad-Spectrum Antibacterial Activity. *PLOS ONE* **2014**, 9 (5), e97514.
- (111) Parhi, A.; Lu, S.; Kelley, C.; Kaul, M.; Pilch, D. S.; Lavoie, E. J. Antibacterial Activity of Substituted Dibenzo[a,g]Quinolizin-7-Ium Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (22), 6962–6966.
- (112) Kelley, C.; Zhang, Y.; Parhi, A.; Kaul, M.; Pilch, D. S.; LaVoie, E. J. 3-Phenyl Substituted 6,7-Dimethoxyisoquinoline Derivatives as FtsZ-Targeting Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (24), 7012–7029.
- (113) Beuria, T. K.; Santra, M. K.; Panda, D. Sanguinarine Blocks Cytokinesis in Bacteria by Inhibiting FtsZ Assembly and Bundling. *Biochemistry* **2005**, 44 (50), 16584–16593.

- (114) Lopus, M.; Panda, D. The Benzophenanthridine Alkaloid Sanguinarine Perturbs Microtubule Assembly Dynamics through Tubulin Binding. *FEBS J.* **2006**, *273* (10), 2139–2150.
- (115) Liu, F.; Venter, H.; Bi, F.; Semple, S. J.; Liu, J.; Jin, C.; Ma, S. Synthesis and Antibacterial Activity of 5-Methylphenanthridium Derivatives as FtsZ Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3399–3402.
- (116) Liu, J.; Ma, R.; Bi, F.; Zhang, F.; Hu, C.; Venter, H.; Semple, S. J.; Ma, S. Novel 5-Methyl-2-Phenylphenanthridium Derivatives as FtsZ-Targeting Antibacterial Agents from Structural Simplification of Natural Product Sanguinarine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (10), 1825–1831.
- (117) Zhang, N.; Song, D.; Chen, W.; Zhang, S.; Zhang, P.; Zhang, N.; Ma, S. Modification of 5-Methylphenanthridium from Benzothiazoles to Indoles as Potent FtsZ Inhibitors: Broadening the Antibacterial Spectrum toward Vancomycin-Resistant Enterococci. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113723.
- (118) Kelley, C.; Lu, S.; Parhi, A.; Kaul, M.; Pilch, D. S.; LaVoie, E. J. Antimicrobial Activity of Various 4- and 5-Substituted 1-Phenyl-naphthalenes. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 395–409.
- (119) Sun, N.; Du, R.-L.; Zheng, Y.-Y.; Huang, B.-H.; Guo, Q.; Zhang, R.-F.; Wong, K.-Y.; Lu, Y.-J. Antibacterial Activity of N-Methylbenzofuro[3,2-b]Quinoline and N-Methylbenzoindolo[3,2-b]-Quinoline Derivatives and Study of Their Mode of Action. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 1–11.
- (120) Sun, N.; Lu, Y.-J.; Chan, F.-Y.; Du, R.-L.; Zheng, Y.; Zhang, K.; So, L.-Y.; Abagyan, R.; Zhuo, C.; Leung, Y.-C.; Wong, K.-Y. A Thiazole Orange Derivative Targeting the Bacterial Protein FtsZ Shows Potent Antibacterial Activity. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 855.
- (121) Sun, N.; Ban, L.; Li, M.; Fang, Z.; Li, X.; Yao, W.; Pan, J.; Lu, Y.; Liu, Z.; Wong, W.-L. Probing the Benzofuroquinolinium Derivative as a Potent Antibacterial Agent through the Inhibition of FtsZ Activity. *J. Pharmacol. Sci.* **2018**, *138* (1), 83–85.
- (122) Li, Y.; Sun, N.; Ser, H.-L.; Long, W.; Li, Y.; Chen, C.; Zheng, B.; Huang, X.; Liu, Z.; Lu, Y.-J. Antibacterial Activity Evaluation and Mode of Action Study of Novel Thiazole-Quinolinium Derivatives. *RSC Adv.* **2020**, *10* (25), 15000–15014.
- (123) Fang, Z.; Ban, L.; Li, Y.; Yuan, W.; Liu, Z.; Liu, T.; Li, X.; Wong, K.; Lu, Y.; Sun, N.; Yao, X. A Quinoline-Based FtsZ Inhibitor for the Study of Antimicrobial Activity and Synergistic Effects with β -Lactam Antibiotics. *J. Pharmacol. Sci.* **2018**, *137* (3), 283–289.
- (124) Zheng, Y.-Y.; Du, R.-L.; Cai, S.-Y.; Liu, Z.-H.; Fang, Z.-Y.; Liu, T.; So, L.-Y.; Lu, Y.-J.; Sun, N.; Wong, K.-Y. Study of Benzofuroquinolinium Derivatives as a New Class of Potent Antibacterial Agent and the Mode of Inhibition Targeting FtsZ. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1937.
- (125) Cai, S.; Yuan, W.; Li, Y.; Huang, X.; Guo, Q.; Tang, Z.; Fang, Z.; Lin, H.; Wong, W.-L.; Wong, K.-Y.; Lu, Y.-J.; Sun, N. Antibacterial Activity of Indolyl-Quinolinium Derivatives and Study Their Mode of Action. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (7), 1274–1282.
- (126) Sun, N.; Li, M.; Cai, S.; Li, Y.; Chen, C.; Zheng, Y.; Li, X.; Fang, Z.; Lv, H.; Lu, Y.-J. Antibacterial Evaluation and Mode of Action Study of BIMQ, a Novel Bacterial Cell Division Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514* (4), 1224–1230.
- (127) Zhong, D.-X.; She, M.-T.; Guo, X.-C.; Zheng, B.-X.; Huang, X.-H.; Zhang, Y.-H.; Ser, H.-L.; Wong, W.-L.; Sun, N.; Lu, Y.-J. Design and Synthesis of Quinolinium-Based

- Derivatives Targeting FtsZ for Antibacterial Evaluation and Mechanistic Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 236, 114360.
- (128) Song, D.; Zhang, N.; Zhang, P.; Zhang, N.; Chen, W.; Zhang, L.; Guo, T.; Gu, X.; Ma, S. Design, Synthesis and Evaluation of Novel 9-Arylalkyl-10-Methylacridinium Derivatives as Highly Potent FtsZ-Targeting Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 221, 113480.
- (129) Song, D.; Zhang, N.; Ma, Y.; Zhang, S.; Chen, W.; Guo, T.; Ma, S. Acridinium-Conjugated Aromatic Heterocycles as Highly Potent FtsZ Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2022**, e2100400.
- (130) Domadia, P.; Swarup, S.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Dasgupta, D. Inhibition of Bacterial Cell Division Protein FtsZ by Cinnamaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74 (6), 831–840.
- (131) Li, X.; Sheng, J.; Huang, G.; Ma, R.; Yin, F.; Song, D.; Zhao, C.; Ma, S. Design, Synthesis and Antibacterial Activity of Cinnamaldehyde Derivatives as Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, 32–41.
- (132) Hemaiswarya, S.; Soudaminikkutty, R.; Narasumani, M. L.; Doble, M. 2011. Phenylpropanoids Inhibit Protofilament Formation of Escherichia Coli Cell Division Protein FtsZ. *J. Med. Microbiol.* **2011**, 60 (9), 1317–1325.
- (133) Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin-Based Drugs: A Patent Review (2008 – Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, 22 (4), 437–454.
- (134) Duggirala, S.; Nankar, R. P.; Rajendran, S.; Doble, M. Phytochemicals as Inhibitors of Bacterial Cell Division Protein FtsZ: Coumarins Are Promising Candidates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 174 (1), 283–296.
- (135) Sridevi, D.; Sudhakar, K. U.; Ananthathatmula, R.; Nankar, R. P.; Doble, M. Mutation at G103 of MtbFtsZ Altered Their Sensitivity to Coumarins. *Front. Microbiol.* **2017**, 8 (578).
- (136) Matsui, T.; Lallo, S.; Nisa, K.; Morita, H. Filamenting Temperature-Sensitive Mutant Z Inhibitors from *Glycyrrhiza Glabra* and Their Inhibitory Mode of Action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (6), 1420–1424.
- (137) Paiva, S. R. de; Figueiredo, M. R.; Aragão, T. V.; Kaplan, M. A. C. Antimicrobial Activity in Vitro of Plumbagin Isolated from *Plumbago* Species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, 98, 959–961.
- (138) Bhattacharya, A.; Jindal, B.; Singh, P.; Datta, A.; Panda, D. Plumbagin Inhibits Cytokinesis in *Bacillus Subtilis* by Inhibiting FtsZ Assembly – a Mechanistic Study of Its Antibacterial Activity. *FEBS J.* **2013**, 280 (18), 4585–4599.
- (139) Acharya, B. R.; Bhattacharyya, B.; Chakrabarti, G. The Natural Naphthoquinone Plumbagin Exhibits Antiproliferative Activity and Disrupts the Microtubule Network through Tubulin Binding. *Biochemistry* **2008**, 47 (30), 7838–7845.
- (140) Wu, Y.-Y.; Zhang, T.-Y.; Zhang, M.-Y.; Cheng, J.; Zhang, Y.-X. An Endophytic Fungi of *Ginkgo Biloba* L. Produces Antimicrobial Metabolites as Potential Inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus Aureus*. *Fitoterapia* **2018**, 128, 265–271.
- (141) Wang, J.; Galgoci, A.; Kodali, S.; Herath, K. B.; Jayasuriya, H.; Dorso, K.; Vicente, F.; González, A.; Cully, D.; Bramhill, D.; Singh, S. Discovery of a Small Molecule That Inhibits Cell Division by Blocking FtsZ, a Novel Therapeutic Target of Antibiotics. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (45), 44424–44428.
- (142) Noh, T. H.; Sen, L.; Hong, J.; Lee, J.-H.; Moon, H. R.; Jung, J. H. Antibacterial Activities of Viriditoxin Congeners and Synthetic Analogues against Fish Pathogens. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (22), 4970–4974.

