



HAL
open science

Synthèse de bioprécurseurs d'acide salicylique et d'analogues chlorés en vue de stimuler les défenses naturelles des plantes

Benoit Guichard

► **To cite this version:**

Benoit Guichard. Synthèse de bioprécurseurs d'acide salicylique et d'analogues chlorés en vue de stimuler les défenses naturelles des plantes. Chimie organique. Université de Poitiers, 2022. Français. NNT : 2022POIT2257 . tel-04069663

HAL Id: tel-04069663

<https://theses.hal.science/tel-04069663v1>

Submitted on 14 Apr 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.

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers – IC2MP
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Chimie organique, minérale et industrielle

Présentée par :

Benoît Guichard

Synthèse de bioprécurseurs d'acide salicylique et d'analogues chlorés en vue de stimuler les défenses naturelles des plantes

Directeurs de Thèse :

Laurent Grasset, Cécile Marivingt-Mounir et Jean-François CHOLLET

Soutenue le 1^{er} mars 2022 devant le jury

Jury :

Rapporteur	Jacques Lebreton	Professeur, Université de Nantes
Rapporteur	Michel Couderchet	Professeur, Université de Reims
Examineur	Éric Léonel	Professeur, Université de Paris-Est Créteil
Membre	Cécile Marivingt-Mounir	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Jean-François Chollet	Chargé de recherche, Université de Poitiers
Membre	Laurent Grasset	Maître de conférences, Université de Poitiers

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers – IC2MP
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Chimie organique, minérale et industrielle

Présentée par :

Benoît Guichard

Synthèse de bioprécurseurs d'acide salicylique et d'analogues chlorés en vue de stimuler les défenses naturelles des plantes

Directeur de Thèse :

Laurent Grasset, Cécile Marivingt-Mounir et Jean-François CHOLLET

Soutenue le 1^{er} mars 2022 devant le jury

Jury :

Rapporteur	Jacques Lebreton	Professeur, Université de Nantes
Rapporteur	Michel Couderchet	Professeur, Université de Reims
Examineur	Éric Léonel	Professeur, Université de Paris-Est Créteil
Membre	Cécile Marivingt-Mounir	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Jean-François Chollet	Chargé de recherche, Université de Poitiers
Membre	Laurent Grasset	Maître de conférences, Université de Poitiers

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les Professeurs Jacques LEBRETON de l'Université de Nantes et Michel COUDERCHET de l'Université de Reims d'avoir accepté de juger ces travaux de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluer en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier le Professeur Éric LÉONEL de l'Université de Paris-Est Créteil d'avoir accepté d'expertiser ces travaux en tant qu'examineur.

Je remercie mon directeur et mes co-directeurs de thèse, le Dr Laurent GRASSET (Maître de conférences), le Dr Jean-François CHOLLET (Chargé de recherche) et le Dr Cécile MARIVINGT-MOUNIR (Maître de conférences) pour leur encadrement durant ces trois années. Je vous adresse également toute ma gratitude pour vos conseils, votre bienveillance et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces travaux de thèse.

Merci à Émilie DUGARO pour ta contribution sur les synthèses que tu as pu réaliser afin de m'avancer dans ces travaux mais également pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour tous les échanges que nous avons pu avoir durant ces trois années.

J'adresse des remerciements sincères au Dr Hanxiang WU pour le travail qu'il a pu réaliser au State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection à Beijing. Merci pour les études préliminaires en biologie (tests de systémie et d'activité biologique) et pour le temps qu'il a consacré à réaliser toutes ces manipulations. Tous ces remerciements ne seraient pas suffisants pour exprimer toute ma gratitude. Je remercie infiniment le Dr Sylvain LA CAMERA (Maître de conférences) pour le temps qu'il a pu m'accorder afin de réaliser des tests biologiques de nos composés sur des plantes. Je tiens également à te dire merci pour ta bienveillance, la patience dont tu as su faire preuve et pour tout ce que tu as pu m'apprendre en biologie sur un laps de temps aussi court.

Je souhaite également remercier mes camarades et collègues docteurs, doctorants et ingénieurs de l'équipe EBiCOM, Thomas RIBETTE, Justin LANGE, Fabiola DJAGO, Ramzi TIMOUMI, et tous les autres pour leur bienveillance, leur bonne humeur et tous les moments que nous avons pu partager tout au long de ces trois années. Merci à Quentin BLANCART REMAURY pour tes analyses HRMS irréprochables mais surtout pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tous les échanges que nous avons pu avoir durant ces trois années.

Je remercie mes collègues du troisième étage, les « Zéolithes » Hugo CRUCHADE, Antoine BEUCQUE, Thibaud AUMOND, Valentin LHOSPITAL, Nathan PICHOT et Jean-Dominique COMPAROT pour tous ces moments passés avec vous et pour votre présence tout au long de ces trois années. Merci pour tout les gars !

Je ne pouvais pas remercier mes collègues « Zéolithes » sans adresser des remerciements à mes collègues et amis « organiciens » Maxime ARTAULT, Paul BOURBON, Rémi CHATRE, Adrien BESSAGUET, Benoit MÉTAYER, Yvain GÉRARD, Chad PLUMET, Zakaria DEBBAH et tous les autres pour tous ces moments passés avec vous et notamment les quelques jeudis soir passés au Drop'NShoot et surtout pour m'avoir aussi bien intégré à votre groupe. Un grand merci à vous les amis !

Je remercie également Antoine RICHIEU, post-doctorant qui m'aura tenu compagnie au laboratoire pendant cette dernière année de thèse. Merci pour tes échanges surtout en chimie et notamment sur ces dérivés indoliques qui nous auront donné du fil à retordre. Merci également pour ta bonne humeur, ta sympathie et ta joie de vivre. Merci également à Samuel BOUCHET et Zoé CUNILL pour votre présence durant les TP de Chimie Organique que j'ai pu encadrer à vos côtés. Merci pour votre patience, votre soutien et votre confiance pendant ces séances que nous avons faites ensemble.

J'adresse également un grand merci à toutes les personnes (doctorants, enseignants-chercheurs, techniciens, ingénieurs, personnel administratif) que j'ai pu côtoyer durant ces trois années passées au laboratoire IC2MP. Je tiens également à remercier tous les étudiants qui ont pu contribuer à l'avancement des travaux de thèse dans le cadre de stages universitaires. Merci à Cécile, Charlotte, Grégoire, Rodolphe, Noémie MARQUES et Noémie YANG, Valentin et Yassine qui m'auront permis d'acquérir une première expérience dans l'encadrement d'étudiants mais également pour leur implication dans les synthèses qu'ils auront pu réaliser.

Je ne pouvais pas réaliser de remerciements sans en adresser à mes parents. Merci pour tout ce que vous avez fait pour nous trois et surtout d'avoir cru en nous. Sans votre soutien, je n'en serai pas là aujourd'hui et vous pouvez être fiers de vos enfants qui vous seront éternellement reconnaissants. Je remercie également mes deux frères Romain et Mathieu. Merci pour votre soutien et votre présence depuis toutes ces années mais surtout pour tous ces bons moments passés à vos côtés mes frères. Sachez que je serai toujours là pour vous comme vous l'êtes pour moi.

Et je termine ces remerciements en les adressant à la personne qui partage ma vie depuis près de huit ans, ma conjointe Laëtitia. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton soutien tout au long de ces années, ta bienveillance et ta présence dans les moments difficiles. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé et encouragé à réaliser une thèse, qui à travers ces remerciements est également la tienne. Saches que je t'aime d'un amour inconditionnel et que tu fais mon bonheur tous les jours malgré mon caractère parfois difficile. Mille mercis.

Valorisation de la thèse

- Participation à la journée des doctorants de première année façon Ma thèse en 180 secondes en avril 2019.
- Premier prix de la présentation orale à la journée des doctorants de troisième année de l'IC2MP du 12 novembre 2020.
- Rédaction d'un article scientifique vulgarisé dans le magazine Microscop de juin 2020 (Microscop n° 82). http://www.dr8.cnrs.fr/plus_microscop/numeros/MS82.pdf
- Activité contractuelle d'enseignement (DCACE) de 45 heures réparties sur deux semestres en TP de Chimie Organique avec des étudiants de Licence 1 et Licence 2 durant la troisième année de thèse.
- Participation au congrès national du Groupe Français de recherche sur les Pesticides (GFP) sous forme de présentation vidéo avec deux demi-journées d'échanges entre les participants et les organisateurs les 20 et 27 mai 2021. <http://www.gfpesticides.org/congres/579/587-27-mai-2021.html> (Vidéo numéro 7).
- Participation au congrès International Symposium on Green Chemistry sous la forme d'une présentation orale «*Use of salicylic acid bioprecursors to stimulate the natural defenses of plants in a sustainable agriculture environment* » du 16 au 20 mai 2022.
- Rédaction d'un article scientifique soumis le 23/01/2022 puis renvoyé après correction le 24/04/2022 au journal Pest Management Science (IF= 4,85) *Synthesis, phloem mobility and induced plant resistance of synthetic salicylic acid amino acid or glucose conjugates*, Benoit GUICHARD, Hanxiang WU, Sylvain LA CAMERA, Richa HU, Cécile MARIVINGT-MOUNIR, Jean-François CHOLLET.

Encadrement d'étudiants

Première année de thèse : 2018-2019

- **Cécile CHMIELOWSKI**, étudiante en quatrième année de pharmacie à l'Université de Poitiers, stage d'initiation à la recherche (SIR), 1 mois. Sujet : *Synthèse d'un conjugué d'acide salicylique dichloré vectorisé par du glucose.*
- **Grégoire DE VILLÈLE**, étudiant en seconde année d'IUT à Poitiers, stage de 10 semaines. Sujet : *Synthèse de composés destinés à stimuler les défenses naturelles des plantes.*
- **Rodolphe NICOLAS**, étudiant en quatrième année de pharmacie à l'Université de Poitiers, Stage SIR, 1 mois. Sujet : *Synthèse d'un conjugué d'acide salicylique 3,5-dichloré vectorisé par un acide aminé.*
- **Yassine ARBAOUI**, étudiant en Master 1 Chimie Organique pour le Vivant (COV), Stage de 8 semaines. Sujet : *Synthèse de deux conjugués d'acide 5-chlorosalicylique vectorisés par un acide aminé et un sucre.*

Seconde année de thèse : 2019-2020

- **Grégoire DE VILLÈLE**, étudiant en seconde année de Licence de Chimie à l'Université de Bordeaux, stage facultatif de 1 mois. Sujet : *Synthèse de dérivés phytostimulants (SDN) conjugués à un acide aminé.*

Troisième année de thèse : 2020-2021

- **Noémie MARQUES**, étudiante en seconde année de BTS ANABIOTEC à Melle, stage de 1 mois. Sujet : *Synthèse d'une molécule destinée à stimuler les défenses naturelles des plantes.*
- **Charlotte POUSSIER**, étudiante en quatrième année de pharmacie à l'université de Poitiers, stage SIR, 1 mois. Sujet : *Synthèse de prodrogues de l'acide salicylique vectorisées par le glucose ou par l'acide glutamique via un espaceur triazole.*
- **Grégoire DE VILLÈLE**, étudiant en troisième année de Licence de Chimie à l'Université de Bordeaux, Sujet : *Synthèse de dérivés phytostimulants (SDN) conjugués à un acide aminé.*
- **Valentin SÉGUY**, étudiant en quatrième année de pharmacie à l'université de Poitiers, Stage SIR, 1 mois. Sujet : *Vectorisation de substances destinées à stimuler les défenses naturelles des plantes.*
- **Noémie YANG**, étudiante en seconde année de BTS ANABIOTEC à Melle, stage de 1 mois. Sujet : *Synthèse de deux molécules destinées à stimuler les défenses naturelles des plantes.*

Liste des abréviations

1-9

2-AS-Glc : Conjugué acide salicylique-glucose en position 2

2-SO₃-AS : Sulfonate d'acide salicylique

2,4-D : Acide 4-(2,4-dichlorophénoxy)acétique

2,4-DB : Acide 4-(2,4-dichlorophénoxy) butyrique

3,5-diCIAS : Acide 3,5-dichlorosalicylique

4-CIAIA : Acide 4-chloroindole-3-acétique

5-CIAS : Acide 5-chlorosalicylique

A

AB : Acide benzoïque

ABC : ATP Binding Cassette

Ac : Acétyle

ACC : Acide 2-*S*-amino-2-cyclopropyl acétique

ADAB : Acide L-2,4-diaminobutyrique

ADAP : Acide L-2,3-diaminopropionique

AIA : Acide 3-indoleacétique

AIB : Acide 3-indolebutyrique

AIC : Acide isochorismique

AIC-Glu : Conjugué acide isochorimique-acide glutamique

AIP : Acide 3-indolepyruvique

APA : Acide phénylacétique

AS : Acide salicylique

AS-Asp : Conjugué acide salicylique-acide aspartique

AS-Glc : Conjugué acide salicylique-glucose

ANT1 : Aromatic and neutral aminoacid transporter

ATP : Adénosine triphosphate

B

BA2H : Benzoic acid 2-hydroxylase

BHE : Barrière hémato-encéphalique

Bn : Benzyle

B (suite)

BSMT1 : Benzoic/Salicylic acid carboxyl méthyltransférase

BTH : Benzothiadiazole

C

CAV : Cellules associées aux vaisseaux

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMR : Cancérogène, mutagène et reprotoxique

COSY : Correlated Spectroscopy

D

d : Doublet

DAPPD : *N,N'*-diacétyl*para*-phénylènediamine

DCC : *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide

dd : Doublet de doublet

DEPT : Distortionless Enhanced Polarization Transfer

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMAP : 4-*N,N*-diméthylaminopyridine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dt : Doublet de triplet

E

éq : Equivalent

EDCI : Chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

EPS1 : Enhanced Pseudomonas Susceptibility 1

ESI : Electrospray ionisation

G

GLUT1 : Glucose Transporter 1

H

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz : Hertz

I

IAAld : Indole-3-acétaldéhyde
IAM : Indole-3-acétamide
IAN : Indole-3-acétonitrile
IAOx : Indole-3-acétaldoxime
ICS : Isochorismate synthase
INA : Acide 2,6-dichloroisonicotinique
IP : Inhibiteur de protéase

J

JA : Acide jasmonique
JA-Ile : Conjugué acide jasmonique-isoleucine
JA-Trp : Conjugué acide jasmonique-tryptophane

L

LAT : L-type/large neutral amino acid transporter

M

M : Multiplet
MCPA : Acide 2-(4-chloro-2-méthyl)acétique
MCPB : Acide 4-(4-chloro-2-méthyl)butyrique
MeAS : Salicylate de méthyle
MeJA : Jasmonate de méthyle
MES : Acide 2-N-morpholinoéthane-1-sulfonique

P

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase
PBZ : Probenazole
PEG : Polyéthylène glycol
pH : Potentiel hydrogène
ppm : Partie par million
PR : Pathogenesis related

Q

q : Quadruplet
qd : Quadruplet de doublet
QTOF : Quadropole time of flight

R

Rf : Facteur de rétention
RH : Réaction/Réponse d'hypersensibilité
RLA : Résistance locale acquise
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RSA : Résistance systémique acquise
ROS : Reactive oxygen species
RubisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

S

s : Singulet
SAM : S-adénosylméthionine
SDN/SDP : Stimulateur des défenses naturelles des plantes
se : singulet élargi
S_N : Substitution nucléophile
SLC : Solute carrier
SOT : Sulfotransférase

T

t : Triplet
TAA1 : Tryptophan aminotransferase of *Arabidopsis* 1
t.amb : Température ambiante
t-Bu : *Tertio*-butyle
tCA : Acide trans-cinnamique
td : Triplet de doublet
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TMV : Virus de la mosaïque du tabac

U

UV : Ultraviolet

Table des matières

Chapitre 1 : Historique	1
Introduction	3
1- La stimulation des défenses naturelles des plantes	5
1.1- Mise en place des mécanismes de défense des plantes	5
1.1.1- La défense passive	5
1.1.2- La défense active	6
1.2- Reconnaissance de l'agent pathogène	7
1.2.1- Reconnaissance par des éliciteurs généraux	7
1.2.2- Reconnaissance par des éliciteurs spécifiques	7
1.2.3- Mise en place des défenses de la plante.....	7
1.3- Réponses défensives de la plante face à son bioagresseur	8
1.3.1- Épaississement de la paroi.....	8
1.3.2- Les phytoalexines.....	8
1.3.3- Les protéines Pathogenesis Related (PR)	9
1.3.4- Les inhibiteurs de protéases	9
2- Les composés éliciteurs (SDN)	10
2.1- Les éliciteurs abiotiques « chimiques »	10
2.2- Les éliciteurs abiotiques « physiques »	11
2.2.1- La stimulation par exposition aux rayons UV.....	11
2.2.2- La stimulation des plantes par ultrasons	12
2.2.3- La stimulation en conditions de stress environnemental	12
3- Les éliciteurs hormonaux	14
3.1- Les auxines	14
3.1.1- Voie de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique IAA.....	14
3.1.2- Dérivés auxiniques naturels et synthétiques	16
3.2- L'acide jasmonique et les jasmonates	18
3.2.1- Structure et propriétés biologiques de l'acide jasmonique	18
3.2.2- Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique	19

3.2.3-	Formes actives de l'acide jasmonique	20
3.3-	L'hormone gazeuse éthylène	21
3.3.1-	Propriétés biologiques de l'éthylène.....	21
3.3.2-	Voie de biosynthèse de l'éthylène	21
3.4-	L'acide salicylique et ses analogues	22
3.4.1-	Historique de l'acide salicylique	22
3.4.2-	Propriétés physico-chimiques de l'acide salicylique.....	23
3.4.3-	Propriétés biologiques de l'acide salicylique	23
3.4.4-	Voies de biosynthèse de l'acide salicylique	25
3.4.5-	Les formes actives de l'acide salicylique chez les plantes.....	26
3.4.6-	Analogues synthétiques de l'acide salicylique	28
4-	La systémie	30
4.1-	Définition	30
4.2-	Avantages et inconvénients	30
4.3-	Les sèves et voies de transport.....	32
4.3.1-	Circulation des sèves phloémienne et xylémienne	32
4.3.2-	Le phloème.....	33
4.3.3-	Le xylème.....	34
4.4-	Transport et distribution des solutés dans la plante	34
4.4.1-	La membrane plasmique.....	34
4.4.2-	Le transport des composés <i>via</i> des protéines de la membrane plasmique	35
4.4.3-	Distribution systémique des solutés.....	37
4.5-	Les mécanismes de transport des xénobiontes.....	39
4.5.1-	Le mécanisme par piégeage d'acide	39
4.5.2-	Importance des transporteurs membranaires	40
4.6-	Utilisation de transporteurs d'acides aminés et de sucres des plantes.....	42
4.7-	Prédiction des propriétés systémiques des xénobiontes	42
5-	La stratégie de prodrogues vectorisées	44
5.1-	Concept et définition du concept de prodrogue	44
5.2-	La stratégie de prodrogue.....	45
5.3-	Le transport de substances actives par des transporteurs membranaires.....	46

5.3.1-	Les transporteurs d'acides aminés de série L.....	46
5.3.2-	Les transporteurs de glucose.....	50
Objectifs de la thèse.....		55
Chapitre 2 : Synthèse de bioprécurseurs associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à des acides aminés ou à un sucre		57
1-	Structures des bioprécurseurs d'acide salicylique	59
1.1-	La substance active.....	59
1.2-	Les nutriments acides aminés et sucres	60
1.2.1-	Les nutriments acides aminés	60
1.2.2-	Le nutriment glucose.....	61
1.3-	L'utilisation stratégique des espaceurs	62
2-	Synthèse de conjugués associant l'AS et ses analogues à des acides aminés ...	63
2.1-	Synthèse de conjugués associant l'AS (ou analogues) à de l'acide L-glutamique... 63	
2.1.1-	Synthèse de conjugués associés par un espaceur 1,2,3-triazole	63
2.1.1.1-	<i>Formation de la 2-azidoéthylamine 1 par substitution nucléophile</i>	65
2.1.1.2-	<i>Condensation peptidique de la 2-azidoéthylamine 1 avec un dérivé commercial d'acide L-glutamique.....</i>	65
2.1.1.3-	<i>Réactions d'acétylation des analogues halogénés de l'AS.....</i>	66
2.1.1.4-	<i>Réactions de condensation entre les dérivés acétylés et la propargylamine</i>	67
2.1.1.5-	<i>Couplage entre les dérivés propargyliques 4a-c et l'azoture d'acide L-glutamique 2 par réaction de click chemistry.....</i>	70
2.1.1.6-	<i>Déprotection des fonctions α-aminoacide des composés 5a-c.....</i>	73
2.1.1.7-	<i>Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués 6a-c.....</i>	74
2.1.2-	Synthèse de conjugués présentant un espaceur éthylène glycol	75
2.1.2.1-	<i>Estérifications de Steglich entre les dérivés 3a-c et le 2-bromoéthanol.....</i>	76
2.1.2.2-	<i>Réactions d'estérification de l'acide L-glutamique en milieu basique.....</i>	79
2.1.2.3-	<i>Réactions de déprotection des fonctions α-aminoacides en milieu acide.....</i>	80
2.1.2.4-	<i>Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués 9a-c.....</i>	81
2.1.3-	Synthèse d'un conjugué AS-acide L-glutamique sans espaceur	81
2.1.3.1-	<i>Réactions de protection de la fonction acide carboxylique de l'AS.....</i>	82
2.1.3.2-	<i>Estérification des composés 10a-b et des acides glutamiques commerciaux</i>	84
2.1.3.3-	<i>Réactions de déprotection des composés 11a et 11b</i>	85

2.1.3.4-	<i>Bilan des réactions de la voie de synthèse du conjugué 12</i>	86
2.1.4-	Bilan des synthèses de conjugués associant l'AS à de l'acide L-glutamique	87
2.2-	Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane	87
2.2.1-	Synthèse d'un conjugué présentant un espaceur 1,2,3-triazole	87
2.2.1.1-	<i>Réaction de protection de la fonction amine du L-tryptophane commercial</i>	89
2.2.1.2-	<i>Réaction de saponification de l'ester méthylique du composé 13</i>	89
2.2.1.3-	<i>Réaction de benzoylation de l'acide carboxylique 14</i>	90
2.2.1.4-	<i>Réaction de N-alkylation du noyau indolique du composé 15</i>	91
2.2.1.5-	<i>Synthèse de l'azoture d'AS 17 par substitution nucléophile S_N2</i>	91
2.2.1.6-	<i>Couplage des composés 16 et 17 par click-chemistry</i>	92
2.2.1.7-	<i>Déprotection de la fonction α-aminoacide du composé 18</i>	93
2.2.1.8-	<i>Bilan des réactions de la voie de synthèse du conjugué 20</i>	94
2.2.2-	Synthèse de deux conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 et 1,5-dicarbonylés.	94
2.2.2.1-	<i>Réactions d'ouverture des anhydrides succinique (n = 1) et glutarique (n = 2)</i>	95
2.2.2.2-	<i>Réactions d'estérification de Steglich entre les composés 21a-b et 10b</i>	96
2.2.2.3-	<i>Déprotection de la fonction α-aminoacide des composés 22a et 22b</i>	98
2.2.2.4-	<i>Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués 24a et 24b</i>	99
2.2.3-	Bilan des synthèses de conjugués associant l'AS au L-tryptophane	99
2.3-	Synthèse de conjugués associant l'AS à des aminoacides sans espaceur	100
2.3.1-	Synthèse de conjugués associant l'AS à des acides diaminocarboxyliques	100
2.3.1.1-	<i>Réactions de condensations peptidiques entre l'aspirine et les acides aminés commerciaux</i>	101
2.3.1.2-	<i>Réactions de déprotection des fonctions amines des composés 25a-c</i>	104
2.3.1.3-	<i>Bilan de synthèse des conjugués 26a-c</i>	105
2.3.2-	Synthèse d'un conjugué associant l'AS à un hydroxy α-aminoacide	105
2.3.2.1-	<i>Protection de la fonction phénol du salicylate de méthyle</i>	106
2.3.2.2-	<i>Saponification de l'ester méthylique du composé 27</i>	107
2.3.2.3-	<i>Protection de la fonction amine de la L-sérine</i>	108
2.3.2.4-	<i>Protection de la fonction acide carboxylique du composé 29</i>	109
2.3.2.5-	<i>Réaction d'estérification de Steglich entre les composés 28 et 30</i>	111
2.3.2.6-	<i>Déprotection des groupements benzyle par hydrogénolyse catalytique</i>	111
2.3.2.7-	<i>Bilan global de la synthèse du conjugué 32</i>	112
2.3.3-	Bilan des synthèses de conjugués d'AS sans espaceur	113

3- Synthèse de conjugués associant l'AS (ou analogues) à un sucre	113
3.1- Synthèse de conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à du glucose par un espaceur triazolique.....	113
3.1.1- Synthèse de l'azoture de glucose 33 par substitution nucléophile S _N 2.....	115
3.1.2- Couplage entre les dérivés propargyliques 4a-c et l'azoture de glucose 33 par click chemistry.....	115
3.1.3- Déprotection des fonctions alcools du glucose en milieu basique	116
3.2- Bilan de la synthèse des conjugués 35a-c	117
4- Perspectives : synthèse d'un conjugué associant l'acide salicylique à de la L-sérine par un espaceur triazole	117
 Chapitre 3 : Études de l'activité biologique potentielle de six bioprécurseurs associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à un acide aminé ou un sucre	
121	
1- Introduction	123
2- Matériel et méthodes	124
2.1- Produits chimiques	124
2.2- Synthèse des bioprécurseurs d'acide salicylique	124
2.3- Matériel végétal et souche fongique	125
2.3.1- Test de mobilité phloémienne (systémie)	125
2.3.2- Activité sur la réponse de défense des plantes.....	125
2.4- Collecte et analyse de la sève phloémienne	125
2.5- Évaluation de l'activité sur la réponse de défense des plantes.....	125
2.6- Propriétés physicochimiques des molécules testées.....	127
2.7- Analyses statistiques	127
3- Résumé des résultats obtenus.....	128
3.1- Étude de la systémie phloémienne	128
3.2- Étude <i>in vitro</i> de l'activité fongicide.....	128
3.3- Évaluation <i>in vivo</i> de l'activité protectrice sur l'helminthosporiose du maïs.....	128
3.4- Évaluation <i>in vivo</i> de l'activité protectrice à distance sur la fusariose du maïs.....	129
3.5- Étude de l'induction de l'expression de gènes liés à la défense du maïs	129
Conclusions et perspectives	159
Conclusions	161

1- Synthèse des bioprécurseurs d'acide salicylique	161
2- Bilan des études biologiques.....	161
Chapitre 4 : Partie expérimentale	167
1- Matériels et méthodes	169
1.1- Suivi des réactions et purifications	169
1.2- Analyse des composés organiques :	169
1.2.1- Analyses RMN.....	169
1.2.2- Analyses physico-chimiques	170
2- Synthèse des conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés associés à des acides aminés de série L	170
2.1- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à de l'acide L-glutamique	170
2.1.1- Synthèse de conjugués présentant un espaceur 1,2,3-triazole.....	170
2.1.2- Synthèse de conjugués possédant un espaceur éthylène glycol.....	181
2.1.3- Synthèse d'un conjugué associant l'AS à l'acide L-glutamique sans espaceur.....	190
2.2- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane.....	194
2.2.1- Synthèse d'un conjugué présentant un espaceur triazolique.....	194
2.2.2- Synthèse de deux conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 et 1,5-dicarbonylés	202
2.3- Synthèse de conjugués associant l'AS à des acides aminés sans espaceur.....	207
2.3.1- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique à des acides diamino-carboxyliques.....	207
2.3.2- Synthèse d'un conjugué associant l'acide salicylique à un hydroxyaminoacide...	214
3- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique et ses analogues chlorés à du β-D-glucose par un espaceur triazole	220
4- Perspectives : Synthèse d'un conjugué associant l'AS à de la L-sérine par un espaceur triazolique.....	227
Références bibliographiques.....	233

Liste des Figures

Figure 1. Illustration de l'induction des gènes de défense des plantes, d'après Benhamou <i>et al</i> ³⁵	6
Figure 2. Structures de l'acide 3-indole acétique (AIA) et de ses analogues : l'acide 3-indole butyrique (AIB), l'acide 3-(4-chloroindole) acétique (4-Cl-AIA) et l'acide phénylacétique (APA).	17
Figure 3. Structures de quelques auxines synthétiques (2,4-D, MCPB, Clopyralid et Picloram).	17
Figure 4. Structures de l'acide jasmonique JA et de son ester, le jasmonate de méthyle MeJA.	18
Figure 5. Structures des formes actives de l'acide jasmonique présentes chez les plantes.	20
Figure 6. Structures de l'acide salicylique (AS) et de l'aspirine.	23
Figure 7. Structures des analogues synthétiques de l'acide salicylique (INA, BTH et PBZ).	28
Figure 8. Les différents types de systémie chez la plante.	31
Figure 9. Schéma simplifié de la circulation des sèves phloémienne et xylémienne chez le végétal (d'après Jensen <i>et al</i> ²⁷⁵).	32
Figure 10. Reconstitution des tubes criblés (TC) et cellules compagnes (CC) dans <i>Vicia Faba</i> (selon Knoblauch <i>et al</i> ²⁷⁸). Les plasmodesmes branchus (PB) permettent de connecter les cellules compagnes (CC) et les tubes criblés (TC). Les mitochondries (M), les plastes du TC (PI) et le réticulum endoplasmique (RE) sont distribués le long de la membrane plasmique où sont agrégées des protéines pariétales (PP). C : callose, CP : Corps protéique, Cr : cribles, N : noyau, Par : paroi, P : plastes, V : vacuole.	33
Figure 11. Représentation de la membrane plasmique (d'après Taiz et Zeiger ²⁸³).	35
Figure 12. Représentations des diffusions simple et facilitée (transport passif dépendant du gradient de concentration) et du transport actif primaire de solutés à travers la membrane plasmique (d'après Taiz et Zeiger ²⁸³).	36
Figure 13. Représentation des deux types de transports secondaires (d'après Taiz et Zeiger ²⁸³).	37
Figure 14. Représentation des voies apoplastique et symplastique (modifiée de Taiz et Zeiger ²⁸³).	38
Figure 15. Représentation du mécanisme par piégeage d'acide dans le symplasma (adaptée de Bromilow et Chamberlain ²⁸⁵).	39
Figure 16. Aperçu des divers transporteurs des membranes plasmique et vacuolaire des cellules végétales (d'après Taiz et Zeiger ²⁸³).	41
Figure 17. Modèles de Bromilow (1) et de Kleier (2) pour la prédiction de la systémie d'acides faibles et de composés non ionisés (d'après Rocher <i>et al</i> ²²¹).	43
Figure 18. Structures de prodrogues d'acides aminés. 1, L-dihydroxyphénylalanine L-DOPA ³³⁸ . 2, Conjugué Kétoprofène-L-tyrosine ³³⁹ . 3, Conjugué Kétoprofène-L-lysine ³⁴⁰ . 4, Melphalan ³⁴¹	47
Figure 19. Structures de différents conjugués pesticide-acides aminés. 1, Conjugués 2,4-D-lysine (1a) et alcool triazolique-acide aspartique ³⁴⁵ (1b). 2, Conjugués dérivés auxiniques-lysine ³⁴⁶ . 3, Conjugué	

fempiconil acide glutamique) ³⁴⁷ . 4 , Conjugués Fempiconil-aminoacide avec un espaceur triazolique ³⁴⁸ (4a , n= 1, Prodrogue fempiconil-acide diaminobutyrique; n= 3, Prodrogue Fempiconil-lysine) ou sans espaceur (4b , conjugué fempiconil-L-lysine). 5 , Conjugué Fipronil-glycine ³⁴⁹ . 6 , Conjugué fipronil-acide glutamique. 7 , Conjugués Tralopyril-acide glutamique avec un espaceur triazolique ³⁵⁰ (n= 2-10).	48
Figure 20. Structures de conjugués de D-glucose reconnus par le transporteur GLUT1 de la barrière hémato-encéphalique. 1 , Conjugués de la dopamine ³⁵⁸ aux positions 1 (a), 3 (b) et 6 (c). 2 , Conjugué de la DAPPD ³⁵⁹ . 3 , Conjugués du Naproxène ³⁶⁰ . 4 , Conjugués de Kétoprofène (4a) et d'Indométacine ³⁶¹ (4b).	51
Figure 21. Structures de xénobiontes associés à des composés glycosylés. 1 , Conjugués fipronil-glucose ³⁶² . 2 , Conjugué fipronil-glucose avec une sonde fluorescente ³⁶⁵ . 3 , Conjugués tralopyril-glucose (R= CH ₂ OH), acide glucuronique (R= CO ₂ H) et glucuronate de méthyle (R= CO ₂ CH ₃) avec (3a) et sans (3b) chaîne méthoxyméthyl ³⁶⁷ . 4 , Conjugué fempiconil-glucose ^{347,368} . 5 , Conjugués fipronil-monosaccharide ³⁶⁶ . 6 , Conjugués acide benzoïque-glucose (6a) et galactose ³⁶⁹ (6b). 7 , Conjugués d'acide benzoïque et analogues associés à de la glucosamine ³⁷⁰	53
Figure 23. Structure de l'acide salicylique et de ses analogues 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques...	59
Figure 24. Structure type des aminoacides de série L employés pour les synthèses des conjugués. ...	60
Figure 25. Structures des acides aminés employés pour les synthèses de prodrogues.	61
Figure 26. Structure du dérivé commercial de glucose employé pour les synthèses de conjugués glycosylés.	61
Figure 27. Structures des quatre espaceurs sélectionnés pour les synthèses de conjugués.	62
Figure 28. Structure des conjugués acide salicylique-acide L-glutamique avec un espaceur triazolique. 6a , conjugué d'acide salicylique (X= Y= H). 6b , conjugué d'acide 5-chlorosalicylique (X= Cl, Y= H). 6c , conjugué d'acide 3,5-dichlorosalicylique (X= Y= Cl).	63
Figure 29. Structure des conjugués associant l'acide salicylique (et analogues) à l'acide L-glutamique par un espaceur éthylène glycol. 9a , Conjugué d'acide salicylique (X= Y= H). 9b , Conjugué d'acide 5-chlorosalicylique (X= Cl, Y= H). 9c , Conjugué d'acide 3,5-dichlorosalicylique (X= Y= Cl).	75
Figure 30. Structure du conjugué acide salicylique-acide L-glutamique 12 sans espaceur.	81
Figure 31. Structures des conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à l'acide L-glutamique par des espaceurs 1,2,3-triazole (6a-c) et éthylène glycol (9a-c).	87
Figure 32. Structure du conjugué 20 associant l'AS au L-tryptophane par un espaceur triazole.	87
Figure 33. Structure des conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 (n = 1) et 1,5 (n = 2) dicarbonylés.	94
Figure 34. Structure des bioprécurseurs partiellement déprotégés 23a-b	98

Figure 35. Structures des conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane par différents espaceurs.	99
Figure 36. Structure des conjugués associant l'acide salicylique à des acides aminés présentant une fonction amine sur leur chaîne latérale. 26a , Conjugué AS-acide L-2,3-diaminopropionique. 26b , Conjugué AS-acide L-2,4-diaminobutyrique. 26c , Conjugué AS-L-lysine.	100
Figure 37. Structure du conjugué 32 associant l'acide salicylique à la L-sérine.	105
Figure 38. Structure proposée pour le composé 30a	110
Figure 39. Structures des conjugués associant l'AS à des acides aminés sans espaceur.	113
Figure 40. Structure des conjugués associant l'AS (et analogues) à du D-glucose par un espaceur triazolique. 35a , Conjugué acide salicylique- β -D-glucose. 35b , Conjugué acide 5-chlorosalicylique- β -D-glucose. 35c , Conjugué acide 3,5-dichlorosalicylique- β -D-glucose.	113
Figure 41. Structure du conjugué 42 associant l'acide salicylique à la L-sérine par un espaceur triazolique.	118
Figure 42. Structure du conjugué associant l'AS à la L-tyrosine sans espaceur.	119

Liste des Schémas

Schéma 1. Principales voies de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique dépendantes de l'acide aminé tryptophane (version simplifiée de Korasick <i>et al</i> ⁹⁴).....	15
Schéma 2. Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique JA, d'après Mueller ¹⁴⁰	19
Schéma 3. Voie de biosynthèse de l'éthylène à partir de la L-méthionine, d'après Xu <i>et al</i> ¹⁶⁵	21
Schéma 4. Voies de biosynthèse de l'acide salicylique (d'après Lefevre <i>et al</i> ²²²).....	25
Schéma 5. Principales formes actives de l'acide salicylique présentes dans les plantes (d'après Dempsey <i>et al</i> ²³³).....	27
Schéma 6. Représentation du concept de prodrogue (adapté d'après Rautio <i>et al</i> ³²¹).....	45
Schéma 7. Voie de synthèse des conjugués acide salicylique-acide L-glutamique 6a-c avec un espaceur 1,2,3-triazole.....	64
Schéma 8. Conditions opératoires de la réaction de substitution nucléophile par de l'azoture de sodium.	65
Schéma 9. Conditions opératoires de la réaction de condensation entre l'azidoéthylamine 1 et l'acide 5- <i>tert</i> -butoxy-4 <i>S</i> -[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (adaptées de Wu <i>et al</i> ³⁴⁷).	66
Schéma 10. Conditions opératoires de la réaction d'acétylation des analogues halogénés de l'acide salicylique (adaptées de Mojtahedi et Samadian ³⁷⁸).....	66
Schéma 11. Condition opératoire de la réaction de condensation peptidique entre les dérivés acétylés d'acide salicylique et la propargylamine.....	67
Schéma 12. Mécanisme réactionnel proposé de la condensation peptidique entre les dérivés 4a-c et la propargylamine.....	68
Schéma 13. Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des composés 4a-c et la propargylacétamide J	69
Schéma 14. Conditions opératoires des réactions de click chemistry entre les dérivés propargyliques 4a-c et l'azoture d'acide L-glutamique 2	70
Schéma 15. Mécanisme réactionnel de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par un sel de cuivre d'après Rostovstev <i>et al</i> ³⁸²	71
Schéma 16. Mécanisme réactionnel de la cycloaddition [3+2] de Huisgen d'après Worrell <i>et al</i> ³⁸³ . ..	72
Schéma 17. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions α -aminoacides en milieu acide.	73
Schéma 18. Voie de synthèse des conjugués 9a-c associant l'acide salicylique (et analogues chlorés) à l'acide L-glutamique par un espaceur éthylène glycol.	75