- (143) Huang, Q.; Kirikae, F.; Kirikae, T.; Pepe, A.; Amin, A.; Respicio, L.; Slayden, R. A.; Tonge, P. J.; Ojima, I. Targeting FtsZ for Antituberculosis Drug Discovery: Noncytotoxic Taxanes as Novel Antituberculosis Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (2), 463–466.
- (144) Singh, D.; Bhattacharya, A.; Rai, A.; Dhaked, H. P. S.; Awasthi, D.; Ojima, I.; Panda, D. SB-RA-2001 Inhibits Bacterial Proliferation by Targeting FtsZ Assembly. *Biochemistry* **2014**, 53 (18), 2979–2992.
- (145) Du, R.-L.; Sun, N.; Fung, Y.-H.; Zheng, Y.-Y.; Chen, Y.-W.; Chan, P.-H.; Wong, W.-L.; Wong, K.-Y. Discovery of FtsZ Inhibitors by Virtual Screening as Antibacterial Agents and Study of the Inhibition Mechanism. *RSC Med. Chem.* **2022**, 13 (1), 79–89.
- (146) Beuria, T. K.; Singh, P.; Surolia, A.; Panda, D. Promoting Assembly and Bundling of FtsZ as a Strategy to Inhibit Bacterial Cell Division: A New Approach for Developing Novel Antibacterial Drugs. *Biochem. J.* **2009**, 423 (1), 61–69.
- (147) Singh, P.; Jindal, B.; Surolia, A.; Panda, D. A Rhodanine Derivative CCR-11 Inhibits Bacterial Proliferation by Inhibiting the Assembly and GTPase Activity of FtsZ. *Biochemistry* **2012**, 51 (27), 5434–5442.
- (148) Kumar, K.; Awasthi, D.; Lee, S.-Y.; Zanardi, I.; Ruzsicska, B.; Knudson, S.; Tonge, P. J.; Slayden, R. A.; Ojima, I. Novel Trisubstituted Benzimidazoles, Targeting Mtb FtsZ, as a New Class of Antitubercular Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (1), 374–381.
- (149) Park, B.; Awasthi, D.; Chowdhury, S. R.; Melief, E. H.; Kumar, K.; Knudson, S. E.; Slayden, R. A.; Ojima, I. Design, Synthesis and Evaluation of Novel 2,5,6-Trisubstituted Benzimidazoles Targeting FtsZ as Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (9), 2602–2612.
- (150) Ray, S.; Jindal, B.; Kunal, K.; Surolia, A.; Panda, D. BT-Benzo-29 Inhibits Bacterial Cell Proliferation by Perturbing FtsZ Assembly. *FEBS J.* **2015**, 282 (20), 4015–4033.
- (151) Mathew, B.; Hobrath, J. V.; Ross, L.; Connelly, M. C.; Lofton, H.; Rajagopalan, M.; Guy, R. K.; Reynolds, R. C. Screening and Development of New Inhibitors of FtsZ from M. Tuberculosis. *PLOS ONE* **2016**, 11 (10), e0164100.
- (152) Panda, P.; Taviti, A. C.; Satpati, S.; Kar, M. M.; Dixit, A.; Beuria, T. K. Doxorubicin Inhibits E. Coli Division by Interacting at a Novel Site in FtsZ. *Biochem. J.* **2015**, 471 (3), 335–346.
- (153) Kaul, M.; Parhi, A. K.; Zhang, Y.; LaVoie, E. J.; Tuske, S.; Arnold, E.; Kerrigan, J. E.; Pilch, D. S. A Bactericidal Guanidinomethyl Biaryl That Alters the Dynamics of Bacterial FtsZ Polymerization. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (22), 10160–10176.
- (154) Jaiswal, R.; Beuria, T. K.; Mohan, R.; Mahajan, S. K.; Panda, D. Totarol Inhibits Bacterial Cytokinesis by Perturbing the Assembly Dynamics of FtsZ. *Biochemistry* **2007**, 46 (14), 4211–4220.
- (155) Kim, M. B.; O'Brien, T. E.; Moore, J. T.; Anderson, D. E.; Foss, M. H.; Weibel, D. B.; Ames, J. B.; Shaw, J. T. The Synthesis and Antimicrobial Activity of Heterocyclic Derivatives of Totarol. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3 (10), 818–822.
- (156) Urgaonkar, S.; La Pierre, H. S.; Meir, I.; Lund, H.; RayChaudhuri, D.; Shaw, J. T. Synthesis of Antimicrobial Natural Products Targeting FtsZ: (±)-Dichamanetin and (±)-2''-Hydroxy-5''-Benzylisouvarinol-B. *Org. Lett.* **2005**, 7 (25), 5609–5612.
- (157) White, E. L.; Suling, W. J.; Ross, L. J.; Seitz, L. E.; Reynolds, R. C. 2-Alkoxy-carbonylaminopyridines: Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis FtsZ. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50 (1), 111–114.

- (158) Reynolds, R. C.; Srivastava, S.; Ross, L. J.; Suling, W. J.; White, E. L. A New 2-Carbamoyl Pteridine That Inhibits Mycobacterial FtsZ. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (12), 3161–3164.
- (159) Mathew, B.; Srivastava, S.; Ross, L. J.; Suling, W. J.; White, E. L.; Woolhiser, L. K.; Lenaerts, A. J.; Reynolds, R. C. Novel Pyridopyrazine and Pyrimidothiazine Derivatives as FtsZ Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (23), 7120–7128.
- (160) Nova, E.; Montecinos, F.; Brunet, J. E.; Lagos, R.; Monasterio, O. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Induces Bundling of Escherichia Coli FtsZ Polymers Inhibiting the GTPase Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 465 (2), 315–319.
- (161) Scoffone, V. C.; Ryabova, O.; Makarov, V.; Iadarola, P.; Fumagalli, M.; Fondi, M.; Fani, R.; De Rossi, E.; Riccardi, G.; Buroni, S. Efflux-Mediated Resistance to a Benzothiadiazol Derivative Effective against Burkholderia Cenocepacia. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 815.
- (162) Trespidi, G.; Scoffone, V. C.; Barbieri, G.; Marchesini, F.; Abualsha'ar, A.; Coenye, T.; Ungaro, F.; Makarov, V.; Migliavacca, R.; De Rossi, E.; Buroni, S. Antistaphylococcal Activity of the FtsZ Inhibitor C109. *Pathog. Basel Switz.* **2021**, 10 (7), 886.
- (163) Sun, N.; Zheng, Y.-Y.; Du, R.-L.; Cai, S.-Y.; Zhang, K.; So, L.-Y.; Cheung, K.-C.; Zhuo, C.; Lu, Y.-J.; Wong, K.-Y. New Application of Tiplaxtinin as an Effective FtsZ-Targeting Chemotype for an Antimicrobial Study. *MedChemComm* **2017**, 8 (10), 1909–1913.
- (164) Chen, C.-C.; Zhang, Y.-Q.; Zhong, D.-X.; Huang, X.-H.; Zhang, Y.-H.; Jiang, W.-H.; Li, M.; Chen, Q.; Wong, W.-L.; Lu, Y.-J. The Study of 9,10-Dihydroacridine Derivatives as a New and Effective Molecular Scaffold for Antibacterial Agent Development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 546, 40–45.
- (165) Santra, M. K.; Beuria, T. K.; Banerjee, A.; Panda, D. Ruthenium Red-Induced Bundling of Bacterial Cell Division Protein, FtsZ*. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (25), 25959–25965.
- (166) Handler, A. A.; Lim, J. E.; Losick, R. Peptide Inhibitor of Cytokinesis during Sporulation in Bacillus Subtilis. *Mol. Microbiol.* **2008**, 68 (3), 588–599.
- (167) Bisson-Filho, A. W.; Discola, K. F.; Castellen, P.; Blasios, V.; Martins, A.; Sforça, M. L.; Garcia, W.; Zeri, A. C. M.; Erickson, H. P.; Dessen, A.; Gueiros-Filho, F. J. FtsZ Filament Capping by MciZ, a Developmental Regulator of Bacterial Division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112 (17), E2130–E2138.
- (168) Ray, S.; Dhaked, H. P. S.; Panda, D. Antimicrobial Peptide CRAMP (16–33) Stalls Bacterial Cytokinesis by Inhibiting FtsZ Assembly. *Biochemistry* **2014**, 53 (41), 6426–6429.
- (169) Shimotohno, K. W.; Kawamura, F.; Natori, Y.; Nanamiya, H.; Magae, J.; Ogata, H.; Endo, T.; Suzuki, T.; Yamaki, H. Inhibition of Septation in Bacillus Subtilis by a Peptide Antibiotic, Edeine B₁. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, 33 (4), 568–571.
- (170) Paulasova, P.; Pellestor, F. The Peptide Nucleic Acids (PNAs): A New Generation of Probes for Genetic and Cytogenetic Analyses. *Ann. Génétique* **2004**, 47 (4), 349–358.
- (171) Ghosal, A.; Nielsen, P. E. Potent Antibacterial Antisense Peptide–Peptide Nucleic Acid Conjugates Against Pseudomonas Aeruginosa. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, 22 (5), 323–334.
- (172) Goh, S.; Loeffler, A.; Lloyd, D. H.; Nair, S. P.; Good, L. Oxacillin Sensitization of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus Pseudintermedius by Antisense Peptide Nucleic Acids in Vitro. *BMC Microbiol.* **2015**, 15 (1), 1–10.

- (173) Narenji, H.; Teymournejad, O.; Rezaee, M. A.; Taghizadeh, S.; Mehramuz, B.; Aghazadeh, M.; Asgharzadeh, M.; Madhi, M.; Gholizadeh, P.; Ganbarov, K.; Yousefi, M.; Pakravan, A.; Dal, T.; Ahmadi, R.; Samadi Kafil, H. Antisense Peptide Nucleic Acids AgainstftsZ AndefaA Genes Inhibit Growth and Biofilm Formation of *Enterococcus Faecalis*. *Microb. Pathog.* **2020**, *139*, 103907.
- (174) Nejad, A. J.; Shahrokhi, N.; Nielsen, P. E. Targeting of the Essential AcpP, FtsZ, and Rne Genes in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* by Antisense PNA Precision Antibacterials. *Biomedicines* **2021**, *9* (4), 429.
- (175) Meng, J.; Da, F.; Ma, X.; Wang, N.; Wang, Y.; Zhang, H.; Li, M.; Zhou, Y.; Xue, X.; Hou, Z.; Jia, M.; Luo, X. Antisense Growth Inhibition of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Locked Nucleic Acid Conjugated with Cell-Penetrating Peptide as a Novel FtsZ Inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (2), 914–922.
- (176) Hwang, D.; Lim, Y.-H. Resveratrol Antibacterial Activity against *Escherichia Coli* Is Mediated by Z-Ring Formation Inhibition via Suppression of FtsZ Expression. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 10029.
- (177) Akhter, Y.; Hussain, R. Chapter Nine - Protein-Protein Complexes as Targets for Drug Discovery against Infectious Diseases. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Ed.; *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Academic Press, 2020; Vol. 121, pp 237–251.
- (178) Sutherland, A. G.; Alvarez, J.; Ding, W.; Foreman, K. W.; Kenny, C. H.; Labthavikul, P.; Mosyak, L.; Petersen, P. J.; Iii, T. S. R.; Ruzin, A.; Tsao, D. H. H.; Wheless, K. L. Structure-Based Design of Carboxybiphenylindole Inhibitors of the ZipA–FtsZ Interaction. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (23), 4138–4140.
- (179) Jennings, L. D.; Foreman, K. W.; Rush, T. S.; Tsao, D. H. H.; Mosyak, L.; Kincaid, S. L.; Sukhdeo, M. N.; Sutherland, A. G.; Ding, W.; Kenny, C. H.; Sabus, C. L.; Liu, H.; Dushin, E. G.; Moghazeh, S. L.; Labthavikul, P.; Petersen, P. J.; Tuckman, M.; Ruzin, A. V. Combinatorial Synthesis of Substituted 3-(2-Indolyl)Piperidines and 2-Phenyl Indoles as Inhibitors of ZipA–FtsZ Interaction. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (19), 5115–5131.
- (180) Jennings, L. D.; Foreman, K. W.; Rush, T. S.; Tsao, D. H. H.; Mosyak, L.; Li, Y.; Sukhdeo, M. N.; Ding, W.; Dushin, E. G.; Kenny, C. H.; Moghazeh, S. L.; Petersen, P. J.; Ruzin, A. V.; Tuckman, M.; Sutherland, A. G. Design and Synthesis of Indolo[2,3-a]Quinolizin-7-One Inhibitors of the ZipA–FtsZ Interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (6), 1427–1431.
- (181) Tsao, D. H. H.; Sutherland, A. G.; Jennings, Lee. D.; Li, Y.; Rush, T. S.; Alvarez, J. C.; Ding, W.; Dushin, E. G.; Dushin, R. G.; Haney, S. A.; Kenny, C. H.; Karl Malakian, A.; Nilakantan, R.; Mosyak, L. Discovery of Novel Inhibitors of the ZipA/FtsZ Complex by NMR Fragment Screening Coupled with Structure-Based Design. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (23), 7953–7961.
- (182) Ferrer-González, E.; Huh, H.; Al-Tameemi, H. M.; Boyd, J. M.; Lee, S.-H.; Pilch, D. S. Impact of FtsZ Inhibition on the Localization of the Penicillin Binding Proteins in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J. Bacteriol.* **2021**, *203* (16), e00204-21.
- (183) Brown, D. R.; Collins, I.; Czaplewski, L. G.; Hayden, D. J. Antibacterial Agents. WO2007107758 (A1), September 27, 2007.
- (184) Barral, K.; Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages. *Org. Lett.* **2007**, *9* (9), 1809–1811.

- (185) Gerfaud, T.; Wei, H.-L.; Neuville, L.; Zhu, J. Unexpected C–C Bond Cleavage: Synthesis of 1,2,4-Oxadiazol-5-Ones from Amidoximes with Pentafluorophenyl or Trifluoromethyl Anion Acting as Leaving Group. *Org. Lett.* **2011**, 13 (23), 6172–6175.
- (186) Dai, H.; Chen, J.; Li, G.; Ge, S.; Shi, Y.; Fang, Y.; Ling, Y. Design, Synthesis, and Bioactivities of Novel Oxadiazole-Substituted Pyrazole Oximes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (4), 950–953.
- (187) Ye, J.; Yang, X.; Xu, M.; Chan, P. K.; Ma, C. Novel N-Substituted Oseltamivir Derivatives as Potent Influenza Neuraminidase Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Evaluation, ADME Prediction and Molecular Docking Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 182, 111635.
- (188) Degrado, W. F.; Wang, J.; Wang, J.; Jo, H.; Canturk, B. Inhibitors Targeting Drug-Resistant Influenza A. WO2013086131 (A1), June 13, 2013.
- (189) Rodrigues, P. C. A.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Mülhaupt, R.; Kratz, F. Correlation of the Acid-Sensitivity of Polyethylene Glycol Daunorubicin Conjugates with Their in Vitro Antiproliferative Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (12), 4110–4117.
- (190) Yang, P.; Xie, X.; Shi, Q. 1, 3, 4-Oxadiazole-Ciprofloxacin Heterozygote as Well as Preparation Method and Application Thereof. CN112480099 (A), March 12, 2021.
- (191) Kort, M. E.; Drizin, I.; Gregg, R. J.; Scanio, M. J. C.; Shi, L.; Gross, M. F.; Atkinson, R. N.; Johnson, M. S.; Pacofsky, G. J.; Thomas, J. B.; Carroll, W. A.; Krambis, M. J.; Liu, D.; Shieh, C.-C.; Zhang, X.; Hernandez, G.; Mikusa, J. P.; Zhong, C.; Joshi, S.; Honore, P.; Roeloffs, R.; Marsh, K. C.; Murray, B. P.; Liu, J.; Werness, S.; Faltynek, C. R.; Krafte, D. S.; Jarvis, M. F.; Chapman, M. L.; Marron, B. E. Discovery and Biological Evaluation of 5-Aryl-2-Furfuramides, Potent and Selective Blockers of the Na^v 1.8 Sodium Channel with Efficacy in Models of Neuropathic and Inflammatory Pain. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (3), 407–416.
- (192) Palnitkar, S. S.; Bin, B.; Jimenez, L. S.; Morimoto, H.; Williams, P. G.; Paul-Pletzer, K.; Parness, J. [3H]Azidodantrolene: Synthesis and Use in Identification of a Putative Skeletal Muscle Dantrolene Binding Site in Sarcoplasmic Reticulum. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (11), 1872–1880.
- (193) Soni, I.; Chakrapani, H.; Chopra, S. Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus Aureus* ATCC 29213. *Genome Announc.* **2015**, 3 (5), e01095-15.
- (194) Diep, B. A.; Stone, G. G.; Basuino, L.; Graber, C. J.; Miller, A.; des Etages, S.-A.; Jones, A.; Palazzolo-Ballance, A. M.; Perdreau-Remington, F.; Sensabaugh, G. F.; DeLeo, F. R.; Chambers, H. F. The Arginine Catabolic Mobile Element and Staphylococcal Chromosomal Cassette Mec Linkage: Convergence of Virulence and Resistance in the USA300 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J. Infect. Dis.* **2008**, 197 (11), 1523–1530.
- (195) Weinstein, M. P.; Patel, J. B. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: M07-A11, 11. edition.; Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute; Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, 2018.
- (196) Hurley, K. A.; Santos, T. M. A.; Nepomuceno, G. M.; Huynh, V.; Shaw, J. T.; Weibel, D. B. Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (15), 6975–6998.
- (197) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (2), 455–461.