Schéma 19. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de Steglich entre les dérivés acétylés d'AS et le 2-bromoéthanol (Adaptées de Steglich et Neises ³⁸⁶).	76
Schéma 20. Conditions opératoires des réactions d'estérification avec un acide de Brønsted (H ₂ SO ₄) ³⁹⁰ ou un acide de Lewis (BF ₃ .Et ₂ O) ³⁹¹	78
Schéma 21. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de l'acide L-glutamique commercial par les composés 7a-c en milieu basique (Adaptées de White ³⁹²).	79
Schéma 22. Conditions opératoires des réactions de déprotection de la fonction α-aminoacide des composés 8a , 8b' et 8c' en milieu acide.	80
Schéma 23. Voie de synthèse du conjugué 12	82
Schéma 24. Conditions opératoires des réactions de protection de l'acide salicylique sous forme d'esters de <i>tert</i> -butyle ^{393,394} (10a) et de benzyle ^{395,396} (10b).	83
Schéma 25. Conditions opératoires des réactions d'estérification de Steglich entre les dérivés protégés (10a et 10b) et les acides 5- <i>tert</i> -butoxy-4 <i>S</i> -[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque et 5-benzyloxy-4 <i>S</i> -[(<i>tert</i> -benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque.	84
Schéma 26. Conditions opératoires des réactions de déprotection des composés 11a et 11b	85
Schéma 27. Voie de synthèse simplifiée du conjugué AS associé au L-tryptophane par un espaceur 1,2,3-triazole 20	88
Schéma 28. Conditions opératoires de la réaction de protection de la fonction amine du tryptophane commercial.	89
Schéma 29. Conditions opératoires de la réaction de saponification de l'ester méthylique du tryptophane protégé 13 (adaptées de Roush <i>et al</i> ⁴⁰¹).	90
Schéma 30. Conditions opératoires de la réaction de benzylation de l'acide carboxylique 14 (adaptées de Yu <i>et al</i> ^{402,403}).	90
Schéma 31. Conditions opératoires de la réaction de <i>N</i> -alkylation du noyau indolique du L-tryptophane protégé 15 (adaptées de Henrottin ⁴⁰⁴ , Schultz ⁴⁰⁵ et Junk ⁴⁰⁶).	91
Schéma 32. Conditions opératoires de préparation de l'azoture d'acide salicylique 17 (adaptées de Ghaly <i>et al</i> ⁴⁰⁷).	91
Schéma 33. Synthèse du conjugué protégé 18 par réaction de cycloaddition ³⁸⁰ [3+2] entre le dérivé propargylique 16 et l'azoture d'AS 17 (adaptées de Suryapeta <i>et al</i> ⁴⁰⁸).	92
Schéma 34. Conditions opératoires de déprotection de la fonction α-aminoacide du composé 18	93
Schéma 35. Voie de synthèse des conjugués 24a (n = 1) et 24b (n = 2).	95
Schéma 36. Conditions opératoires des réactions d'ouverture des anhydrides succinique (n = 1) et glutarique (n = 2) par le dérivé 15 (adaptées de Dai ⁴⁰⁹ , Saget ⁴¹⁰ et Zhong ⁴¹¹).	96
Schéma 37. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de Steglich des composés 21a (n = 1) et 21b (n = 2) avec le composé 10b (R = CH ₂ Ph).	97

Schéma 38. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions acides carboxyliques et amine des composés 22a et 22b .	98
Schéma 39. Voie de synthèse des conjugués 26a-c (adaptée de Rentzea ⁴¹² et Wang ⁴¹³).	100
Schéma 40. Conditions opératoires des réactions de condensation entre l'aspirine et les acides aminés commerciaux.	101
Schéma 41. Mécanisme réactionnel de la condensation peptidique entre le chlorure d'acide [25] et les acides aminés commerciaux.	102
Schéma 42. Conditions opératoires de déprotection des fonctions amines des composés 25a-c .	104
Schéma 43. Voie de synthèse proposée pour la préparation du conjugué 32 .	106
Schéma 44. Conditions opératoires de la réaction de benzylation de la fonction phénol du salicylate de méthyle (adaptées de DeBerardinis ⁴¹⁶ , Kikkeri ⁴¹⁷ et Shen ⁴¹⁸).	107
Schéma 45. Conditions opératoires de la réaction de saponification du produit d'alkylation 27 (adaptées de Shanzer ⁴¹⁹ et Bremner ⁴²⁰).	107
Schéma 46. Conditions opératoires de la réaction de protection de la fonction amine de la L-sérine sous forme de carbamate de benzyle (adaptées d'Anžiček ⁴²¹ et Yamamoto ⁴²²).	108
Schéma 47. Conditions opératoires de la benzylation de fonction acide carboxylique du composé 29 en milieu basique (adaptées d'Anžiček <i>et al</i> ⁴²¹).	109
Schéma 48. Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des composés 30 et 30a .	110
Schéma 49. Conditions opératoires de l'estérification de Steglich entre les composés 28 et 30 .	111
Schéma 50. Conditions opératoires de la réaction d'hydrogénolyse des fonctions α -aminoacide et phénol du composé 31 .	112
Schéma 51. Voie de synthèse proposée pour les conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à du β -D-glucose par un espaceur triazolique.	114
Schéma 52. Conditions opératoires pour la synthèse de l'azoture de glucose peracétylé 33 (adaptées de Silva ⁴³⁰ , Jarrahpour ⁴³¹ et Ibatullin ⁴³²).	115
Schéma 53. Conditions opératoires des réactions de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre les dérivés d'AS propargyliques 4a-c et l'azoture de glucose 33 .	115
Schéma 54. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions alcools du glucose par méthanolyse (adaptées de Goyard <i>et al</i> ⁴³⁷ , Shukla <i>et al</i> ³⁶⁹ et Yu <i>et al</i> ⁴³⁸).	116
Schéma 55. Voie de synthèse du conjugué 42 .	118

Liste des Tableaux

Tableau 1. Résultats expérimentaux des condensations peptidiques entre les dérivés acétylés d'AS et la propargylamine.....	68
Tableau 2. Résultats expérimentaux des réactions de cycloadditions [3+2] sur les dérivés propargyliques 4a-c	73
Tableau 3. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés 5a-c	74
Tableau 4. Résultats expérimentaux des réactions d'estérifications de Steglich sur les dérivés acétylés de l'AS et de ses analoges.....	77
Tableau 5. Résultats expérimentaux des estérifications de Fischer de l'AS.....	78
Tableau 6. Résultats expérimentaux des réactions d'estérification de l'acide L-glutamique.....	79
Tableau 7. Résultats expérimentaux des réactions de déprotections des fonctions aminoacides.....	80
Tableau 8. Résultats expérimentaux des réactions de protections sélectives de l'AS.....	83
Tableau 9. Résultats expérimentaux des réactions d'estérification de Steglich.....	84
Tableau 10. Résultats expérimentaux des ouvertures d'anhydrides par le composé 15	96
Tableau 11. Résultats expérimentaux des réactions d'estérifications de Steglich entre le composé 10a et les dérivés 21a et 21b	97
Tableau 12. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés 22a et 22b	98
Tableau 13. Résultats expérimentaux des réactions de condensations peptidiques avec le chlorure d'acide de l'aspirine [25].....	103
Tableau 14. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés 25a-c en milieu acide.....	104
Tableau 15. Résultats expérimentaux des réactions de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre l'azoture de glucose 33 et les dérivés propargyliques 4a-c	116
Tableau 16. Résultats expérimentaux des réactions de méthanolyse des composés 34a-c	117
Tableau 17. Attribution des numéros des bioprécurseurs dans l'article scientifique.....	123

Chapitre 1 : Historique

Introduction

L'agriculture a su se développer et se moderniser grâce aux avancées scientifiques et technologiques réalisées depuis les années 1950. Ce développement permettait de répondre aux besoins alimentaires de la population dans le contexte d'après-guerre où la demande en nourriture était très forte au niveau mondial. Cependant, la question alimentaire mondiale est toujours présente principalement dans les pays en développement où la population s'accroît fortement, mais elle redevient aussi un enjeu majeur dans les pays développés comme la France où la gestion de la pandémie de COVID-19 a eu pour conséquence un nombre croissant de personnes qui ne peut plus s'alimenter correctement. Une enquête Ipsos récente, réalisée pour le Secours Populaire¹ a révélé que 27% des Français n'ont pas les moyens de se nourrir convenablement. Cette valeur s'élève même à 42% en ajoutant les personnes se privant afin que leurs enfants soient convenablement nourris.

Un récent rapport des Nations Unies estime que la population mondiale devrait augmenter de 2 milliards d'individus d'ici 30 ans pour atteindre 9,7 milliards d'ici 2050². Ceci suggère que les besoins alimentaires mondiaux pourraient doubler d'ici 2050³ afin de nourrir convenablement une population en croissance constante. Une seconde étude estime que cette densité de population sera atteinte en 2064^{4,5}. Cette valeur semblerait être un maximum et serait suivie d'une diminution de la population mondiale due à un contrôle du taux de natalité, contrairement aux projections des Nations Unies qui prévoient une croissance continue de la population pour atteindre près de 11 milliards d'individus d'ici 2100². Quelles que soient les prédictions réalisées sur le long terme, la première conséquence de cette croissance démographique sera d'anticiper les besoins alimentaires qui vont fortement croître durant les 30 prochaines années.

Par ailleurs, l'agriculture est également confrontée à des pressions constantes qui sont dues à la détérioration de l'environnement, aux changements climatiques^{6,7}, à la perte de biodiversité et aux ravageurs des cultures. Ces problèmes phytosanitaires, et notamment la propagation des ravageurs de cultures, sont l'une des causes majeures de perte des récoltes. Ces ravageurs de cultures comprennent à l'échelle mondiale plus de 10 000 espèces d'insectes, 30 000 espèces d'adventices (« mauvaises herbes ») et 100 000 maladies causées par des bactéries, des champignons, des virus ou d'autres microorganismes. Une étude réalisée par Bebbler *et al*⁸ comparant la distribution des ravageurs et pathogènes en 2014 et en 1901 semble prévoir une saturation des productions agricoles par ces ravageurs dans les prochaines décennies. Il est donc nécessaire d'avoir un contrôle de ces agents ravageurs et pathogènes, ce qui est essentiel pour la sécurité alimentaire mondiale.

Cette nécessité d'accroître les productions agricoles en un laps de temps parfois très court n'est pas un phénomène nouveau. En effet, avec le développement de la chimie organique et l'apparition de produits phytopharmaceutiques après la Seconde Guerre Mondiale⁹, les rendements des cultures agricoles ont pu fortement augmenter pour atteindre des valeurs jusqu'alors impossibles techniquement.

Cependant, après quelques décennies, des effets indésirables liés à l'utilisation de ces produits phytosanitaires sont devenus apparents sur l'environnement et la santé^{10,11}. De plus, grâce au développement de méthodes analytiques de plus en plus précises et sophistiquées, il est désormais possible de détecter ces composés et/ou leurs métabolites en très faible quantité en abaissant la limite de détection de ces appareils^{12,13}. Tout cela a eu pour conséquence directe une méfiance grandissante quant à l'utilisation de ces produits phytopharmaceutiques, principalement dans les pays développés. S'en est suivie une évolution stricte de la réglementation dans de nombreux pays et le retrait de nombreuses substances actives du marché, rendant de plus en plus difficile l'enregistrement de nouveaux principes actifs pour les entreprises agrochimiques¹⁴.

Avec cette inquiétude grandissante de la population, une tendance claire visant à réduire l'utilisation des pesticides dans le monde entier se met en place. Le Parlement Européen, *via* la directive 2009/128/CE, a établi un cadre pour parvenir à utiliser ces produits phytosanitaires de façon durable et permettre de réduire les risques de leur impact sur l'environnement et la santé humaine, tout en promouvant des alternatives moins dangereuses telles que la lutte intégrée, la gestion à faible consommation des pesticides et les alternatives non chimiques¹⁵. La France qui est le septième pays en termes d'utilisation de pesticides au niveau mondial et le premier pays européen avec plus de 70 000 tonnes par an¹⁶ a mis en œuvre un plan d'action nommé « Écophyto » en 2008 (Écophyto II+ depuis 2018) qui a pour objectif de réduire de moitié l'utilisation des pesticides à l'échelle nationale d'ici 2025.

Cette situation peut sembler contradictoire avec d'une part, des besoins alimentaires en forte augmentation tout en maintenant la qualité des productions agricoles et d'autre part, des attentes sociétales très élevées vis-à-vis des cultures en n'utilisant que peu ou pas d'agrochimie¹⁷. Il s'avère donc impératif d'innover en prenant en compte toutes les options disponibles telles que des principes actifs plus sûrs, ne présentant aucun ou peu de danger pour l'environnement et la santé¹⁵, ceci pouvant nécessiter l'emploi de technologies diverses et complémentaires^{18,19}. Il est donc nécessaire d'imaginer des solutions alternatives en tenant compte de ces deux impératifs.

Les progrès très rapides dans les domaines de la puissance informatique et de l'automatisation ont notamment permis de différencier les plantes cultivées des adventices afin d'éliminer celles-ci de façon sélective par des traitements chimiques localisés ou par des moyens mécaniques²⁰. Une solution consisterait à lutter contre les insectes ravageurs grâce aux connaissances et à l'utilisation de germes entomopathogènes tels que des virus, des bactéries ou des champignons spécifiques aux insectes²¹. Cette solution permettrait de proposer des substances provenant d'organismes vivants (plantes, nématodes, virus, bactéries, champignons...) comme pesticides naturels (biopesticides). Ces molécules d'origine naturelle présenteraient également l'avantage de cibler de façon plus spécifique que les pesticides chimiques²²⁻²⁴ les espèces nuisibles. Les traitements contre les maladies fongiques (champignons) ont engendré une forte augmentation de l'utilisation de sels de cuivre²⁵ qui peuvent poser

à long terme des problèmes de pollution des sols. Une voie indirecte, mais également prometteuse, qui pourrait être employée est l'utilisation de la stimulation des défenses naturelles des plantes^{26,27}. C'est cet aspect qui a retenu notre attention au cours de ce travail.

1- La stimulation des défenses naturelles des plantes

Les plantes possèdent divers mécanismes de défense qui sont activés lorsque certaines molécules émises par les bioagresseurs (virus, bactéries, champignons...) sont détectées par la plante. Pour vulgariser cette notion, la stimulation des défenses naturelles des plantes peut s'apparenter à une vaccination et va consister à activer le système de défense des plantes de façon que celles-ci soient capables de répondre à une éventuelle agression à venir. Cependant, cette « vaccination » des plantes n'a qu'une action à court terme. Les molécules impliquées dans ces mécanismes de défense sont appelées des « éliciteurs » (provenant du verbe anglais *to elicit* : provoquer) ou « stimulateurs des défenses naturelles des plantes » (SDN ou SDP). Ces molécules sont reconnues par les plantes comme premier signal lors d'une agression ou comme signal d'alerte dans une cascade de signalisation.

1.1- Mise en place des mécanismes de défense des plantes

Dans leur milieu naturel, les plantes sont confrontées à un stress constant pouvant être causé par l'agression d'un agent pathogène, par exemple un virus ou un champignon, on parlera alors de stress biotique (stress provenant d'un organisme vivant sur un autre organisme vivant)²⁸. Mais les plantes sont également soumises à d'autres stress provenant de paramètres qui ne peuvent être contrôlés tels que les conditions climatiques et environnementales, il s'agira alors d'un stress dit abiotique²⁹. Ce dernier peut être causé par un excès ou un manque d'eau, la salinité du sol³⁰, la présence de nutriments dans le sol, un manque d'oxygène, mais également la température (froid, chaleur)^{31,32}. Les plantes sont donc soumises à un stress permanent pouvant avoir des origines diverses. Ces stress, qu'ils soient abiotiques ou biotiques, sont la principale cause de perte de cultures agricoles^{31,33}. Afin de pouvoir se défendre face à ces agressions, les plantes possèdent et/ou développent des stratégies/mécanismes de défense. Ces mécanismes de défense vont être répartis en deux catégories.

1.1.1- La défense passive

Les plantes ont su mettre en place des barrières de protection « physiques » contre les bioagresseurs telles que la cuticule (couche protectrice) recouvrant les organes aériens des plantes, des épines (présentes sur les rosiers, acacias...) ou la paroi pectocellulosique (matrice extracellulaire) protégeant toutes les cellules végétales des plantes. Ces protections mécaniques vont apporter à la plante une première défense face à ces bioagresseurs. Si ces bioagresseurs parviennent à franchir ces barrières, ils seront confrontés aux mécanismes de défense active de la plante.

1.1.2- La défense active

Une fois que l'agent pathogène a réussi à franchir les barrières de la défense passive telles que la cuticule, il se retrouve dans le système vasculaire de la plante. Une fois dans la plante, de nouveaux mécanismes de défense se mettent en place dès que l'agent pathogène est détecté. Ils vont alors permettre de confiner l'agent pathogène dans les cellules de la zone infectée de la plante, allant même parfois jusqu'à sacrifier les cellules environnantes pour empêcher la multiplication et la propagation de l'agent infectieux, assurant ainsi la survie du végétal. Ces mécanismes de défense active vont débiter avec une réponse dite d'hypersensibilité (RH). Cette réaction va entraîner la mort des cellules végétales au niveau de la zone infectée qui, avant de se détruire, vont transmettre des signaux d'alerte aux cellules voisines afin que celles-ci développent une résistance à l'agent infectieux au niveau local (zone de l'infection). On parlera alors de Résistance Locale Acquisée (RLA)³⁴. Cette résistance locale va ainsi empêcher ou limiter la propagation et la multiplication du pathogène dans la plante. Cette résistance peut ensuite se propager dans l'ensemble de la plante en rendant l'intégralité de celle-ci résistante au bioagresseur, on parlera alors de Résistance Systémique Acquisée (RSA). De façon simplifiée, ces mécanismes peuvent (Figure 1) se décomposer en trois phases de reconnaissance de l'agent pathogène, de signalisation et de mise en place des défenses.

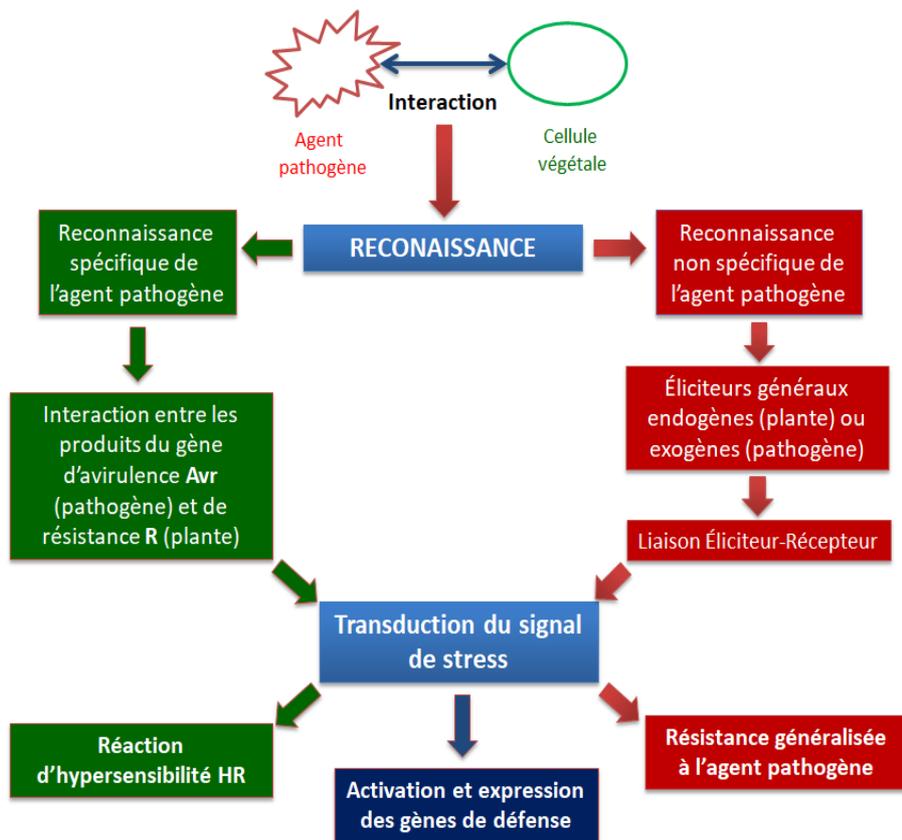


Figure 1. Illustration de l'induction des gènes de défense des plantes, d'après Benhamou *et al*³⁵.

1.2- Reconnaissance de l'agent pathogène

L'identification et la perception d'un agent pathogène nécessitent une reconnaissance spécifique ou non spécifique d'un éliciteur. La reconnaissance spécifique faisant intervenir le produit du gène d'avirulence de l'agent pathogène et le produit du gène de résistance de la plante. La reconnaissance non spécifique implique quant à elle des composés éliciteurs généraux qui ne ciblent pas spécifiquement un gène.

1.2.1- Reconnaissance par des éliciteurs généraux

Un composé éliciteur est une molécule qui a la capacité de déclencher une cascade d'évènements biologiques et/ou physiologiques dans le but d'exprimer des réactions de défense chez la plante³⁵. Ces éliciteurs généraux ne reproduisent pas la reconnaissance spécifique gène pour gène de Flor³⁶. Ces composés stimulant les défenses naturelles des plantes présentent des structures chimiques très variées. Ils peuvent provenir de l'agent pathogène et seront alors définis comme des éliciteurs exogènes. Ces composés peuvent également être directement synthétisés par la plante et seront définis comme éliciteurs endogènes. Ces éliciteurs ne cibleront pas un gène spécifique et permettront à la plante de se défendre en synthétisant de façon immédiate des molécules de défense peu spécifiques en réponse au stress qu'elle subit, lui permettant ainsi de développer une résistance dite basale face à son bioagresseur.

1.2.2- Reconnaissance par des éliciteurs spécifiques

Cette reconnaissance dite spécifique est une réaction dite « gène pour gène » selon la théorie de Flor³⁶ et va conférer à la plante une résistance spécifique à l'agent pathogène. Pour cela, la plante doit posséder un gène de résistance R, et, l'agent pathogène, un gène d'avirulence Avr. L'interaction entre le produit du gène d'avirulence Avr de l'agent pathogène et le produit du gène de résistance R de la plante va permettre à celle-ci de développer une résistance spécifique à cet agent infectieux en produisant des molécules activant une voie de défense efficace contre ce pathogène. La plante pourra par la suite mettre en place ses défenses et développer une résistance à son bioagresseur à un niveau local (Résistance Locale Acquise, RLA) qui sera ensuite transmise à l'ensemble du végétal : on parlera alors de Résistance Systémique Acquise (RSA).

1.2.3- Mise en place des défenses de la plante

Peu de temps après la reconnaissance du ou des éliciteurs (endogènes ou exogènes), la plante va développer une réponse précoce qui va se manifester dans un premier temps par un flux ionique à travers la membrane plasmique³⁴. Ce flux ionique va se caractériser par un influx d'ions calcium^{37,38} et de protons (Ca^{2+} et H^+) ainsi qu'un efflux d'ions potassium et chlorure (K^+ et Cl^-) ; cela va être une étape clé dans la transduction du signal de stress³⁹. La mise en place de ces défenses va ensuite se poursuivre

par l'activation de diverses enzymes telles que les protéines kinases responsables de la phosphorylation/déphosphorylation des protéines et les protéines G qui sont des protéines membranaires participant à la transduction du signal de stress. La plante va alors produire des espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species ou ROS en anglais) telles que le peroxyde d'hydrogène⁴⁰ (H₂O₂). Lors d'une agression, la plante va surproduire ces espèces oxygénées qui vont induire un état de stress dit « oxydant » ayant pour conséquence une accumulation d'espèces toxiques pour les cellules végétales. Mais en contrepartie, ces ROS vont être impliquées dans diverses activités liées à la résistance comme une défense antimicrobienne instantanée ou la régulation de certains gènes. Ainsi, cet état de stress « oxydant » est une étape indispensable dans l'induction et l'activation des gènes de défense des plantes.

1.3- Réponses défensives de la plante face à son bioagresseur

Lorsque la plante est attaquée par un bioagresseur, elle active des protéines/enzymes telles que les polyphénol-oxydases, peroxydases, chitinases et bien d'autres⁴¹. Ces protéines jouent un rôle crucial dans les réactions de défense de la plante et vont permettre à celle-ci de renforcer ses parois cellulaires, confiner le pathogène pour arrêter sa propagation et enfin de l'éliminer. Ces réponses vont ainsi se manifester par différentes voies de signalisation qui vont induire des réactions de défense.

1.3.1- Épaississement de la paroi

Afin de lutter contre des enzymes microbiennes pouvant digérer la paroi des cellules végétales, la plante est capable de la renforcer en synthétisant des protéines, des polysaccharides ou des polymères aromatiques³⁴ similaires à la lignine. La dégradation de ces parois par des champignons va également accélérer la mise en place d'une résistance car les composés obtenus (polysaccharides) vont avoir le rôle d'éliciteurs endogènes. Ce renforcement de la paroi cellulaire va donc permettre à la plante de ralentir la pénétration du pathogène afin que celle-ci puisse mettre en place les défenses adaptées contre son bioagresseur.

1.3.2- Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des molécules qui sont synthétisées par la plante en réponse à différents facteurs de stress qu'ils soient biotiques ou abiotiques. Ces molécules sont synthétisées lors de la réaction d'hypersensibilité ou pendant la RSA. Leur synthèse est induite par des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) telles que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ ou le monoxyde d'azote (NO) jouant le rôle de molécules de signalisation. Les phytoalexines peuvent également être synthétisées par la voie de l'acide jasmonique et de son ester méthylique, qui vont induire l'expression des gènes les produisant. Ces molécules, toxiques pour les pathogènes, peuvent l'être également pour la

plante à forte concentration⁴². C'est notamment le cas des phytoalexines, qui à des concentrations importantes peuvent s'avérer toxiques pour les cellules végétales^{43,44}.

1.3.3- Les protéines Pathogenesis Related (PR)

Les protéines PR (Pathogenesis Related) sont les protéines les plus connues parmi celles impliquées dans les réactions de défense des plantes⁴⁵. Ces protéines ont été découvertes dans des plants de tabac infectés par le virus de la mosaïque du tabac^{46,47}. Ces protéines sont réparties en 17 familles qui sont basées sur leurs activités biologique et enzymatique et sur les similitudes des séquences des protéines⁴⁸. Elles sont synthétisées par la voie de signalisation de l'acide salicylique⁴⁹ qui est l'une des molécules clés dans l'induction des gènes de défense des plantes. Ces protéines semblent également posséder des propriétés antimicrobiennes directes (chitinases et glucanases) ou indirectes (osmotines et permatines)^{35,50}. Certaines protéines PR peuvent également présenter une synergie en agissant ensemble comme les chitinases et glucanases, ceci afin de dégrader plus efficacement les parois des agents fongiques⁵¹. Ces protéines présentent un grand intérêt dans la stratégie de défense des plantes car elles s'avèrent être nombreuses.

1.3.4- Les inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases (IP) sont des protéines de défense qui sont capables de rendre inactives des enzymes dites « protéolytiques » (capables de cliver *via* une hydrolyse des liaisons peptidiques de protéines, par exemple les peptidases) qu'elles soient endogènes ou exogènes⁵². Ces inhibiteurs protègent la plante d'une activité protéolytique endogène incontrôlée et permettent également de contrôler les protéases exogènes provenant d'insectes ou d'agents pathogènes. Ils se répartissent en quatre catégories selon le type de protéases auquel ils vont s'associer. Parmi ces inhibiteurs, les inhibiteurs de protéases à sérine^{53,54} et à cystéine⁵⁵ sont abondants chez les plantes, contrairement aux inhibiteurs de métalloprotéases⁵⁶ et de protéases acides⁵⁷ qui sont peu présents. Des études ont été réalisées sur l'effet de l'ingestion de ces inhibiteurs sur la survie des insectes. Les résultats semblent s'accorder sur le fait que les IP ingérés par les larves d'insecte présentent des propriétés antimétaboliques et antinutritives inhibant les protéases digestives qui privent l'insecte d'acides aminés indispensables à son développement et à sa croissance⁵⁸. Cependant, les bioagresseurs (insectes, pathogènes) ont su développer de nouveaux mécanismes afin d'éviter les effets néfastes (toxiques, répulsifs...) de ces molécules de défense⁵⁹.

Les plantes possèdent ainsi un large arsenal de défense pour répondre aux attaques des bioagresseurs quels qu'ils soient. Ces moyens/mécanismes de défense peuvent se mettre en place grâce aux composés éliciteurs ou SDN.

2- Les composés éliciteurs (SDN)

Un composé éliciteur est une substance qui a la capacité de déclencher des événements menant à l'expression des gènes de défense chez la plante. Le terme éliciteur était d'abord employé pour des molécules pouvant stimuler la synthèse des phytoalexines³⁵, mais il est aujourd'hui employé pour des molécules capables d'induire une ou des réactions de défense chez la plante⁶⁰. L'élargissement de cette définition a permis de définir deux groupes d'éliciteurs : les éliciteurs abiotiques et biotiques. Ces composés, du fait de leur diversité, ont un large spectre d'action qui leur permet d'agir sur de nombreuses sources de stress auxquelles la plante peut être confrontée. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux éliciteurs abiotiques⁶¹. Les SDN abiotiques peuvent induire la production de métabolites secondaires chez les plantes. Ces composés sont répartis en trois catégories : les éliciteurs chimiques, physiques et hormonaux.

2.1- Les éliciteurs abiotiques « chimiques »

Les éliciteurs abiotiques sont des composés qui permettent d'induire une réponse pouvant entraîner une résistance contre un stress environnemental tel que le stress hydrique. Ces éliciteurs vont se composer de sels de métaux lourds comme des sels de cadmium, de cuivre et d'argent, mais également de composés organiques tels des détergents, des antibiotiques ou des phytohormones. Ces dernières seront abordées dans un paragraphe séparé (voir § 3, pages 14 à 30).

Les éliciteurs abiotiques chimiques peuvent donc être organiques ou minéraux, mais nous nous sommes plus particulièrement intéressés ici aux composés inorganiques et plus précisément aux sels de métaux lourds. Les traitements des plantes avec des sels de métaux lourds ont montré que ces derniers peuvent modifier certains aspects du métabolisme de la plante en entraînant une modification de la production des métabolites secondaires⁶². Des métaux tels que le nickel, le fer, l'argent et le cobalt ont pu montrer une activité élicitrice sur la modification de ces métabolites chez plusieurs espèces de plantes⁶³. Des tests réalisés sur des cellules de plants de vigne (*Vitis vinifera*) ont pu mettre en évidence que des sels de métaux (Co, Ag et Ni) pouvaient, à de faibles concentrations (5 µM), stimuler la production d'acides phénoliques et multiplier par 1,6 le niveau de contrôle de 3-O-glucosyl-resvératrol après 4 heures de traitement⁶⁴. Des études ont également mis en évidence que des sels d'argent, de cadmium ou de calcium pouvaient améliorer la production des alcaloïdes scopolamine et hyoscyamine dans des cultures de racines de *Brugmansia candida*^{65,66}.

Les sels de métaux lourds, bien qu'ils présentent un intérêt en tant qu'éliciteurs abiotiques, ont également des effets néfastes, notamment leur impact environnemental *via* une accumulation dans les eaux et les sols. Cela se produit par exemple avec les sels de cuivre qui sont largement utilisés depuis la fin du XIX^e siècle dans le domaine agrochimique et notamment dans le traitement de la vigne²⁵. Il faut

aussi noter que ces métaux lourds présentent également un danger sur la santé humaine avec une toxicité importante avérée⁶⁷.

2.2- Les éliciteurs abiotiques « physiques »

Parmi la liste des éliciteurs abiotiques, les éliciteurs dits « physiques » peuvent également jouer un rôle dans l'induction des mécanismes de défense chez la plante. Des traitements par irradiation ultraviolette^{68,69} ou par des ultrasons^{70,71} peuvent également induire la production de métabolites secondaires et stimuler des réactions de défense chez les plantes.

2.2.1- La stimulation par exposition aux rayons UV

Le rayonnement ultraviolet (UV) peut agir comme un facteur de stress abiotique qui stimule la biosynthèse de métabolites secondaires chez la plante^{61,72}. Les radiations UV se répartissent en trois régions : UV-A (315 à 400 nm), UV-B (280 à 315 nm) et UV-C (inférieures à 280 nm). Les rayons UV-B ont longtemps été considérés comme une source de stress chez la plante, mais ils sont également capables de déclencher des changements dans le métabolisme secondaire par l'accumulation de composés phénoliques tels que les flavonoïdes⁷². Cette irradiation aux rayons UV-B induit une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'oxyde nitrique (NO) dans des cals (structures de prolifération cellulaire) de *Ginkgo biloba*⁷³. Cette augmentation de la production de NO peut s'expliquer par une activité plus importante de l'enzyme oxyde nitrique synthase, mais ce n'est pas la seule enzyme dont l'activité se trouve être stimulée. En effet, l'activité de l'enzyme phénylalanine ammonialyase est également augmentée et entraînerait la biosynthèse de flavonoïdes⁷³. Une exposition aux rayons UV-B entraîne également une activité élicitrice chez la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) en augmentant la concentration en alcaloïdes indoliques de la famille des terpènes⁷⁴ tels que la serpentine, l'ajmalicine et la lochnericine. Les rayonnements UV-B présentent ainsi des activités élicitrices sur une large variété d'espèces végétales en induisant la biosynthèse de molécules présentant diverses propriétés biologiques (insecticide, fongicide). Ainsi, ces molécules élicitrices permettent aux plantes de se défendre face à des sources de stress variées (insecte, pathogène, sécheresse).

Les rayonnements UV-C présentent également une activité élicitrice vis-à-vis de certaines plantes et notamment sur des cals d'arachides⁷⁵ où une irradiation aux UV-C favoriserait la synthèse des molécules de la famille des stillbènes comme le resvératrol et le piceatannol. Les rayonnements UV-C peuvent également induire la synthèse de composés phénoliques simples ayant un effet fongistatique (limitant le développement des champignons) et également plus complexes (polymères) tels que la lignine et la subérine⁶⁸ ayant un rôle de barrière physique contre les agents pathogènes. Les irradiations UV-C peuvent également être associées à d'autres composés éliciteurs telles que les phytohormones

comme l'acide salicylique ou l'ester de l'acide jasmonique, le jasmonate de méthyle⁷⁶. L'association phytohormone/UV-C permet d'accroître la production de stillbène dans les cultures cellulaires de la vigne (*Vitis vinifera*).

Les rayonnements UV-B et C présentent un intérêt dans la stimulation des défenses naturelles des plantes et notamment sur la production de métabolites secondaires chez diverses variétés d'espèces végétales. Ils peuvent également être associés à d'autres composés éliciteurs (phytohormones) afin d'agir en synergie avec ces derniers. Ces irradiations, bien qu'elles présentent un intérêt, restent cependant difficiles à appliquer sur de grandes surfaces agricoles et les temps d'irradiation ne doivent pas être trop longs pour ne pas endommager les plantes.

2.2.2- La stimulation des plantes par ultrasons

Les ultrasons de basse énergie ou basse fréquence (16 à 100 000 kHz) peuvent également agir comme éliciteurs abiotiques pour induire les mécanismes de défense et stimuler la production de métabolites secondaires des plantes⁷⁷. Les ultrasons peuvent induire la perméabilisation des membranes cellulaires pour augmenter la libération de produits intracellulaires. Cette perméabilisation des cellules peut être complémentaire à la culture sur deux phases (« two-phase culture » en anglais) permettant de libérer le produit des cellules et de l'éliminer du milieu. Les ultrasons permettent de stimuler la production de métabolites secondaires présentant un intérêt, qu'il soit pour stimuler les mécanismes de défense des plantes ou pour extraire des molécules d'intérêt thérapeutique ou autre.

L'association des ultrasons à des techniques d'extraction peut s'avérer efficace pour améliorer le rendement en produit désiré. Il a ainsi été possible de doubler le rendement en shikonine en combinant les ultrasons à l'extraction dans une culture cellulaire de *Lithospermum erythrorhizon*⁷¹. L'utilisation des ultrasons a également permis de multiplier par 1,5 et jusqu'à 1,8 le rendement d'extraction en paclitaxel (substance active utilisée dans le traitement du cancer de l'ovaire, commercialisée sous le nom Taxol[®]) provenant de *Taxus chinensis* avec seulement un à deux traitements aux ultrasons de deux minutes sur une culture cellulaire d'une semaine⁷⁰. Les ultrasons peuvent également être associés à des composés éliciteurs afin d'agir en synergie au même titre que l'irradiation aux rayons UV. Ainsi, l'association avec l'acide salicylique permet de multiplier par 3 la quantité de paclitaxel libérée dans des cultures cellulaires de *Taxus baccata*⁷⁸. Cette stimulation présente l'avantage d'être peu coûteuse en énergie et ne nécessite pas des temps d'application très longs, mais elle reste cependant difficile à mettre en place à grande échelle.

2.2.3- La stimulation en conditions de stress environnemental

Les plantes sont confrontées à des sources de stress permanentes dans leur milieu naturel, qu'il s'agisse de l'attaque d'un bioagresseur ou bien de leur environnement. Les sources de stress

environnemental sont nombreuses, mais elles peuvent également présenter un intérêt pour stimuler la production de métabolites secondaires chez la plante. Nous présenterons de façon succincte des stimulations provenant de stress hydrique (osmotique), salin ou causés par la sécheresse.

Le stress osmotique ou hydrique est un stress abiotique qui se traduit par un environnement dans lequel la quantité d'eau absorbée par la plante est inférieure à la quantité d'eau évaporée (transpirée) par celle-ci. Mais ce stress s'avère également présenter une activité élicitrice qui affecte la croissance, le développement et la production de métabolites secondaires chez la plante⁷⁹. Ce stress permet par exemple d'augmenter la production de capsaïcine (alcaloïde, composant actif du piment) dans les cultures cellulaires de *Capsicum chinensis*⁸⁰. Il permettrait également d'augmenter la production de glycosides de stéviol dans des cals et cultures cellulaires en suspension de *Stevia rebaudiana*⁸¹.

Le stress salin peut également jouer le rôle d'éliciteur chez la plante. Une exposition à la salinité peut stimuler la production de métabolites secondaires comme des alcaloïdes ou des composés phénoliques^{82,83}. Le chlorure de sodium (NaCl) est également employé comme éliciteur pour améliorer la synthèse de la vinblastine et de la vincristine (alcaloïdes employés dans les traitements de divers cancers) dans la culture de tissus embryogéniques de *Catharanthus roseus*⁸⁴. Il semble également augmenter la teneur en sitostérol dans des suspensions cellulaires de *Nitaria tangutorum*⁸⁵ par un traitement avec une solution de NaCl à une concentration de 0,25 mol/L.

La sécheresse est un facteur de stress important qui limite la croissance, la reproduction et la survie de la plante, mais ne se manifeste pas de la même manière chez les différentes espèces. Ce facteur a un impact direct sur la production de métabolites secondaires chez diverses espèces de plantes telles que *Glycyrrhiza uralensis* (réglisse chinoise) où un déficit en eau a augmenté la production d'acide glycyrrhizique⁸⁶ (principe actif de la réglisse) dans les racines de la plante. Le stress de la sécheresse peut être induit chez la plante par des produits chimiques tels que le polyéthylène glycol (PEG). C'est notamment le cas sur des cals de palmier dattier cultivés *in vitro*, où la concentration en proline (acide aminé essentiel chez la plante) augmente progressivement en réponse à l'augmentation de la concentration en PEG⁸⁷.

Les conditions de stress environnemental peuvent induire une réaction de stimulation afin de permettre à la plante de se défendre et surtout de survivre dans des conditions difficiles (sécheresse, froid). Ainsi, les éliciteurs abiotiques présentent un intérêt pour les réactions de stimulation de défense des plantes. Certains éliciteurs abiotiques, bien qu'efficaces, ne pourront être que peu utilisés pour leurs effets indésirables autant sur l'environnement que chez l'homme (métaux lourds). D'autres traitements, tels que les expositions à des rayonnements UV ou aux ultrasons, restent intéressants à petite échelle (laboratoire), mais sont difficiles et coûteux à mettre en place à plus grande échelle (culture en plein champ) et ne tiennent pas compte des paramètres environnementaux tels que la température, le vent et la quantité d'eau apportée aux plantes. Le stress causé par les conditions environnementales, bien qu'il

induit une activité élicitrice chez les plantes, reste cependant dangereux car il peut entraîner la mort des végétaux. Il reste cependant une catégorie d'éliciteurs abiotiques qui pourraient présenter un grand intérêt dans l'induction de réactions de défense des plantes car ils sont naturellement produits par celles-ci, il s'agit des composés définis comme hormonaux également appelés phytohormones.