- (198) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 42717.
- (199) Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. PkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (9), 4066–4072.
- (200) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings1PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46 (1), 3–26.
- (201) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (12), 2615–2623.
- (202) Hu, Z.; Zhang, S.; Zhou, W.; Ma, X.; Xiang, G. Synthesis and Antibacterial Activity of 3-Benzylamide Derivatives as FtsZ Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (8), 1854–1858.
- (203) Ndikuryayo, F.; Kang, W.-M.; Wu, F.-X.; Yang, W.-C.; Yang, G.-F. Hydrophobicity-Oriented Drug Design (HODD) of New Human 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 166, 22–31.
- (204) Liu, J.-K.; Gu, W.; Cheng, X.-R.; Cheng, J.-P.; Zhou, W.-X.; Nie, A.-H. Design and Synthesis of Cyclic Acylguanidines as BACE1 Inhibitors. *Chin. Chem. Lett.* **2015**, 26 (10), 1327–1330.
- (205) Liénard, B. M. R.; Horsfall, L. E.; Galleni, M.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. Inhibitors of the FEZ-1 Metallo- β -Lactamase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (4), 964–968.
- (206) Fang, Q. K.; Hopkins, S.; Jones, S. Benzo[d]isoxazol-3-ol DAAO Inhibitors. US2005143434 (A1), June 30, 2005.
- (207) Sheppeck, J. E.; Gilmore, J. L.; Dhar, T. G. M.; Xiao, H.-Y. Modulators of Glucocorticoid Receptor, Ap-1, and/or Nf- κ B Activity and Use Thereof. WO2008057856 (A2), May 15, 2008.
- (208) *Chemical Probes in Biology: Science at the Interface of Chemistry, Biology and Medicine*; [Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Chemical Probes in Biology - Science at the Interface on Chemistry, Biology and Medicine, Island of Spetses, Greece, 18-30 August 2002]; Schneider, M. P., Ed.; NATO science series Series 2, Mathematics, physics and chemistry; Kluwer Acad. Publ: Dordrecht, 2003.
- (209) Wagner-Wysiecka, E.; Rzymowski, T.; Fonari, M. S.; Kulmaczewski, R.; Luboch, E. Pyrrole Azocrown Ethers—Synthesis, Crystal Structures, and Fluorescence Properties. *Tetrahedron* **2011**, 67 (10), 1862–1872.
- (210) Trindade, E. O.; Souza, H. D. S.; Brandão, M. C. R.; Neto, H. D.; Lima, E. O.; Lira, B. F.; Athayde-Filho, P. F. de; Barbosa-Filho, J. M. New Diesters Derived from Piperine: In Silico Study and Evaluation of Their Antimicrobial Potential. *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, 31, 1668–1678.
- (211) Hoque, J.; Konai, M. M.; Gonuguntla, S.; Manjunath, G. B.; Samaddar, S.; Yarlagadda, V.; Haldar, J. Membrane Active Small Molecules Show Selective Broad Spectrum Antibacterial Activity with No Detectable Resistance and Eradicate Biofilms. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (14), 5486–5500.

- (212) Vázquez, J.; López, M.; Gibert, E.; Herrero, E.; Luque, F. J. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. *Molecules* **2020**, 25 (20), 4723.
- (213) Geppert, H.; Vogt, M.; Bajorath, J. Current Trends in Ligand-Based Virtual Screening: Molecular Representations, Data Mining Methods, New Application Areas, and Performance Evaluation. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50 (2), 205–216.
- (214) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, 20 (7), 13384–13421.
- (215) Shoichet, B. K. Virtual Screening of Chemical Libraries. *Nature* **2004**, 432 (7019), 862–865.
- (216) Vijayalakshmi, P.; Nisha, J.; Rajalakshmi, M. Virtual Screening of Potential Inhibitor against FtsZ Protein from *Staphylococcus Aureus*. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2014**, 6 (4), 331–339.
- (217) Soulère, L.; Soulage, C. O. Exploring Docking Methods for Virtual Screening: Application to the Identification of Neuraminidase and Ftsz Potential Inhibitors. *Mol. Simul.* **2017**, 43 (8), 656–663.
- (218) Tripathy, S.; Sahu, S. K.; Azam, M. A.; Jupudi, S. Computer-Aided Identification of Lead Compounds as *Staphylococcal Epidermidis* FtsZ Inhibitors Using Molecular Docking, Virtual Screening, DFT Analysis, and Molecular Dynamic Simulation. *J. Mol. Model.* **2019**, 25 (12), 360.
- (219) Tripathy, S.; Sahu, S. K.; Azam, M. A.; Jupudi, S.; Gupta, V. K.; Sharma, S. Identification of Antimycobacterial Agent Using In Silico Virtual Screening, ADME Prediction, Docking, and Molecular Dynamics Simulations Approach. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2020**, 17 (6), 806–816.
- (220) Mishra, R. C.; Kumari, R.; Yadav, S.; Yadav, J. P. Target Based Virtual Screening of New Leads Inhibitor against Bacterial Cell Division Protein FtsZ for the Discovery of Antibacterial Agents. *Med. Chem.* **2020**, 16 (2), 169–175.
- (221) Akinpelu, O. I.; Kumalo, H. M.; Mhlongo, S. I.; Mhlongo, N. N. Identifying the Analogues of Berberine as Promising Antitubercular Drugs Targeting Mtb-FtsZ Polymerisation through Ligand-Based Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Recognit.* **2022**, 35 (2), e2940.
- (222) Alexey, R.; Dariya, S.; Liudmyla, I.; Lilia, V.; Valeriy, M.; Dmytro, L.; Oleksandr, B.; Svitlana, S.; Sergii, O.; Elijah, B.; Mariia, S.; Yaroslav, B.; Pavel, K. Structure-Based Virtual Screening and Biological Evaluation of Novel Inhibitors of Mycobacterium Z-Ring Formation. *J. Cell. Biochem.* **2022**, 123 (5), 852–862.
- (223) Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, 7 (2), 146–157.
- (224) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19 (14), 1639–1662.
- (225) Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, 161 (2), 269–288.
- (226) Suzuki, T.; Imai, K.; Imai, E.; Iida, S.; Ueda, R.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Miyata, N. Design, Synthesis, Enzyme Inhibition, and Tumor Cell Growth Inhibition of 2-

- Anilinobenzamide Derivatives as SIRT1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (16), 5900–5905.
- (227) Liu, S.; Zu, W.; Zhang, J.; Xu, L. Chemoselective N -Arylation of Aminobenzamides via Copper Catalysed Chan–Evans–Lam Reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (44), 9288–9292.
- (228) Miltz, W.; Velcicky, J.; Dawson, J.; Littlewood-Evans, A.; Ludwig, M.-G.; Seuwen, K.; Feifel, R.; Oberhauser, B.; Meyer, A.; Gabriel, D.; Nash, M.; Loetscher, P. Design and Synthesis of Potent and Orally Active GPR4 Antagonists with Modulatory Effects on Nociception, Inflammation, and Angiogenesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (16), 4512–4525.
- (229) AID 2205 - HCS assay for microtubule stabilizers - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/2205> (accessed 2022-05-30).
- (230) Hart, T. N.; Read, R. J. A Multiple-Start Monte Carlo Docking Method. *Proteins* **1992**, *13* (3), 206–222.
- (231) Leonczak, P.; Gao, L.-J.; Ramadori, A. T.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Herdewijn, P. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of 2-(1,3,4-Oxadiazole-2(3H)-Thione)-3-Amino-5-Arylthieno[2,3-b]Pyridines as Inhibitors of DRAK2. *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2587–2601.
- (232) Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Pinheiro, P. de S. M.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. N-Acylhydrazones as Drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (17), 2797–2806.
- (233) Palla, G.; Predieri, G.; Domiano, P.; Vignali, C.; Turner, W. Conformational Behaviour and E/Z Isomerization of N-Acyl and N-Aroylhydrazones. *Tetrahedron* **1986**, *42* (13), 3649–3654.
- (234) Kumar, P.; Kadyan, K.; Duhan, M.; Sindhu, J.; Singh, V.; Saharan, B. S. Design, Synthesis, Conformational and Molecular Docking Study of Some Novel Acyl Hydrazone Based Molecular Hybrids as Antimalarial and Antimicrobial Agents. *Chem. Cent. J.* **2017**, *11* (1), 115.
- (235) Fedi, V.; Altamura, M.; Catalioto, R.-M.; Giannotti, D.; Giolitti, A.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. S.; Lecci, A.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A. Discovery of a New Series of Potent and Selective Linear Tachykinin NK2 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (20), 4793–4807.
- (236) Mueller, C. E.; Pegurier, C.; Deligny, M. L. R.; El-Tayeb, A.; Hockemeyer, J.; Ledecq, M.; Mercier, J.; Provins, L.; Boshta, N. M.; Bhattarai, S.; Namasivayam, V.; Funke, M.; Schwach, L.; Gollos, S.; Von, L. D.; Barré, A. (Aza)Indole-, Benzothiophene-, and Benzofuran-3-Sulfonamides. *WO2018122232 (A1)*, July 5, 2018.
- (237) Kim, B.-K.; Ko, H.; Jeon, E.-S.; Ju, E.-S.; Jeong, L. S.; Kim, Y.-C. 2,3,4-Trihydroxybenzyl-Hydrazide Analogues as Novel Potent Coxsackievirus B3 3C Protease Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 202–216.
- (238) Younus Wani, M.; Athar, F.; Salauddin, A.; Mohan Agarwal, S.; Azam, A.; Choi, I.; Roouf Bhat, A. Novel Terpene Based 1,4,2-Dioxazoles: Synthesis, Characterization, Molecular Properties and Screening against Entamoeba Histolytica. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (9), 4742–4752.
- (239) Li, Z.; Xu, Q.; Yu, C.; Yee, C.; Gwaltney, I. S. L.; Metcalf, B. W.; Richards, S.; Lardy, M. a; Setti, L.; Sham, H. Pyrazolopyridine Pyrazolopyrimidine and Related Compounds. *US2015315198 (A1)*, November 5, 2015.
- (240) Keri, R. S.; Chand, K.; Budagumpi, S.; Balappa Somappa, S.; Patil, S. A.; Nagaraja, B. M. An Overview of Benzo[b]Thiophene-Based Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 1002–1033.

- (241) Liger, F.; Bouhours, P.; Ganem-Elbaz, C.; Jolival, C.; Pellet-Rostaing, S.; Popowycz, F.; Paris, J.-M.; Lemaire, M. C2 Arylated Benzo[b]Thiophene Derivatives as Staphylococcus Aureus NorA Efflux Pump Inhibitors. *ChemMedChem* **2016**, 11 (3), 320–330.
- (242) Barbier, T.; Barbry, A.; Magand, J.; Badiou, C.; Davy, F.; Baudouin, A.; Queneau, Y.; Dumitrescu, O.; Lina, G.; Soulère, L. Synthesis and Biological Evaluation of Benzo[b]Thiophene Acylhydrazones as Antimicrobial Agents against Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus. *Biomolecules* **2022**, 12 (1), 131.
- (243) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int> (accessed 2022-06-08).
- (244) Kung, S.; Doppen, M.; Black, M.; Braithwaite, I.; Kearns, C.; Weatherall, M.; Beasley, R.; Kearns, N. Underestimation of COVID-19 Mortality during the Pandemic. *ERJ Open Res.* **2021**, 7 (1).
- (245) Menéndez, J. C. Approaches to the Potential Therapy of COVID-19: A General Overview from the Medicinal Chemistry Perspective. *Molecules* **2022**, 27 (3), 658.
- (246) Rahimi, A.; Mirzazadeh, A.; Tavakolpour, S. Genetics and Genomics of SARS-CoV-2: A Review of the Literature with the Special Focus on Genetic Diversity and SARS-CoV-2 Genome Detection. *Genomics* **2021**, 113 (1), 1221–1232.
- (247) Zhu, C.; He, G.; Yin, Q.; Zeng, L.; Ye, X.; Shi, Y.; Xu, W. Molecular Biology of the SARS-CoV-2 Spike Protein: A Review of Current Knowledge. *J. Med. Virol.* **2021**, 93 (10), 5729–5741.
- (248) Zhang, B.; Tian, J.; Zhang, Q.; Xie, Y.; Wang, K.; Qiu, S.; Lu, K.; Liu, Y. Comparing the Nucleocapsid Proteins of Human Coronaviruses: Structure, Immunoregulation, Vaccine, and Targeted Drug. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, 9.
- (249) Pillaiyar, T.; Meenakshisundaram, S.; Manickam, M. Recent Discovery and Development of Inhibitors Targeting Coronaviruses. *Drug Discov. Today* **2020**, 25 (4), 668–688.
- (250) Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E. J.; Campbell, E. A. Structures and Functions of Coronavirus Replication–Transcription Complexes and Their Relevance for SARS-CoV-2 Drug Design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, 23 (1), 21–39.
- (251) Lamers, M. M.; Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 Pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, 20 (5), 270–284.
- (252) Yang, B.; Jia, Y.; Meng, Y.; Xue, Y.; Liu, K.; Li, Y.; Liu, S.; Li, X.; Cui, K.; Shang, L.; Cheng, T.; Zhang, Z.; Hou, Y.; Yang, X.; Yan, H.; Duan, L.; Tong, Z.; Wu, C.; Liu, Z.; Gao, S.; Zhuo, S.; Huang, W.; Gao, G. F.; Qi, J.; Shang, G. SNX27 Suppresses SARS-CoV-2 Infection by Inhibiting Viral Lysosome/Late Endosome Entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2022**, 119 (4), e2117576119.
- (253) Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, 181 (2), 271–280.e8.
- (254) Ou, X.; Liu, Y.; Lei, X.; Li, P.; Mi, D.; Ren, L.; Guo, L.; Guo, R.; Chen, T.; Hu, J.; Xiang, Z.; Mu, Z.; Chen, X.; Chen, J.; Hu, K.; Jin, Q.; Wang, J.; Qian, Z. Characterization of Spike Glycoprotein of SARS-CoV-2 on Virus Entry and Its Immune Cross-Reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **2020**, 11 (1), 1620.
- (255) Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; Yuan, M.-L.; Zhang, Y.-L.; Dai, F.-H.; Liu, Y.; Wang, Q.-M.; Zheng, J.-J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y.-Z. A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. *Nature* **2020**, 579 (7798), 265–269.

- (256) Alanagreh, L.; Alzoughool, F.; Atoum, M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens* **2020**, *9* (5), 331.
- (257) Muramatsu, T.; Kim, Y.-T.; Nishii, W.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Autoprocessing Mechanism of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-like Protease (SARS-CoV 3CLpro) from Its Polyproteins. *FEBS J.* **2013**, *280* (9), 2002–2013.
- (258) Arya, R.; Kumari, S.; Pandey, B.; Mistry, H.; Bihani, S. C.; Das, A.; Prashar, V.; Gupta, G. D.; Panicker, L.; Kumar, M. Structural Insights into SARS-CoV-2 Proteins. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433* (2), 166725.
- (259) Romano, M.; Ruggiero, A.; Squeglia, F.; Maga, G.; Berisio, R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* **2020**, *9* (5), 1267.
- (260) Ng, T. I.; Correia, I.; Seagal, J.; DeGoey, D. A.; Schrimpf, M. R.; Hardee, D. J.; Noey, E. L.; Kati, W. M. Antiviral Drug Discovery for the Treatment of COVID-19 Infections. *Viruses* **2022**, *14* (5), 961.
- (261) Costa, C. F. S.; Barbosa, A. J. M.; Dias, A. M. G. C.; Roque, A. C. A. Native, Engineered and de Novo Designed Ligands Targeting the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Biotechnol. Adv.* **2022**, *59*, 107986.
- (262) Bakkari, M. A.; Moni, S. S.; Sultan, M. H.; Madkhali, O. A. Monoclonal Antibodies and Their Target Specificity Against SARS-CoV-2 Infections: Perspectives and Challenges. *Recent Pat. Biotechnol.* **2022**, *16* (1), 64–78.
- (263) Müller, P.; Maus, H.; Hammerschmidt, S. J.; Knaff, P. M.; Mailänder, V.; Schirmeister, T.; Kersten, C. Interfering with Host Proteases in SARS-CoV-2 Entry as a Promising Therapeutic Strategy. *Curr. Med. Chem.* **2022**, *29* (4), 635–665.
- (264) Seyedpour, S.; Khodaei, B.; Loghman, A. H.; Seyedpour, N.; Kisomi, M. F.; Balibegloo, M.; Nezamabadi, S. S.; Gholami, B.; Saghazadeh, A.; Rezaei, N. Targeted Therapy Strategies against SARS-CoV-2 Cell Entry Mechanisms: A Systematic Review of in Vitro and in Vivo Studies. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236* (4), 2364–2392.
- (265) Das, S.; Ramachandran, A. K.; Birangal, S. R.; Akbar, S.; Ahmed, B.; Joseph, A. The Controversial Therapeutic Journey of Chloroquine and Hydroxychloroquine in the Battle against SARS-CoV-2: A Comprehensive Review. *Med. Drug Discov.* **2021**, *10*, 100085.
- (266) Tan, H.; Hu, Y.; Jadhav, P.; Tan, B.; Wang, J. Progress and Challenges in Targeting the SARS-CoV-2 Papain-like Protease. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (11), 7561–7580.
- (267) Agost-Beltrán, L.; de la Hoz-Rodríguez, S.; Bou-Iserte, L.; Rodríguez, S.; Fernández-de-la-Pradilla, A.; González, F. V. Advances in the Development of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors. *Molecules* **2022**, *27* (8), 2523.
- (268) Chia, C. S. B.; Xu, W.; Shuyi Ng, P. A Patent Review on SARS Coronavirus Main Protease (3CLpro) Inhibitors. *ChemMedChem* **2022**, *17* (1), e202100576.
- (269) Agrawal, N.; Goyal, A. Potential Candidates against COVID-19 Targeting RNA-Dependent RNA Polymerase: A Comprehensive Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *23* (3), 396–419.
- (270) Cannalire, R.; Cerchia, C.; Beccari, A. R.; Di Leva, F. S.; Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (4), 2716–2746.
- (271) Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved α -Ketoamide Inhibitors. *Science* **2020**, *368* (6489), 409–412.