3- Les éliciteurs hormonaux

Les composés hormonaux étaient traditionnellement définis et étudiés dans le cadre de la croissance et du développement des plantes, mais plus récemment, ces phytohormones ont commencé à être étudiées pour leurs propriétés à induire une ou des réaction(s) de défense face à des stress abiotiques et/ou biotiques. Ces molécules vont présenter différents modes d'action qui vont leur permettre de s'insérer dans une cascade de signalisations complexes aboutissant à la production de molécules élaborées (protéines, phytoalexines, auxines...) répondant à la source de stress (agresseur, stress environnemental) que subit la plante. Ces éliciteurs présentent des structures plus ou moins complexes qui leur confèrent un large panel de propriétés biologiques pour répondre au mieux aux attaques de bioagresseurs (insectes, agents pathogènes, nématodes). Parmi ces composés dont l'activité élicitrice est reconnue, se trouvent les auxines, l'éthylène, les acides jasmonique et salicylique ainsi que leurs esters qui seront présentés dans ce manuscrit.

3.1- Les auxines

Les auxines ont été découvertes dans les années 1920 par le biologiste allemand Frits Warmolt Went et l'une de ces hormones, l'acide 3-indole acétique (AIA), fut isolée pour la première fois par Kenneth Thimann. Ces molécules présentent toutes une fonction acide carboxylique et un cycle aromatique (benzène, indole, pyridine) dans leurs structures⁸⁸. L'AIA a été identifié comme principale auxine naturellement présente dans les plantes^{89,90}. L'AIA est capable d'engendrer d'importants changements chez les plantes et notamment au niveau des racines où il est responsable de l'architecture et du développement de celles-ci^{91,92}. L'AIA est synthétisé par la plante à partir d'un aminoacide présentant une structure similaire (le tryptophane) en sollicitant des mécanismes dépendants et indépendants de celui-ci^{93,94}.

3.1.1- Voie de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique IAA

Cinq composés d'origine naturelle ont pu être reconnus comme des précurseurs de l'AIA : l'indole 3-acétamide (IAM), indole 3-acétonitrile (IAN), l'acide 3-indole pyruvique (AIP) ainsi que l'indole 3-acétaldéhyde (IAAld) et l'indole 3-acétaldoxime (IAOx). La biosynthèse de l'AIA est excessivement complexe et semble passer par plusieurs voies de biosynthèse. Nous nous sommes intéressés à trois voies de biosynthèse passant par les cinq précurseurs de l'AIA. Ces voies enzymatiques

sont présentées de façon simplifiée sur le Schéma 1. Ces trois voies correspondent aux chemins de l'acide 3-indole pyruvique (AIP) représenté en bleu, de l'indole 3-acétaldoxime (IAOx) représenté en vert et de l'indole 3-acétamide (IAM) représenté en rouge bordeaux, ces trois molécules ayant été identifiées comme des précurseurs de l'acide 3-indole acétique (AIA). Ces voies de biosynthèse seront présentées de façon simplifiée car certains de ces mécanismes restent non résolus à ce jour.

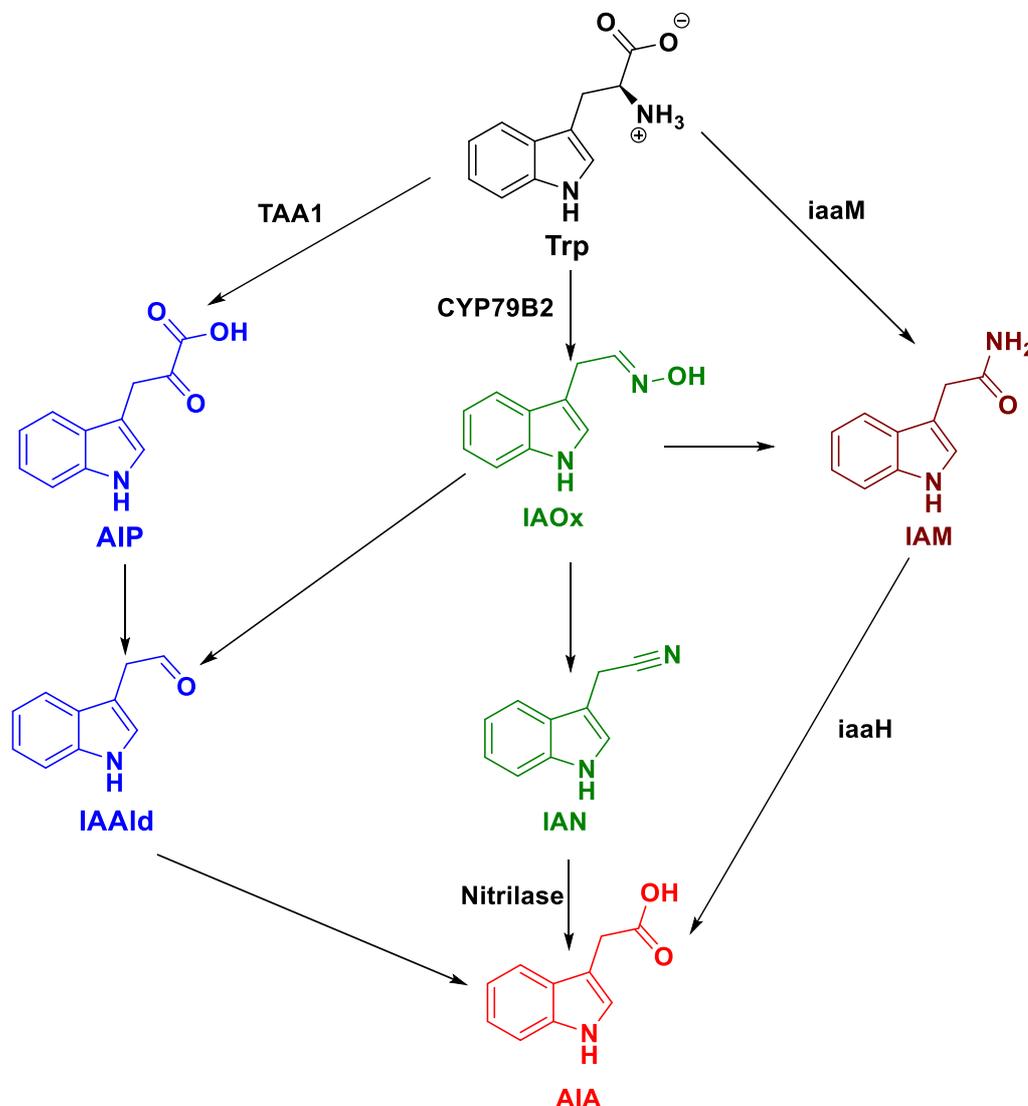


Schéma 1. Principales voies de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique dépendantes de l'acide aminé tryptophane (version simplifiée de Korasick *et al*⁹⁴).

L'AIA peut être produit par la voie de l'acide 3-indole pyruvique (AIP) qui a pu être identifié dans certains microorganismes⁹⁴. La première étape de cette voie est une conversion du tryptophane en AIP par une enzyme qui a pu être identifiée sur des plants mutants d'*Arabidopsis*⁹⁵, une Tryptophane Aminotransférase (TAA1 ; Schéma 1). L'AIP est à son tour converti en indole 3-acétaldéhyde (IAAld) par une enzyme AIP décarboxylase qui a été clonée chez les bactéries *Azospirillum brasilense*⁹⁶ et *Enterobacter cloacae*⁹⁷. L'IAAld est ensuite transformé en AIA par l'action d'enzymes oxydantes, les

aldéhyde oxidases^{98,99}. Les gènes responsables de la conversion du tryptophane en AIA et les enzymes responsables de l'oxydation de l'IAAld n'ont à ce jour pas pu être identifiés de façon précise. L'AIA peut également être obtenu par la voie de l'indole 3-acétamide (IAM) en deux étapes. La première étape correspond à une conversion du tryptophane en IAM grâce à une tryptophane-2-monooxygénase (iaaM¹⁰⁰ ; Schéma 1). L'IAM est ensuite hydrolysé en AIA par l'action d'une hydrolase¹⁰¹ (iaaH, Indole 3-acétamide hydrolase ; Schéma 1). Cette voie de l'IAM est la seule voie à être entièrement dépendante du tryptophane. Une famille d'amidases pouvant hydrolyser l'IAM en AIA a également été identifiée chez *Arabidopsis*¹⁰², faisant de cette molécule un intermédiaire clé dans la biosynthèse de l'AIA. Cependant, les réactions biochimiques conduisant à la production de l'intermédiaire IAM restent à ce jour inconnues⁹⁴. L'IAM a cependant été retrouvé dans des plantes poussant dans des conditions stériles, laissant supposer que l'IAM était hydrolysé en AIA par une amidase AMI1¹⁰³. Une troisième voie de production de l'AIA est également possible *via* l'indole 3-acétaldoxime (IAOx) et va se composer de trois étapes. L'IAOx est obtenu par des enzymes homologues du cytochrome P450 (CYP79B2 et CYP79B3)¹⁰⁴. La conversion enzymatique de l'IAOx en indole 3-acétonitrile (IAN) reste à ce jour non élucidée¹⁰⁵. L'IAN est à son tour converti en AIA par l'action d'enzymes nitrilases qui sont des hydrolases catalysant l'hydrolyse de groupements nitrile en acide carboxylique et en ammoniac^{106,107}. Par ailleurs, l'IAOx peut également être hydrolysé en indole 3-acétaldéhyde (IAAld)¹⁰⁸ ou converti en indole 3-acétamide (IAM)^{109,110} qui peuvent ensuite être convertis en AIA selon les deux voies présentées ci-dessus.

L'acide 3-indole acétique peut ainsi être obtenu par différentes voies de biosynthèse dépendantes ou indépendantes du tryptophane dont certaines n'ont pas été élucidées. Il existe également une voie de biosynthèse de l'AIA passant par la tryptamine¹¹¹ qui s'avère plus longue et complexe. Ce composé s'avère essentiel dans le développement et la croissance de la plante. Cependant, l'AIA n'est pas la seule auxine présente, d'autres molécules naturelles ou synthétiques présentent des propriétés les définissant comme des auxines (SDN, herbicide, fongicide...) pour les végétaux.

3.1.2- Dérivés auxiniques naturels et synthétiques

Il existe d'autres auxines endogènes qui sont naturellement produites par la plante¹¹². Parmi ces composés, se retrouvent des analogues de l'acide 3-indole acétique (AIA) tels que les acides 3-(4-chloroindole)acétique¹¹³ (4-Cl-AIA) et 3-indole butyrique^{114,115} (AIB), mais également l'unique dérivé phénylique, l'acide phénylacétique¹¹⁶ (APA). Les structures de ces composés sont présentées sur la Figure 2. L'acide 3-indole butyrique est également considéré comme une auxine synthétique, bien qu'il ait pu être détecté dans plusieurs espèces de plantes. Les rôles et mécanismes d'action de ces auxines endogènes restent peu décrits à ce jour.

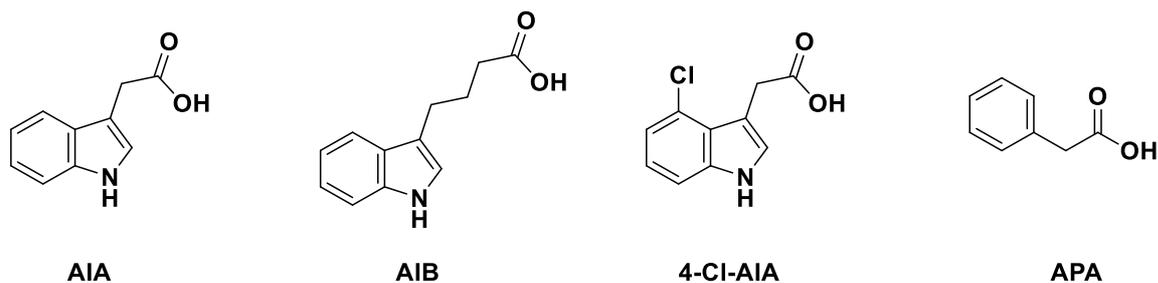


Figure 2. Structures de l'acide 3-indole acétique (AIA) et de ses analogues : l'acide 3-indole butyrique (AIB), l'acide 3-(4-chloroindole) acétique (4-Cl-AIA) et l'acide phénylacétique (APA).

Avec les avancées dans les domaines de la biologie et de la synthèse organique, des composés présentant une activité définie comme « auxinique » ont pu être synthétisés. Ces auxines synthétiques présentent pour la plupart des propriétés herbicides à l'image des acides 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 4-(4-chloro-2-méthyl)phénoxybutyrique (MCPB), 3,6-dichloropicolinique (Clopyralid), 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinique (Picloram). Le 2,4-D fût le premier herbicide sélectif utilisé et sa commercialisation en 1946 a entraîné une véritable révolution des pratiques culturales dans le monde agricole. Il permettait de détruire sélectivement les adventices dicotylédones sans nuire à la plupart des graminées cultivées telles que certaines céréales. Les structures de ces composés auxiniques sont présentées en Figure 3.

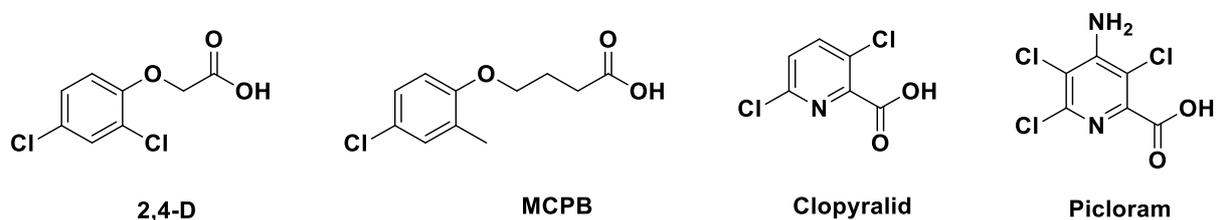


Figure 3. Structures de quelques auxines synthétiques (2,4-D, MCPB, Clopyralid et Picloram).

Ces auxines synthétiques possèdent pour la plupart un cycle aromatique dans leurs structures. De nombreux herbicides possèdent un cycle benzénique ou un hétérocycle tel que la pyridine ou la pyrimidine. Ces auxines sont classées dans le groupe O (substances de croissance agissant comme l'AIA) du HRAC (Herbicide Resistance Action Committee). Ce groupe O est divisé en plusieurs sous-groupes dépendant de la structure de ces auxines¹¹⁷ tels que : i/ les acides benzoïques (Dicamba), ii/ les acides phénoxy-carboxyliques (2,4-D, 2,4-DP et 2,4-DB, 2,4,5-T, MCPA et B, Mecocrop), iii/ les acides carboxyliques de pyridines (Fluroxypir, Clopyralid, Triclopyr et Picloram), de quinoléines (Quinmerac et Quinclorac) et de pyrimidine (Aminocyclopyrachlor) ou iv/ les acides arylpicoliniques tels que le Halauxifen-méthyl et le Florpyrauxifen-benzyl. Busi *et al*¹¹⁷ se sont intéressés aux dérivés auxiniques et plus particulièrement aux résistances développées par certaines espèces végétales contre ces herbicides. Ainsi, depuis 1960, plus de trente espèces végétales ont développé des résistances à ces

composés. Les auteurs ont analysé l'évolution de cette résistance aux auxines synthétiques, ainsi que les mécanismes de résistance connus chez certaines familles de plantes. Malgré le développement de résistances à ces composés, les auxines de synthèse restent toujours viables pour le traitement d'adventices, notamment en association à d'autres familles d'herbicides.

3.2- L'acide jasmonique et les jasmonates

L'acide jasmonique (JA, Figure 4) est une hormone végétale jouant un rôle clé dans la mise en place de réactions de défense des plantes. L'acide jasmonique ne fut pas la première molécule à être identifiée, mais c'est son ester, le jasmonate de méthyle (MeJA, Figure 4) qui fut isolé par le chimiste suisse Édouard Demole¹¹⁸ en 1962 comme métabolite secondaire dans les huiles essentielles de jasmin. C'est en 1971 que l'acide jasmonique fut isolé à partir de filtrats de culture du champignon *Botryodiplodia theobromae*¹¹⁹. Ce composé est l'une des hormones impliquées dans de nombreux aspects du développement des plantes et dans les réponses aux différentes sources de stress subies par celles-ci.



Figure 4. Structures de l'acide jasmonique JA et de son ester, le jasmonate de méthyle MeJA.

3.2.1- Structure et propriétés biologiques de l'acide jasmonique

JA et MeJA possèdent dans leurs structures un cycle à 5 atomes de carbone portant une fonction cétone (cyclopentanone). Le cycle pentanone est substitué en position α par un groupement pent-2-èn-1-yle de configuration relative Z et en position β substituée par un groupement acétate CH_2COOR ($\text{R} = \text{H}$ pour JA et $\text{R} = \text{CH}_3$ pour MeJA ; Figure 4). Par la présence de ces substituants, le cycle pentanone possède deux centres stéréogènes dont les configurations absolues ont une importance capitale pour l'activité biologique de cette hormone et de son ester. Holbrook *et al*¹²⁰ ont pu mettre en évidence l'importance des configurations absolues de ces deux centres stéréogènes en sollicitant les quatre stéréoisomères de JA et MeJA. Ils ont ainsi montré que les stéréoisomères de configurations absolues (1R, 2R) présentaient une meilleure activité à induire la production d'éthylène dans des cotylédons de tournesol. Ces résultats sont pertinents car ces stéréoisomères sont les plus stables (produits thermodynamiques) et correspondent aux formes produites majoritairement par les plantes lors de leur biosynthèse.

L'acide jasmonique est produit par les plantes lorsqu'elles sont attaquées par des insectes herbivores¹²¹⁻¹²³, des agents pathogènes¹²⁴⁻¹²⁶, mais également lorsqu'elles subissent un stress abiotique¹²⁷⁻¹²⁹. Tout comme l'AIA, l'acide jasmonique et son ester sont impliqués dans des processus cruciaux de croissance et de développement des plantes. Ils sont notamment responsables de certaines fonctions physiologiques telles que le développement des graines et des fleurs¹³⁰, l'élicitation de métabolites secondaires¹³¹, l'accumulation de protéines de stockage¹³², la mise en place de la résistance systémique^{133,134} ou encore la sénescence des plantes¹³⁵ (vieillessement des végétaux ou d'une partie d'un organisme). L'acide jasmonique est ainsi l'une des molécules clés dans la mise en place des défenses des plantes et également dans leur développement, mais il est également capable d'interagir en synergie avec d'autres hormones telles que l'éthylène^{136,137} et l'acide salicylique^{138,139}.

3.2.2- Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique

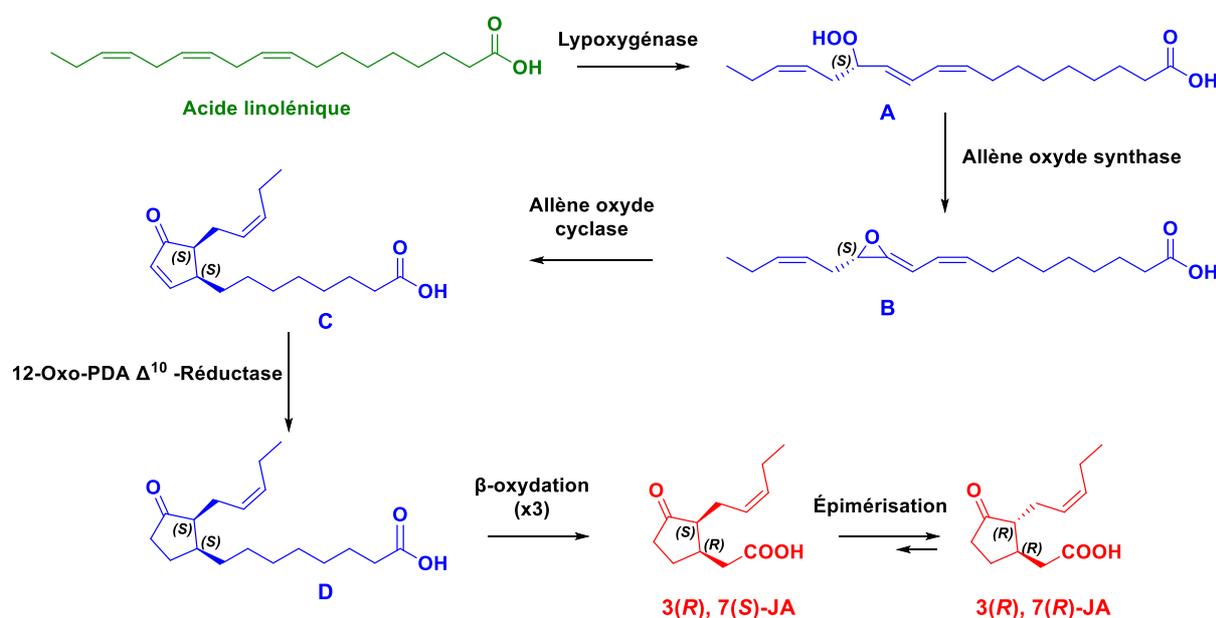


Schéma 2. Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique JA, d'après Mueller¹⁴⁰.

L'acide jasmonique est biosynthétisé chez les plantes par la voie de l'acide linoléique qui est un acide carboxylique insaturé à longue chaîne carbonée (18 carbones). Cette voie de l'acide linoléique va permettre la formation de l'acide jasmonique en six étapes enzymatiques représentées sur le Schéma 2. La première étape de cette biosynthèse va convertir l'acide linoléique en acide 13-hydroperoxylinoléique (**A**, schéma 2) sous oxygénation d'une lipoxygénase. La fonction hydroperoxyde de cet acide est alors convertie en époxyde ou oxirane (**B**, schéma 2) par réaction enzymatique avec une allène oxyde synthase. L'intermédiaire **B** (Schéma 2), très instable, va se réarranger pour obtenir l'acide 12-oxo-phytyldiénoïque (**C**, Schéma 2) par action d'une allène oxyde cyclase. L'insaturation du cycle va ensuite être réduite sélectivement par une 12-Oxo-phytyldiénoïque

acid réductase ou 12-Oxo-PDA Δ^{10} -réductase, permettant ainsi la formation du dérivé **D** (Schéma 2). Ce dernier va subir 3 coupures oxydantes ou β -oxydations successives de la chaîne carbonée portant la fonction acide carboxylique afin d'obtenir l'acide jasmonique de configuration absolue 3(*R*),7(*S*), qui va ensuite s'épimériser en α de la fonction cétone afin d'obtenir le diastéréoisomère **3(*R*),7(*R*)**, correspondant à la forme la plus stable et biologiquement active.

3.2.3- Formes actives de l'acide jasmonique

Outre le jasmonate de méthyle, l'acide jasmonique peut être associé à des acides aminés par biosynthèse. Ces molécules, appelées conjugués, peuvent ainsi présenter de nouvelles activités élicitrices ou physiologiques bénéfiques pour les plantes. Parmi elles, le conjugué acide jasmonique-isoleucine (JA-Ile, Figure 5-1) est l'un des composés les plus décrits dans la littérature¹⁴¹⁻¹⁴³. Ce conjugué est notamment impliqué dans les réactions de défense des plantes en réponse à des sources de stress abiotiques et/ou biotiques telles qu'une exposition en milieu salin¹⁴⁴, un stress osmotique¹³⁵ ou dans la mise en place de la résistance systémique acquise, notamment chez *Arabidopsis thaliana*^{145,146}. Ce conjugué s'avère, au même titre que sa forme acide JA, nécessaire au développement et à la mise en place des réactions de défense des plantes.

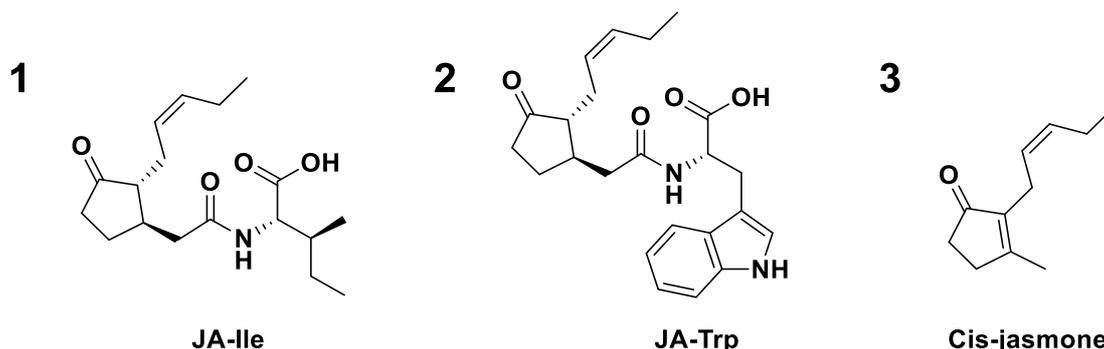


Figure 5. Structures des formes actives de l'acide jasmonique présentes chez les plantes.

Bien que le conjugué JA-Ile soit majoritaire chez de nombreuses plantes, des molécules associant l'acide jasmonique à d'autres acides aminés ont pu être identifiées. C'est notamment le cas du tryptophane dont la forme conjuguée JA-Trp (Figure 5-2) a pu être détectée chez *Asparagus officinalis* (asperge)¹⁴⁷ lors de la sénescence foliaire (perte de feuilles). Staswick *et al* ont pu mettre en évidence que ce conjugué JA-Trp avait une action directe sur l'activité de l'auxine AIA et semblait contrôler un transporteur d'auxines¹⁴⁸. Ce conjugué reste cependant beaucoup moins décrit que son analogue JA-Ile.

D'autres composés peuvent également être obtenus par biosynthèse à partir de l'acide jasmonique sans conjugaison. C'est le cas de la cis-jasmone (Figure 5-3) qui est obtenue par décarboxylation de JA et qui a été détectée en tant que composé volatil odorant des fleurs pour attirer les insectes pollinisateurs¹⁴⁹. La cis-jasmone (ou (*Z*)-jasmone) présente des propriétés élicitrices et

notamment sur des plants de tomates où une application foliaire du composé peut induire la production de métabolites secondaires entraînant une résistance des plantes à l'oviposition (pontage d'œufs) d'insectes herbivores¹⁵⁰.

3.3- L'hormone gazeuse éthylène

L'éthylène est le composé hydrocarboné insaturé ou alcène le plus simple de formule C_2H_4 et qui fut le premier composé gazeux à être identifié comme hormone chez les plantes. C'est en 1901 que le botaniste russe Dimitry Neljubow découvrit que l'éthylène était le composant actif d'un gaz d'éclairage pour stimuler le mouvement du pois mange-tout (*Pisum sativum*)¹⁵¹.

3.3.1- Propriétés biologiques de l'éthylène

L'éthylène, tout comme les acides 3-indole acétique (AIA) et jasmonique (JA), est impliqué dans la régulation de nombreux processus de croissance, de développement et de réponses aux diverses sources de stress des plantes. L'hormone est notamment impliquée dans la croissance et le développement des feuilles de plantes et présente des effets variables dépendant de la concentration du composé éliciteur et de l'espèce végétale¹⁵²⁻¹⁵⁴. L'éthylène joue également un rôle dans la sénescence foliaire¹⁵⁵ et serait l'hormone la plus importante dans la régulation de ce phénomène¹⁵⁶. Il est également impliqué dans les phénomènes de développement des fleurs^{156,157} et de maturation des fruits^{158,159}. L'éthylène joue également un rôle important dans la signalisation des réponses à différentes sources de stress abiotiques telles que le froid¹⁶⁰, la salinité¹⁶¹, la sécheresse¹⁶². L'éthylène, au même titre que l'AIA et JA, s'avère être une hormone primordiale dans les divers phénomènes physiologiques et biologiques des plantes, ceci malgré sa structure chimique très simple.

3.3.2- Voie de biosynthèse de l'éthylène

L'éthylène est obtenu chez les plantes par biosynthèse en empruntant la voie de la méthionine^{163,164}, un acide aminé sulfuré dont la fonction thiol (RSH) est substituée par un groupement méthyle (RSCH₃). Cette voie de biosynthèse qui se compose de 3 étapes enzymatiques est présentée sur le Schéma 3.

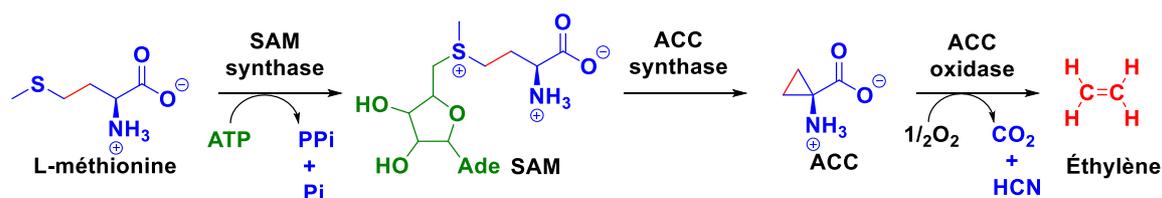


Schéma 3. Voie de biosynthèse de l'éthylène à partir de la L-méthionine, d'après Xu *et al*¹⁶⁵.

La première étape de cette voie de biosynthèse correspond à la conversion de la L-méthionine en S-adenosylméthionine (**SAM**) par une SAM synthase en présence d'adénosine triphosphate ATP¹⁶⁶. L'ATP va ainsi permettre la formation de l'intermédiaire ionique (sulfonium) **SAM** en libérant des ions phosphate Pi et pyrophosphate PPi au cours de cette étape. La seconde étape est une dégradation de la **SAM** en acide 2S-amino-2-cyclopropylacétique **ACC** par action de l'ACC synthase (1-AminoCyclopropylCarboxylate synthase). Cet intermédiaire **ACC** est à son tour converti en éthylène accompagné d'un dégagement gazeux de dioxyde de carbone CO₂ et d'acide cyanhydrique HCN, ceci en milieu oxydant par une ACC oxydase¹⁶⁷. Cette voie de biosynthèse de l'éthylène permet aux plantes de produire de l'éthylène en 3 étapes enzymatiques. Cependant, la méthionine est présente en faible abondance dans les cellules végétales, ce qui a supposé un éventuel mécanisme de revalorisation de cet aminoacide¹⁶⁸ chez les plantes. Yang *et al*^{169,170} ont mené des études qui ont permis d'identifier des métabolites radioactifs provenant d'une méthionine marquée et de découvrir le cycle de cet aminoacide (appelé cycle de Yang) chez les plantes supérieures. Ainsi la méthionine est régénérée par le biais de ce cycle et permet aux plantes de produire de l'éthylène de façon continue sans source ou apport exogène de soufre. La méthionine joue ainsi un rôle majeur dans la production d'éthylène, mais est également impliquée dans la biosynthèse de polyamines¹⁷⁰ et de la nicotianamine¹⁷¹.

L'éthylène, malgré la simplicité de sa structure, est une hormone jouant un rôle crucial dans divers processus biologiques des plantes. L'hormone gazeuse peut également interagir en synergie avec d'autres hormones vis-à-vis d'un processus biologique tel que la sénescence des feuilles, où celle-ci interagit avec avec l'acide salicylique¹⁷².

3.4- L'acide salicylique et ses analogues

3.4.1- Historique de l'acide salicylique

C'est en 1828 que le scientifique allemand Johann A. Buchner isola un dérivé de l'acide salicylique, la salicyline (ou salicine) provenant de l'écorce de saule. Ce n'est que dix ans plus tard que l'acide salicylique fut synthétisé par le chimiste italien Raffaele Piria. Le produit fut obtenu par conversion de la salicine en un sucre (glucose) et un composé qui par oxydation devint un acide aromatique nommé acide salicylique (AS, Figure 6). C'est en 1859 que l'acide salicylique fut synthétisé pour la première fois par le chimiste allemand Hermann Kolbe par la synthèse dite de Kolbe ou Kolbe-Schmitt qui est une réaction de carboxylation du phénolate de sodium¹⁷³. Cependant, le produit obtenu présentait quelques défauts tels qu'un goût désagréable et provoquait des irritations de l'estomac¹⁷⁴. C'est en 1876 que le premier essai clinique d'un dérivé d'acide salicylique fut enregistré par le médecin écossais Thomas MacLagan qui employa la salicine pour traiter la fièvre et des inflammations articulaires chez des patients souffrant de rhumatismes^{174,175}.

C'est en 1897 que fut synthétisé l'analogue le plus connu de l'acide salicylique : l'aspirine ou acide 2-acétylsalicylique¹⁷⁶ (Figure 6). C'est le chimiste allemand Felix Hoffmann, de la société Friedrich Bayer and Co (actuel Bayer), qui s'est intéressé au groupement phénol (OH) de l'acide salicylique et a réussi à acétyler ce dernier en présence d'anhydride acétique porté à reflux. L'aspirine fut considérée comme le premier médicament à avoir été conçu de façon synthétique¹⁷⁷. Ce composé fut ensuite testé sur des animaux, puis sur l'homme au cours d'essais cliniques¹⁷⁴. L'aspirine est employée pour le traitement de douleurs et de fièvres, mais également dans la prévention de maladies cardiovasculaires^{178,179} et de cancers¹⁸⁰⁻¹⁸².



Figure 6. Structures de l'acide salicylique (AS) et de l'aspirine.

3.4.2- Propriétés physico-chimiques de l'acide salicylique

L'acide salicylique, ou acide 2-hydroxybenzoïque en nomenclature IUPAC, appartient à la famille des composés aromatiques ($4n + 2$ électrons). Composé inodore de formule chimique $C_7H_6O_3$, l'acide salicylique possède une masse molaire de $138,12 \text{ g mol}^{-1}$ et se présente sous forme de poudre ou de cristaux de couleur blanche dont le point de fusion est 158 °C ¹⁸³. L'acide salicylique est peu soluble dans l'eau en raison de la présence du noyau aromatique très hydrophobe, mais il est soluble dans certains solvants organiques tels que le diéthyléther, l'acétone et les alcools (méthanol, éthanol). L'AS possède deux valeurs de constantes d'acidité correspondant aux formes acido-basiques de l'acide benzoïque et du groupement phénol qui sont respectivement proches de 3,0 et de 13,8. La valeur de pKa de la fonction acide (3,0) le définit comme un acide faible. Il présente cependant des risques chimiques car il est irritant en cas de contact avec les yeux et la peau et il doit être manipulé avec les équipements de protection adaptés. L'AS est classé en tant que composé CMR de catégorie 2, ce qui signifie que des doutes existent quant à sa toxicité sur la reproduction et son caractère mutagène et cancérigène, ceci malgré ses applications dans de nombreux domaines (cosmétique, agrochimie, médecine...) et son implication dans les défenses des plantes.

3.4.3- Propriétés biologiques de l'acide salicylique

L'acide salicylique est également présent dans le monde végétal et c'est l'une des molécules jouant un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques des plantes. C'est en 1979 que le rôle de l'AS et de l'aspirine fut mis en évidence dans la résistance aux maladies des plants de tabac¹⁸⁴. Depuis, l'importance de l'acide salicylique dans les mécanismes de défenses des plantes à des stress abiotiques

et/ou biotiques a été établie. Une augmentation de la production d'acide salicylique a pu être observée chez les plantes lors d'infections causées par des virus¹⁸⁵, des agents fongiques¹⁸⁶, des bactéries¹⁸⁷ et des insectes¹⁸⁸. Des études ont également mis en évidence qu'un apport exogène d'AS pouvait renforcer les défenses de la plante hôte¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Cette phytohormone est en outre essentielle dans la signalisation des défenses et le développement d'une résistance aux niveaux local (RLA)^{192,193} et systémique (RSA)¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ des plantes. L'acide salicylique est aussi impliqué dans de nombreux processus biologiques et physiologiques durant toute la durée de vie des plantes et joue notamment un rôle clé dans la régulation de leur croissance et leur développement¹⁹⁷. La phytohormone aurait notamment une action sur le processus de germination des graines qui est le stade de développement le plus critique d'une plante¹⁹⁸. L'AS aurait notamment un impact positif sur ce processus lorsque les végétaux subissent un stress abiotique^{199,200} et notamment chez *Vicia faba* où une application exogène à des concentrations comprises entre 0,25 et 1 mM améliore la germination en conditions de stress salin²⁰¹. Le rôle de l'acide salicylique dans ce processus de germination va dépendre du génotype de la plante et du stress subi par celle-ci²⁰².

La croissance et le développement des plantes sont des processus dans lesquels l'AS est également impliqué, notamment chez le soja où la croissance des racines est exacerbée après une application exogène à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-2} M²⁰³. Une application exogène peut également augmenter la croissance et le rendement sur *Oryza sativa* (riz) en cas de hautes températures²⁰⁴. Cependant, une concentration trop importante ou une accumulation d'AS peut avoir des effets négatifs sur la croissance des végétaux et induire un nanisme réduisant la taille des feuilles, la taille et le nombre de cellules^{205,206}. Le processus de floraison est également régulé par cet éliciteur ; ainsi, sur des violettes africaines, une application foliaire a augmenté le nombre de boutons floraux, la forme de la fleur et la couleur des fleurs²⁰⁷. Un traitement d'AS sur des fleurs d'anthurium présente également une action bénéfique sur la floraison, mais également une senescence retardée des fleurs lors d'une exposition des plantes au froid²⁰⁸. L'AS est impliqué dans le processus de photosynthèse de nombreuses plantes dans des conditions normales et/ou stressantes. L'AS jouerait un rôle dans la régulation de ce processus et affecterait la structure des chloroplastes et des feuilles²⁰⁹, la fermeture des stomates²¹⁰ et l'activité d'enzymes telles que la RuBisCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase)²¹¹ et l'anhydrase carbonique²¹². Un autre impact positif de l'AS sur la photosynthèse est la protection conférée à certaines espèces végétales comme le maïs et l'orge contre le stress oxydatif induit par le paraquat²¹³ (herbicide) ou le cadmium²¹⁴.

L'AS est donc impliqué dans de nombreux processus biologiques et physiologiques^{215,216}. L'hormone et ses dérivés induisent l'expression de protéines liées à la pathogénèse, les protéines PR^{217,218} (Pathogenesis Related). L'AS est également employé par les plantes en réponse à des agents pathogènes tels que *Colletotrichum falcatum* (agent fongique)²¹⁹ et *Agrobacterium tumefaciens* (bactérie)²²⁰ pour lesquels il est toxique. L'AS possède un intérêt majeur pour l'agrochimie car il est naturellement synthétisé par les plantes et présente peu de danger pour la santé humaine et le

développement du végétal. De plus, l'AS est produit en quantités importantes par de nombreux fournisseurs de produits chimiques en étant disponible à des prix accessibles (1800 \$ la tonne chez le manufacturier chinois Jinhua Elegance). Cependant, l'AS est confronté à une contrainte majeure lorsqu'il est apporté de façon exogène à la plante. En effet, malgré son caractère mobile²²¹, ce dernier est rapidement métabolisé et compartimenté²¹⁸ dans le végétal et n'aura donc qu'une action à court terme.

3.4.4- Voies de biosynthèse de l'acide salicylique

L'acide salicylique est biosynthétisé dans les plantes par deux voies enzymatiques distinctes, une première à partir de l'acide isochorismique (AIC) et une seconde à partir de la phénylalanine, elle-même provenant de l'acide chorismique²²² (Schéma 4).