- (272) Zhang, Y.; Gao, H.; Hu, X.; Wang, Q.; Zhong, F.; Zhou, X.; Lin, C.; Yang, Y.; Wei, J.; Du, W.; Huang, H.; Zhou, H.; He, W.; Zhang, H.; Zhang, Y.; McCormick, P. J.; Fu, J.; Wang, D.; Fu, Y.; Lu, X.; Zhang, T.; Duan, J.; Qin, B.; Jiang, H.; Luo, J.; Zhang, Y.; Chen, Q.; Luo, Q.; Cheng, L.; Zhang, Z.; Zhang, J.; Li, J. Structure-Based Discovery and Structural Basis of a Novel Broad-Spectrum Natural Product against the Main Protease of Coronavirus. *J. Virol.* **2022**, 96 (1), e0125321.
- (273) Sabbah, D. A.; Hajjo, R.; Bardaweel, S. K.; Zhong, H. A. An Updated Review on SARS-CoV-2 Main Proteinase (MPro): Protein Structure and Small-Molecule Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2021**, 21 (6), 442–460.
- (274) Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhvani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science* **2003**, 300 (5626), 1763–1767.
- (275) Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Namasivayam, V.; Hayashi, Y.; Jung, S.-H. An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (14), 6595–6628.
- (276) Dalton, S. E.; Campos, S. Covalent Small Molecules as Enabling Platforms for Drug Discovery. *ChemBioChem* **2020**, 21 (8), 1080–1100.
- (277) Mslati, H.; Gentile, F.; Perez, C.; Cherkasov, A. Comprehensive Consensus Analysis of SARS-CoV-2 Drug Repurposing Campaigns. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, 61 (8), 3771–3788.
- (278) Bolcato, G.; Bissaro, M.; Pavan, M.; Sturlese, M.; Moro, S. Targeting the Coronavirus SARS-CoV-2: Computational Insights into the Mechanism of Action of the Protease Inhibitors Lopinavir, Ritonavir and Nelfinavir. *Sci. Rep.* **2020**, 10 (1), 20927.
- (279) Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; Fan, G.; Ruan, L.; Song, B.; Cai, Y.; Wei, M.; Li, X.; Xia, J.; Chen, N.; Xiang, J.; Yu, T.; Bai, T.; Xie, X.; Zhang, L.; Li, C.; Yuan, Y.; Chen, H.; Li, H.; Huang, H.; Tu, S.; Gong, F.; Liu, Y.; Wei, Y.; Dong, C.; Zhou, F.; Gu, X.; Xu, J.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Li, H.; Shang, L.; Wang, K.; Li, K.; Zhou, X.; Dong, X.; Qu, Z.; Lu, S.; Hu, X.; Ruan, S.; Luo, S.; Wu, J.; Peng, L.; Cheng, F.; Pan, L.; Zou, J.; Jia, C.; Wang, J.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, X.; Ge, Q.; He, J.; Zhan, H.; Qiu, F.; Guo, L.; Huang, C.; Jaki, T.; Hayden, F. G.; Horby, P. W.; Zhang, D.; Wang, C. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 382 (19), 1787–1799.
- (280) Chen, H.; Zhang, Z.; Wang, L.; Huang, Z.; Gong, F.; Li, X.; Chen, Y.; Wu, J. J. First Clinical Study Using HCV Protease Inhibitor Danoprevir to Treat COVID-19 Patients. *Medicine (Baltimore)* **2020**, 99 (48), e23357.
- (281) Ma, C.; Sacco, M. D.; Hurst, B.; Townsend, J. A.; Hu, Y.; Szeto, T.; Zhang, X.; Tarbet, B.; Marty, M. T.; Chen, Y.; Wang, J. Boceprevir, GC-376, and Calpain Inhibitors II, XII Inhibit SARS-CoV-2 Viral Replication by Targeting the Viral Main Protease. *Cell Res.* **2020**, 30 (8), 678–692.
- (282) Günther, S.; Reinke, P. Y. A.; Fernández-García, Y.; Lieske, J.; Lane, T. J.; Ginn, H. M.; Koua, F. H. M.; Ehrt, C.; Ewert, W.; Oberthuer, D.; Yefanov, O.; Meier, S.; Lorenzen, K.; Krichel, B.; Kopicki, J.-D.; Gelisio, L.; Brehm, W.; Dunkel, I.; Seychell, B.; Gieseler, H.; Norton-Baker, B.; Escudero-Pérez, B.; Domaracky, M.; Saouane, S.; Tolstikova, A.; White, T. A.; Hänle, A.; Groessler, M.; Fleckenstein, H.; Trost, F.; Galchenkova, M.; Gevorkov, Y.; Li, C.; Awel, S.; Peck, A.; Barthelmess, M.; Schlünzen, F.; Lourdu Xavier, P.; Werner, N.; Andaleeb, H.; Ullah, N.; Falke, S.; Srinivasan, V.; França, B. A.; Schwinzer, M.; Brognaro, H.; Rogers, C.; Melo, D.; Zaitseva-Doyle, J. J.; Knoska, J.; Peña-Murillo, G. E.; Mashhour, A. R.; Hennicke, V.; Fischer, P.; Hakanpää, J.; Meyer,

- J.; Gribbon, P.; Ellinger, B.; Kuzikov, M.; Wolf, M.; Beccari, A. R.; Bourenkov, G.; von Stetten, D.; Pompidor, G.; Bento, I.; Panneerselvam, S.; Karpics, I.; Schneider, T. R.; Garcia-Alai, M. M.; Niebling, S.; Günther, C.; Schmidt, C.; Schubert, R.; Han, H.; Boger, J.; Monteiro, D. C. F.; Zhang, L.; Sun, X.; Pletzer-Zelgert, J.; Wollenhaupt, J.; Feiler, C. G.; Weiss, M. S.; Schulz, E.-C.; Mehrabi, P.; Karničar, K.; Usenik, A.; Loboda, J.; Tidow, H.; Chari, A.; Hilgenfeld, R.; Uetrecht, C.; Cox, R.; Zaliani, A.; Beck, T.; Rarey, M.; Günther, S.; Turk, D.; Hinrichs, W.; Chapman, H. N.; Pearson, A. R.; Betzel, C.; Meents, A. X-Ray Screening Identifies Active Site and Allosteric Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *Science* **2021**, 372 (6542), 642–646.
- (283) Hughes, J. M. SARS: An Emerging Global Microbial Threat. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **2004**, 115, 361–372; discussion 372-374.
- (284) Yang, H.; Xie, W.; Xue, X.; Yang, K.; Ma, J.; Liang, W.; Zhao, Q.; Zhou, Z.; Pei, D.; Ziebuhr, J.; Hilgenfeld, R.; Yuen, K. Y.; Wong, L.; Gao, G.; Chen, S.; Chen, Z.; Ma, D.; Bartlam, M.; Rao, Z. Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. *PLOS Biol.* **2005**, 3 (10), e324.
- (285) Jin, Z.; Du, X.; Xu, Y.; Deng, Y.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; Duan, Y.; Yu, J.; Wang, L.; Yang, K.; Liu, F.; Jiang, R.; Yang, X.; You, T.; Liu, X.; Yang, X.; Bai, F.; Liu, H.; Liu, X.; Guddat, L. W.; Xu, W.; Xiao, G.; Qin, C.; Shi, Z.; Jiang, H.; Rao, Z.; Yang, H. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and Discovery of Its Inhibitors. *Nature* **2020**, 582 (7811), 289–293.
- (286) Menéndez, C. A.; Byléhn, F.; Perez-Lemus, G. R.; Alvarado, W.; de Pablo, J. J. Molecular Characterization of Ebselen Binding Activity to SARS-CoV-2 Main Protease. *Sci. Adv.* **2020**, 6 (37), eabd0345.
- (287) Zhu, W.; Xu, M.; Chen, C. Z.; Guo, H.; Shen, M.; Hu, X.; Shinn, P.; Klumpp-Thomas, C.; Michael, S. G.; Zheng, W. Identification of SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors by a Quantitative High-Throughput Screening. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3 (5), 1008–1016.
- (288) Kulkarni, S. A.; Ingale, K. CHAPTER 1 In Silico Approaches for Drug Repurposing for SARS-CoV-2 Infection. **2022**, 1–80.
- (289) Mahdi, M.; Mótyán, J. A.; Szojka, Z. I.; Golda, M.; Miczi, M.; Tózsér, J. Analysis of the Efficacy of HIV Protease Inhibitors against SARS-CoV-2's Main Protease. *Viol. J.* **2020**, 17 (1), 1–8.
- (290) Macip, G.; Garcia-Segura, P.; Mestres-Truyol, J.; Saldivar-Espinoza, B.; Ojeda-Montes, M. J.; Gimeno, A.; Cereto-Massagué, A.; Garcia-Vallvé, S.; Pujadas, G. Haste Makes Waste: A Critical Review of Docking-Based Virtual Screening in Drug Repurposing for SARS-CoV-2 Main Protease (M-pro) Inhibition. *Med. Res. Rev.* **2022**, 42 (2), 744–769.
- (291) Kapusta, K.; Kar, S.; Collins, J. T.; Franklin, L. M.; Kolodziejczyk, W.; Leszczynski, J.; Hill, G. A. Protein Reliability Analysis and Virtual Screening of Natural Inhibitors for SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) through Docking, Molecular Mechanic & Dynamic, and ADMET Profiling. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, 1–18.
- (292) Bernardi, M.; Ghaani, M. R.; Bayazeid, O. Phenylethanoid Glycosides as a Possible COVID-19 Protease Inhibitor: A Virtual Screening Approach. *J. Mol. Model.* **2021**, 27 (11), 341.
- (293) Garg, A.; Goel, N.; Abhinav, N.; Varma, T.; Achari, A.; Bhattacharjee, P.; Kamal, I. M.; Chakrabarti, S.; Ravichandiran, V.; Reddy, A. M.; Gupta, S.; Jaisankar, P. Virtual Screening of Natural Products Inspired In-House Library to Discover Potential Lead Molecules against the SARS-CoV-2 Main Protease. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2022**, 0 (0), 1–13.

- (294) El-Ashrey, M. K.; Bakr, R. O.; Fayed, M. A. A.; Refaey, R. H.; Nissan, Y. M. Pharmacophore Based Virtual Screening for Natural Product Database Revealed Possible Inhibitors for SARS-COV-2 Main Protease. *Virology* **2022**, 570, 18–28.
- (295) Padhi, S.; Masi, M.; Chourasia, R.; Rajashekar, Y.; Rai, A. K.; Evidente, A. ADMET Profile and Virtual Screening of Plant and Microbial Natural Metabolites as SARS-CoV-2 S1 Glycoprotein Receptor Binding Domain and Main Protease Inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, 890, 173648.
- (296) Gentile, D.; Patamia, V.; Scala, A.; Sciortino, M. T.; Piperno, A.; Rescifina, A. Putative Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease from A Library of Marine Natural Products: A Virtual Screening and Molecular Modeling Study. *Mar. Drugs* **2020**, 18 (4), 225.
- (297) Ton, A.-T.; Gentile, F.; Hsing, M.; Ban, F.; Cherkasov, A. Rapid Identification of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease by Deep Docking of 1.3 Billion Compounds. *Mol. Inform.* **2020**, 39 (8), e2000028.
- (298) Lutten, A.; Gullberg, H.; Abdurakhmanov, E.; Vo, D. D.; Akaberi, D.; Talibov, V. O.; Nekhotiaeva, N.; Vangeel, L.; De Jonghe, S.; Jochmans, D.; Krambrich, J.; Tas, A.; Lundgren, B.; Gravenfors, Y.; Craig, A. J.; Atilaw, Y.; Sandström, A.; Moodie, L. W. K.; Lundkvist, Å.; van Hemert, M. J.; Neyts, J.; Lennerstrand, J.; Kihlberg, J.; Sandberg, K.; Danielson, U. H.; Carlsson, J. Ultralarge Virtual Screening Identifies SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors with Broad-Spectrum Activity against Coronaviruses. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144 (7), 2905–2920.
- (299) Mohseni, M.; Bahrami, H.; Farajmand, B.; Hosseini, F. S.; Amanlou, M.; Salehabadi, H. Indole Alkaloids as Potential Candidates against COVID-19: An in Silico Study. *J. Mol. Model.* **2022**, 28 (6), 144.
- (300) Hernández González, J. E.; Eberle, R. J.; Willbold, D.; Coronado, M. A. A Computer-Aided Approach for the Discovery of D-Peptides as Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, 8, 816166.
- (301) Amendola, G.; Ettari, R.; Previti, S.; Di Chio, C.; Messere, A.; Di Maro, S.; Hammerschmidt, S. J.; Zimmer, C.; Zimmermann, R. A.; Schirmeister, T.; Zappalà, M.; Cosconati, S. Lead Discovery of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors through Covalent Docking-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, 61 (4), 2062–2073.
- (302) Zhang, Y.; Zhang, D.; Tian, H.; Jiao, Y.; Shi, Z.; Ran, T.; Liu, H.; Lu, S.; Xu, A.; Qiao, X.; Pan, J.; Yin, L.; Zhou, W.; Lu, T.; Chen, Y. Identification of Covalent Binding Sites Targeting Cysteines Based on Computational Approaches. *Mol. Pharm.* **2016**, 13 (9), 3106–3118.
- (303) Lin, H.; Zhang, H.; Pratt-Hyatt, M. J.; Hollenberg, P. F. Thr302 Is the Site for the Covalent Modification of Human Cytochrome P450 2B6 Leading to Mechanism-Based Inactivation by Tert-Butylphenylacetylene. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39 (12), 2431–2439.
- (304) Choi, J.-E.; Kim, J.-H.; Song, N.-Y.; Suh, J.; Kim, D.-H.; Kim, S.-J.; Na, H.-K.; Nadas, J.; Dong, Z.; Cha, Y.-N.; Surh, Y.-J. 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 Stabilizes Hypoxia Inducible Factor-1 α through Induction of Heme Oxygenase-1 and Direct Modification Ofprolyl-4-Hydroxylase 2. *Free Radic. Res.* **2016**, 50 (10), 1140–1152.
- (305) Douangamath, A.; Fearon, D.; Gehrtz, P.; Krojer, T.; Lukacik, P.; Owen, C. D.; Resnick, E.; Strain-Damerell, C.; Aimon, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Brandão-Neto, J.; Carbery, A.; Davison, G.; Dias, A.; Downes, T. D.; Dunnett, L.; Fairhead, M.; Firth, J. D.; Jones, S. P.; Keeley, A.; Keserü, G. M.; Klein, H. F.; Martin, M. P.; Noble, M. E. M.;

- O'Brien, P.; Powell, A.; Reddi, R. N.; Skyner, R.; Snee, M.; Waring, M. J.; Wild, C.; London, N.; von Delft, F.; Walsh, M. A. Crystallographic and Electrophilic Fragment Screening of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 5047.
- (306) AID 435019 - A Cell Based Secondary Assay To Explore Cytotoxicity of Compounds that Inhibit Mycobacterium Tuberculosis - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/435019> (accessed 2022-06-17).
- (307) AID 1825 - Luminescence-based counterscreen assay for KLF5 inhibitors: cell-based high throughput screening assay to identify cytotoxic compounds using the IEC-6 intestinal epithelial cell line. - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1825> (accessed 2022-06-17).
- (308) AID 504648 - Nrf2 qHTS screen for inhibitors: counterscreen for cytotoxicity - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/504648> (accessed 2022-06-17).
- (309) AID 602141 - uHTS determination of small molecule cytotoxicity in a fluorescence assay to identify cystic fibrosis induced NFκB Inhibitors - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/602141> (accessed 2022-06-17).
- (310) Vasudevan, A.; Argiriadi, M. A.; Baranczak, A.; Friedman, M. M.; Gavriluk, J.; Hobson, A. D.; Hulce, J. J.; Osman, S.; Wilson, N. S. Chapter One - Covalent Binders in Drug Discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Witty, D. R., Cox, B., Eds.; Elsevier, 2019; Vol. 58, pp 1–62.
- (311) Burness, C. B.; Deeks, E. D. Dimethyl Fumarate: A Review of Its Use in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2014**, *28* (4), 373–387.
- (312) Eschenburg, S.; Priestman, M.; Schönbrunn, E. Evidence That the Fosfomycin Target Cys115 in UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) Is Essential for Product Release*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (5), 3757–3763.
- (313) Burger, J. A.; Tedeschi, A.; Barr, P. M.; Robak, T.; Owen, C.; Ghia, P.; Bairey, O.; Hillmen, P.; Bartlett, N. L.; Li, J.; Simpson, D.; Grosicki, S.; Devereux, S.; McCarthy, H.; Coutre, S.; Quach, H.; Gaidano, G.; Maslyak, Z.; Stevens, D. A.; Janssens, A.; Offner, F.; Mayer, J.; O'Dwyer, M.; Hellmann, A.; Schuh, A.; Siddiqi, T.; Polliack, A.; Tam, C. S.; Suri, D.; Cheng, M.; Clow, F.; Styles, L.; James, D. F.; Kipps, T. J. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (25), 2425–2437.
- (314) Barnett, A. DPP-4 Inhibitors and Their Potential Role in the Management of Type 2 Diabetes. *Int. J. Clin. Pract.* **2006**, *60* (11), 1454–1470.
- (315) Mantero, V.; Abate, L.; Basilico, P.; Balgera, R.; Salmaggi, A.; Nourbakhsh, B.; Cordano, C. COVID-19 in Dimethyl Fumarate-treated Patients with Multiple Sclerosis. *J. Neurol.* **2020**.
- (316) Capone, F.; Ferraro, E.; Motolese, F.; Di Lazzaro, V. COVID-19 in Multiple Sclerosis Patients Treated with Dimethyl Fumarate. *J. Neurol.* **2021**, *268* (9), 3132–3134.
- (317) Pathania, Y. S. Dimethyl Fumarate for COVID-19. *BMJ Support. Palliat. Care* **2021**.
- (318) Timpani, C. A.; Rybalka, E. Calming the (Cytokine) Storm: Dimethyl Fumarate as a Therapeutic Candidate for COVID-19. *Pharm. Basel Switz.* **2020**, *14* (1), 15.
- (319) Zinovkin, R. A.; Grebenchikov, O. A. Transcription Factor Nrf2 as a Potential Therapeutic Target for Prevention of Cytokine Storm in COVID-19 Patients. *Biochem. Biokhimiia* **2020**, *85* (7), 833–837.
- (320) Kifle, Z. D. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors as Potential Therapeutic Agents for COVID-19: A Review. *Metab. Open* **2021**, *11*, 100116.