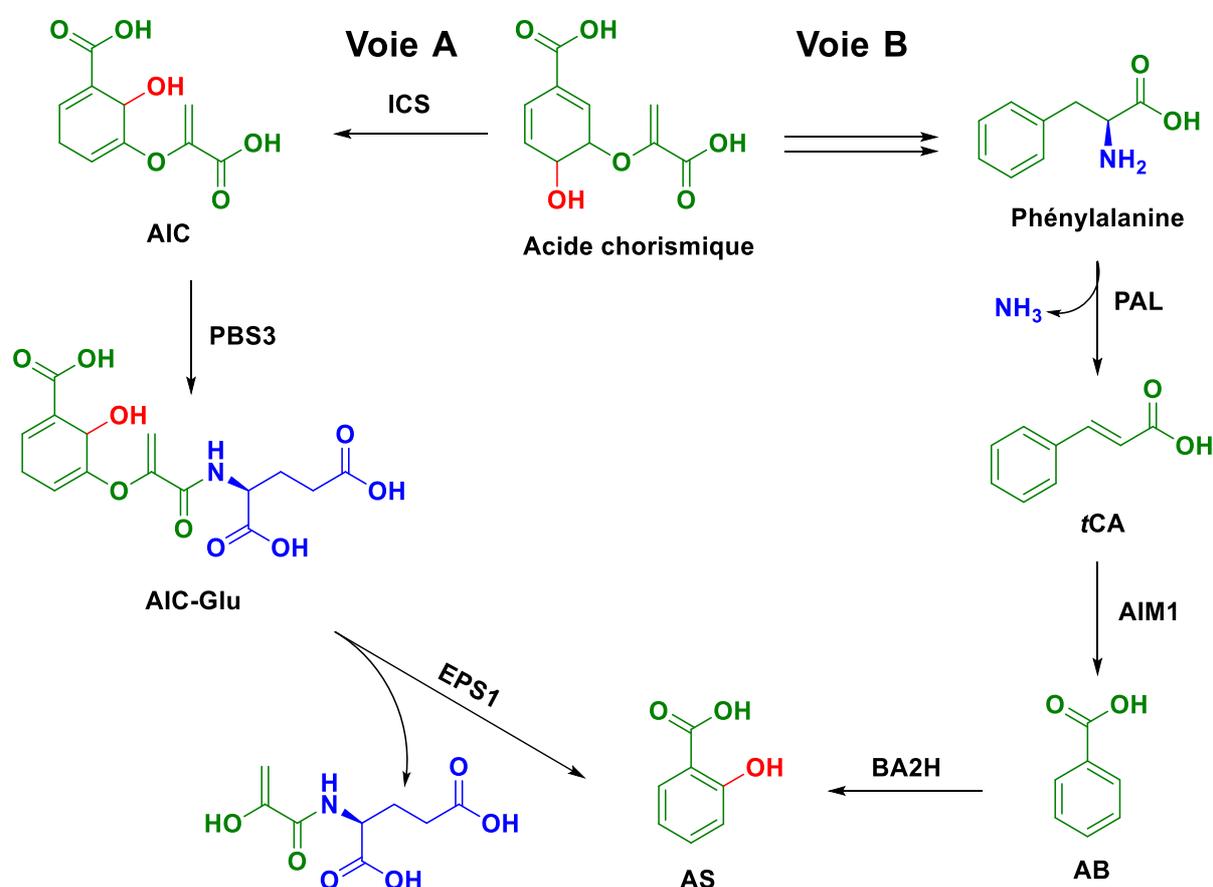


Schéma 4. Voies de biosynthèse de l'acide salicylique (d'après Lefevre *et al*²²²).

Ces deux voies de biosynthèse de l'AS seront présentées de façon simplifiée. La voie de l'acide isochorismique AIC (**Voie A** ; Schéma 4) passe par une biosynthèse en 3 étapes enzymatiques. La première étape de cette voie est une conversion de l'acide chorismique en son isomère acide isochorismique AIC par l'isomérase IsoChorismate Synthase (ICS). La seconde étape va convertir l'acide isochorismique en un conjugué acide isochorismique-acide glutamique (AIC-Glu) qui est obtenu

par le gène PBS3 caractérisé à ce jour uniquement chez *Arabidopsis*^{223,224}. Ce conjugué AIC-Glu peu stable, est spontanément converti en acide salicylique par une acyltransférase EPS1²²⁴ (Enhanced Pseudomonas Susceptibility 1). Cette dernière étape de la voie enzymatique reste encore peu décrite et n'est pas totalement élucidée à ce jour^{222,225}.

La seconde voie de biosynthèse à partir de la phénylalanine est un chemin en quatre étapes enzymatiques (**Voie B** ; Schéma 4). Nous ne nous attarderons pas sur les étapes de conversion de l'acide chorismique en phénylalanine qui sont complexes. La phénylalanine va être convertie en acide trans-cinnamique tCA avec libération d'ammoniac (NH₃) par une phénylalanine ammonia-lyase (PAL). L'acide *trans*-cinnamique est à son tour converti en acide benzoïque AB *via* l'enzyme AIM1 par une réaction de β-oxydation de l'insaturation (double liaison). L'enzyme AIM1 appartient à la famille des protéines multifonctionnelles et a été identifiée chez *Arabidopsis* et le riz^{226,227}. Cette famille d'enzymes joue un rôle majeur dans le métabolisme des acides gras et elle est également essentielle au métabolisme des aminoacides²²². La dernière étape de cette biosynthèse est la conversion de l'acide benzoïque en AS par une hydroxylase de l'acide benzoïque qui n'a pas été identifiée. Cela peut être dû à la grande variété d'enzymes pouvant remplir ce rôle. En 1995, Leon *et al*²²⁸ ont suggéré qu'une monooxygénase P450, la BA2H (Benzoic Acid 2-Hydroxylase) était capable d'accomplir cette tâche chez le tabac, mais aucun résultat complémentaire ne fût publié.

3.4.5- Les formes actives de l'acide salicylique chez les plantes

Après avoir été biosynthétisé par l'une des deux voies enzymatiques (AIC ou phénylalanine ; Schéma 4), l'acide salicylique peut subir des modifications dans la plante afin d'obtenir de nouvelles espèces actives (métabolites) pour les végétaux. Ainsi, les formes actives de l'AS peuvent se présenter comme des conjugués avec des sucres (Conjugués AS-Glc et 2-AS-Glc) ou avec des acides aminés (Conjugué AS-Asp), mais également sous forme d'ester méthylique (MeAS) ou de sulfonyle (2-SO₃-AS). Ces différentes formes (Schéma 5) seront brièvement introduites ainsi que leurs principaux intérêts dans les processus biologiques et physiologiques des plantes.

L'acide salicylique peut être converti en conjugués AS-Glc par glycosylation de la fonction acide carboxylique conduisant à l'ester glucosidique ou 2-AS-Glc par glycosylation de la fonction phénol menant à l'éther glucosidique. Ces conversions sont réalisées par l'intervention de glycosyltransférases^{229,230}. Ces formes conjuguées jouent un rôle important dans le processus de défense des plantes. En effet, ces dernières vont avoir tendance à s'accumuler en grandes quantités dans les vacuoles (organes de stockage) des plantes afin d'être converties en AS par hydrolyse^{231,232}. Lors d'une attaque par un agent pathogène, les concentrations en AS et en conjugués (AS-Glc et 2-AS-Glc) vont s'accroître de façon significative et activer la voie dépendante de la résistance systémique acquise²³¹.

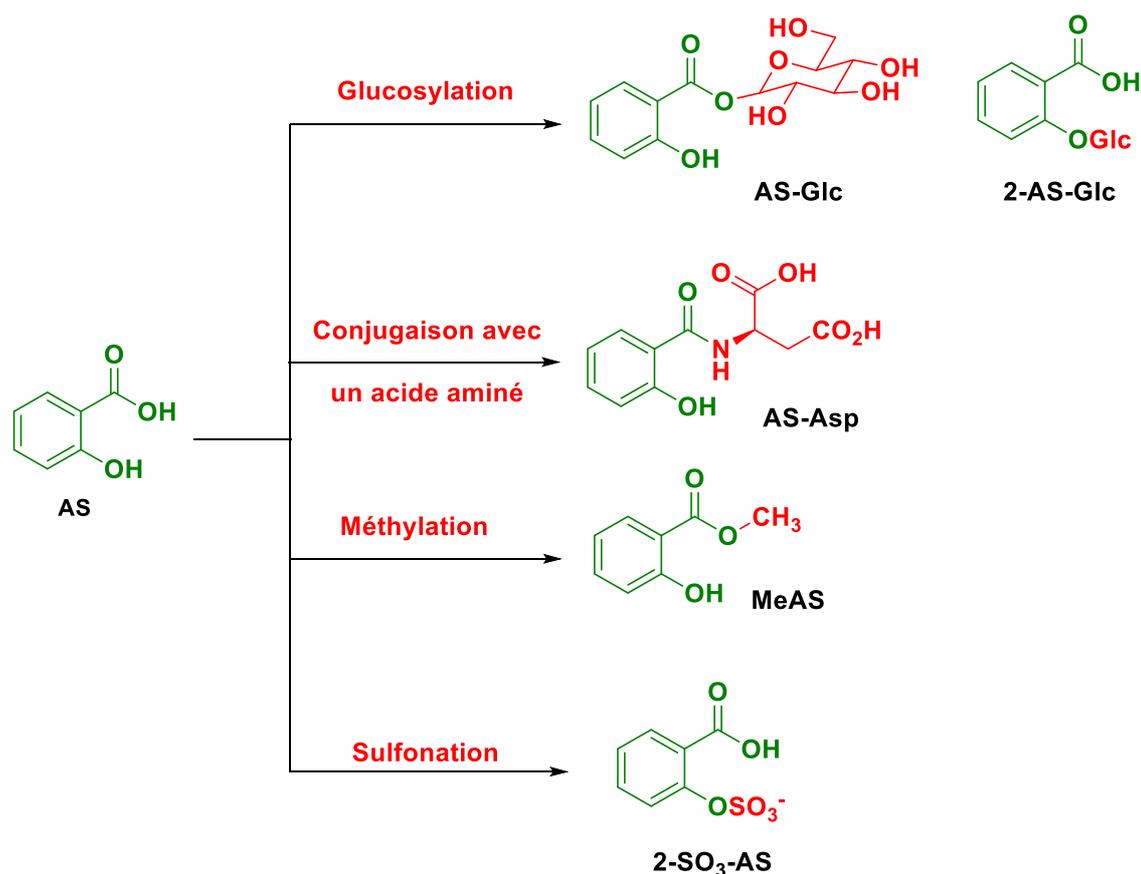


Schéma 5. Principales formes actives de l'acide salicylique présentes dans les plantes (d'après Dempsey *et al*²³³).

Les conjugués acide salicylique-aminoacides sont peu décrits dans la littérature contrairement à ceux de l'acide jasmonique JA avec notamment sa forme associée à l'isoleucine¹⁴¹⁻¹⁴³. À notre connaissance, le seul conjugué acide salicylique-aminoacide à avoir été détecté est le conjugué AS-acide L-aspartique (AS-Asp). Ce composé fut détecté dans des ceps de différentes variétés de vignes²³⁴, mais également dans *Phaseolus vulgaris*²³⁵ (haricot vert) et *Arabidopsis*²³⁶. Des auteurs ont montré la mobilité de ce composé chez *Arabidopsis* et une potentielle activation des gènes de défense PR de la plante²³⁷, mais qui n'est pas comparable à celle engendrée par l'AS.

L'AS peut également être converti en salicylate de méthyle MeAS par une BSMT1 (Benzoic/Salicylic Acid carboxyl MéthylTransférase²³⁸. MeAS, composé très volatil, peut être considéré comme une forme active de l'acide salicylique car il est impliqué dans des processus physiologiques tels que le développement de l'odeur florale afin d'attirer les insectes pollinisateurs²³⁹. Il est également engagé lors des réactions de défense des plantes, notamment dans les feuilles où l'expression de BSMT1 est induite en réponse à des sources de stress (abiotiques et biotiques)²⁴⁰⁻²⁴² et la production de MeAS qui en résulte est alors impliquée dans plusieurs niveaux de la signalisation de défense des plantes. Le salicylate de méthyle est également impliqué dans la résistance à des agents pathogènes et à des insectes. Il assure la résistance à certains insectes en attirant leurs prédateurs respectifs²⁴³ et c'est un composé

inducteur de la résistance à des agents pathogènes microbiens en servant de molécule signal pour la RSA²¹⁶.

Chez les mammifères, la sulfonation est une étape importante pour activer ou désactiver diverses hormones. Chez *Arabidopsis*, de nombreuses hormones telles que les flavonoïdes, l'hydroxyjasmonate et plus récemment l'acide salicylique ont été converties *in vitro* en composés sulfatés (groupement O-SO₃⁻) par des enzymes/protéines de la famille des Sulfotransférases^{244,245} (SOT). Ainsi, l'AS peut être converti en 2-SO₃-AS grâce à une SOT. Baek *et al*²⁴⁵ ont démontré qu'une surexpression d'une SOT (SOT12) favorisait l'accumulation de l'AS et induisait une résistance locale et également systémique. Les auteurs ont pu prouver le transfert *in vitro* du groupement sulfuryle (SO₃⁻) sur la position 2 (groupement phénol) de l'AS et ont émis l'hypothèse que cette protéine pouvait agir comme un transporteur d'organosulfates. Cette forme 2-SO₃-AS s'avère ainsi être un dérivé actif de l'AS ayant un rôle important dans l'induction des résistances locale (RLA) et systémique (RSA). C'est une molécule signal mobile qui a un intérêt majeur dans la stimulation des défenses naturelles des plantes.

L'acide salicylique peut donc être converti en différentes formes actives ayant toutes un ou plusieurs rôles bien définis dans des processus biologiques et physiologiques des plantes, avec un rôle majeur de cette hormone dans le développement des végétaux et dans les réactions de défense. Cependant, ces composés naturels ne sont pas les seuls analogues de l'AS à présenter un intérêt dans la stimulation des défenses naturelles des plantes. En effet, des analogues synthétiques présentent également des activités élicitrices similaires à celles de l'hormone naturelle.

3.4.6- Analogues synthétiques de l'acide salicylique

Grâce aux avancées réalisées dans le domaine de la synthèse organique, de nombreux composés synthétiques ayant des propriétés biologiques similaires (défenses des plantes) à l'acide salicylique ont pu être développés. Bektas et Eulgem²⁴⁶ ont décrit différents éliciteurs synthétiques parmi lesquels figurent des analogues de l'AS tels que l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA, Figure 7), le benzothiadiazole (BTH, Figure 7) ou encore le probénazole (PBZ, Figure 7). Nous nous intéresserons à ces trois analogues parmi tous les composés listés par les auteurs.

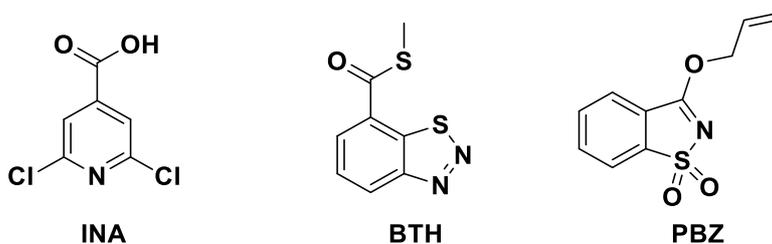


Figure 7. Structures des analogues synthétiques de l'acide salicylique (INA, BTH et PBZ).

L'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) fut identifié comme composé pour activer la résistance du concombre contre le pathogène fongique *Colletotrichum lagenarium*²⁴⁷. Une application par pulvérisation foliaire à une concentration de l'ordre de 100 µM a permis de protéger les plants de concombre contre cet agent fongique. L'INA est également capable d'induire une résistance aux agents pathogènes chez différentes plantes^{247,248} telles que les poiriers, les poivriers et le riz. Tout comme l'acide salicylique, l'INA est reconnu pour induire une RSA chez le tabac et *Arabidopsis*^{249,250}. L'AS et l'INA partagent également la capacité d'induire l'expression de gènes PR (Pathogenesis Related) et de résistance aux maladies²⁴⁶. L'INA peut être considéré comme un analogue synthétique fonctionnel de l'AS car il mime plusieurs effets biochimiques et physiologiques de la phytohormone. Cependant, l'acide 2,6-dichloroisonicotinique et ses dérivés sont phytotoxiques sur certaines cultures et n'ont pu être commercialisés²⁵¹. L'INA reste cependant employé à ce jour comme molécule modèle dans les études de RSA.

Le benzothiadiazole BTH, également connu sous le nom d'acilobenzolar-S-méthyl (ASM), appartient à la famille des acides carboxyliques de benzo[1,2,3]thiadiazoles. Tout comme l'INA, le BTH induit l'expression et la régulation de gènes PR et peut déclencher la RSA, en particulier chez *Arabidopsis*²⁵². Ces deux composés partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles comme le fait de ne pas induire d'accumulation d'AS dans les plantes^{253,254}. Le BTH, contrairement à l'INA, a été commercialisé en Europe sous le nom « BION® » en 1989 et aux États-Unis sous le nom « Actigard® » en 1990^{251,255}. Il a notamment été employé en tant qu'activateur de défense des plantes contre l'oïdium des céréales en Allemagne et en Suisse²⁵⁶. Cet analogue synthétique de l'AS est employé pour activer un large spectre de résistance de diverses espèces de plantes contre des agents fongiques, des bactéries, des nématodes ou bien encore des insectes²⁴⁶. En 1997, le BTH fut identifié comme inducteur potentiel de réponses immunitaires des plantes, en particulier chez le concombre contre *Colletotrichum lagenarium* (champignon phytopathogène)²⁵⁵

Des dérivés de 1,2-benzisothiazoles ont pu montrer un large spectre d'activités pharmacologiques allant de propriétés anti-inflammatoires²⁵⁷, antimicrobiennes²⁵⁵ ou encore antifongiques²⁵⁹. Certains de ces dérivés ont une activité similaire à celle de l'auxine AIA et ont été employés comme herbicides^{260,261}. Des chercheurs de la compagnie japonaise Meiji Seika Pharma Co., Ltd ont réalisé des tests avec des composés de cette famille de molécules²⁶² et ont découvert que le 1,1-dioxyde de 3-(allyloxy)benzoisothiazole (probénazole ; PBZ) pouvait être employé pour lutter contre la pyriculariose du riz^{262,263}. Le composé est commercialisé sous le nom d'Orizemate® depuis plus de 40 ans pour protéger les cultures de riz de cette maladie fongique, mais également contre des bactéries. Le PBZ présente également des activités similaires à celles de l'AS, en particulier l'induction de l'expression de gènes PR, l'accumulation d'AS et l'induction de la RSA chez *Arabidopsis*²⁴⁶.

D'autres analogues naturels et synthétiques de l'acide salicylique ont été étudiés et testés comme hormones de défense de plantes telles que des dérivés halogénés. Ainsi, les acides 4-chloro, 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique sont capables de mimer l'induction de l'expression des gènes PR1 rendant les plants de tabac résistants à la maladie de la mosaïque (TMV)²⁶⁴. L'acide 3,5-dichlorosalicylique est naturellement présent chez certaines plantes²⁶⁵ et il montre un intérêt dans la lutte contre la tavelure du pommier²⁶⁶ en étant plus efficace que l'acide 2,6-dichloroisonicotinique. Des analogues chlorés de l'acide benzoïque (3-Cl et 3,5-diCl) ont également un intérêt en induisant l'expression de gènes de défense basale contre *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*) chez *Arabidopsis*²⁶⁷. D'autres composés analogues de l'AS, tels que les acides 2-amino, 3 ou 4-hydroxy, 2,3 ; 2,4 ou 2,5-dihydroxybenzoïques, n'ont montré aucune activité dans l'induction de réactions de défense des plantes²⁶⁸⁻²⁷⁰.

4- La systémie

4.1- Définition

La systémie correspond à l'aptitude d'une molécule à se déplacer dans le système vasculaire de la plante. Une molécule est donc considérée comme « systémique » si elle est capable de pénétrer dans la plante pour atteindre les tissus conducteurs afin d'être transportée loin de la zone d'application (feuilles, racines)²⁷¹. Pour cela, le composé va emprunter les voies de transport à longue distance de la plante qui sont les tubes criblés du phloème^{272,273} et les vaisseaux du xylème²⁷⁴ transportant respectivement la sève phloémienne (sève élaborée) et la sève xylémienne (sève brute). La sève xylémienne est transportée par un courant ascendant et elle permet à la plante de diriger des petites molécules organiques, des ions et de l'eau issus du sol jusqu'aux sites stratégiques où se produit la photosynthèse. Les produits de la photosynthèse et les molécules provenant des racines sont distribués aux organes en croissance ou de stockage de la plante par la sève phloémienne. Cette sève circule dans les deux sens pour alimenter les racines et tubercules (si présents) et les organes aériens (bourgeons).

4.2- Avantages et inconvénients

La systémie est une propriété avantageuse pour des composés éliciteurs qui seraient doués d'une telle propriété. Cela signifie tout d'abord que les molécules sont pénétrantes et qu'elles seront ainsi protégées de la lumière et de l'eau (lessivages), mais surtout qu'elles sont capables de se déplacer dans l'ensemble de la plante.

Dans le cas d'une systémie xylémienne (apoplastique, Figure 8), la molécule devra être au contact de la graine ou des racines en étant appliquée directement sur le sol²⁷⁴. Puis, lors de la croissance de la plante, la substance sera transportée dans les parties aériennes de la plante par le courant de transpiration où elle pourra exercer son rôle (éliciteur, fongicide...). Un des avantages des produits apoplastiques est qu'ils pénètrent peu dans les organes de la plante tels que les fruits et graines et ne

présenteront donc qu'un risque très limité pour l'alimentation humaine ou animale. L'inconvénient majeur est le mode d'application de la substance active sur le sol ou la graine car son absorption ne sera que partielle. Le reste de la substance active se retrouve exposé au lessivage et présente alors un risque de pollution des eaux et des sols dans le cas de produits présentant des effets indésirables sur l'environnement et la santé humaine.

Dans le cas d'une systémie phloémienne (symplastique, Figure 8), la molécule sera entraînée vers les parties du végétal en voie de croissance telles que les apex caulinaire (extrémité de la tige) et racinaires (extrémités des racines), mais également vers les organes de stockage de la plante (tubercules, fruits)^{272,273}. Cette propriété semble plutôt avantageuse pour les composés tels que les éliciteurs (SDN), herbicides et autres fongicides car elle leur permet d'atteindre des zones stratégiques qui contrôlent le développement de la plante.

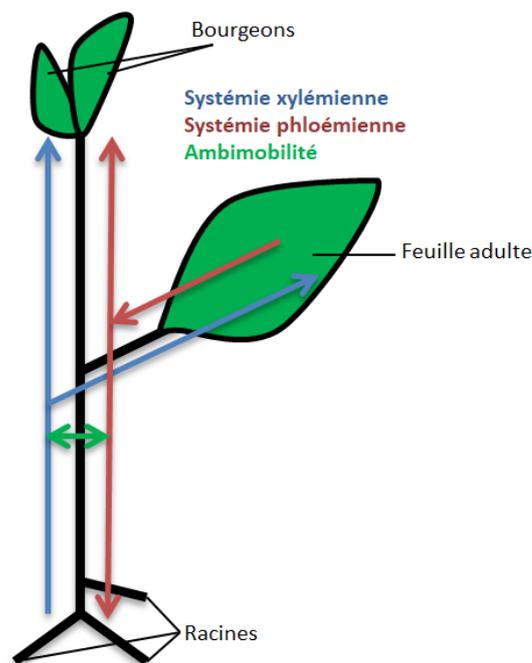


Figure 8. Les différents types de systémie chez la plante.

Dans certains cas, des échanges entre le phloème et le xylème le long des voies de transport peuvent permettre aux produits mobiles dans le phloème (phloème-mobiles) d'être partiellement repris dans le courant de sève brute (xylémienne) et leur assurer une meilleure distribution dans l'ensemble de la plante. Ces composés mobiles dans les deux voies de transport (phloème et xylème) sont dits « ambimobiles ». La systémie phloémienne et l'ambimobilité sont des propriétés avantageuses pour les différentes substances actives employées sur la plante et qui ne présentent pas d'inconvénient sur des cultures ne contribuant pas à l'alimentation animale ou humaine. Il faut cependant être vigilant quant à l'utilisation de ces composés systémiques, notamment sur la période d'utilisation, la compartimentation dans la plante et la spécificité de la cible.

4.3- Les sèves et voies de transport

4.3.1- Circulation des sèves phloémienne et xylémienne

La circulation de la sève élaborée ou phloémienne résulte d'une turgescence selon le modèle de flux de pression proposé par Münch en 1930. Les produits de la photosynthèse tels que les sucres vont s'accumuler dans les éléments conducteurs du phloème (cellules criblées) et générer un influx d'eau dans ces cellules qui se retrouvent dans un état de tension (pression de turgescence). Cette pression de turgescence (Figure 9) va permettre une circulation des solutés (sucres et eau) correspondant à la sève phloémienne dans les parties de la plante en voie de croissance.

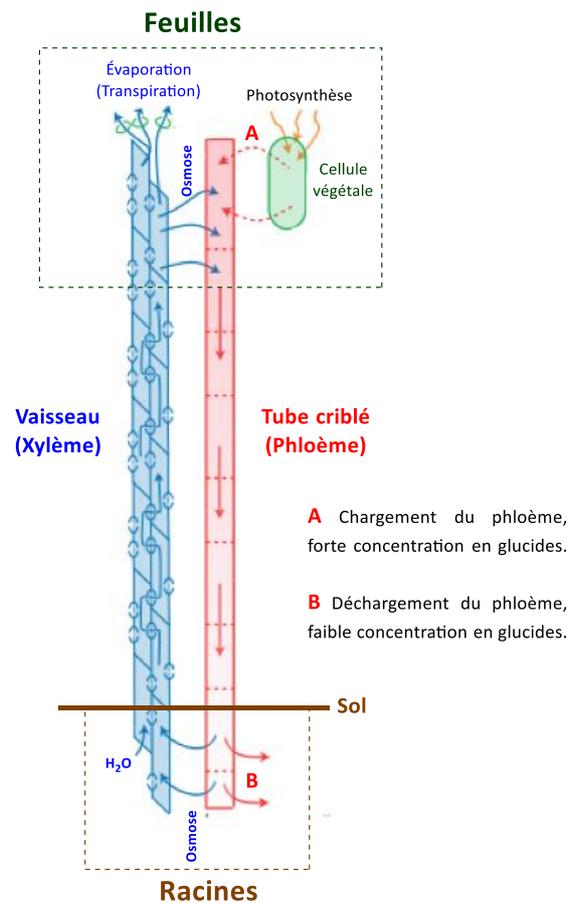


Figure 9. Schéma simplifié de la circulation des sèves phloémienne et xylémienne chez le végétal (d'après Jensen *et al*²⁷⁵).

La circulation de la sève brute ou xylémienne peut être expliquée par un mécanisme proposé par Dixon *et al*²⁷⁶ et la théorie de cohésion-tension qui stipule que la tension de transpiration, la propriété de cohésion de l'eau et l'hydratation des parois cellulaires sont de façon collective responsables de l'ascension de la sève brute. Ce mouvement d'eau dans le xylème est causé par une différence de pression entre les deux extrémités (feuilles et racines) de la plante. En effet, la pression en partie supérieure de la plante (feuilles) est moins importante que dans les racines (partie inférieure) de celle-ci. Cette pression négative est due à la transpiration (évaporation de l'eau) des parois cellulaires au

niveau des feuilles de la plante. Cette transpiration (Figure 9) va générer une tension (pression négative) qui est transmise à travers tout le xylème et jusqu'aux racines permettant l'ascension de l'eau et des nutriments (ions) nécessaires au développement de la plante.

4.3.2- Le phloème

Le phloème est un tissu qui se compose de plusieurs types de cellules possédant des fonctions spécifiques, mais nous nous attarderons ici sur le complexe formé par la cellule compagne et la cellule criblée. Ces deux cellules, bien qu'issues de la même cellule méristématique, possèdent cependant des différenciations et des fonctions très différentes. La cellule compagne est caractérisée par la présence d'un noyau volumineux, d'un vacuome réduit, de mitochondries, de plastes et de ribosomes (Figure 10). La cellule criblée subit une destruction programmée par autolyse partielle car celle-ci n'entraîne pas la mort des cellules durant la différenciation. Cette cellule ne possède pas de noyau et est également dépourvue d'appareil vacuolaire et de ribosomes. La partie centrale cellule semble vide, il ne reste que des mitochondries, des plastes et des éléments de réticulum en bordure de la membrane plasmique. La cellule compagne communique avec la cellule criblée par l'intermédiaire de plasmodesmes branchus et aux éléments criblés voisins (sus et sous-jacents) par des pores résultant de l'élargissement de plasmodesmes (Figure 10). Cet ensemble forme le tube criblé dans lequel la sève phloémienne s'écoule. Les cellules criblées contiennent des protéines spécifiques du phloème, les protéines-P. Ces protéines peuvent s'assembler afin de former un corps protéique (CP ; Figure 10) également appelé forisome. Lors d'une agression de la plante (blessure, stress chimique...), le forisome va se disperser et ses éléments vont boucher les pores du crible²⁷⁷.

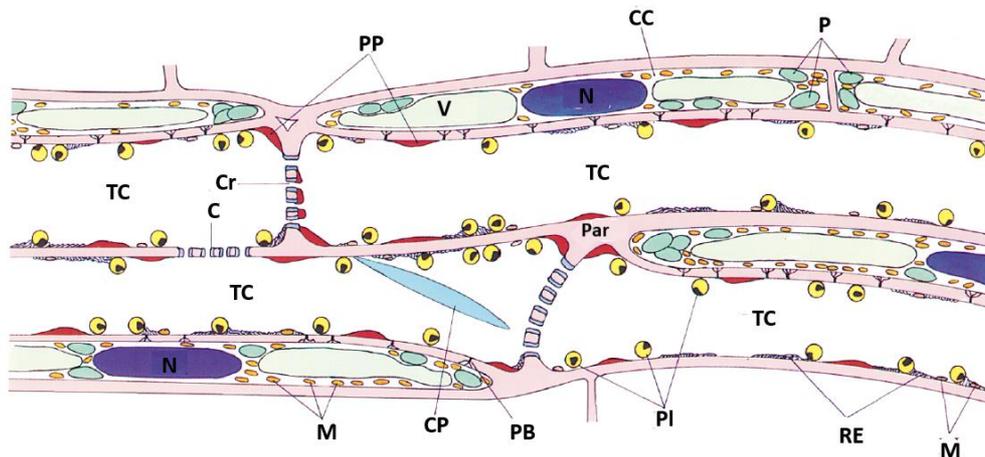


Figure 10. Reconstitution des tubes criblés (TC) et cellules compagnes (CC) dans *Vicia Fabia* (selon Knoblauch *et al*²⁷⁸). Les plasmodesmes branchus (PB) permettent de connecter les cellules compagnes (CC) et les tubes criblés (TC). Les mitochondries (M), les plastes du TC (PI) et le réticulum endoplasmique (RE) sont distribués le long de la membrane plasmique où sont agrégées des protéines pariétales (PP). C : callose, CP : Corps protéique, Cr : cribles, N : noyau, Par : paroi, P : plastes, V : vacuole.

4.3.3- Le xylème

Le xylème est également constitué de plusieurs types de cellules possédant chacune des fonctions spécifiques. Seuls deux types de cellules seront présentés ici, la cellule associée aux vaisseaux (CAV) et l'élément de vaisseau. Au contraire des cellules compagne et criblée, ces deux types de cellules proviennent de deux cellules méristématiques différentes. La différenciation de l'élément de vaisseau est une mort cellulaire programmée et complète, contrairement à la cellule criblée du phloème. La mort cellulaire va entraîner une lignification des parois longitudinales. La destruction des parois transversales peut également se produire chez certaines plantes (plus évoluées), avec pour conséquence que chaque élément de vaisseau communique avec le suivant par une perforation pour former un vaisseau. Chacun de ses vaisseaux est formé d'une ou plusieurs dizaines d'éléments de vaisseaux dans lesquels la sève xylémienne circule. L'élément de vaisseau est entouré d'un nombre variable de CAVs dépendant de l'espèce végétale. Cette cellule présente des similitudes structurales avec la cellule compagne du phloème, mais contrairement à celle-ci, elle ne communique pas avec l'élément de vaisseau par les plasmodesmes²⁷⁹. Par conséquent, les échanges de solutés avec la sève xylémienne sont régulés par la membrane plasmique de la CAV qui participe également au contrôle du pH de la sève²⁸⁰.

4.4- Transport et distribution des solutés dans la plante

4.4.1- La membrane plasmique

Chaque cellule est entourée par une membrane. Cette membrane, également appelée membrane plasmique (ou plasmalemme), permet de séparer l'intérieur de la cellule, appelé cytoplasme, de son environnement extérieur (milieu extracellulaire). La membrane plasmique permet à la cellule d'absorber et de retenir certaines substances, mais également d'en exclure. Cette circulation sélective des solutés à travers la membrane est possible grâce à des protéines de transport intégrées à la membrane (protéines intégrales, Figure 11), mais également par des protéines situées à l'extérieur de celle-ci (protéines périphériques). La membrane plasmique se compose d'une bicouche phospholipidique^{281,282} (Figure 11) qui se compose d'une partie hydrophile polaire (ou « tête »), et d'une partie hydrophobe. La tête hydrophile va être tournée vers l'extérieur de la bicouche phospholipidique tandis que la partie hydrophobe se retrouvera à l'intérieur de celle-ci. Cette bicouche lipidique va permettre d'établir une séparation entre le compartiment apoplastique (qui se compose de la paroi et de cellules mortes telles que les éléments de vaisseau) et le compartiment symplastique (partie interne bordée par la membrane plasmique).

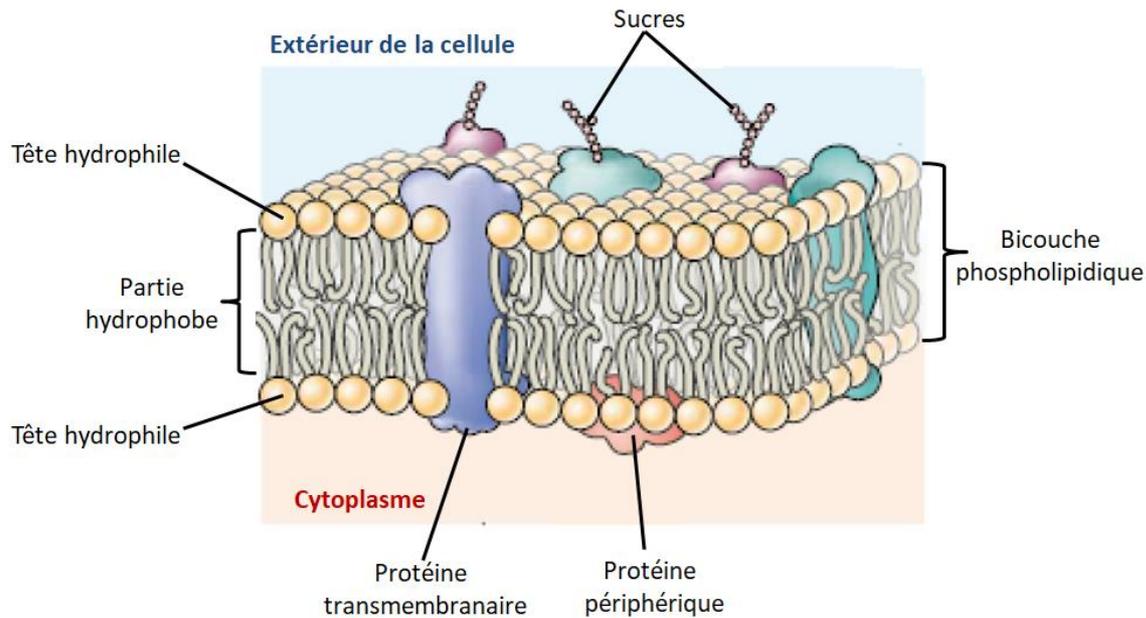


Figure 11. Représentation de la membrane plasmique (d'après Taiz et Zeiger²⁸³).

4.4.2- Le transport des composés *via* des protéines de la membrane plasmique

Des protéines membranaires jouent un rôle fondamental dans le transport des molécules élaborées et de nutriments (sucres, acides aminés) à travers la membrane plasmique. Ces protéines membranaires, également appelés transporteurs membranaires, se répartissent en trois groupes : les canaux, les transporteurs et les pompes (Figure 12). Les protéines de canal forment des pores ouverts dans la paroi de la membrane plasmique et permettent à des molécules de petite taille pouvant être chargées (cations, anions) ou neutres (eau)²⁸⁴ de passer au travers de la bicouche lipidique. Les transporteurs protéiques sont des transporteurs transmembranaires ne formant pas de pore dans la membrane, mais qui sont sélectifs vis-à-vis du soluté transporté (sucre, aminoacide, ion). Les solutés vont ainsi emprunter différents transporteurs protéiques pour être transportés à travers la membrane cellulaire par diffusion facilitée ou par transport actif primaire (Figure 12).

- *La diffusion simple (sans les canaux)*

Certaines molécules sont capables de traverser la membrane plasmique par un mécanisme de diffusion passive (ou simple). Au cours de cette diffusion, une molécule peut se dissoudre dans la bicouche phospholipidique, diffuser à travers celle-ci²⁸⁴ et se retrouver en solution aqueuse de l'autre côté de la membrane. Ce mécanisme n'implique aucun transporteur membranaire et suit le sens du gradient de concentration.

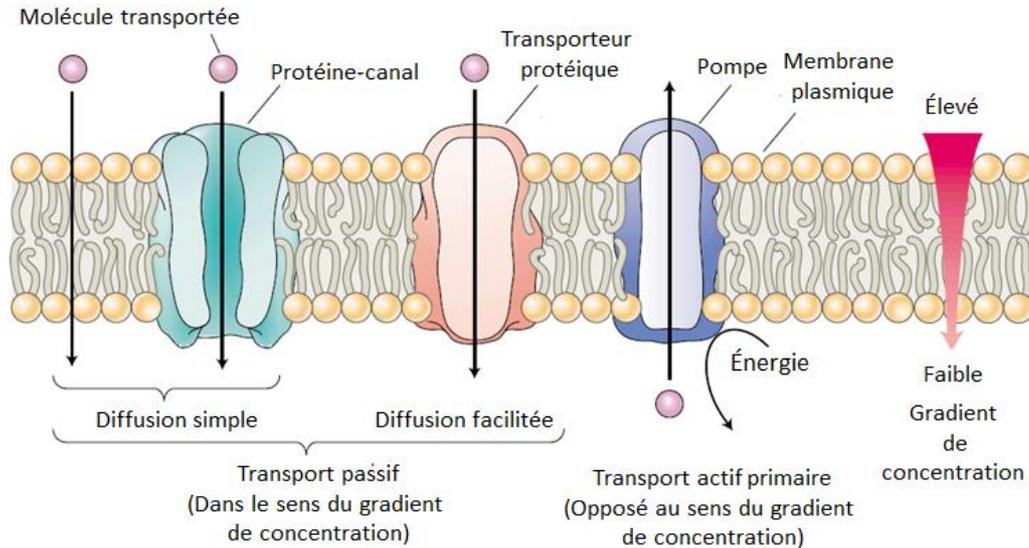


Figure 12. Représentations des diffusions simple et facilitée (transport passif dépendant du gradient de concentration) et du transport actif primaire de solutés à travers la membrane plasmique (d'après Taiz et Zeiger²⁸³).

- *La diffusion simple (assurée par des canaux)*

Cette diffusion est assurée par des protéines de la membrane qui fonctionnent comme des pores et jouent un rôle important dans les échanges d'espèces ioniques²⁸⁴ (cations et anions). Ces protéines membranaires sont également capables de contrôler la durée de la diffusion, la nature de l'ion transporté grâce à différentes parties du canal utilisées comme des filtres de sélectivité (nature, taille de l'ion) et des « portes » (durée de la diffusion).