Partie 4 – Références bibliographiques

- (321) Stack, M.; Sacco, K.; Castagnoli, R.; Livinski, A. A.; Notarangelo, L. D.; Lionakis, M. S. BTK Inhibitors for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A Systematic Review. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **2021**, 230, 108816.
- (322) Nar, H.; Schnapp, G.; Hucke, O.; Hardman, T. C.; Klein, T. Action of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors on SARS-CoV-2 Main Protease. *ChemMedChem* **2021**, 16 (9), 1425–1426.
- (323) Soulère, L.; Barbier, T.; Queneau, Y. Docking-Based Virtual Screening Studies Aiming at the Covalent Inhibition of SARS-CoV-2 MPro by Targeting the Cysteine 145. *Comput. Biol. Chem.* **2021**, 92, 107463.
- (324) AID 1706 - QFRET-based primary biochemical high throughput screening assay to identify inhibitors of the SARS coronavirus 3C-like Protease (3CLPro) - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1706> (accessed 2022-06-24).
- (325) Xue, X.; Yu, H.; Yang, H.; Xue, F.; Wu, Z.; Shen, W.; Li, J.; Zhou, Z.; Ding, Y.; Zhao, Q.; Zhang, X. C.; Liao, M.; Bartlam, M.; Rao, Z. Structures of Two Coronavirus Main Proteases: Implications for Substrate Binding and Antiviral Drug Design. *J. Virol.* **2008**, 82 (5), 2515–2527.
- (326) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (W1), W320–W324.
- (327) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99 (6), 1129–1143.
- (328) Sargsyan, K.; Grauffel, C.; Lim, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, 13 (4), 1518–1524.
- (329) Banerjee, P.; Eckert, A. O.; Schrey, A. K.; Preissner, R. ProTox-II: A Webserver for the Prediction of Toxicity of Chemicals. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46 (W1), W257–W263.
- (330) Ghone, S.; Kang, F.; Jain, N.; Parhi, A.; Ponnaiah, R.; Soni, A. K.; Athunuri, S. R. R.; Korrakuti, T.; Seelam, P. Synthetic Processes and Synthetic Intermediates. WO2018183917 (A1), October 4, 2018.
- (331) Lin, Y.; Zhu, N.; Han, Y.; Jiang, J.; Si, S. Identification of Anti-Tuberculosis Agents That Target the Cell-Division Protein FtsZ. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2014**, 67 (9), 671–676.
- (332) Xu, L.-L.; Wu, Y.-F.; Wang, L.; Li, C.-C.; Li, L.; Di, B.; You, Q.-D.; Jiang, Z.-Y. Structure-Activity and Structure-Property Relationships of Novel Nrf2 Activators with a 1,2,4-Oxadiazole Core and Their Therapeutic Effects on Acetaminophen (APAP)-Induced Acute Liver Injury. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 157, 1376–1394.
- (333) Cai, J.; Wei, H.; Hong, K. H.; Wu, X.; Cao, M.; Zong, X.; Li, L.; Sun, C.; Chen, J.; Ji, M. Discovery and Preliminary Evaluation of 2-Aminobenzamide and Hydroxamate Derivatives Containing 1,2,4-Oxadiazole Moiety as Potent Histone Deacetylase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 96, 1–13.
- (334) Mcleod, D. a; Kers, A.; Malmberg, J.; Oscarsson, K.; Edwards, L.; Isaac, M.; Slassi, A.; Stormann, T. M. New Compounds. WO2004014370 (A2), February 19, 2004.
- (335) Sharma, P.; Tripathi, A.; Tripathi, P. N.; Singh, S. S.; Singh, S. P.; Shrivastava, S. K. Novel Molecular Hybrids of N-Benzylpiperidine and 1,3,4-Oxadiazole as Multitargeted Therapeutics to Treat Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, 10 (10), 4361–4384.
- (336) Natero, R.; Koltun, D. O.; Zablocki, J. A. Microwave-Assisted One-Step Synthesis of Substituted 2-Chloromethyl-1,3,4-oxadiazoles. *Synth. Commun.* **2004**, 34 (14), 2523–2529.

- (337) Zhu, Y.; Yan, H.; Lu, L.; Liu, D.; Rong, G.; Mao, J. Copper-Catalyzed Methyl Esterification Reactions via C–C Bond Cleavage. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (19), 9898–9905.
- (338) Luo, W.; Jiang, K.; Li, Y.; Jiang, H.; Yin, B. Direct Alkoxyacylation of Heteroarenes via Cu-Mediated Trichloromethylation and In Situ Alcoholysis. *Org. Lett.* **2020**, 22 (5), 2093–2098.
- (339) Chiarelli, L. R.; Mori, M.; Barlocco, D.; Beretta, G.; Gelain, A.; Pini, E.; Porcino, M.; Mori, G.; Stelitano, G.; Costantino, L.; Lapillo, M.; Bonanni, D.; Poli, G.; Tuccinardi, T.; Villa, S.; Meneghetti, F. Discovery and Development of Novel Salicylate Synthase (MbtI) Furanic Inhibitors as Antitubercular Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 155, 754–763.
- (340) Fu, H. Y.; Doucet, H. Methyl 2-Furoate: An Alternative Reagent to Furan for Palladium-Catalysed Direct Arylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011 (35), 7163–7173.
- (341) Chacón-Huete, F.; Lasso, J. D.; Szavay, P.; Covone, J.; Forgione, P. Synthesis of 2,5-Diaryl Nonsymmetric Furans C6-Platform Chemicals via Catalytic Conversion of Biomass and the Formal Synthesis of Dantrolene. *J. Org. Chem.* **2021**, 86 (1), 515–524.
- (342) Li, J.; Rudolph, M.; Rominger, F.; Xie, J.; Hashmi, A. S. K. A Gold-Catalyzed A3 Coupling/Cyclization/Elimination Sequence as Versatile Tool for the Synthesis of Furfuryl Alcohol Derivatives from Glyceraldehyde and Alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358 (2), 207–211.
- (343) Kim, J.; Shin, J. S.; Ahn, S.; Han, S. B.; Jung, Y.-S. 3-Aryl-1,2,4-Oxadiazole Derivatives Active Against Human Rhinovirus. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, 9 (7), 667–672.
- (344) Gill, D. M.; Povinelli, A. P. R.; Zazeri, G.; Shamir, S. A.; Mahmoud, A. M.; Wilkinson, F. L.; Alexander, M. Y.; Cornelio, M. L.; Jones, A. M. The Modulatory Role of Sulfated and Non-Sulfated Small Molecule Heparan Sulfate-Glycomimetics in Endothelial Dysfunction: Absolute Structural Clarification, Molecular Docking and Simulated Dynamics, SAR Analyses and ADMET Studies. *RSC Med. Chem.* **2021**, 12 (5), 779–790.
- (345) Cavedon, C.; Madani, A.; Seeberger, P. H.; Pieber, B. Semiheterogeneous Dual Nickel/Photocatalytic (Thio)Etherification Using Carbon Nitrides. *Org. Lett.* **2019**, 21 (13), 5331–5334.
- (346) Guo, S.; Sun, X.; Zou, Q.; Zhang, J.; Ni, H. Antibacterial Activities of Five Cationic Gemini Surfactants with Ethylene Glycol Bisacetyl Spacers. *J. Surfactants Deterg.* **2014**, 17 (6), 1089–1097.
- (347) Huigens, R. W.; Reyes, S.; Reed, C. S.; Bunders, C.; Rogers, S. A.; Steinhauer, A. T.; Melander, C. The Chemical Synthesis and Antibiotic Activity of a Diverse Library of 2-Aminobenzimidazole Small Molecules against MRSA and Multidrug-Resistant *A. Baumannii*. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (2), 663–674.
- (348) Lakshmi Narayana, B.; Raghu Ram Rao, A.; Shanthan Rao, P. Synthesis of New 2-Substituted Pyrido[2,3-d]Pyrimidin-4(1H)-Ones and Their Antibacterial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44 (3), 1369–1376.
- (349) Mueller, C. E.; Pegurier, C.; Deligny, M. L. R.; El-Tayeb, A.; Hockemeyer, J.; Ledecq, M.; Mercier, J.; Provins, L.; Boshta, N. M.; Bhattarai, S.; Namasivayam, V.; Funke, M.; Schwach, L.; Gollos, S.; Von Laufenberg, D.; Barré, A. (Aza)Indole-, Benzothiophene-, and Benzofuran-3-Sulfonamides, July 5, 2018.
- (350) Cheng, K.; Wang, X.; Yin, H. Small-Molecule Inhibitors of the TLR3/DsRNA Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (11), 3764–3767.

Partie 4 – Références bibliographiques

- (351) Cai, G.; Yu, W.; Song, D.; Zhang, W.; Guo, J.; Zhu, J.; Ren, Y.; Kong, L. Discovery of Fluorescent Coumarin-Benzo[b]Thiophene 1, 1-Dioxide Conjugates as Mitochondria-Targeting Antitumor STAT3 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *174*, 236–251.
- (352) Zhang, X.-P.; Liu, J.; Zhang, J.-X.; Huang, J.-H.; Wan, C.-Z.; Li, C.-H.; You, X.-Z. Synthesis and Ferroelectric Properties of Platinum(II) Complexes with Chiral Isoxazoline Ligand. *Polyhedron* **2013**, *60*, 85–92.
- (353) Tan, Y. J.; Li, M.; Gunawan, G. A.; Nyantakyi, S. A.; Dick, T.; Go, M.-L.; Lam, Y. Amide–Amine Replacement in Indole-2-Carboxamides Yields Potent Mycobactericidal Agents with Improved Water Solubility. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (5), 704–712.
- (354) Chen, W.; Zhou, Z.-H.; Chen, H.-B. Efficient Synthesis of Chiral Benzofuryl β -Amino Alcohols via a Catalytic Asymmetric Henry Reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (6), 1530–1536.
- (355) Gensini, M.; Altamura, M.; Dimoulas, T.; Fedi, V.; Giannotti, D.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. S.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A. Modulation on C- and N-Terminal Moieties of a Series of Potent and Selective Linear Tachykinin NK2 Receptor Antagonists. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 65–78.
- (356) O’Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J. Cheminformatics* **2011**, *3* (1), 33.
- (357) Laskowski, R. A.; Swindells, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2778–2786.
- (358) Thompson, M. A. ArgusLaB 4.0.1, 2004.
- (359) Dallakyan, S.; Olson, A. J. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2015**, *1263*, 243–250.
- (360) Shin, J. M.; Kim, N. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Proton Pump Inhibitors. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2013**, *19* (1), 25–35.
- (361) Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA: A Versatile Program to Convert, Handle and Visualize Molecular Structure on Windows-Based PCs. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *21* (1), 47–49.
- (362) Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA--an Open Platform to Develop Chemo-Bio-Informatics Applications, Using Plug-in Architecture and Script Programming. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2004**, *18* (3), 167–173.
- (363) Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J. T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302* (1), 205–217.
- (364) Sturgeon, J. B.; Laird, B. B. Symplectic Algorithm for Constant-Pressure Molecular Dynamics Using a Nosé–Poincaré Thermostat. **2000**.