- *La diffusion facilitée*

Ce second mode de diffusion est le résultat d'une interaction entre le soluté et un constituant du transporteur, et il se fait sans aucune dépense d'énergie car il se produit dans le sens du gradient de concentration au travers de la membrane plasmique. Cette diffusion, contrairement à la diffusion simple, se présente comme un type de transport saturable.

- *Le transport actif primaire*

Le transport actif de soluté par des transporteurs s'effectue dans le sens opposé au gradient de concentration de la membrane cellulaire. Ce type de transport nécessite un apport d'énergie supplémentaire provenant principalement de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine-triphosphate). Dans ce cas, les transporteurs protéiques sont appelés des pompes et le transport des solutés est dit « primaire » car il utilise directement l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP.

• *Le transport actif secondaire*

Le transport actif secondaire correspond au transport d'un soluté dans le sens croissant de son potentiel électrochimique (gradient de concentration) couplé à la diffusion facilitée d'un second soluté dans le sens décroissant de son potentiel électrochimique. Ce second soluté est la plupart du temps une espèce ionique (ions H^+ , Na^+ ...) dont la différence de potentiel électrochimique a été générée par un mécanisme de transport actif primaire (hydrolyse de l'ATP), cet ion étant appelé ion moteur. Les mécanismes secondaires engendrent également le transport de molécules élaborées comme des acides aminés ou des sucres par la diffusion facilitée du soluté moteur. Ainsi la diffusion de l'ion moteur peut être couplée au transport du second soluté (aminoacide, sucre) dans le même sens ou dans le sens opposé ; on parlera dans le premier cas de cotransport ou symport (**A** sur la Figure 12) et dans le second cas d'antiport (**B** sur la Figure 13).

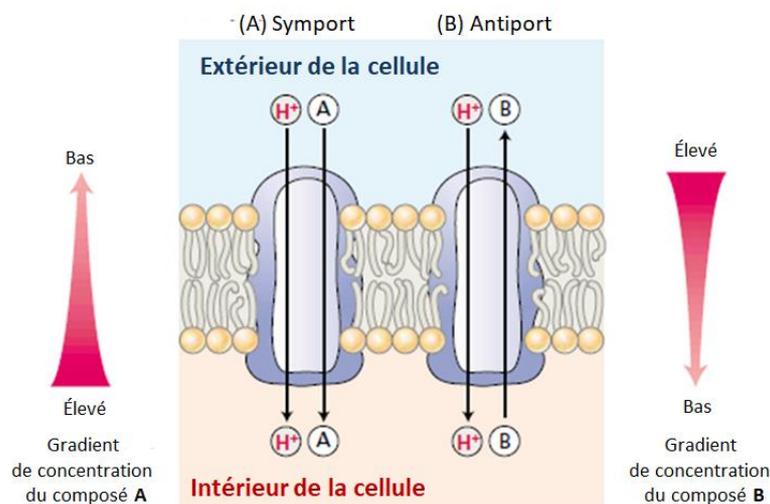


Figure 13. Représentation des deux types de transports secondaires (d'après Taiz et Zeiger²⁸³).

4.4.3- Distribution systémique des solutés

Un composé est défini comme systémique s'il est capable de pénétrer dans la plante pour atteindre les tissus conducteurs et être transporté loin de la zone d'application *via* le phloème et/ou le xylème. L'absorption de ces molécules systémiques par le végétal est principalement réalisée par une application foliaire ou racinaire. Ces composés sont distribués de façon systémique dans la plante en empruntant deux voies de déplacement définies comme apoplastique (ou apoplasmique) et symplastique (ou symplasmique).

L'apoplasme (ou aposplaste) correspond à la partie « non vivante » de la plante et se situe à l'extérieur de la membrane plasmique. Les déplacements à courte et longue distance se font respectivement à travers les espaces intercellulaires et dans les vaisseaux du xylème (Figure 14). Ces déplacements à courte et longue distance sont apoplastiques (ou apoplasmiques). Le symplasma (ou

symplaste) est défini comme la partie vivante de la plante qui est délimitée par la membrane plasmique. Les transports à courte et longue distance se font respectivement de cellule à cellule *via* les plasmodesmes et dans le phloème (Figure 14) et ils sont définis comme **symplastiques** (ou symplasmiques).

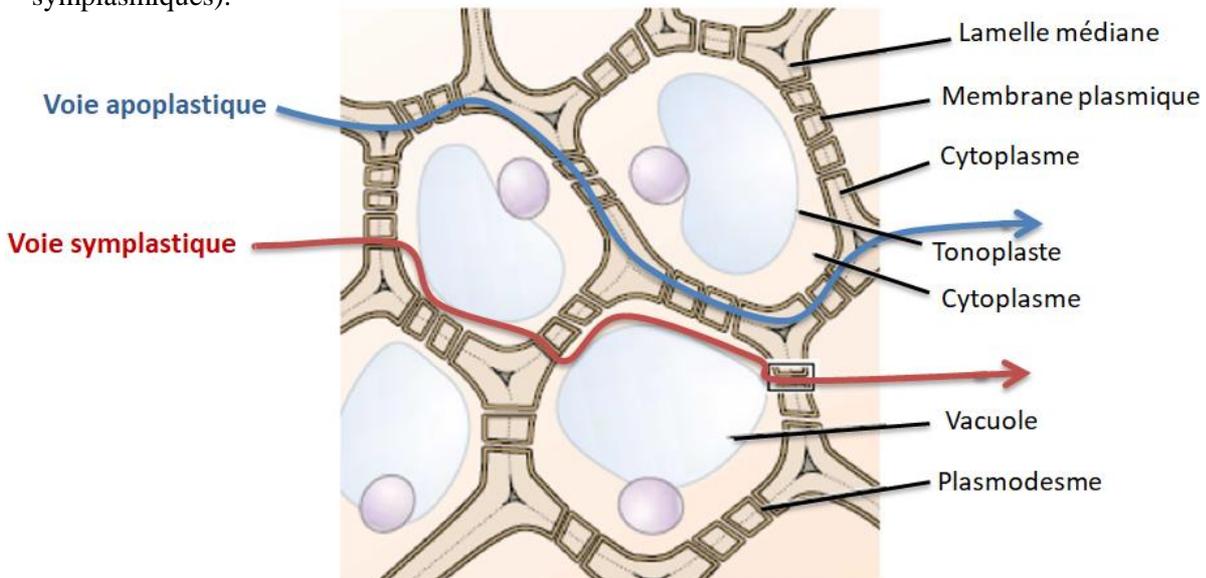


Figure 14. Représentation des voies **apoplastique** et **symplastique** (modifiée de Taiz et Zeiger²⁸³).

Les molécules systémiques (fongicides, herbicides, SDN) sont majoritairement appliquées par pulvérisation sur la surface foliaire de la plante et elles doivent dans un premier temps franchir la cuticule dont la couche externe est une surface cireuse très hydrophobe qui joue le rôle de barrière physique. Afin de franchir la cuticule, les composés systémiques ne doivent pas être trop hydrophiles, mais ils doivent être suffisamment lipophiles pour traverser les cires. Une fois la cuticule franchie, les molécules se retrouvent au niveau de la paroi cellulaire qui se compose de cellulose, d'hémicellulose et de pectine (polysaccharides). Une fois la paroi cellulaire franchie, les substances systémiques arrivent au niveau du complexe cellule criblée-cellule compagne du phloème selon trois voies : la voie apoplastique (par diffusion dans les parois puis franchissement la membrane du complexe cellule criblée-cellule compagne), la voie symplastique (par franchissement de la membrane plasmique) ou par l'association de ces deux voies. Les composés systémiques pourront ensuite être transportés à longue distance dans le phloème selon deux mécanismes.

4.5- Les mécanismes de transport des xénobiontes

4.5.1- Le mécanisme par piégeage d'acide

De nombreuses molécules à systémie phloémienne, en particulier des herbicides (2,4-D, MCPA, Picloram...), ont dans leurs structures une fonction acide carboxylique (COOH). Un mécanisme de franchissement de la membrane plasmique et d'accumulation dans la sève phloémienne a ainsi pu être proposé : le mécanisme dit de « piégeage d'acide » (Figure 15). Dans l'environnement extérieur de la cellule (apoplasme) où la valeur du pH est proche de 5,0 ; ces molécules possédant une fonction acide carboxylique ne sont que partiellement dissociées. La forme neutre ou non dissociée AH de ces composés est suffisamment apolaire ou lipophile pour traverser la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique et se retrouver dans le compartiment symplastique. Le pH de ce dernier est plus élevé avec une valeur proche de 7,5-8,0. Dans ce milieu, les molécules AH vont être majoritairement dissociées sous forme anionique A^- correspondant à un ion carboxylate $RCOO^-$. Sous cette forme, les composés ne peuvent plus franchir aussi facilement la membrane plasmique et restent ainsi piégés dans le symplaste. Ces molécules vont alors être entraînées à longue distance vers les organes en croissance de la plante *via* la sève phloémienne.

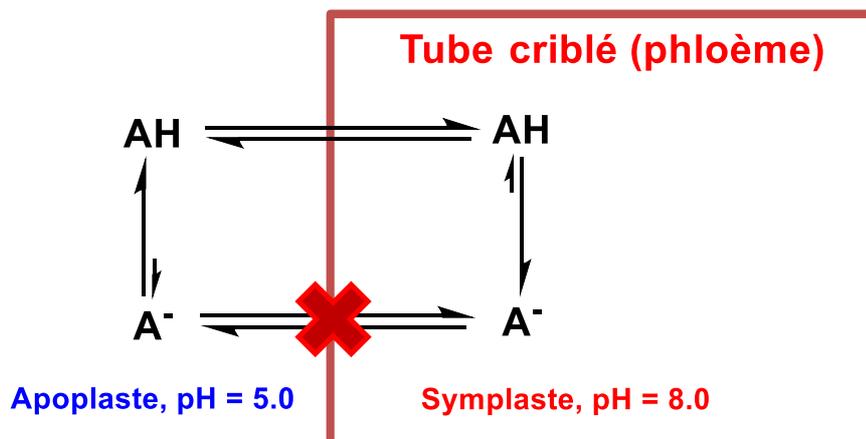


Figure 15. Représentation du mécanisme par piégeage d'acide dans le symplaste (adaptée de Bromilow et Chamberlain²⁸⁵).

Ce mécanisme par piégeage d'acide permet ainsi le transport de molécules (herbicides, fongicides, phytohormones) dans le phloème à condition que celles-ci possèdent une fonction acide carboxylique. Des études ont ainsi mis en évidence que cette fonction acide carboxylique était nécessaire pour le transport dans la sève phloémienne des herbicides tels que le 2,4-D²⁸⁶ qui, sans cette fonction acide, perd sa propriété de mobilité. Il est également possible de rendre un composé phloème-mobile en greffant à celui-ci une fonction acide. Ainsi, l'ajout d'une fonction acide carboxylique sur un fongicide non systémique de la famille des phénylpyrroles (fenpiclonil) a permis à ce composé d'être détecté dans la sève phloémienne de plantules de *Ricinus communis* (ricin)^{287,288}

4.5.2- Importance des transporteurs membranaires

La membrane plasmique est une barrière de diffusion hydrophobe séparant le cytoplasme du milieu extérieur, qui doit également être capable de faciliter et réguler de façon permanente les échanges (informations et substances) entre la cellule et son environnement extérieur. Les transports à plus grande échelle entre la plante et son environnement ou entre différentes parties (feuilles et racines) sont régulés au niveau cellulaire par des transporteurs membranaires²⁸³. Ces transporteurs sont capables d'améliorer la diffusion de l'eau et des ions à travers les membranes plasmiques des plantes²⁸⁹. Ces transporteurs membranaires sont des canaux ou des protéines porteuses. Les canaux sont des protéines transmembranaires, c'est-à-dire qu'elles traversent entièrement la membrane cellulaire et permettent notamment à l'eau (canaux d'eau) de traverser les membranes plus rapidement que par une simple diffusion à travers la bicouche lipidique²⁹⁰. Parmi tous les transporteurs présents, nous accorderons une attention particulière aux transporteurs d'acides aminés et de sucres.

Les acides aminés sont des molécules essentielles dans la structure, la physiologie et le métabolisme des cellules de l'ensemble des êtres vivants et sont également les constituants des peptides et protéines. Les acides aminés sont synthétisés par la plante et peuvent jouer des rôles très importants et variés chez celle-ci. Ils peuvent notamment modifier la perméabilité des membranes cellulaires, réguler le transport d'ions²⁸³ (H^+ , Na^+ , K^+) et protéger la plante lorsqu'elle est soumise à un stress environnemental (stress hydrique, exposition à des métaux lourds...). Ces composés sont transportés de leur site de biosynthèse aux autres parties de la plante telles que les organes puits (fruits, tubercules, graines...) *via* le phloème et le xylème dans lesquels des transporteurs d'acides aminés vont avoir un rôle essentiel dans le chargement et le déchargement de ces molécules²⁹¹.

Les sucres tout comme les acides aminés sont des molécules essentielles pour l'ensemble des êtres vivants et en particulier chez les plantes. Ces composés proviennent de façon directe ou indirecte de la photosynthèse et ils ont des rôles très variés. Ils sont notamment impliqués dans les processus de croissance et développement des plantes^{292,293}, la résistance des plantes contre les maladies fongiques causées par des agents pathogènes et également en tant que molécules de signalisation dans les mécanismes de défense^{294,295}. Les carbohydrates sont transportés dans la plante depuis le site de synthèse jusqu'aux organes puits par des transporteurs de polysaccharides (saccharose...) et de monosaccharides (glucose...) qui ont un rôle fondamental dans le chargement et le déchargement des sucres dans le phloème^{296,297}.

Ces différents mécanismes de transport, qu'il s'agisse du piégeage d'acide ou par des transporteurs spécifiques (aminoacides, sucres), sont de nouvelles cibles pour faciliter la circulation de molécules xénobiotiques (fongicide, herbicide, SDN) dans les sèves phloémienne et xylémienne (Figure 16).

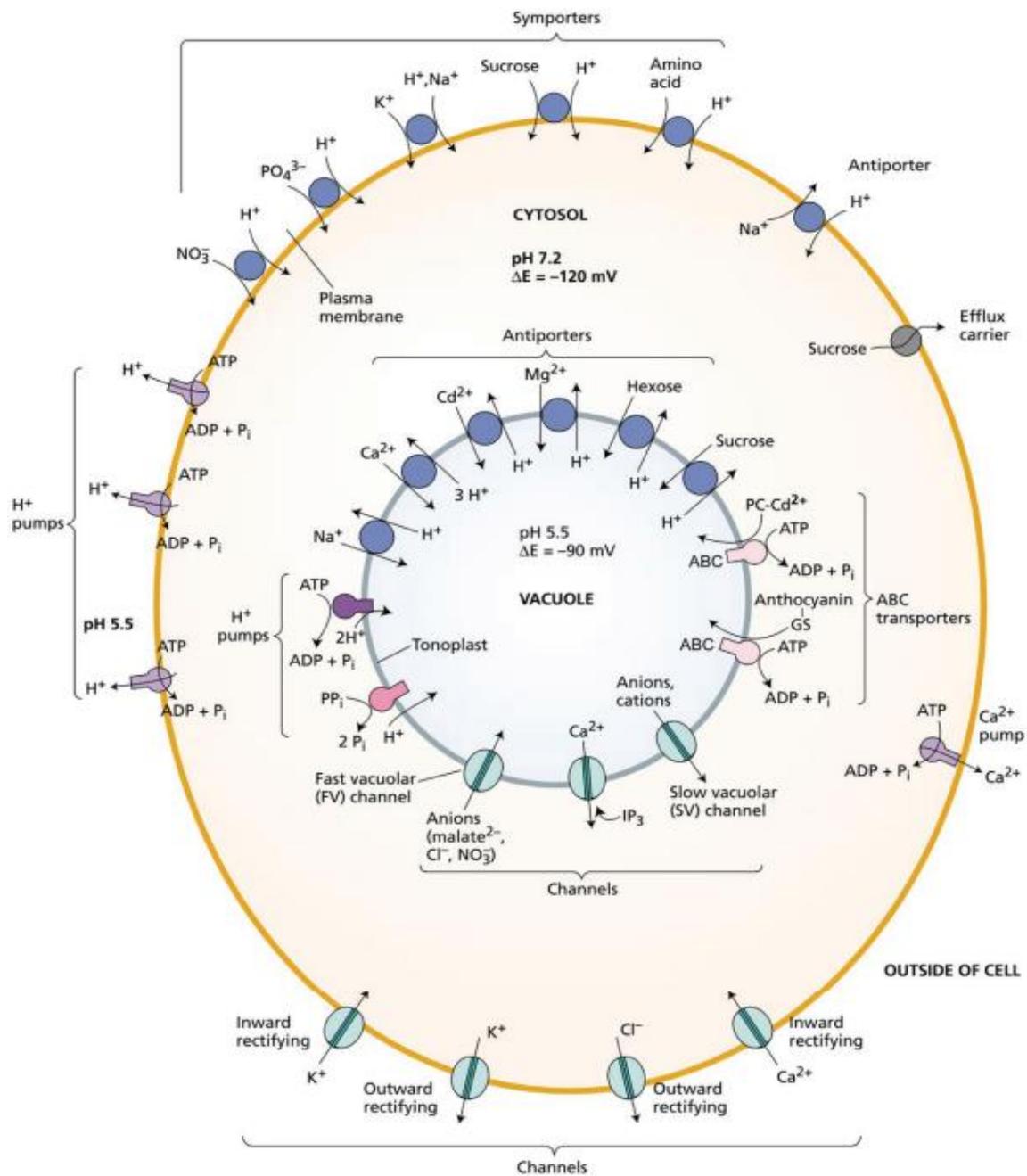


Figure 16. Aperçu des divers transporteurs des membranes plasmique et vacuolaire des cellules végétales (d'après Taiz et Zeger²⁸³).

4.6- Utilisation de transporteurs d'acides aminés et de sucres des plantes

Dans le domaine de la recherche pharmaceutique moderne, il a été admis que la diffusion transcellulaire passive et les mécanismes utilisant un transporteur peuvent coexister afin de contribuer à l'absorption de substances actives (médicaments) à travers les membranes biologiques. La diffusion a cependant été longtemps considérée comme l'unique voie d'absorption et de transport des composés phytosanitaires dans les plantes. L'activité potentielle de transporteurs de produits phytopharmaceutiques semblait invraisemblable, tout comme la synthèse de composés pouvant être sollicités par ces transporteurs.

Mais au cours de ces dernières décennies, la recherche a progressé et des découvertes ont permis de mettre en évidence le transport de xénobiotiques par des systèmes de transport identifiés chez les plantes. Il a été prouvé que le glyphosate, herbicide largement utilisé, est transporté vers les tissus racinaires de la plante par le phloème après une application foliaire^{298,299}. L'absorption de glyphosate à faible concentration par un transporteur a été mise en évidence dans les protoplastes (cellules végétales dont la paroi cellulaire a disparu) foliaires de *Vicia faba* (fève) via un transporteur de phosphate³⁰⁰. Une étude récente a pu également mettre en évidence le rôle majeur joué par des transporteurs d'acides aminés de série L (LAT1/LAT2, de l'anglais L-Type Amino Acid Transporter) dans l'absorption du glyphosate à travers les tissus épithéliaux de mammifères³⁰¹. Le 2,4-D, herbicide auxinique, peut être absorbé par les protoplastes de racines de maïs selon deux mécanismes, le mécanisme de piégeage d'acide et le transport actif via un transporteur d'auxine³⁰². Par ailleurs, le 2,4-D peut également être transporté à travers la membrane plasmique par le transporteur d'acides aminés ANT1³⁰³.

4.7- Prédiction des propriétés systémiques des xénobiotiques

La prédiction des propriétés systémiques de composés phytopharmaceutiques ou apparentés peut être réalisée par des modèles mathématiques développés depuis trois décennies et/ou par l'application de règles simples extrapolées depuis le domaine du médicament. Ces règles et modèles sont employés pour prédire et évaluer l'absorption et le transfert des composés à étudier en se basant sur les propriétés physicochimiques de ces derniers. C'est donc principalement la diffusion au travers de membranes biologiques qui va être prise en compte par ces prédictions. Pour cela, deux modèles ont été très largement utilisés pour déterminer le degré de mobilité de xénobiotiques, le modèle de Bromilow³⁰⁴ et le modèle de Kleier²⁷² (Figure 17) qui, tous les deux, font appel à la constante de dissociation acide pKa et au coefficient de partage octanol/eau Kow (ou Log P) des molécules. Le modèle de Bromilow a été élaboré de façon empirique à partir de résultats expérimentaux, alors que le modèle de Kleier est purement mathématique. Dans les deux cas, s'il y a une discordance entre les résultats expérimentaux et les modèles, par exemple un composé retrouvé concentré dans la sève phloémienne alors qu'il était prédit comme non mobile, il est alors possible de suspecter l'intervention d'un mécanisme de transport actif.

Pour les prodrogues employées dans le domaine médical, la biodisponibilité orale et la perméabilité membranaire passive sont les propriétés déterminantes pour l'efficacité de celles-ci. Nous évoquerons ici simplement deux modèles de prédiction relativement simples et applicables à un grand nombre de molécules : la règle des cinq de Lipinski³⁰⁵ (« Rule of five » en anglais ou Ro5) ainsi que les règles établies par Veber³⁰⁶. La règle des cinq de Lipinski³⁰⁵ stipule que pour qu'une substance soit active par voie orale, cette dernière doit : i) Posséder un nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène (liaisons OH, NH, SH) inférieur ou égal à cinq ; ii) Posséder un nombre d'atomes accepteurs de liaisons hydrogène (N, O, S...) inférieur ou égal à dix ; iii) Avoir une masse moléculaire inférieure à 500 daltons (Da) ; iv) enfin, avoir un coefficient de partage octanol-eau (log P) inférieur ou égal à 5. La règle de Veber³⁰⁶ stipule que pour qu'une substance soit active par voie orale, celle-ci doit : i) Posséder un nombre de liaisons à libre rotation inférieur ou égal à 10 et ii) Avoir une surface polaire ne dépassant pas 140 Å².

Par analogie, ces approches ont ensuite été employées pour les composés agrochimiques³⁰⁷⁻³¹⁰ afin de cribler et d'optimiser les propriétés de composés candidats. Le processus de criblage va permettre de sélectionner des molécules censées présenter de bonnes propriétés d'absorption ou de perméabilité membranaire et donc des propriétés physico-chimiques appropriées pour être définies comme des substances actives³⁰⁷. Hao *et al*³¹¹ ont établi des règles pour les composés pouvant être considérés comme des pesticides qui sont dérivées des règles de Lipinski pour les médicaments. Ces règles stipulent que les pesticides employés possèdent : i) Un nombre d'atomes accepteurs de liaisons hydrogène inférieur ou égal à 6 ; ii) Un nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène inférieur ou égal à 2 ; iii) Un poids moléculaire inférieur ou égal à 435 Da ; iv) Un log P inférieur ou égal à 6 ; v) Un nombre de liaisons à libre rotation inférieur ou égal à 9 et vi) Un nombre de liaisons aromatiques inférieur ou égal à 17.

5- La stratégie de prodrogues vectorisées

5.1- Concept et définition du concept de prodrogue

Le terme actuel de prodrogue fut introduit pour la première fois dans le courant des années 1950 par Adrien Albert³¹² et il définit des substances qui sont inactives par elles-mêmes, mais qui deviennent actives par biotransformation. Ce concept fut ensuite complété par Harper en 1959 lorsqu'il introduisit le terme de « latence » pour faire référence aux prodrogues spécifiquement conçues pour nécessiter une bioactivation³¹³. La définition la plus appropriée du terme « prodrogue » reste aujourd'hui celle de l'IUPAC³¹⁴ qui stipule « *Une prodrogue est un composé qui subit une biotransformation avant de présenter des effets pharmacologiques* » (biologiques dans le cas des plantes). La prodrogue peut ainsi être définie comme un dérivé inactif d'une substance active subissant une transformation enzymatique et/ou chimique *in vivo* afin de libérer cette molécule parent (drogue) pour qu'elle puisse exercer son/ses activité(s) pharmacologique(s)/biologique(s)^{315,316}.

Pour être transportées dans le système vasculaire de la plante, toutes les molécules (pesticides, SDN) doivent franchir la membrane plasmique avant de pénétrer dans le symplasme²⁷⁴. Le mécanisme d'entrée du xénobionte dans le symplasme va être un paramètre crucial qui va influencer le transport à longue distance et la distribution du composé dans l'ensemble du végétal. Afin d'optimiser la systémie de la substance active, une approche classique est de modifier les propriétés physico-chimiques de celle-ci afin d'améliorer sa diffusion au travers de la membrane plasmique³¹⁷. C'est aussi une approche couramment employée dans le domaine du médicament pour améliorer l'absorption intestinale³¹⁸.

5.2- La stratégie de prodrogue

La stratégie de prodrogue est avant tout employée pour améliorer les propriétés physicochimiques, mais également biologiques d'une molécule parente afin d'améliorer sa distribution dans l'organisme ou dans une zone ciblée de ce dernier³¹⁹. La nouvelle molécule (prodrogue) va être inactive hors de la zone ciblée (tumeur, milieu cellulaire...), mais avec certaines propriétés physico-chimiques (stabilité, solubilité, lipophilie, etc.) optimisées. Une fois dans l'organisme, la prodrogue subira une biotransformation *via* une réaction chimique et/ou enzymatique afin de libérer la drogue et lui permettre d'exercer son activité pharmacologique/biologique (Schéma 6). Au cours des vingt dernières années, le nombre de drogues classifiées comme prodrogues a augmenté de façon significative (10 %) dans le monde³²⁰.

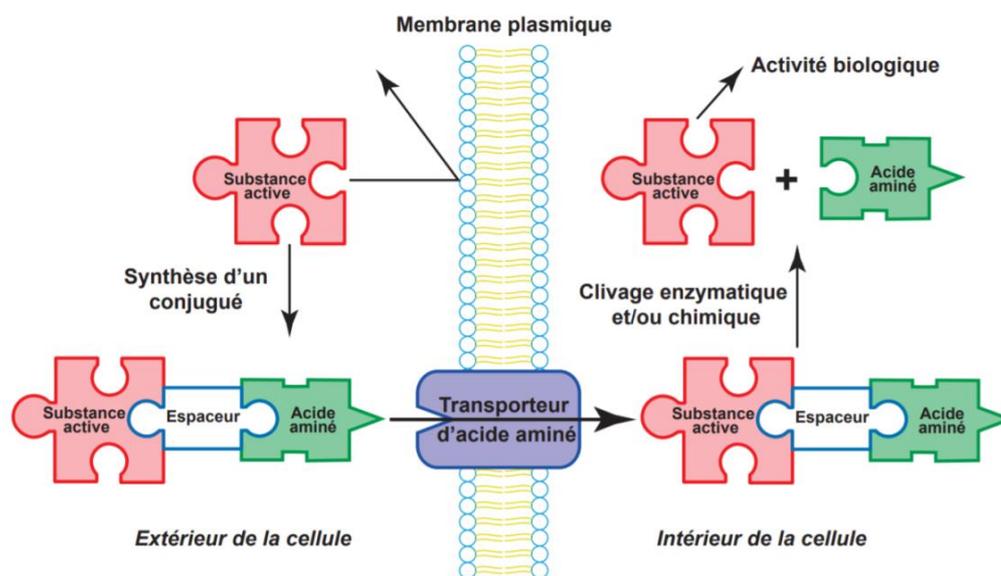


Schéma 6. Représentation du concept de prodrogue (adapté d'après Rautio *et al*³²¹).

La stratégie de prodrogue est notamment appliquée dans des traitements de maladies inflammatoires³²², cardiovasculaires³²³, en oncologie³²⁴, mais peut également concerner le milieu végétal. En effet, les plantes sont capables de produire par voie enzymatique des conjugués entre des

molécules endogènes qui peuvent s'associer à des sucres ou des acides aminés. Ainsi, comme nous l'avons déjà mentionné (voir § 3.2.3, pages 20-21), l'acide jasmonique peut se conjuguer à l'isoleucine afin de former une « prodrogue » naturelle¹⁴¹⁻¹⁴³. Cette stratégie de bioprécurseur peut aussi être transposée à des xénobiotiques (pesticides, composés SDN) afin qu'ils puissent se retrouver dans le système vasculaire des végétaux (voir § 4.6, page 42) avant de libérer ultérieurement la matière active.

5.3- Le transport de substances actives par des transporteurs membranaires

L'une des propriétés intéressantes qui peuvent être conférées par la stratégie des prodrogues est le transport de ces substances par des transporteurs membranaires spécifiques³²⁵. Ces derniers sont reconnus comme déterminants dans l'absorption, l'entrée de la substance active dans les zones ciblées et l'excrétion (élimination)³²⁶. Plus de 400 transporteurs membranaires sont connus et répartis en deux grandes familles : les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette en anglais) et les transporteurs de solutés SLC (Solute Carrier en anglais)³²⁷. Des tentatives ont été réalisées pour améliorer l'absorption des drogues en ciblant des transporteurs spécifiques³²⁸. Les transporteurs couramment exploités sont des transporteurs d'acides aminés, de peptides et de glucose. Nous nous intéresserons ici aux transporteurs d'acides aminés et de glucose.

5.3.1- Les transporteurs d'acides aminés de série L

Les transporteurs d'acides aminés de série L sont l'une des principales voies d'entrée des acides aminés. Parmi ces transporteurs d'acides aminés, nous porterons un intérêt aux transporteurs LAT1-4³²⁹ (L-type amino acid transporter) et plus particulièrement au transporteur LAT1 qui est surexprimé dans le cas de divers cancers³³⁰. Ce transporteur est un échangeur indépendant du sodium qui a été cloné pour la première fois en 1998^{331,332}. LAT1 intervient dans la distribution vers des tissus de divers organes tels que le cerveau, l'intestin et les reins^{333,334} et il est fortement exprimé dans les membranes de la barrière hémato-encéphalique (BHE)^{332,335,336}. Il régule notamment le transport d'acides aminés à travers la BHE et il favorise le passage de composés de série L dont la charge est neutre³³⁶ avec des chaînes latérales volumineuses et/ou ramifiées³³⁷.

L'exploitation du transporteur LAT1 pourrait être une stratégie intéressante pour renforcer le franchissement de la BHE afin d'améliorer l'administration de drogues associées à des acides aminés dans le système nerveux central. La L-dihydroxyphénylalanine L-DOPA (Figure 18-1) est une prodrogue employée dans le traitement de la maladie de Parkinson et qui est transportée dans le cerveau par LAT1^{337,338,342}, alors que sa molécule parent, la dopamine, n'est que peu transportée dans la BHE en raison de sa nature hydrophile.

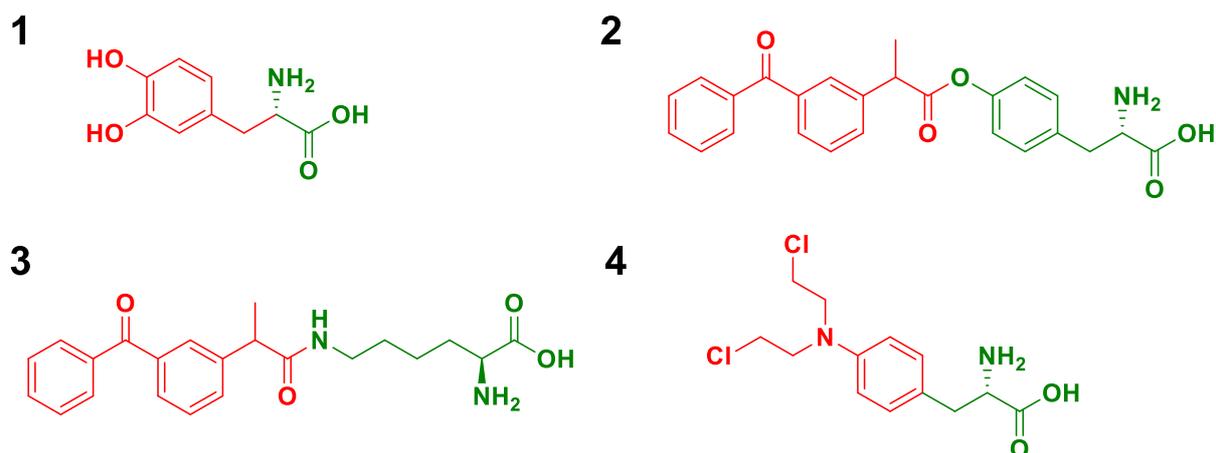


Figure 18. Structures de prodrogues d'acides aminés. **1**, L-dihydroxyphénylalanine L-DOPA³³⁸. **2**, Conjugué Kétoprofène-L-tyrosine³³⁹. **3**, Conjugué Kétoprofène-L-lysine³⁴⁰. **4**, Melphalan³⁴¹.

La prodrogue conjuguant le Kétoprofène à la L-tyrosine (Figure 18-2) est un exemple d'application réussie de l'absorption par le LAT1³³⁹ car il s'agit du premier conjugué d'acide aminé à être non seulement reconnu, mais également transporté de façon active à travers la BHE par ce transporteur. Un second conjugué de Kétoprofène associé cette fois-ci à de la L-lysine (Figure 18-3) a également été capable de franchir la BHE par l'intermédiaire du transporteur LAT1³⁴⁰. Le transport de ces prodrogues Ketoprofène-acide aminé permettrait de transporter de façon ciblée la drogue dans le cerveau³⁴³. Le melphalan (Figure 18-4) est un agent alkylant employé dans le traitement de cancers du cerveau et qui est transporté à travers la BHE chez le rat par un transporteur d'acides aminés neutre³⁴¹. Les prodrogues d'acides aminés ont pu mettre en évidence leur capacité à améliorer l'administration des drogues ayant une faible solubilité aqueuse et perméabilité. Elles ont également été employées avec succès pour obtenir une libération prolongée de la substance active et améliorer la stabilité métabolique³⁴⁴.

Cette stratégie de substances actives associées à des acides aminés peut également être appliquée au domaine végétal car les plantes possèdent également des transporteurs d'acides aminés. Des travaux initiés par Dufaud *et al*³⁴⁵ ont permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice sur le transport de thréonine de deux molécules associant l'herbicide 2,4-D et un alcool triazolique respectivement à la L-lysine et à l'acide L-aspartique (Figure 19-1a et 1b), ceci en conservant la fonction α -aminoacide libre. Ces conjugués ont inhibé l'absorption de thréonine (acide aminé protéinogène) et le chargement du phloème par les tissus foliaires, laissant supposer ainsi que ces herbicides modifiés pouvaient être reconnus par un transporteur d'acides aminés³⁴⁵.

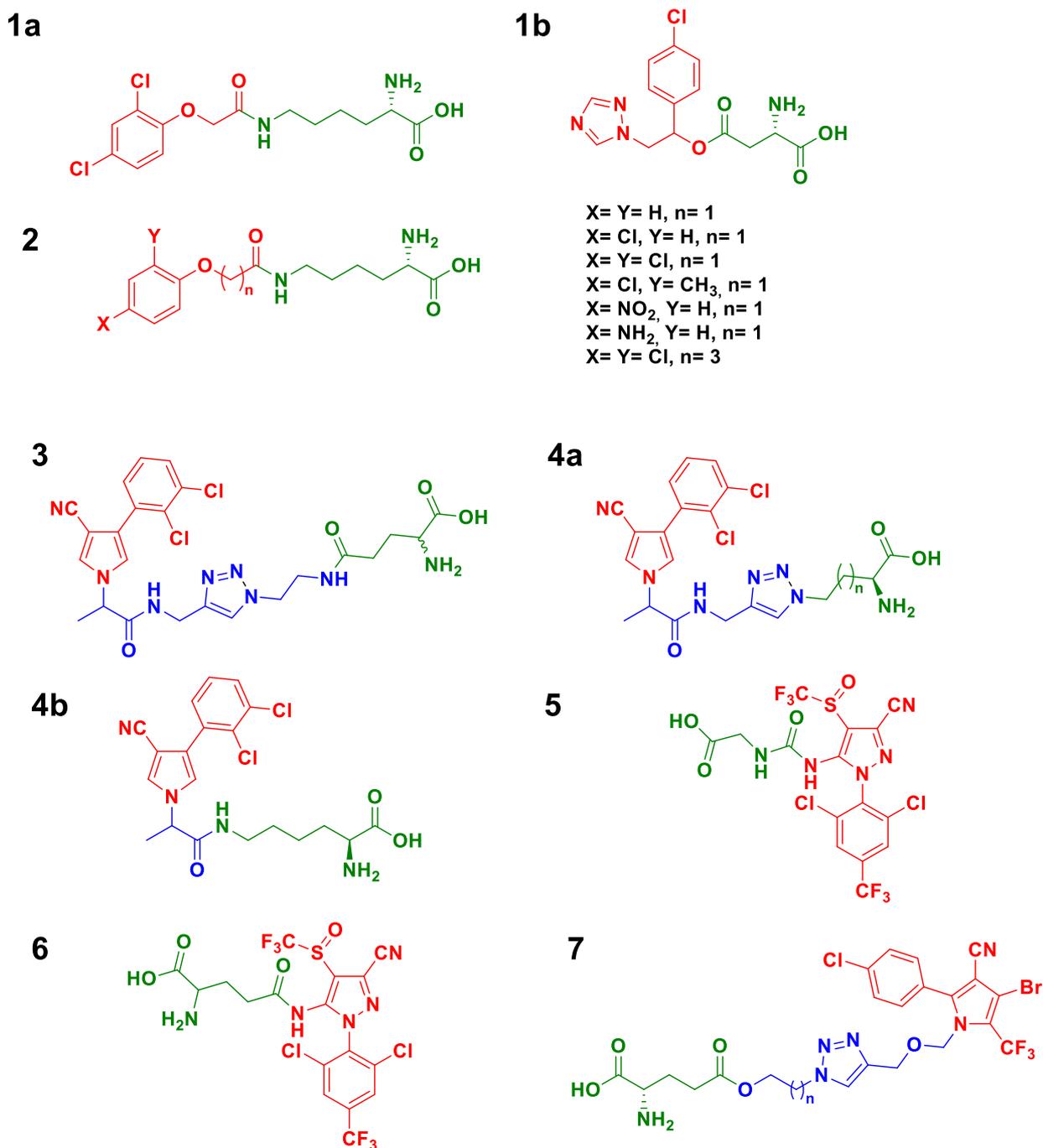


Figure 19. Structures de différents conjugués pesticide-acides aminés. **1**, Conjugués 2,4-D-lysine (**1a**) et alcool triazolique-acide aspartique³⁴⁵ (**1b**). **2**, Conjugués dérivés auxiniques-lysine³⁴⁶. **3**, Conjugué fenpiclonil acide glutamique³⁴⁷. **4**, Conjugués Fenpiclonil-aminoacide avec un espaceur triazolique³⁴⁸ (**4a**, $n = 1$, Prodrogue fenpiclonil-acide diaminobutyrique; $n = 3$, Prodrogue Fenpiclonil-lysine) ou sans espaceur (**4b**, conjugué fenpiclonil-L-lysine). **5**, Conjugué Fipronil-glycine³⁴⁹. **6**, Conjugué fipronil-acide glutamique. **7**, Conjugués Tralopyril-acide glutamique avec un espaceur triazolique³⁵⁰ ($n = 2-10$).

Une autre étude, utilisant cette fois-ci un large panel de dérivés d'acides phénoxyalcanecarboxyliques associés à la L-lysine (Figure 19-2), a permis de démontrer que les transporteurs d'acides aminés des plantes sont capables de reconnaître de nombreuses substances conjuguées avec des propriétés physicochimiques (structure, longueur de chaîne, K_{ow}) hétérogènes³⁴⁶. La distribution comparative du 2,4-D et de sa forme conjuguée à la lysine a été étudiée sur la fève et une différence significative a été mise en évidence dans certains organes de la plante³⁴⁵, notamment dans le système racinaire où l'accumulation de la forme conjuguée (2,4-D-lysine) se trouve être 5 à 10 fois supérieure à celle du xénobionte parent (2,4-D)³⁴⁵.

Plus récemment, des travaux réalisés par Wu *et al*³⁴⁷ ont permis de mettre en évidence que la conjugaison d'un acide aminé avec un fongicide non systémique pouvait rendre ce dernier mobile dans la plante. En effet, le fenpiclonil, fongicide de la famille des phénylpyrroles, est un composé non systémique, mais en associant ce dernier à un acide aminé (acide glutamique), les auteurs ont montré que ce conjugué fenpiclonil-acide glutamique (Figure 19-3) était mobile dans le phloème de plantules de ricin³⁴⁷. Les mobilités des deux isomères L et D des conjugués fenpiclonil-acide glutamique ont également été comparées et cela a permis de mettre en évidence une mobilité cinq fois plus importante pour l'isomère de configuration L, suggérant ainsi l'implication d'un ou de transporteurs stéréosélectifs chez les plantes³⁴⁷.

Ce conjugué fongicide-acide aminé présente un espaceur 1,2,3-triazole pour lier la substance active (fongicide) au nutriment (acide aminé). Cet espaceur peut être obtenu par une réaction dite de « chimie click » (« click chemistry » en anglais) et c'est l'un des plus employés dans la préparation de prodrogues. Il présente divers avantages dont sa stabilité^{351,352} et ses activités biologiques potentielles³⁵³. Marhadour *et al*³⁴⁸ se sont intéressés à l'influence de cet espaceur triazolique sur la systémie phloémienne de trois conjugués fenpiclonil-acide aminé liés par ce dernier (Figure 19-3 et 19-4a). Parmi ces conjugués, nous retrouvons le conjugué avec l'acide L-glutamique, mais également deux composés associés à l'acide L-2,3-diaminobutyrique (n= 1) et à la L-lysine (n= 3). Un quatrième conjugué étudié correspond au conjugué fongicide-L-lysine sans espaceur (Figure 19-4b). Une étude sur la relation structure-activité de ces quatre conjugués a été réalisée et a mis en évidence que le conjugué avec la chaîne latérale la plus courte en présence de l'espaceur (conjugué fenpiclonil-acide diaminobutyrique, n= 1) avait la meilleure mobilité dans les plantules de ricin. Les auteurs ont montré que la présence de cet espaceur triazolique n'avait pas d'impact négatif sur la mobilité des conjugués et que ces derniers étaient manipulés par un transporteur dépendant du pH et reconnaissant la fonction α -amino acide.

Par ailleurs, Xie *et al*³⁴⁹ ont travaillé sur des conjugués associant un insecticide non systémique, le fipronil, à des acides aminés. Le conjugué avec la glycine (Figure 19-5) s'est avéré mobile dans le phloème de *Ricinus communis* grâce à des transporteurs d'acides aminés, ceci, et contrairement aux conjugués évoqués précédemment, malgré l'absence d'une fonction aminoacide libre. En effet, les

auteurs ont pu montrer que ce composé était capable d'induire une surexpression de gènes permettant l'absorption et le chargement de ce dernier dans le phloème. Les auteurs ont poursuivi leurs études sur le fipronil en synthétisant un conjugué³⁵⁴ associant le fipronil aux deux énantiomères (D et L) de l'acide glutamique (Figure 19-6). L'isomère L a montré une meilleure mobilité phloémienne que la forme D. De plus, son activité biologique est comparable à celle du fipronil, faisant ainsi de cette prodrogue un candidat potentiel pour un insecticide phloème-mobile.

Des études ont également été réalisées sur l'insecticide non systémique Tralopyril³⁵⁰ conjugué à l'acide glutamique (Figure 19-7). Les auteurs ont étudié l'influence de la longueur de la chaîne carbonée, allant de 3 à 11 atomes de carbone entre l'espaceur triazolique et l'acide aminé, sur la mobilité phloémienne. Parmi les neuf composés synthétisés, quatre d'entre eux (n= 2-5) présentaient une systémie phloémienne permettant de confirmer les résultats de Marhadour *et al* sur les conjugués du fenpiclonil³⁴⁸ et la longueur de la chaîne carbonée. Les auteurs ont ensuite étudié le métabolisme des deux conjugués avec les chaînes carbonées les moins longues (n= 2-3) sur des larves de *Plutella xylostella* (papillon). Ces deux conjugués libèrent le composé parent (tralopyril) *in vivo*, faisant de ces derniers des composés prometteurs en tant qu'insecticides phloème-mobiles.

5.3.2- Les transporteurs de glucose

Les sucres peuvent être transportés dans le corps humain par l'intervention de transporteurs de glucose tels que le transporteur GLUT1 (GLUcose Transporter 1 en anglais) auquel nous allons nous intéresser. Ce transporteur appartient à la famille des transporteurs de solutés, tout comme les transporteurs d'acides aminés. Il s'agit d'une protéine transmembranaire indépendante du sodium et responsable de la diffusion facilitée du glucose à travers une membrane³⁵⁵. GLUT1 possède une grande capacité de transport³²¹ et est notamment distribué sur la barrière hémato-encéphalique BHE³⁵⁶. Il transporte le D-glucose et également d'autres hexoses tels que le galactose, le mannose et le déoxyglucose³⁵⁷.

Plusieurs études ont montré que GLUT1 pouvait participer au transport de prodrogues présentant un motif glycosidique à travers la BHE. Fernandez *et al*³⁵⁸ ont synthétisé une gamme de prodrogues de la dopamine sur différentes positions du D-glucose (Figure 20-1). La dopamine est greffée aux positions 1 (**a**), 3 (**b**) et 6 (**c**) du sucre par un groupement carbamate. Les auteurs ont étudié l'activité inhibitrice de ces conjugués sur le transport du glucose en employant des érythrocytes (globules rouges). Ces érythrocytes expriment le même transporteur GLUT1 que dans la BHE. Les résultats obtenus ont montré que la prodrogue substituée en position 6 du D-glucose présentait une meilleure affinité pour GLUT1.

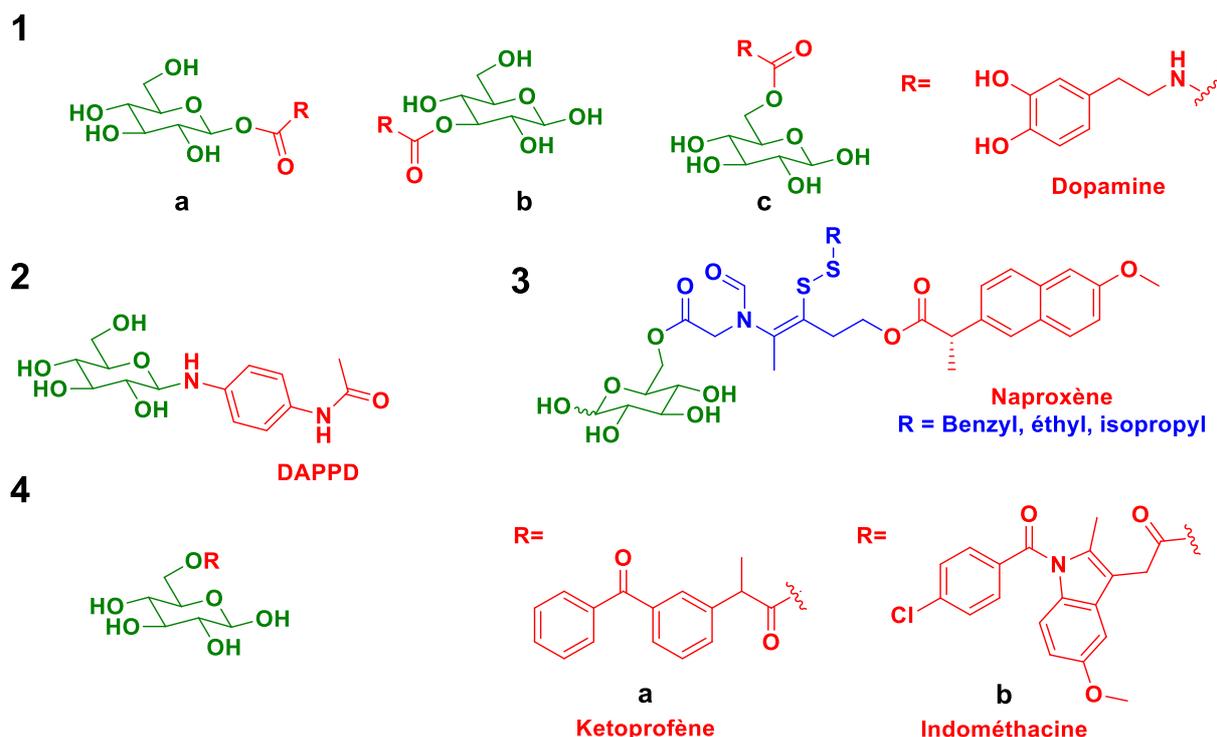


Figure 20. Structures de conjugués de D-glucose reconnus par le transporteur GLUT1 de la barrière hémato-encéphalique. **1**, Conjugués de la dopamine³⁵⁸ aux positions 1 (**a**), 3 (**b**) et 6 (**c**). **2**, Conjugué de la DAPPD³⁵⁹. **3**, Conjugués du Naproxène³⁶⁰. **4**, Conjugués de Kétoprofène (**4a**) et d'Indométacine³⁶¹ (**4b**).

Kim *et al*³⁵⁹ se sont également intéressés à la synthèse d'une prodrogue glycosylée en conjuguant la *N,N'*-diacétyl-para-phénylènediamine DAPPD (agent neuroantiinflammatoire) à du D-glucose en position 1 (Figure 20-2). Les auteurs ont montré que cette stratégie de prodrogue améliore la solubilité de la DAPPD et lui permet de franchir la BHE chez la souris, mais aussi de conserver les propriétés biologiques du composé parent.

Cette stratégie de glycosylation a également été utilisée afin de transporter le naproxène (agent anti-inflammatoire non stéroïdien) dans le système nerveux central³⁶⁰. Ces prodrogues de type glucosyl thiamine disulfure de naproxène (Figure 20-3) ont montré une capacité remarquable à franchir la BHE après injection chez la souris. Par ailleurs, Gynther *et al*³⁶¹ ont synthétisé deux conjugués de kétoprofène et d'indométacine avec du D-glucose (Figure 20-4) qui inhibent de façon significative l'absorption du D-glucose marqué au carbone 14 dans le cerveau du rat. Ces deux prodrogues sont également capables de franchir la BHE, suggérant que l'absorption de ces conjugués est liée à l'intervention de transporteurs.

Des transporteurs de sucres et de polysaccharides sont également présents dans le monde végétal. En effet, diverses études de composés phytosanitaires (fongicide, insecticide) et également de composés éliciteurs ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence l'intérêt de ces transporteurs de composés osidiques chez les plantes. L'association de produits phytosanitaires avec des sucres a

également été étudiée pour développer des composés mobiles (insecticides, fongicides) dans le phloème. Yang *et al*³⁶² ont notamment travaillé sur la synthèse d'un conjugué associant un insecticide, le fipronil, à du glucose afin d'évaluer sa mobilité dans le phloème de plantules de *Ricinus communis* et ils ont ainsi pu détecter le conjugué de fipronil dans la sève phloémienne. Lei *et al*³⁶³ ont également travaillé sur ce conjugué fipronil-glucose (Figure 21-1) fonctionnalisé sur la position anomérique (position 1) du sucre et ses isomères en positions 2, 3, 4 et 6. Les auteurs ont pu observer une mobilité phloémienne modérée de chacun de ces isomères et que celle-ci était étroitement liée à la position sur le glucose. Une étude plus approfondie du conjugué fipronil-glucose (en position 1) a mis en évidence que le mécanisme de systémie du composé faisait appel à un transporteur impliqué dans l'absorption et le chargement du phloème³⁶⁴.

Afin de visualiser le mouvement de ce conjugué, ce dernier a été modifié en lui greffant une sonde fluorescente (4-amino-7-benzofurazane représenté en violet sur la Figure 21-2) en position 2 du glucose³⁶⁵. Ce conjugué fluorescent présentait une mobilité phloémienne comparable à celle du conjugué parent. La microscopie à fluorescence a permis de montrer que ce conjugué modifié pouvait être chargé dans les tubes criblés et transporté du cotylédon à l'hypocotyle dans les plantules de ricin³⁶⁵. Les auteurs se sont également intéressés à la synthèse de conjugués de fipronil associés à différents sucres³⁶⁶ (hexoses, pentoses et composés déoxy). Dix conjugués (Figure 21-5) ont ainsi pu être synthétisés pour évaluer leur mobilité phloémienne sur des plantules de ricin et leur activité insecticide vis-à-vis de *Spodoptera litura* (papillon). Sur ces dix molécules, huit d'entre elles s'avèrent mobiles dans les plantes à des degrés très variables, ce qui met en évidence l'importance de l'orientation et des positions des groupements hydroxyles (OH) sur la mobilité phloémienne des conjugués. Les résultats sont cependant moins concluants concernant l'activité insecticide car aucun conjugué ne semble présenter une quelconque activité.

Des travaux réalisés par Chen *et al*³⁶⁷ se sont intéressés à la synthèse de conjugués de tralopyril (Figure 21-3a et 3b) associé à du glucose (R= CH₂OH), de l'acide glucuronique (R= CO₂H) ou du glucuronate de méthyle (R= CO₂CH₃) afin d'évaluer leur mobilité ainsi que leur activité insecticide. Ces six conjugués présentent un espaceur triazolique (**3a**) et pour trois d'entre eux, une chaîne méthoxyméthyl (**3b**) entre l'hétérocycle pyrrole et l'espaceur. Parmi ces six bioprécurseurs, les conjugués d'acide glucuronique (R= CO₂H) présentent des résultats intéressants tant en termes de mobilité que d'activité insecticide.

Wu *et al*³⁴⁷ se sont également intéressés à la synthèse d'un conjugué associant le fenpiclonil à du D-glucose (Figure 21-4). Bien qu'ayant une mobilité phloémienne moindre que celle des conjugués analogues avec des aminoacides, les auteurs ont cependant mis en évidence l'activité inhibitrice remarquable³⁶⁸ de ce conjugué sur des transporteurs de saccharose, en faisant ainsi un outil de premier choix pour l'étude des propriétés de ces transporteurs.

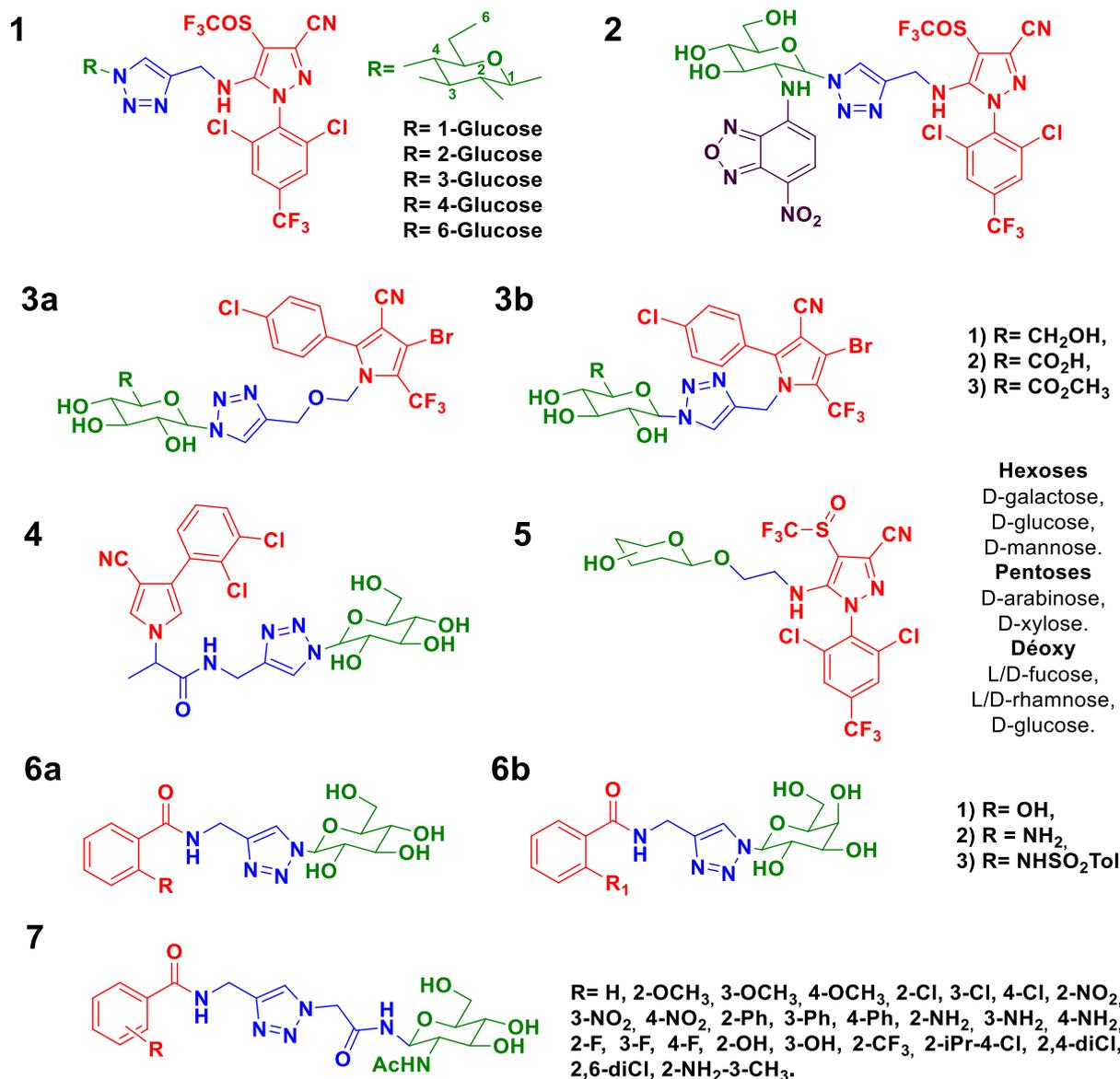


Figure 21. Structures de xénobiontes associés à des composés glycosylés. **1**, Conjugués fipronil-glucose³⁶². **2**, Conjugué fipronil-glucose avec une sonde fluorescente³⁶⁵. **3**, Conjugués tralopyril-glucose (R= CH₂OH), acide glucuronique (R= CO₂H) et glucuronate de méthyle (R= CO₂CH₃) avec (**3a**) et sans (**3b**) chaîne méthoxyméthyl³⁶⁷. **4**, Conjugué fenpiclonil-glucose^{347,368}. **5**, Conjugués fipronil-monosaccharide³⁶⁶. **6**, Conjugués acide benzoïque-glucose (**6a**) et galactose³⁶⁹ (**6b**). **7**, Conjugués d'acide benzoïque et analogues associés à de la glucosamine³⁷⁰.

Plusieurs équipes ont réalisé des synthèses de conjugués d'acide benzoïque et d'une large gamme d'analogues associés à des sucres. Les conjugués qui seront évoqués, bien qu'ils présentent des similitudes dans leurs structures, ont des applications très hétérogènes allant de l'inhibition de glucosidases à l'utilisation en tant qu'insecticides. Très récemment, Shukla *et al*³⁶⁹ ont réalisé la synthèse de six conjugués d'acide benzoïque et de ses analogues 2-hydroxy (salicylique), 2-amino et 2-(4-méthylsulfonamido)benzoïques, associés à du glucose (Figure 21-6a) ou du galactose (Figure 21-6b) par un espaceur triazolique. Après évaluation de l'activité inhibitrice de ces conjugués sur une α -glucosidase, trois de ces molécules ont montré un taux d'inhibition avoisinant les 40 % contre 53 % pour l'acarbose (médicament utilisé dans le traitement du diabète de type 2), faisant de ces composés des candidats potentiels en tant qu'agents anti-diabétiques.

Dong *et al*³⁷⁰ se sont également intéressés à la synthèse de conjugués d'acide benzoïque et de vingt-cinq analogues avec de la glucosamine (Figure 21-7) afin d'évaluer leur activité inhibitrice sur l'enzyme β -N-acétylhexosaminidase OfHex1 d'insectes. Ces conjugués n'ont cependant montré qu'une activité modeste par rapport à des conjugués de naphtalamides présentant des résultats bien plus prometteurs.

Ces différentes études permettent ainsi de souligner l'implication des transporteurs de glucose, aussi bien chez l'homme que chez les plantes, dans l'absorption et l'acheminement de prodrogues vers une zone ciblée (BHE, sève phloémienne) et leur intérêt potentiel pour de futurs schémas de vectorisation. Cependant, la conjugaison avec ces composés osidiques peut entraîner une perte d'activité de la substance active (fipronil, fenpiclonil), mais peut conférer de nouvelles activités parfois inattendues (inhibiteur de transporteurs de saccharose pour le conjugué de fenpiclonil associé au glucose).

Objectifs de la thèse

La stratégie de vectorisation en utilisant des bioprécurseurs permet de transporter des substances actives dans des zones non accessibles pour ces dernières en les associant (conjuguant) avec des composés endogènes pouvant être reconnus par des transporteurs membranaires. Cette stratégie est employée pour leurrer un transporteur en greffant un nutriment reconnu (acide aminé, sucre) par ce dernier sur la substance active. La vectorisation en utilisant des prodrogues est largement employée dans le domaine pharmaceutique, mais elle reste peu développée dans l'industrie agrochimique. Cependant, cette stratégie a fait l'objet d'études fondamentales pour le domaine agrochimique avec l'objectif d'améliorer l'efficacité des produits phytosanitaires et d'en réduire l'utilisation.

Les composés éliciteurs (SDN), qui sont produits par les plantes en réponse à une source de stress, peuvent également être considérés comme une alternative possible à l'utilisation des produits phytopharmaceutiques. Parmi ces composés, l'acide salicylique intervient dans de nombreux processus biologiques et physiologiques^{221,371,372} des végétaux, mais ce dernier est rapidement métabolisé et compartimenté (stocké) lorsqu'il est appliqué de façon exogène. Ceci va avoir pour conséquence, une action limitée dans le temps de l'activité biologique de l'acide salicylique. Pour pallier ce problème, nous avons envisagé d'utiliser la stratégie de prodrogue en conjuguant l'acide salicylique ou des analogues halogénés à un composé endogène reconnu par les transporteurs membranaires des végétaux tels qu'un acide aminé ou un sucre comme cela a déjà été mis en œuvre au laboratoire pour divers xénobiontes³⁴⁵⁻³⁴⁷. Cette stratégie devrait permettre aux transporteurs d'acides aminés ou de sucres de reconnaître et manipuler ces prodrogues d'acide salicylique, en espérant par la suite une libération progressive de ce dernier *in planta* afin d'augmenter sa durée de vie et par conséquent son activité biologique.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont donc de :

- 1) Réaliser la synthèse de conjugués d'acide salicylique ou d'analogues chlorés en les associant à des acides aminés ou des sucres et de réaliser leurs caractérisations par des techniques usuelles d'analyses de composés organiques (RMN, HRMS).
- 2) Lors de ces synthèses, effectuer des modulations sur les structures de ces conjugués en insérant si besoin des espaceurs variés (triazole, éthylène glycol), mais également en modifiant la substance active (AS ou analogues chlorés) ou le nutriment aminoacide (sérine, acide glutamique, tryptophane...).
- 3) Réaliser des études préliminaires sur les relations structure-activité de ces conjugués en effectuant des tests de systémie sur des plantules de ricin et en évaluant l'activité biologique de ces molécules et de leurs composés parents (AS et analogues).

Chapitre 2 : Synthèse de bioprécurseurs associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à des acides aminés ou à un sucre

1- Structures des bioprécurseurs d'acide salicylique

1.1- La substance active

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués ayant pour substance active l'acide salicylique ou acide 2-hydroxybenzoïque (AS, Figure 23) et deux analogues chlorés ; les acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques (5-ClAS et 3,5-diClAS sur la Figure 23). Ces molécules possèdent sur leurs structures deux fonctions réactives, la fonction acide carboxylique (COOH) et la fonction phénol (OH) en position 2 (ortho).

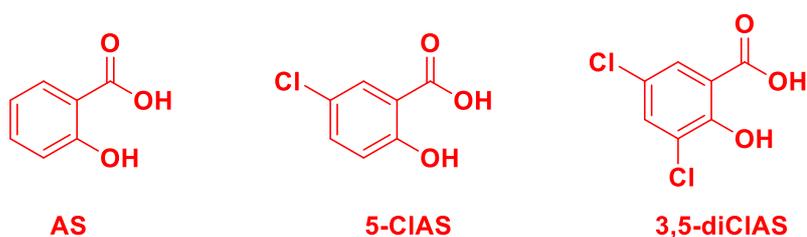


Figure 23. Structure de l'acide salicylique et de ses analogues 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques.

Ces deux fonctions chimiques s'avèrent être nucléophiles et peuvent réagir avec des composés électrophiles tels que des halogénures d'alkyle (RX avec X= Cl, Br ou I) en milieu basique. Cependant ces deux fonctions peuvent être impliquées de façon sélective dans des réactions chimiques. En effet, les fonctions acide carboxylique et phénol possèdent des constantes d'acidité (pKa) bien distinctes qui sont respectivement de l'ordre de 3,0 et de 13,8. Cette différence d'acidité entre la fonction phénol et la fonction acide carboxylique permet de faire réagir sélectivement la fonction acide carboxylique en employant des bases faibles telles que de l'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO₃). L'emploi de bases plus fortes telles que des bases carbonatées ou les alcoolates entraînerait une compétition entre les deux fonctions. Il s'avère donc primordial de trouver une stratégie afin de réaliser des réactions sélectives sur la fonction souhaitée.

Ainsi, la protection d'une de ces deux fonctions s'avère nécessaire afin d'éviter des réactions secondaires indésirables. Le choix des groupements protecteurs va donc s'avérer être une étape stratégique. En effet, les groupements employés doivent répondre à plusieurs critères tels que la stabilité dans diverses conditions expérimentales (conditions acides, basiques, oxydantes ou réductrices). Ces groupements doivent également être déprotégés pour certains de façon sélective. Ces réactions de protection/déprotection vont correspondre aux étapes déterminantes de ces voies de synthèse car ces dernières doivent permettre d'obtenir le composé désiré. Cependant, la partie substance active n'est pas la seule à devoir être protégée afin d'obtenir ces conjugués. La partie nutriment (acide aminé ou sucre) doit également être protégée.

1.2- Les nutriments acides aminés et sucres

Les conjugués synthétisés au cours de ces travaux de thèse présentent tous un nutriment (vecteur) reconnu par des transporteurs de la membrane plasmique des plantes. Parmi ces nutriments, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux acides aminés et aux sucres. Cependant, ces nutriments (acides aminés ou sucres) doivent remplir certaines conditions afin d'être reconnus par les transporteurs spécifiques de la plantes. Les conditions nécessaires à cette reconnaissance vont être évoquées dans les parties 1.2.1 et 1.2.2.

1.2.1- Les nutriments acides aminés

Afin d'être reconnus par les transporteurs d'acides aminés de la membrane plasmique, les acides aminés employés pour les synthèses de conjugués doivent remplir plusieurs conditions. Comme nous avons pu l'évoquer dans la partie introductive du manuscrit, les α -aminoacides peuvent être reconnus de façon sélective par des transporteurs³⁴⁷. En effet, les énantiomères de série L sont bien mieux reconnus par ces transporteurs que les énantiomères D. Ainsi, les acides aminés employés pour les synthèses devront posséder cette configuration L. Ces derniers doivent également posséder leur fonction α -aminoacide libre, c'est-à-dire que les fonctions acide carboxylique (CO_2H) et amine (NH_2) ne doivent pas être fonctionnalisées. Cette condition va impliquer que les acides aminés de série L employés pour les synthèses de ces conjugués possèdent une fonction chimique réactive XH sur leur chaîne latérale. Cette fonction XH peut être un alcool (OH), une amine (NH_2), un acide carboxylique (CO_2H) ou bien encore un hétérocycle azoté (indole). La structure type des acides aminés employés pour les synthèses de conjugués est présentée sur la Figure 24.

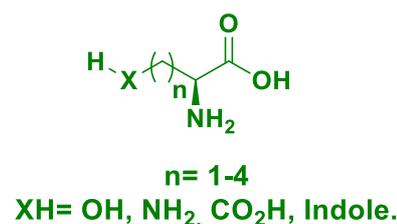


Figure 24. Structure type des aminoacides de série L employés pour les synthèses des conjugués.

Cette condition visant à obtenir des conjugués avec cette fonction α -aminoacide libre va nécessiter la protection des fonctions acide carboxylique et amine. Tout comme pour l'AS et ses analogues, le choix des groupes protecteurs va s'avérer stratégique car les groupements choisis ne pourront être déprotégés qu'à la fin des synthèses. Ces étapes de déprotection sont stratégiques car les conditions opératoires de ces déprotections ne doivent pas détruire la structure du nouveau composé AS-espaceur-aminoacide et permettre d'accéder au conjugué désiré.

Ainsi, le choix des nutriments s'est porté sur six α -aminoacides de série L présentant des structures simples ou plus élaborées. Les acides aminés sélectionnés sont la L-sérine, les acides L-2,3-diaminopropionique (ADAP) et L-2,4-diaminobutyrique (ADAB), l'acide L-glutamique, la L-lysine et le L-tryptophane. Les structures des acides aminés sélectionnés sont présentées sur la Figure 25.

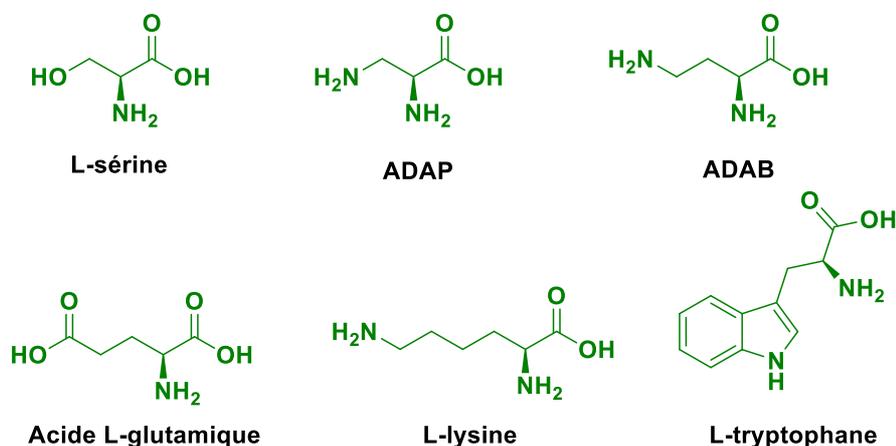


Figure 25. Structures des acides aminés employés pour les synthèses de prodrogues.

1.2.2- Le nutriment glucose

Pour être reconnu par les transporteurs de glucose, les sucres choisis pour les synthèses de prodrogues doivent présenter leurs fonctions alcools libres. Dans le cas des conjugués synthétisés, les fonctions alcools doivent être déprotégées en positions 2, 3, 4 et 6 du sucre. Ainsi, afin de déprotéger toutes ces fonctions alcools en une seule étape, la meilleure stratégie est que toutes ces fonctions soient protégées par un groupement protecteur unique. Parmi les groupements employés pour protéger les fonctions alcools des sucres, les esters sont des fonctions fiables et faciles à déprotéger. Dans le cas des conjugués synthétisés avec un nutriment ose, le choix s'est porté sur un dérivé commercial de glucose : le bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosile dont la structure est détaillée sur la Figure 26. La présence de l'atome de brome en position anomérique (position 1) du sucre permet de fonctionnaliser ce dernier par des fonctions chimiques ayant un caractère nucléophile telles que des alcools, amines ou bien un azoture.

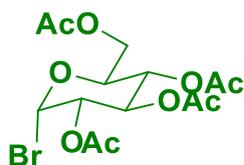


Figure 26. Structure du dérivé commercial de glucose employé pour les synthèses de conjugués glycosylés.

1.3- L'utilisation stratégique des espaceurs

Lors de la synthèse de ces bioprécurseurs, un troisième composé est utilisé pour lier la substance active et le nutriment afin de modifier la distance entre ces deux parties. Cette troisième partie est appelée espaceur et permet de faire la liaison entre la substance active (drogue) et le nutriment (acide aminé ou sucre). Cette partie espaceur doit dans un premier temps, ne pas être toxique pour la plante mais également permettre une libération de la drogue *via* un clivage enzymatique et/ou chimique dans l'environnement ciblé (milieu cellulaire végétal).

Parmi les espaceurs employés pour la synthèse de conjugués, l'espaceur 1,2,3-triazole est l'un des plus simples à obtenir. En effet, ce dernier est obtenu par une réaction dite de chimie click (click chemistry) entre un alcyne vrai et un azoture en présence d'un sel de cuivre. Ce cycle 1,2,3-triazole présente l'avantage d'être stable en milieux acides et basiques, oxydants et réducteurs³⁵¹ et s'avère également être un bioisostère de liaisons amides^{373,374}.

Nous nous sommes également intéressés à la chaîne éthylène glycol comme espaceur. L'espaceur éthylène glycol est généralement employé sous la forme de polymère ou polyéthylène glycol (PEG). Il permet d'obtenir des conjugués avec des fonctions esters entre le nutriment et la substance active. Ces liaisons esters sont susceptibles d'être hydrolysées afin de libérer la substance active (AS ou analogues).

Nous nous sommes également intéressés à l'emploi d'espaceurs dicarboxylés (diCO) et plus particulièrement 1,4 ($n = 1$) et 1,5-dicarboxylés ($n = 2$). Ces derniers présentent l'avantage d'établir des liaisons sous forme d'esters et/ou d'amides.

Les structures des espaceurs sélectionnés pour les synthèses des conjugués sont présentées sur la Figure 27.

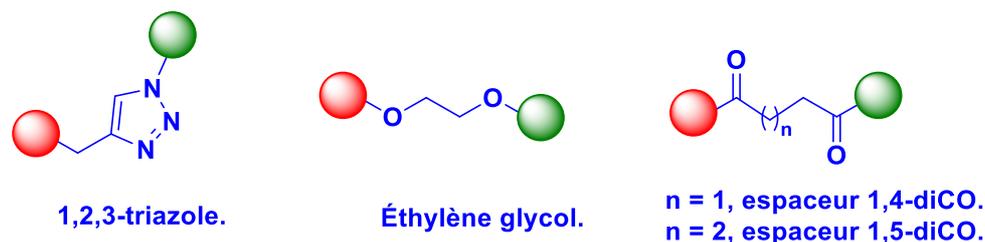


Figure 27. Structures des quatre espaceurs sélectionnés pour les synthèses de conjugués.

2- Synthèse de conjugués associant l'AS et ses analogues à des acides aminés

2.1- Synthèse de conjugués associant l'AS (ou analogues) à de l'acide L-glutamique

2.1.1- Synthèse de conjugués associés par un espaceur 1,2,3-triazole

Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de mettre en évidence l'utilité des acides aminés pour rendre mobile un fongicide non systémique (Fenpiclonil) *in planta*^{347,348}. Dans le cadre de ces travaux de thèse et compte-tenu des résultats obtenus antérieurement, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués à partir de l'acide L-glutamique ayant pour espaceur un cycle 1,2,3-triazole et avons réalisé des modulations au niveau de la substance active correspondant à l'acide salicylique ou à ses analogues chlorés (Figure 28).

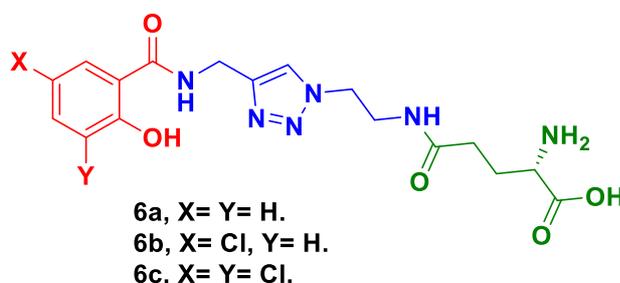


Figure 28. Structure des conjugués acide salicylique-acide L-glutamique avec un espaceur triazolique. **6a**, conjugué d'acide salicylique (X = Y = H). **6b**, conjugué d'acide 5-chlorosalicylique (X = Cl, Y = H). **6c**, conjugué d'acide 3,5-dichlorosalicylique (X = Y = Cl).

Ces conjugués présentent sur leurs structures deux liaisons amides situées sur la fonction acide carboxylique de la substance active et sur la chaîne latérale de l'acide L-glutamique. Ces liaisons amides présentent l'avantage d'être stables en conditions acides et basiques mais également oxydantes, rendant leurs synthèses plus abordables qu'avec des liaisons esters plus sensibles aux milieux basiques. La présence de l'espaceur 1,2,3-triazole facilite également la synthèse car elle va permettre de former le conjugué avec les groupements protecteurs adaptés en une étape unique qu'est la réaction de chimie click. Ces conjugués protégés seront par la suite déprotégés dans des conditions opératoires adaptées afin d'obtenir les conjugués **6a-c**.

Ces composés **6a-c** peuvent être obtenus par une voie de synthèse se décomposant en cinq étapes pour le composé **6a** et six étapes pour les composés **6b** et **6c**. Les différentes étapes de cette voie de synthèse et leurs conditions opératoires sont présentées sur le Schéma 7.

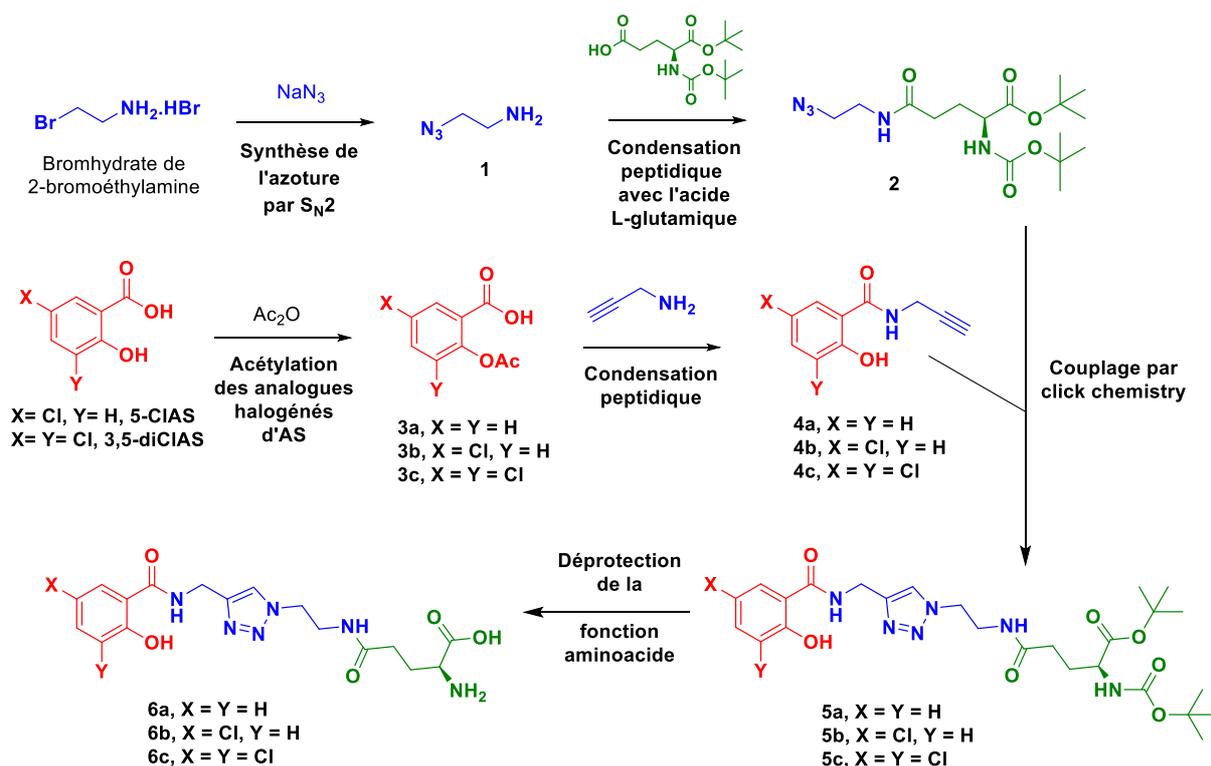


Schéma 7. Voie de synthèse des conjugués acide salicylique-acide L-glutamique **6a-c** avec un espaceur 1,2,3-triazole.

Cette voie de synthèse débute par une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) sur le bromhydrate de 2-bromoéthylamine par de l'azoture de sodium (NaN_3) afin de former la 2-azidoéthylamine **1**. L'amine **1** est ensuite engagée dans une réaction de condensation avec l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque commercial protégé sur la fonction α -aminoacide par des groupements *tert*-butyle (carbamate et ester). Cette réaction de condensation permet d'obtenir l'azoture d'acide L-glutamique protégé **2**. Ces deux étapes permettent de générer l'azoture de l'acide L-glutamique **2** nécessaire à la formation du cycle 1,2,3-triazole.

Dans un second temps, les acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques sont engagés dans des réactions d'acétylation afin de protéger leurs fonctions phénols. Cette étape permet d'obtenir les composés acétylés **3b** et **3c**. Disposant d'aspirine **3a** commerciale, cette étape n'a pas été réalisée sur l'acide salicylique. Cette étape de protection de la fonction phénol est nécessaire afin d'éviter que cette dernière n'interfère dans l'étape de condensation peptidique. Ces dérivés acétylés (composés **3a-c**) sont à leur tour, engagés dans des réactions de condensations peptidiques avec de la propargylamine. Cette étape de condensation permet d'obtenir les amides **4a-c** présentant un groupement alcyne terminal ($R = H$), également appelé alcyne vrai. Cette fonction alcyne vrai tout comme le groupement azoture du composé **2** est indispensable pour la réaction de click chemistry. Les dérivés propargyliques d'acide salicylique **4a-c** sont ensuite engagés dans une réaction de click chemistry avec l'azoture d'acide L-glutamique protégé **2** afin d'obtenir les conjugués protégés **5a-c** présentant le cycle 1,2,3-triazole. Ces

composés sont ensuite déprotégés pour conduire aux conjugués **6a-c** présentant la fonction α -aminoacide. Ces étapes de synthèse ainsi que les conditions opératoires et les résultats expérimentaux obtenus seront présentés plus en détail dans les sous-parties suivantes.

2.1.1.1- Formation de la 2-azidoéthylamine **1** par substitution nucléophile

2.1.1.1.1- Présentation des conditions opératoires

Cette première étape de la voie de synthèse correspond à une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) du bromhydrate de 2-bromoéthylamine avec utilisation d'azoture de sodium (NaN_3) comme nucléophile. Cette réaction est réalisée en milieu aqueux avec un chauffage à 80 °C comme l'ont décrit plusieurs auteurs^{375,376}. Les conditions opératoires de cette étape sont présentées sur le Schéma 8.

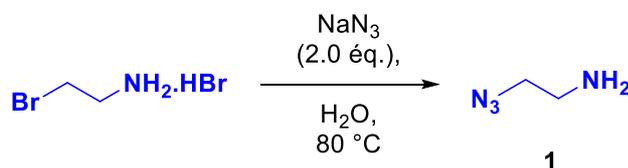


Schéma 8. Conditions opératoires de la réaction de substitution nucléophile par de l'azoture de sodium.

2.1.1.1.2- Résultat expérimental de la réaction de substitution nucléophile S_N2

Cette première étape a permis d'obtenir le composé **1** avec un rendement de **97 %**. La structure du composé a pu être confirmée par une analyse RMN ^1H , conforme à la littérature^{375,376}.

2.1.1.2- Condensation peptidique de la 2-azidoéthylamine **1** avec un dérivé commercial d'acide *L*-glutamique

2.1.1.2.1- Présentation des conditions opératoires

La seconde étape de cette réaction est une réaction de condensation peptidique entre la 2-azidoéthylamine **1** et l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque. Cette réaction est réalisée en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) en quantité catalytique et d'un agent de condensation ou agent d'activation qui est le chlorhydrate de 1-éthyl-3-[(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide]³⁷⁷ (EDCI) employé en excès. Cette réaction va engager la fonction amine de la 2-azidoéthylamine **1** et la fonction acide carboxylique libre de l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque afin de former l'amide **2** (Schéma 9).

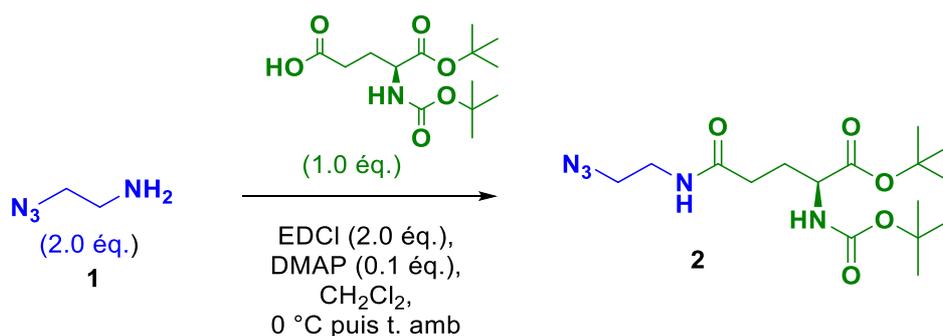


Schéma 9. Conditions opératoires de la réaction de condensation entre l'azidoéthylamine **1** et l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (adaptées de Wu *et al*³⁴⁷).

2.1.1.2.2- Résultat expérimental de la réaction de condensation peptidique

Cette réaction a permis d'isoler l'amide **2** avec un rendement de **97 %**. La structure de ce composé a été confirmée par des analyses RMN (proton ¹H et carbone ¹³C) qui s'avèrent conformes à celles décrites dans la littérature³⁴⁷.

2.1.1.3- Réactions d'acétylation des analogues halogénés de l'AS

2.1.1.3.1- Présentation des conditions opératoires

La troisième étape de cette voie de synthèse va consister à protéger les fonctions phénols des analogues chlorés de l'acide salicylique. Cette étape de protection correspond à une réaction d'acétylation en présence d'anhydride acétique (Ac₂O) et d'acétate de sodium (AcONa, Schéma 10).

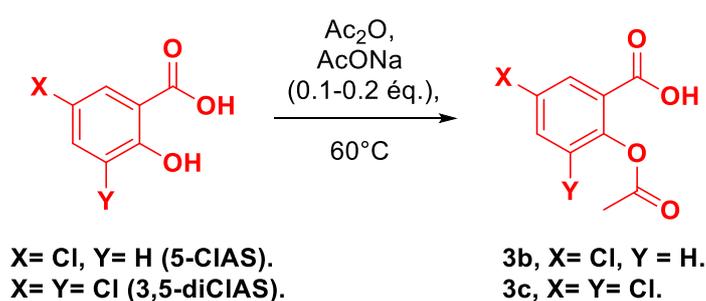


Schéma 10. Conditions opératoires de la réaction d'acétylation des analogues halogénés de l'acide salicylique (adaptées de Mojtahedi et Samadian³⁷⁸)

2.1.1.3.2- Résultats expérimentaux des réactions d'acétylations des fonctions phénols

Les réactions d'acétylation des acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques ont permis d'obtenir les composés acétylés **3b** et **3c** avec des rendements respectifs de **77 %** et **85 %** en appliquant des conditions opératoires identiques pour les deux acides. La structure des composés acétylés **3b** et **3c** est confirmée par des analyses en RMN ¹H. Les analyses RMN ¹H confirment la présence des groupements acétyle par l'apparition d'un singulet intégrant pour trois protons à 2.25 ppm pour le dérivé **3b** et 2.32 ppm pour le dérivé **3c**.

2.1.1.4- Réactions de condensation entre les dérivés acétylés et la propargylamine

2.1.1.4.1- Présentation des conditions opératoires

Ces réactions de condensation peptidique vont engager les composés acétylés **3a-c** et la propargylamine en présence de DMAP et d'EDCI. Les conditions opératoires sont présentées sur le (Schéma 11).

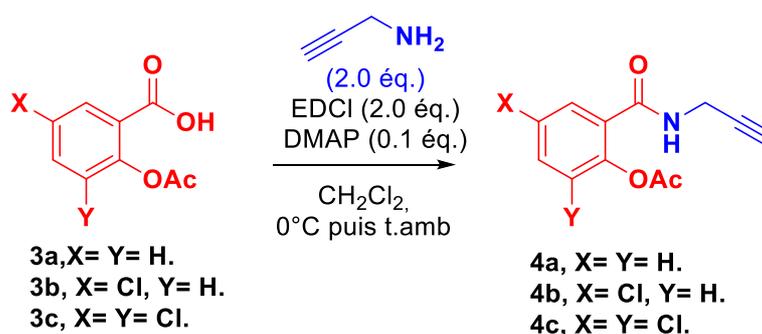


Schéma 11. Condition opératoire de la réaction de condensation peptidique entre les dérivés acétylés d'acide salicylique et la propargylamine.

2.1.1.4.2- Mécanisme réactionnel de la condensation peptidique

La formation des amides propargyliques **4a-c** résulte d'une condensation peptidique dont le mécanisme réactionnel est décrit sur le Schéma 12. La première étape est une réaction acido-basique entre la fonction acide carboxylique du composé acétylé et le carbodiimide générant le carboxylate **A** et l'ammonium correspondant. L'intermédiaire **A** va présenter un caractère nucléophile exacerbé lui permettant de réagir avec le carbodiimide *via* une addition nucléophile afin de générer l'intermédiaire **B**. Ce dernier va ensuite réagir par prototropie avec l'ammonium de propargylamine, conduisant à l'isourée **C**. La propargylamine va ensuite réagir sur le carbonyle de cette isourée **C** par addition nucléophile afin de générer l'intermédiaire tétraédrique **D**. Cet intermédiaire va spontanément se réarranger et conduire aux dérivés propargyliques **4a-c** et à l'urée de l'EDCI **E**.

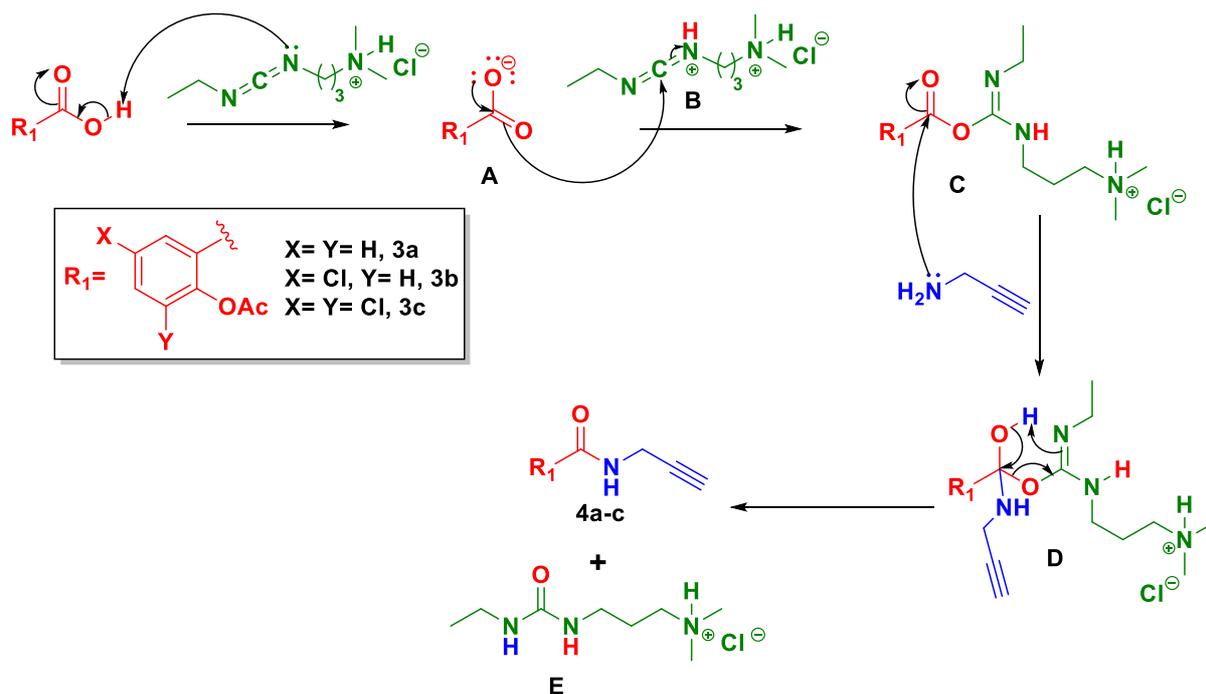


Schéma 12. Mécanisme réactionnel proposé de la condensation peptidique entre les dérivés **4a-c** et la propargylamine.

2.1.1.4.3- Résultats expérimentaux des réactions de condensations peptidiques entre les dérivés acétylés d'AS et la propargylamine

Tableau 1. Résultats expérimentaux des condensations peptidiques entre les dérivés acétylés d'AS et la propargylamine.

Entrées	Réactifs	n _{réactif} (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	3a	36,3	24	50
2	3b	9,32	26	40
3	3c	8,03	22 ^a	25

a: dont 5h à reflux.

Les composés **4a-c** ont été isolés avec des rendements respectifs de **50 %**, **40 %** et **25 %**. Ces trois composés ont été analysés par RMN ¹H afin de confirmer leur structure. Ces analyses nous confirment : i/ la formation de l'amide propargylique par la présence d'un triplet intégrant pour un proton à 9.19 (**4a**) et 9.22 ppm (**4b**) correspondant au NH. ii/ la présence du groupement propargyle par des signaux présents à 2.26 et 4.10 ppm (**4a**), 3.20 et 4.10 ppm (**4b**), 2.24 et 4.34 ppm (**4c**).correspondant aux protons propargyliques. iii/ la perte des groupements acétyle par la présence d'un singulet intégrant pour un proton entre 12.27 et 12.35 ppm, caractéristique d'un groupement phénol.

Nous avons pu grâce à ces analyses RMN ^1H , mettre en évidence la désacétylation du phénol lors de l'obtention des composés **4a-c**. Nous avons également pu isoler lors de la réaction de condensation du composé **3c**, un produit qui, après une analyse par RMN ^1H a pu être identifié comme étant la propargylamine acétylée. Cette analyse confirme la perte du groupement acétyle sur la fonction phénol conduisant aux produits de condensation désacétylés **4a-c**. Nous avons ainsi pu proposer un mécanisme réactionnel (Schéma 13) conduisant à l'obtention de ces dérivés propargyliques.

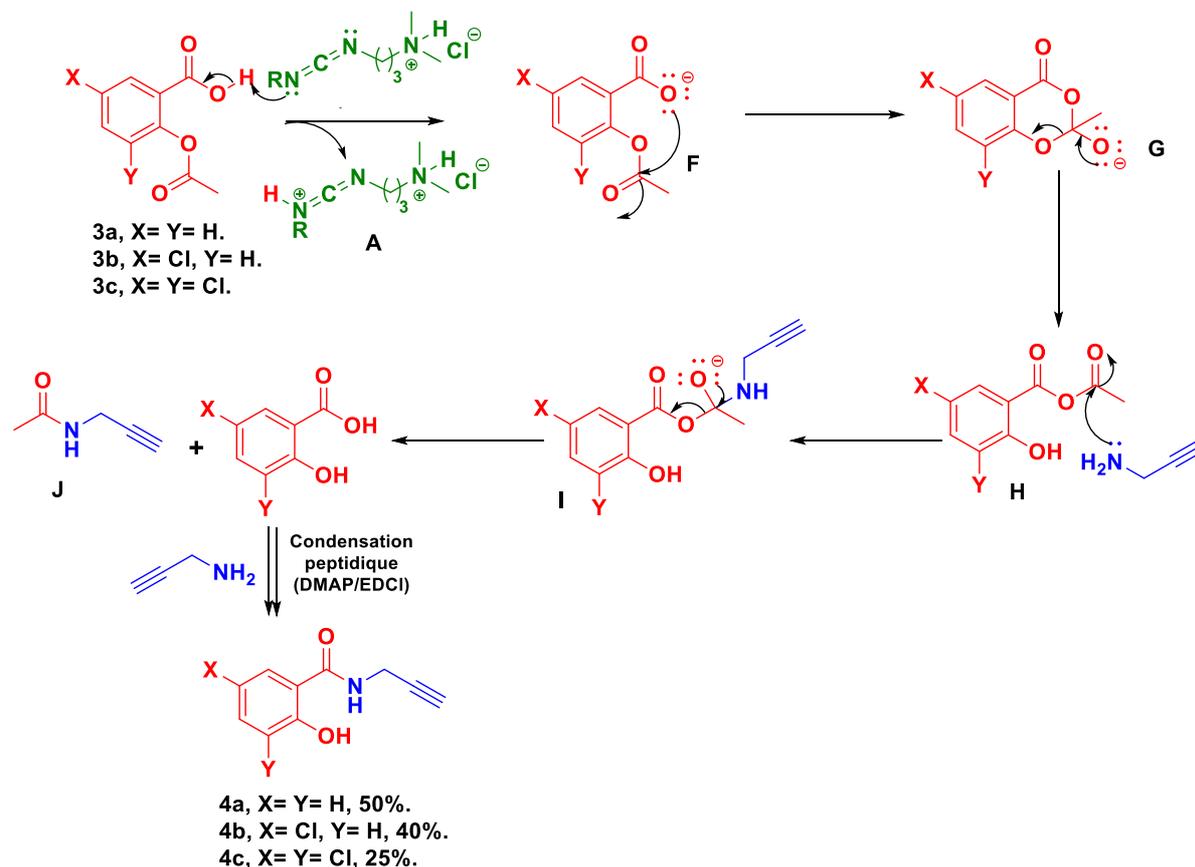


Schéma 13. Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des composés **4a-c** et la propargylacétamide **J**.

Le mécanisme va débiter par une réaction acido-basique entre la fonction acide carboxylique des dérivés acétylés **3a-c** et l'EDCI générant l'intermédiaire protoné **A** et le carboxylate **F** dont le caractère nucléophile a été exacerbé. Le carboxylate **F** va pouvoir réagir en intramoléculaire avec le groupement carbonyle présent sur le phénol *via* une étape d'addition nucléophile pour générer l'orthoformate intermédiaire **G**. Cet orthoformate **G** va spontanément se réarranger et générer l'anhydride mixte **H** *via* une réaction d'élimination permettant de libérer la fonction phénol. L'anhydride mixte **H** va ensuite réagir avec de la propargylamine par une réaction d'addition-élimination passant par l'intermédiaire tétraédrique **I**, se réarrangeant en propargylacétamide **J** et acide salicylique (ou analogues). L'acide salicylique ou ses analogues pourront ensuite réagir selon le mécanisme de condensation peptidique permettant d'obtenir les dérivés propargyliques désacétylés **4a-c**. Ce

mécanisme réactionnel conduisant à la perte du groupement acétyle de l'aspirine a également été décrit par Chandrasekhar et Kumar³⁷⁹.

Cette désacétylation est également favorisée par l'emploi de propargylamine en excès (2,0 équivalents). Il serait intéressant de réaliser ces réactions de condensation en modifiant le groupement protecteur de la fonction phénol de l'acide salicylique (ou analogues) ou en employant un réactif limitant la désacétylation tel que l'hydroxybenzotriazole. Bien qu'elle ait un impact sur les rendements en produits de condensation, cette réaction de désacétylation s'avère bénéfique pour la suite de la synthèse car elle permet de déprotéger la fonction phénol.

2.1.1.5- Couplage entre les dérivés propargyliques **4a-c** et l'azoture d'acide L-glutamique **2** par réaction de click chemistry

2.1.1.5.1- Présentation des conditions opératoires

Les dérivés propargyliques **4a-c** sont ensuite engagés dans des réactions de click chemistry avec l'azoture d'acide L-glutamique **2** en présence d'un sel de cuivre I généré *in-situ* par réduction de sulfate de cuivre II pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) avec de l'ascorbate de sodium. Ces réactions sont réalisées dans un solvant protique (Schéma 14). La formation de ce cycle 1,2,3-triazole permet de générer les conjugués protégés **5a-c**.

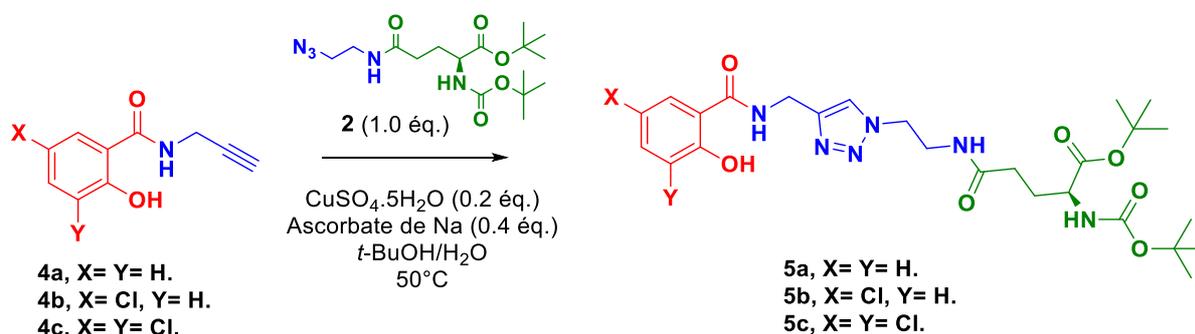


Schéma 14. Conditions opératoires des réactions de click chemistry entre les dérivés propargyliques **4a-c** et l'azoture d'acide L-glutamique **2**.

Cette réaction de click chemistry est également appelée cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen³⁸⁰. Cette réaction appartient à la famille des cycloadditions et dans le cas présent, des cycloadditions [3+2]. Elle est définie comme une réaction péricyclique concertée. Afin de former le cycle à cinq atomes, la réaction va être engagée entre une espèce définie comme 1,3-dipole (ici l'azoture **2**) et un second composé défini comme un dipolarophile (dérivés propargyliques **4a-c**). Ces conditions opératoires permettent de générer spécifiquement le cycle triazolique sous la forme de son régioisomère 1,4^{381,382}.

2.1.1.5.2- Mécanisme réactionnel de la cycloaddition [3+2] de Huisgen catalysée par du cuivre (CuAAC)

Le mécanisme de cycloaddition [3+2] de Huisgen permettant d'accéder à nos composés est le suivant, il repose sur le cycle catalytique représenté sur le Schéma 15. Ce cycle catalytique a été proposé par Rotovstev *et al*³⁸².

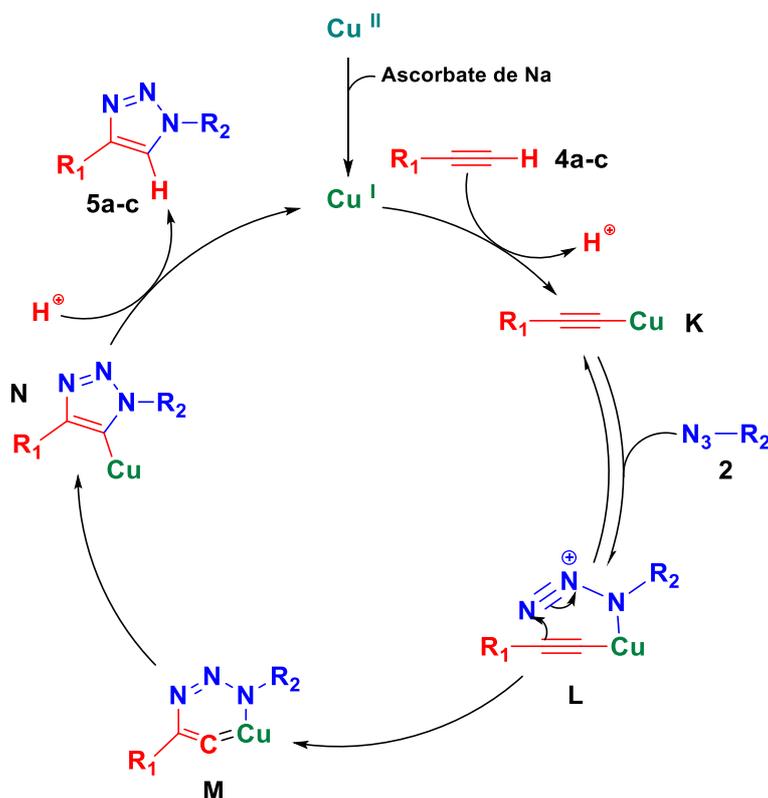


Schéma 15. Mécanisme réactionnel de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par un sel de cuivre d'après Rostovstev *et al*³⁸².

Le sel de cuivre I va réagir avec la fonction alcyne terminale des composés **4a-c** générant l'alcynylcuprate **K**. Cet alcynylcuprate **K** va ensuite réagir avec l'azoture **2** et l'atome d'azote nucléophile de cette fonction N₃ va se coordonner à l'atome de cuivre pour générer l'intermédiaire **L**. Cet intermédiaire **L** va se réarranger de façon à former un cycle à 6 chaînons *via* une réaction entre l'atome d'azote terminal de la fonction azoture et l'une des liaisons π de la fonction alcyne. L'intermédiaire **M** est ainsi généré et va se réarranger afin d'obtenir le cuprate du cycle 1,2,3-triazole **N**. L'intermédiaire **N** va ensuite subir une élimination réductrice par réaction avec une source de protons (solvant) permettant d'obtenir le cycle 1,2,3-triazole sous la forme du régioisomère 1,4-disubstitué souhaité. Cette étape d'élimination réductrice permet également de régénérer le sel de cuivre.

Bien que le mécanisme proposé par Rostovstev *et al*³⁸² ait été admis, des auteurs se sont intéressés de plus près au mécanisme réactionnel de cette cycloaddition [3+2] de Huisgen. Worrell *et*

*al*³⁸³ ont étudié cette réaction et ont proposé un mécanisme impliquant deux atomes de cuivre. Le mécanisme réactionnel proposé par Worrell *et al*³⁸³ est présenté sur le Schéma 16.

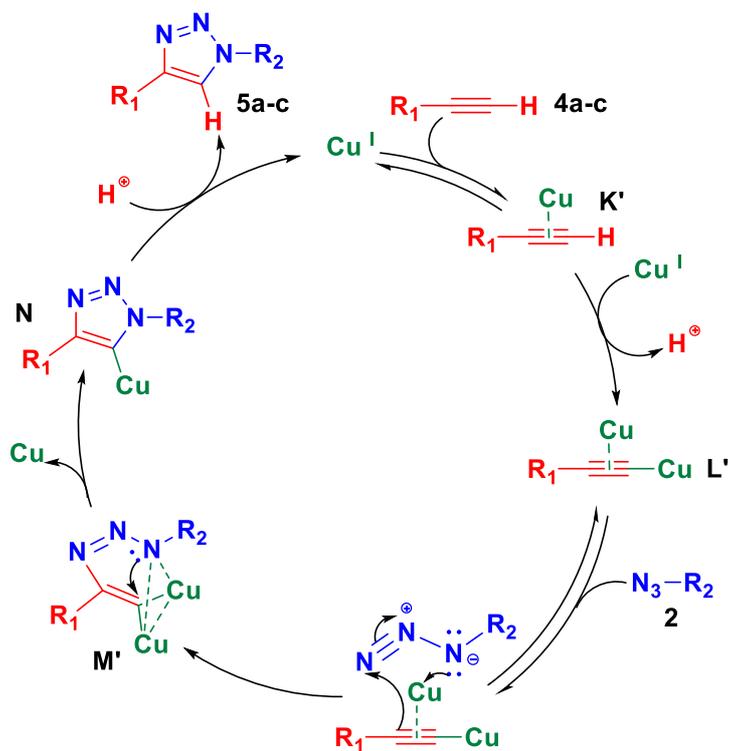


Schéma 16. Mécanisme réactionnel de la cycloaddition [3+2] de Huisgen d'après Worrell *et al*³⁸³.

La première étape de ce cycle catalytique est une coordination du sel de cuivre sur la triple liaison de la fonction alcyne des composés **4a-c** afin de former l'intermédiaire **K'**. L'addition d'un second atome de cuivre va se produire sur l'intermédiaire **K'** entraînant la perte du proton terminal de la fonction alcyne et générant l'alcynylcuprate **L'** présentant deux atomes de cuivre. L'étape suivante correspond à l'addition de l'azoture **2** qui va permettre de générer l'intermédiaire cyclique **M'** coordonné aux deux atomes de cuivre. **M'** va se réarranger de façon spontanée en éliminant un atome de cuivre. Ce réarrangement va conduire à la formation de l'intermédiaire **N** correspondant à l'organocuprate du cycle 1,2,3-triazole. Puis l'étape d'élimination réductrice va conduire à la formation des conjugués triazoliques 1,4-disubstitués **5a-c**.

2.1.1.5.3- Résultats expérimentaux des réactions de cycloaddition de Huisgen

Tableau 2. Résultats expérimentaux des réactions de cycloadditions [3+2] sur les dérivés propargyliques **4a-c**.

Entrées	Alcyne	n _{alcyne} (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	4a	18,0	1	41
2	4b	2,32	3	44
3	4c	3,03	2	74

Les composés **5a-c** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de **41 % (5a)**, **44 % (5b)** et **74 % (5c)**. Les structures de ces composés ont été confirmées par des analyses en RMN ¹H. La formation des cycles triazoliques est confirmée par l'apparition de singulets intégrant pour un proton à 8.04 ppm (**5a**) et 8.00 ppm (**5b-c**). La présence des signaux caractéristiques de l'acide aminé confirment également la formation des conjugués et notamment les signaux du proton de la fonction α-aminoacide présents respectivement à 3.74 ppm pour les composés **5a-b** et 3.76 ppm pour le composé **5c**. Parmi les signaux caractéristiques, l'apparition de singulets entre 1.37 et 1.39 ppm, intégrant pour dix-huit protons confirme la présence des groupements protecteurs *tert*-butyle.

2.1.1.6- Déprotection des fonctions α-aminoacide des composés **5a-c**

2.1.1.6.1- Présentation des conditions opératoires

Les conjugués protégés **5a-c** ont ensuite été engagés dans des réactions de déprotection de leurs fonctions acide carboxylique et amine. Ces réactions sont réalisées en présence d'acide trifluoroacétique (CF₃CO₂H), dans un solvant organique (ici, dichlorométhane, Schéma 17).

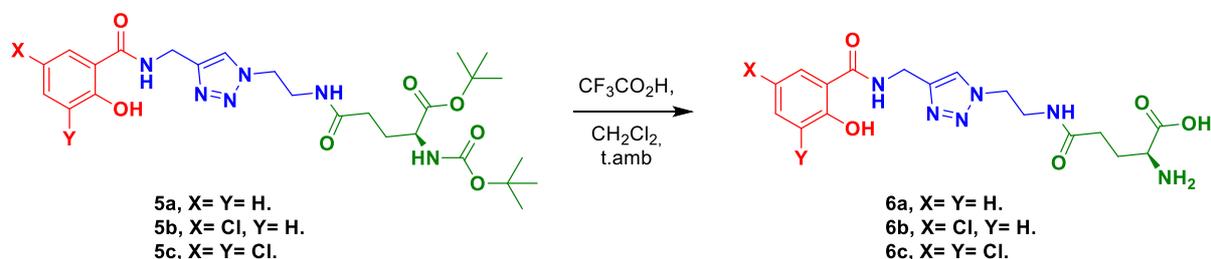


Schéma 17. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions α-aminoacides en milieu acide.

L'emploi de l'acide trifluoroacétique est employé pour déprotéger des groupements *tert*-butyle de carbamates pour les fonctions amines et d'esters pour les acides carboxyliques^{384,385}. Ainsi, en une seule étape, nous accédons aux conjugués **6a-c** avec la fonction α -aminoacide libre.

2.1.1.6.2- Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés **5a-c**

Tableau 3. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés **5a-c**

Entrées	Réactif	n _{réactif} (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	5a	3,73	3	70
2	5b	2,24	3	42
3	5c	2,11	3	41

Les conjugués **6a-c** avec des rendements respectifs de **70 % (6a)**, **42 % (6b)** et **41 % (6c)**. Les analyses des trois composés en RMN ¹H ont permis de confirmer la perte des groupements *tert*-butyle présents entre 1.37 et 1.39 ppm intégrant pour neuf ou dix-huit protons. Les structures des conjugués ont pu être confirmées par la présence des signaux correspondant aux phénols à 12.46 (**6a**), 12.90 (**6b**) et 13.63 ppm (**6c**). La présence du cycle 1,2,3-tiazole est également confirmée par des singulets apparaissant respectivement à 8.15, 8.00 et 8.05 ppm. La présence de l'acide L-glutamique est également confirmée par des signaux compris entre 1.95 et 3.27 ppm (**6a**), 1.93 et 3.46 ppm (**6b**) et 1.92 et 3.90 ppm (**6c**).

Des analyses par spectrométrie de masse (HRMS) ont également été réalisées afin de confirmer les analyses RMN. Ainsi ces analyses complémentaires ont permis de mesurer des valeurs m/z de 391.1739 (**6a**), 425.1336 (**6b**) et 459.0940 (**6c**), correspondant aux espèces chargées [M+H]⁺. Ces analyses HRMS permettent ainsi de confirmer les structures de ces trois conjugués.

2.1.1.7- Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués **6a-c**

Les composés finaux **6a-c** ont pu être obtenus avec des rendements globaux de synthèse de **13 %** en cinq étapes pour le composé **6a**, **4 %** et **6 %** en six étapes pour les conjugués **6b** et **6c**.

2.1.2- Synthèse de conjugués présentant un espaceur éthylène glycol

Suite à la synthèse des conjugués **6a-c** associant l'acide salicylique (ou ses analogues) à l'acide L-glutamique par un espaceur triazolique, nous nous sommes intéressés à la préparation de nouveaux conjugués en modifiant la structure de l'espaceur en employant cette fois-ci un espaceur éthylène glycol entre la substance active et le nutriment. La structure générale de ces conjugués est présentée sur la Figure 29.

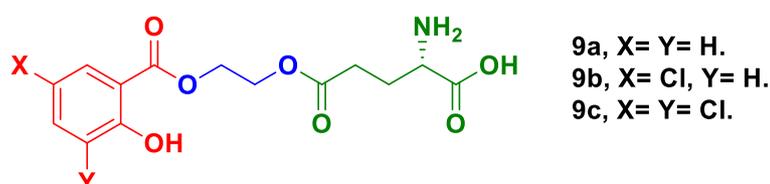


Figure 29. Structure des conjugués associant l'acide salicylique (et analogues) à l'acide L-glutamique par un espaceur éthylène glycol. **9a**, Conjugué d'acide salicylique (X= Y= H). **9b**, Conjugué d'acide 5-chlorosalicylique (X= Cl, Y= H). **9c**, Conjugué d'acide 3,5-dichlorosalicylique (X= Y= Cl).

Cet espaceur permet d'associer les différentes parties des conjugués (substance active et nutriment) par des liaisons esters. Afin de préparer ces trois conjugués, une synthèse en trois étapes (Schéma 18) a été envisagée à partir des dérivés acétylés d'AS **3a-c** et de l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*--[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque employé précédemment.

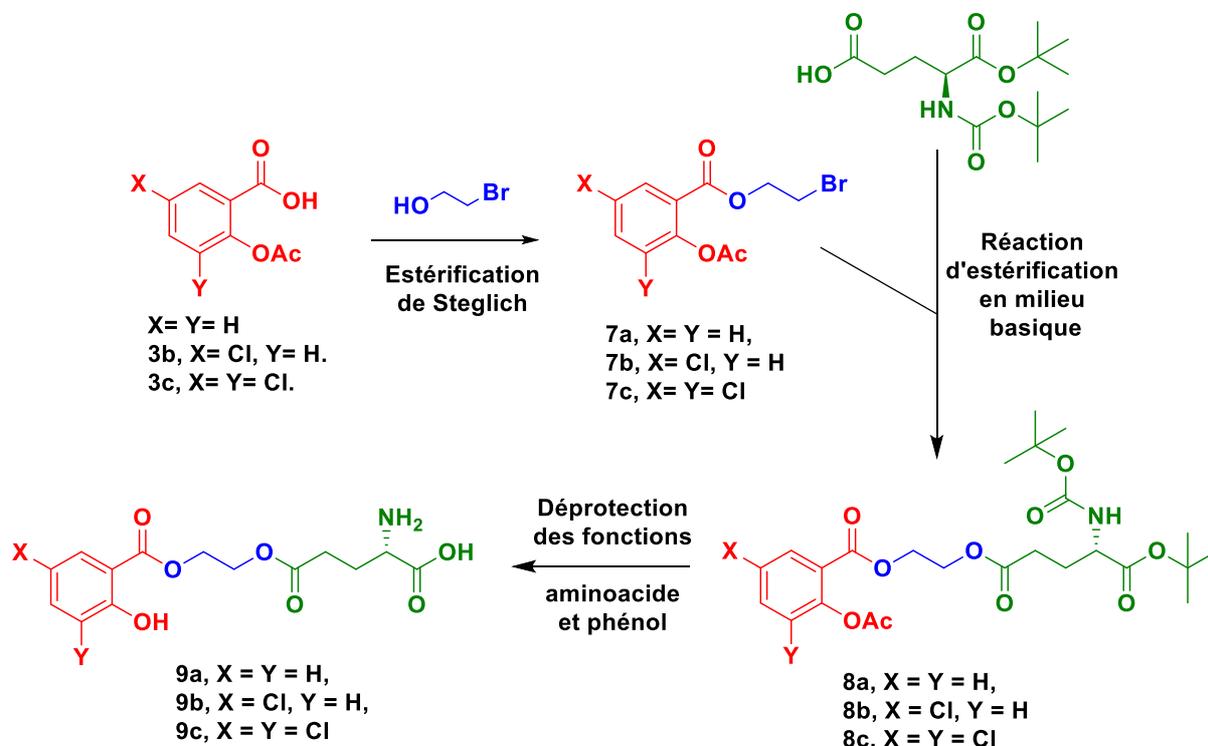


Schéma 18. Voie de synthèse des conjugués **9a-c** associant l'acide salicylique (et analogues chlorés) à l'acide L-glutamique par un espaceur éthylène glycol.

La première étape de cette voie de synthèse est une réaction de condensation entre les dérivés acétylés (**3a-c**) et du 2-bromoéthanol en employant des conditions opératoires similaires à celles des condensations peptidiques des composés **2** et **4a-c**. Cette étape de condensation est également appelée estérification de Steglich, elle permet d'obtenir les esters **7a-c**. Les bromoesters **7a-c** sont ensuite condensés avec la fonction acide carboxylique libre de l'acide L-glutamique commercial. Ces réactions permettent d'obtenir les conjugués protégés **8a-c**. Ces derniers sont ensuite engagés dans des réactions de déprotection des fonctions acide carboxylique, amine et phénol en milieu acide pour générer les conjugués **9a-c** avec leurs fonctions aminoacides et phénol libres.

2.1.2.1- Estérifications de Steglich entre les dérivés **3a-c** et le 2-bromoéthanol

2.1.2.1.1- Présentation des conditions opératoires

L'estérification de Steglich fut découverte par le professeur Wolfgang Steglich et Bernard Neises³⁸⁶ en 1978. Elle permet de synthétiser des esters en engageant des acides carboxyliques et des alcools en présence de DMAP comme agent de transfert de groupement acyle et d'un agent de condensation. Les auteurs ont employé la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et ont pu obtenir les esters désirés avec des rendements allant de **30** à **98** % en fonction des réactifs engagés. Les conditions opératoires de ces réactions d'estérifications sont présentées sur le Schéma 19.

Le choix d'employer l'EDCI à la place de la DCC comme agent de condensation est stratégique car cela permet d'éviter la formation de dicyclohexylurée, qui s'avère difficile à éliminer. Peu de réactions d'estérifications entre des dérivés d'acide salicylique et le 2-bromoéthanol ont été décrites et aucune de celles répertoriées n'emploie d'agent de condensation^{387,388}.

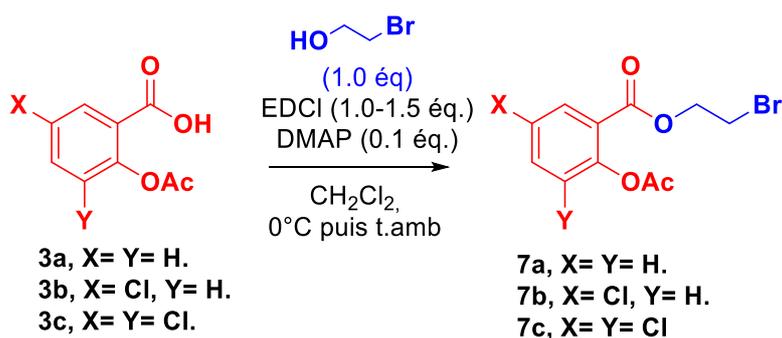


Schéma 19. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de Steglich entre les dérivés acétylés d'AS et le 2-bromoéthanol (Adaptées de Steglich et Neises³⁸⁶).

2.1.2.1.2- Résultats expérimentaux des réactions d'estérifications de Steglich

Tableau 4. Résultats expérimentaux des réactions d'estérifications de Steglich sur les dérivés acétylés de l'AS et de ses analogues.

Entrées	Réactif	n _{réactif} (mmol)	Équivalent EDCI	Temps (h)	Rendement (%)
1	3a	18,9	1,0	60	67
2	3b	5,36	1,0	24	34
3	3c	6,43	1,5	24	50

Le composé **7a** a été isolé avec un rendement de **67 %**. Après une analyse RMN ¹H, nous avons pu constater que le produit obtenu avait conservé son groupement acétyle observé par la présence d'un singulet intégrant pour 3 protons à 2.36 ppm. L'apparition de deux triplets, intégrant pour deux protons chacun à 4.57 et 3.70 ppm permet de nous confirmer la présence de la chaîne éthyloxy de l'ester. Cependant, l'analyse RMN ¹H ne permet pas de confirmer la présence de l'atome de brome en position 2 de cette chaîne éthyloxy. Afin de confirmer la présence de l'halogène, une analyse de spectrométrie de masse HRMS a été réalisée. Cette dernière a permis de confirmer la présence de l'atome de brome sur le composé en mesurant une valeur m/z de 308.9737, correspondant à l'espèce chargée [M+Na]⁺.

Les composés **7b** et **7c** ont été isolés avec des rendements respectifs de **34** et **50 %**. Ces derniers ont été analysés afin de confirmer leurs structures. Ces analyses RMN s'avèrent comparables à celles du composé **7a**. La présence du groupement acétyle a pu être confirmée par des singulets intégrant pour trois protons, présents respectivement à 2.36 (**7b**) et 2.41 ppm (**7c**). La présence des chaînes 2-bromoéthyle a également pu être confirmée par deux triplets de deux protons chacun, présents respectivement à 3.61 et 4.59 ppm pour les deux composés.

Les conditions opératoires de Steglich permettent d'obtenir les esters correspondants. Contrairement aux condensations peptidiques, nous n'avons pas observé la perte du groupement acétyle au cours de ces réactions. La présence du groupement acétyle va s'avérer problématique car les conjugués **9a-c** possèdent également deux liaisons esters supplémentaires qui sont susceptibles d'être saponifiées lors de la déprotection des fonctions phénols. Il s'avère donc nécessaire de réfléchir à des alternatives ne nécessitant pas de protéger cette fonction phénol.

2.1.2.1.3- Alternative à la réaction d'estérification de Steglich

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la formation de ces esters désacétylés en employant des acides forts comme décrit dans les conditions d'estérification de Fischer³⁸⁹. L'estérification de Fischer fut décrite pour la première fois en 1895. Elle met en jeu un acide carboxylique et un alcool en présence d'un catalyseur acide. Afin de réaliser cette réaction d'estérification, nous nous sommes inspirés des travaux d'Egorova *et al*³⁹⁰ réalisés sur l'acide salicylique en présence d'acide sulfurique et de Babazadeh et Edjlali³⁹¹ employant le diéthylétherate de trifluorure de bore (BF₃.Et₂O) afin d'obtenir le composé **7a'** avec sa fonction phénol libre (Schéma 20).

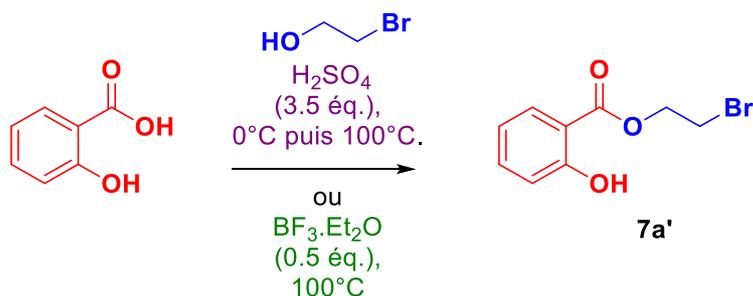


Schéma 20. Conditions opératoires des réactions d'estérification avec un acide de Brønsted (H₂SO₄)³⁹⁰ ou un acide de Lewis (BF₃.Et₂O)³⁹¹.

Tableau 5. Résultats expérimentaux des estérifications de Fischer de l'AS

Entrées	Acide employé	Temps (h)	Conditions opératoires	Rendement 7a' (%)
1	H ₂ SO ₄ (3,5 équ)	24	Egorova <i>et al</i> ³⁹⁰	25
2	BF ₃ .Et ₂ O (0,5 équ)	8	Babazadeh et Edjlali ³⁹¹	51

Ainsi, dans les conditions d'Egorova *et al*³⁹⁰, le composé **7a'** a pu être isolé avec un rendement de **25 %**. Dans les conditions de Babazadeh et Edjlali³⁹¹, le composé **7a'** a pu être isolé avec un rendement de **51 %**. Ce dernier a été analysé par RMN ¹H afin de confirmer sa structure. L'analyse a ainsi permis de confirmer la présence de la chaîne 2-bromoéthyle par l'apparition de deux triplets intégrant pour deux protons à 3.66 et 4.63 ppm. La présence du groupement phénol a également pu être confirmée par un singulet intégrant pour un proton à 10.57 ppm.

2.1.2.2- Réactions d'estérification de l'acide L-glutamique en milieu basique

2.1.2.2.1- Présentation des conditions opératoires

La seconde étape de cette voie de synthèse va correspondre à des réactions d'estérification de la fonction acide carboxylique de l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque avec les dérivés bromés **7a-c**. Ces réactions sont réalisées en présence de carbonate de potassium (K₂CO₃) dans du DMF anhydre. Ces conditions opératoires permettent d'obtenir les conjugués protégés **8a-c** présentant l'espaceur éthylène glycol. Les conditions opératoires présentées sur le Schéma 21 sont adaptées des travaux de Donald White³⁹² sur des réactions d'alkylation avec du carbonate de potassium.

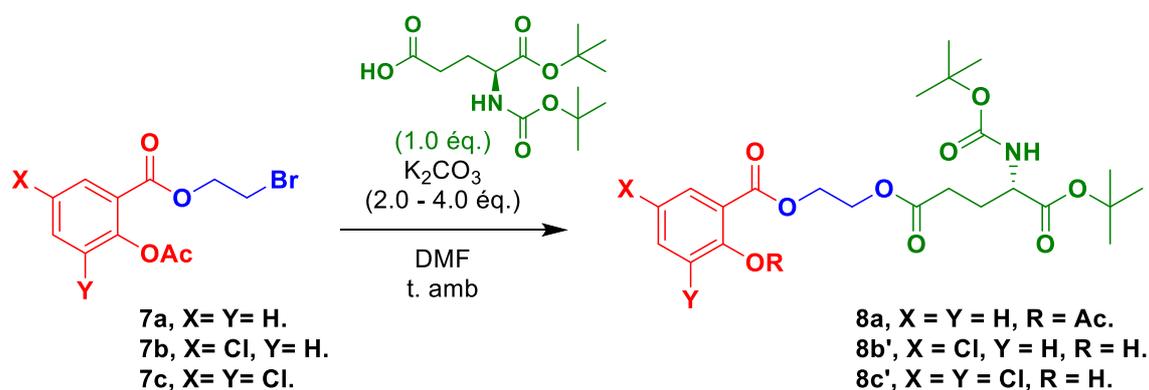


Schéma 21. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de l'acide L-glutamique commercial par les composés **7a-c** en milieu basique (Adaptées de White³⁹²).

2.1.2.2.2- Résultats expérimentaux des réactions d'estérification de l'acide L-glutamique

Tableau 6. Résultats expérimentaux des réactions d'estérification de l'acide L-glutamique.

Entrées	Dérivé bromé	Éq. base	Temps (h)	Rendement 8 (%)	Rendement 8' (%)
1	7a	2,0	18	98	/
2	7b	2,0	16	a	9
3	7c	2,0	16	a	17

a : Composé obtenu en mélange avec l'acide glutamique commercial.

Le composé **8a** a pu être obtenu avec un rendement de **98 %**. Ce dernier a été analysé par RMN ¹H afin de confirmer sa structure. L'analyse RMN nous informe de la présence du groupement acétyle par la présence d'un singulet à 2.33 ppm. La présence de l'acide L-glutamique est également confirmée par quatre multiplets situés respectivement à 1.87, 2.16, 2.41 et 4.19 ppm, correspondant aux protons de la chaîne aliphatique et au CH de l'aminoacide.

Malgré des conditions opératoires similaires à celles du composé **8a**, les dérivés **8b** et **8c** ont pu être identifiés par RMN ^1H sans être isolés. Cependant, des sous-produits minoritaires ont pu être isolés avec des rendements respectifs de **9 %** pour le composé **8b'** et de **17 %** pour le composé **8c'**. Ces composés **8b'** et **8c'** ont été analysés par RMN ^1H et présentent des caractéristiques similaires au composé **8a** à l'exception du groupement acétyle qui n'est pas présent. Nous avons cependant pu remarquer la présence de singulets intégrant pour un proton à respectivement 10.56 (**8b'**) et 11.12 ppm (**8c'**) qui sont caractéristiques de groupements phénols. Ces dérivés **8b'** et **8c'** correspondent ainsi aux produits d'estérification désacétylés.

2.1.2.3- Réactions de déprotection des fonctions α -aminoacides en milieu acide

2.1.2.3.1- Présentation des conditions opératoires

L'étape suivante de la voie de synthèse correspond à la déprotection des groupements *tert*-butyle présents sur les fonctions acide carboxylique et amine des composés **8b'** et **8c'** et également phénol pour le composé **8a**. Les déprotections sont comme précédemment, réalisées en milieu acide en employant l'acide trifluoroacétique (Schéma 22).

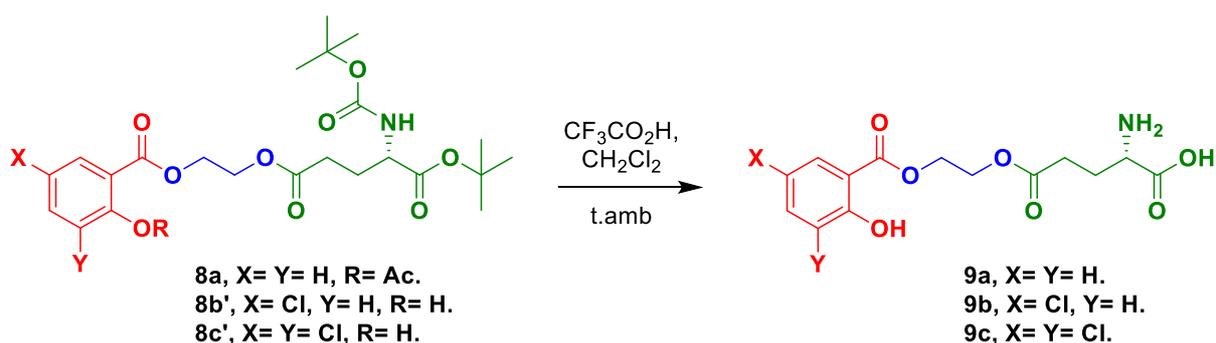


Schéma 22. Conditions opératoires des réactions de déprotection de la fonction α -aminoacide des composés **8a**, **8b'** et **8c'** en milieu acide.

2.1.2.3.2- Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des fonctions α -aminoacides

Tableau 7. Résultats expérimentaux des réactions de déprotections des fonctions aminoacides.

Entrées	Composé	n _{réactif} (mmol)	V _{TFA} (mL)	Temps (h)	Rendement (%)
1	8a	0.68	5	48	79
2	8b'	0.39	4	1	63
3	8c'	0.19	2	3	96

Les composés **9a-c** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de **79 %**, **63 %** et **96 %**. Les composés ont été analysés par RMN ¹H afin de déterminer leurs structures. Ces analyses ont tout d'abord permis de confirmer la perte des groupements protecteurs *tert*-butyle présents sous formes de singulets de neufs protons entre 1.41 et 1.46 ppm sur les spectres ¹H des composés **8a**, **8b'** et **8c'**. L'analyse du composé **9a** a également permis de confirmer la perte du groupement acétyle par l'apparition d'un singulet intégrant pour un proton à 10.54 ppm.

La présence de l'espaceur a également été confirmée par des signaux apparaissant sous formes de deux triplets intégrant pour deux protons à 3.70 et 4.32 ppm (**9a**), 3.73 et 4.32 ppm (**9b**), 4.41 et 4.54 ppm (**9c**). La présence de l'acide L-glutamique a également pu être confirmée par la présence de multiplets compris entre 1.92 et 2.37 ppm, correspondant aux deux groupements CH₂ de l'acide. La présence du proton de la fonction α-aminoacide a également pu être confirmée par des multiplets intégrant pour un proton à 3.90 (**9a**), 4.06 (**9b**) et 3.72 ppm (**9c**). Ces trois composés ont également été analysés par HRMS pour confirmer leurs structures. Les analyses HRMS ont mesuré des valeurs m/z respectives de 312.1071 (**9a**), 345.0688 (**9b**) et 380.0230 (**9c**), correspondant aux espèces chargés [M+H]⁺.

2.1.2.4- Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués **9a-c**

Les conjugués **9a-c** ont pu être obtenus avec des rendements globaux de synthèse de **52 %** (**9a**), **2 %** (**9b**) et **8 %** (**9c**) en trois étapes. Le composé **9a** présente un rendement global bien supérieur à ses deux analogues chlorés. L'étape limitante s'avère être l'estérification de l'acide L-glutamique conduisant à l'obtention des composés **8b** et **8c** en mélange avec l'acide L-glutamique commercial mais également à l'obtention des composés désacétylés **8b'** et **8c'** en faibles quantités.

2.1.3- Synthèse d'un conjugué AS-acide L-glutamique sans espaceur

Nous avons par la suite choisi d'orienter nos travaux vers la synthèse d'un nouveau conjugué associant l'acide salicylique à l'acide L-glutamique sans espaceur. L'acide salicylique est associé à l'acide L-glutamique par une liaison ester entre la fonction phénol de la substance active et la fonction acide carboxylique de la chaîne latérale du nutriment (Figure 30).

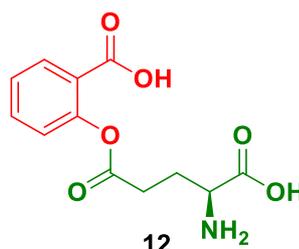


Figure 30. Structure du conjugué acide salicylique-acide L-glutamique **12** sans espaceur.

Afin d'obtenir le conjugué **12**, nous avons proposé une synthèse en trois étapes (Schéma 23) en employant deux groupements protecteurs distincts : le groupement *tert*-butyle (R= *t*-Bu) et le groupement benzyle (R= CH₂Ph).

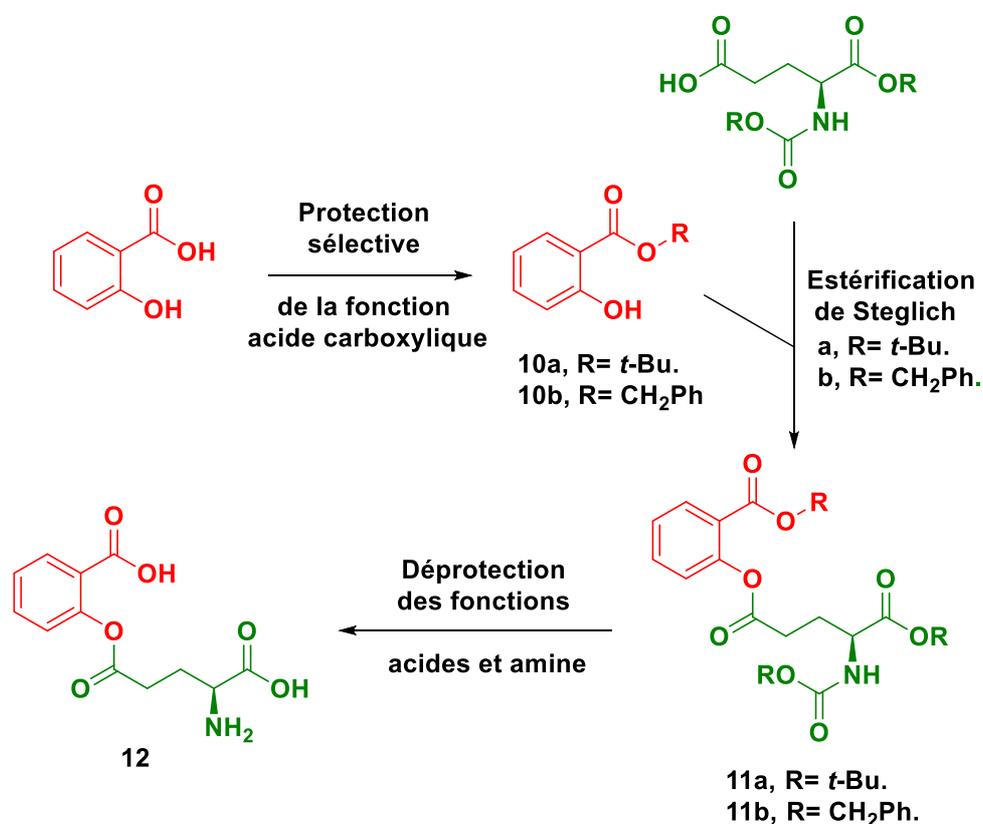


Schéma 23. Voie de synthèse du conjugué **12**.

Cette voie de synthèse en trois étapes débute par une réaction de protection sélective de la fonction acide carboxylique de l'acide salicylique pour obtenir les esters **10a** (R = *t*-Bu) et **10b** (R = CH₂Ph). Ces composés sont ensuite engagés dans des estérifications de Steglich avec les acides 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (R = *t*-Bu pour **10a**) et 5-benzyloxy-4*S*-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (R = CH₂Ph pour **10b**). Ces condensations permettent d'obtenir les conjugués protégés **11a** et **11b** qui seront ensuite déprotégés afin d'obtenir le conjugué **12**. Nous avons choisi de réaliser ces réactions avec des groupements benzyle afin d'obtenir le composé **12** dans des conditions de déprotection différentes de celles proposées pour la déprotection des groupements *tert*-butyle.

2.1.3.1- Réactions de protection de la fonction acide carboxylique de l'AS

2.1.3.1.1- Présentation des conditions opératoires

Afin de protéger de façon sélective la fonction acide carboxylique de l'acide salicylique, nous nous sommes intéressés à des conditions opératoires permettant de conserver la fonction phénol libre.

Ainsi, nous avons choisi de réaliser la protection sous forme d'esters de *tert*-butyle (**10a**) et de benzyle (**10b**). Les conditions opératoires conduisant à l'ester **10a** ou des analogues substitués ont pu être décrites par divers auteurs tels que Bolton *et al*³⁹³ et plus récemment Chuprakov *et al*³⁹⁴. Les conditions expérimentales conduisant à l'ester benzylique **10b** ont quant à elle été décrites par Kotian *et al*³⁹⁵ et Thomas *et al*³⁹⁶. Les conditions opératoires de ces deux réactions sont présentées sur le Schéma 24.

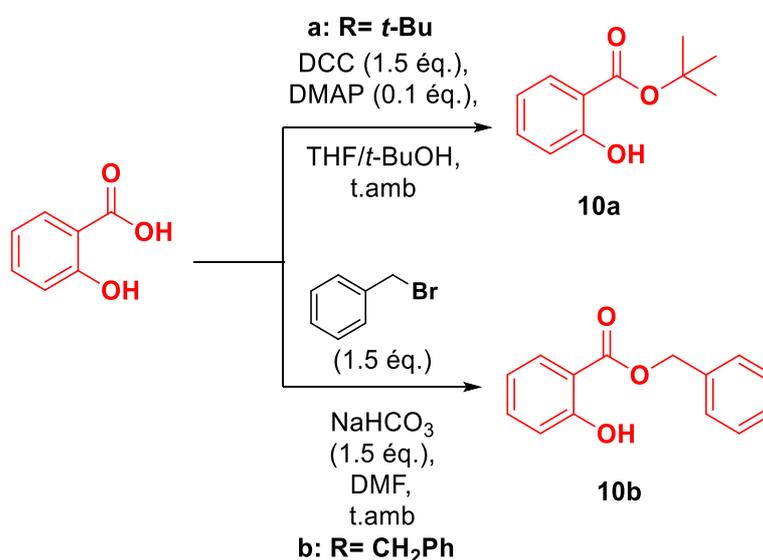


Schéma 24. Conditions opératoires des réactions de protection de l'acide salicylique sous forme d'esters de *tert*-butyle^{393,394} (**10a**) et de benzyle^{395,396} (**10b**).

2.1.3.1.2- Résultats expérimentaux des réactions de protections sélectives de l'AS

Tableau 8. Résultats expérimentaux des réactions de protections sélectives de l'AS.

Entrées	n _{AS} (mmol)	R	Temps (h)	Rendement (%)
1	36,7	<i>t</i> -Bu	18	8
2	32,6	CH ₂ Ph	40	78

L'ester de *tert*-butyle **10a** a pu être isolé avec un très faible rendement de **8 %**. Le résultat obtenu s'avère très modeste en comparaison des résultats obtenus par les auteurs sur les acides 5-formylsalicylique²⁶ (**93 %**) et 5-nitrosalicylique²⁷ (**81 %**). Ce résultat peut être justifié par l'absence de groupements à effet inductif (-I) ou mésomère (-M) attracteurs en position 5 de l'acide salicylique. Malgré un rendement très faible, le composé a pu être isolé et identifié en RMN ¹H avec l'apparition d'un singulet de 9 protons à 1.61 ppm. La conservation de la fonction phénol libre est également confirmée par la présence d'un singulet intégrant pour un proton à 11.05 ppm.

L'ester benzylique **10b** a pu être obtenu avec un rendement de **78 %**. La structure de l'ester benzylique a pu être confirmée par une analyse en RMN ¹H avec l'apparition d'un singulet intégrant pour deux protons à 5.24 ppm et de multiplets de cinq protons compris entre 7.38 et 7.51 ppm correspondant au groupement CH₂ et aux protons aromatiques du groupement protecteur benzyle. La présence de la fonction phénol est également confirmée par un singulet intégrant pour un proton à 10.79 ppm.

2.1.3.2- Estérification des composés **10a-b** et des acides glutamiques commerciaux

2.1.3.2.1- Présentation des conditions opératoires

Les esters d'AS **10a** et **10b** sont ensuite engagés dans des réactions d'estérifications de Steglich avec respectivement les acides 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque et 5-benzyloxy-4*S*-[(*tert*-benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque. Ces réactions vont permettre de générer les esters **11a** et **11b** (Schéma 25).

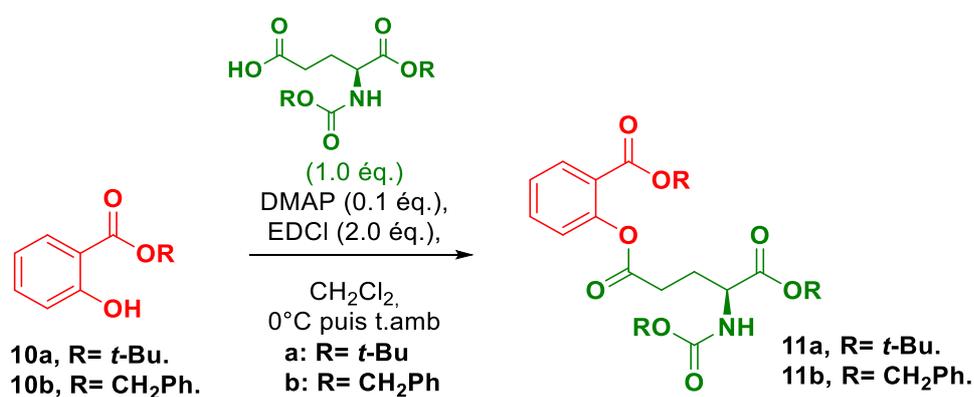


Schéma 25. Conditions opératoires des réactions d'estérification de Steglich entre les dérivés protégés (**10a** et **10b**) et les acides 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque et 5-benzyloxy-4*S*-[(*tert*-benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque.

2.1.3.2.2- Résultats expérimentaux des estérifications des dérivés **10a** et **10b**

Tableau 9. Résultats expérimentaux des réactions d'estérification de Steglich.

Entrées	n ₁₀ (mmol)	R	Temps (h)	Rendement (%)
1	2,93	<i>t</i> -Bu	20	95
2	2,69	CH ₂ Ph	24	64

L'ester **11a** (R = *t*-Bu) a pu être obtenu avec un rendement de **95 %**. Une analyse par RMN ^1H a pu confirmer la fonctionnalisation du groupement phénol par la disparition du singulet intégrant pour un proton à 11.05 ppm sur le composé **10a**. La structure du composé **11a** a également pu être confirmée par la présence des 3 groupements *tert*-butyle apparaissant sous la forme de trois singulets de neuf protons chacun entre 1.45 et 1.55 ppm mais également par des signaux compris entre 2.06 et 4.29 ppm intégrant pour cinq protons correspondant à la chaîne aliphatique et à la fonction α -aminoacide de l'acide glutamique. Les quatre signaux correspondant aux protons aromatiques entre 7.10 et 7.90 ppm permettent de confirmer la présence de l'AS.

Le composé **11b** (R = CH_2Ph) a été obtenu avec un rendement de **64 %**. La structure du composé a pu être confirmée par RMN ^1H avec la disparition du singulet intégrant pour un proton à 10.79 ppm sur le composé **10b**. La présence de trois signaux apparaissant sous formes singulets à 5.11, 5.17 et 5.23 ppm intégrant chacun pour deux protons ainsi qu'un multiplet de seize protons à 7.32 ppm confirme la présence des groupements protecteurs benzyle. La présence de l'acide glutamique est confirmée par les quatre signaux compris entre 1.91 et 4.4 ppm qui correspondent à la chaîne latérale et à la fonction α -aminoacide de ce dernier. La présence de l'AS est quant à elle confirmée par les quatre cycles aromatiques observés entre 7.04 et 8.04 ppm.

2.1.3.3- Réactions de déprotection des composés **11a** et **11b**

2.1.3.3.1- Présentation des conditions opératoires

Les conjugués protégés **11a** (R = *t*-Bu) et **11b** (R = CH_2Ph) sont engagés dans des réactions de déprotection des groupements *tert*-butyle du composé **11a** et benzyle du composé **11b**. Les groupements *tert*-butyle vont être déprotégés en milieu acide par l'emploi d'acide trifluoroacétique ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). Les groupements benzyle sont quant à eux déprotégés en présence de palladium déposé sur charbon (Pd/C) sous atmosphère d'hydrogène (Schéma 26).

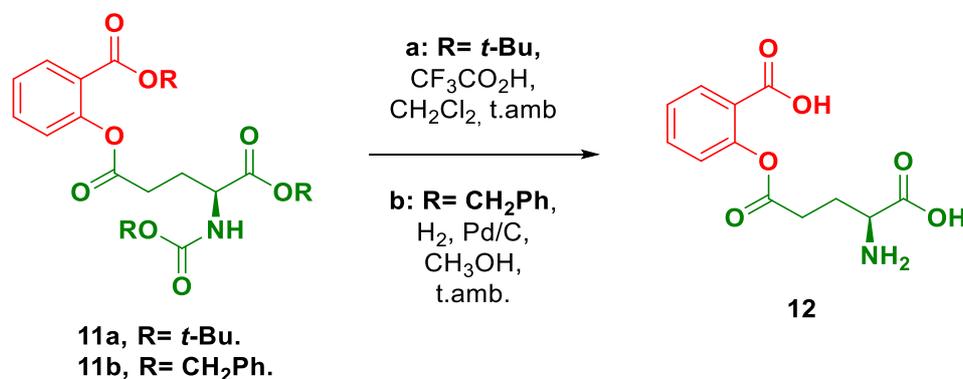


Schéma 26. Conditions opératoires des réactions de déprotection des composés **11a** et **11b**.

2.1.3.3.2- Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés **11a** et **11b**

L'avancement de ces réactions de déprotection a pu être suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Le suivi de ces réactions a permis de confirmer la conversion des composés protégés **11a** (R = *t*-Bu) et **11b** (R = CH₂Ph). Cependant, le résultat observé sur les plaques CCM correspond à la formation de deux produits distincts. La formation de deux produits au cours de ces réactions laisse supposer que la liaison ester entre les fonctions phénol de l'AS et acide carboxylique de l'acide glutamique a été clivée. Des analyses RMN ¹H des milieux réactionnels ont été réalisées et ont permis d'identifier un composé présentant quatre protons aromatiques compris entre 6.90 et 7.80 ppm. Ces analyses ont permis d'identifier l'acide salicylique comme produit de réaction, permettant de confirmer la destruction de la liaison ester entre le phénol de l'AS et l'acide caboxylique de l'acide L-glutamique.

Dans le cas des conditions opératoires de déprotection du composé **11a** (R= *t*-Bu), la liaison ester entre l'AS et l'acide glutamique s'avère peu stable en milieu acide. Les conditions opératoires de déprotection du composé **11b** (R= CH₂Ph), l'emploi de méthanol comme solvant de réaction a conduit à une transestérification de la liaison ester entre la substance active et le nutriment α -aminoacide. Afin d'éviter cette réaction, nous pourrions réaliser la déprotection du composé **11b** en employant un alcool plus encombré tel que l'isopropanol ou le *tert*-butanol.

2.1.3.4- Bilan des réactions de la voie de synthèse du conjugué **12**

Les deux étapes de synthèse ont permis d'obtenir les composés protégés **11a** et **11b** avec des rendements globaux de synthèse respectifs de **7** et **50 %** en deux étapes. Les conditions opératoires présentées n'ont pas permis d'aboutir à la synthèse du conjugué **12**. En effet, les conditions opératoires employées ont conduit à la formation des acides L-glutamique et salicylique. Ainsi, si nous souhaitons réaliser la synthèse du conjugué **12**, nous devons envisager d'employer des conditions opératoires différentes (solvant pour l'hydrogénolyse et acide employé pour les groupement *tert*-butyle) ou d'autres groupements protecteurs afin de ne pas hydrolyser cette fonction ester.

2.1.4- Bilan des synthèses de conjugués associant l'AS à de l'acide L-glutamique

Les voies de synthèse présentées dans ce premier chapitre ont permis d'obtenir six conjugués d'acide salicylique et de ses analogues 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques associés à de l'acide L-glutamique. Parmi ces six molécules, trois sont associées à l'acide aminé par un espaceur 1,2,3-triazole (**6a-c**) et par un espaceur éthylène glycol (**9a-c**). Les structures de ces conjugués sont représentées sur la Figure 31.

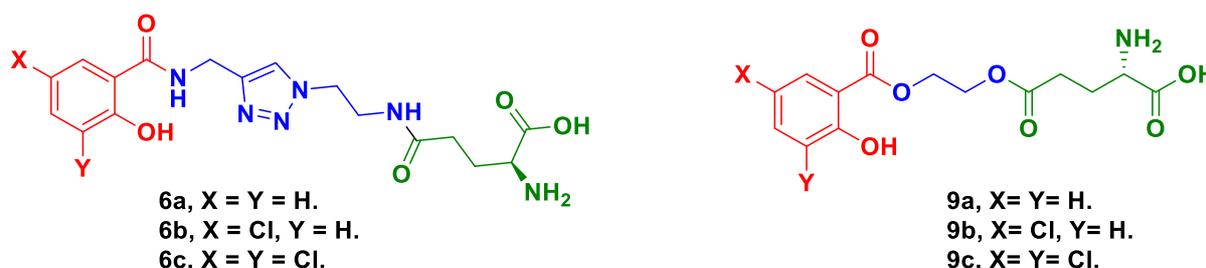


Figure 31. Structures des conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à l'acide L-glutamique par des espaceurs 1,2,3-triazole (**6a-c**) et éthylène glycol (**9a-c**).

2.2- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane

2.2.1- Synthèse d'un conjugué présentant un espaceur 1,2,3-triazole

Nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un conjugué associant l'acide salicylique au L-tryptophane par un espaceur triazolique (Figure 32).

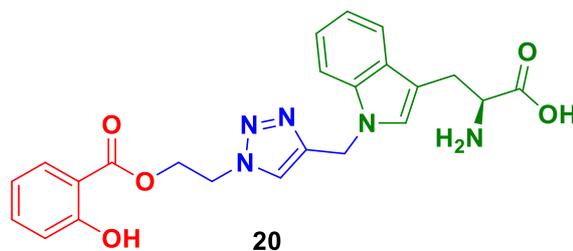


Figure 32. Structure du conjugué **20** associant l'AS au L-tryptophane par un espaceur triazole.

Ce dernier, présentant un noyau indole, s'avère particulièrement intéressant car cette structure est impliquée dans la synthèse de l'auxine^{397,398} ou acide 3-indoleacétique (AIA). Ainsi pour accéder à cette structure, nous avons élaboré une voie de synthèse en huit étapes à partir du chlorhydrate de L-tryptophanate de méthyle commercial et du composé **7a'** (Schéma 27).

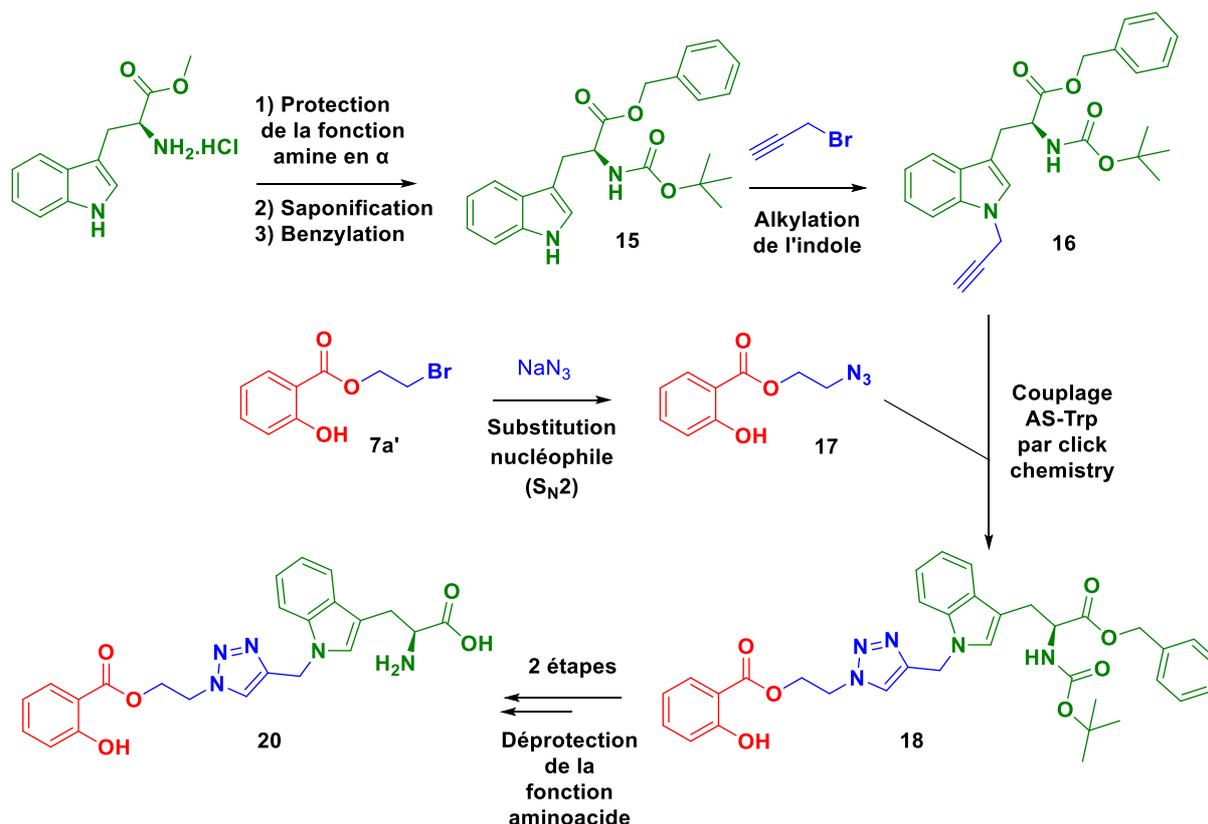


Schéma 27. Voie de synthèse simplifiée du conjugué AS associé au L-tryptophane par un espaceur 1,2,3-triazole **20**.

Cette voie de synthèse va ainsi débiter par une protection sélective de la fonction amine en α de l'acide carboxylique sous forme de carbamate de *tert*-butyle en employant un nombre limité d'équivalents d'anhydride de Boc afin d'éviter la protection du NH de l'indole qui sera impliquée dans l'obtention de l'espaceur 1,2,3-triazole. Cette première étape va permettre de générer l'intermédiaire **13** qui sera ensuite saponifié puis protégé sous forme d'ester benzylique **15**. Cette modification de groupement protecteur est réalisée afin d'éviter les réactions en milieu basique délétaires pour la liaison ester entre l'AS et l'espaceur.

Le composé **15** est ensuite engagé dans une réaction d'alkylation de l'atome d'azote (*N*-alkylation) de l'indole en présence de bromure de propargyle afin de greffer la fonction alcyne vrai nécessaire à la formation du cycle triazole. Cette réaction permet d'obtenir l'indole propargylique **16**. Le composé **7a'**, préalablement synthétisé est quant à lui engagé dans une réaction de substitution nucléophile du second ordre avec de l'azoture de sodium (NaN_3) afin d'obtenir l'azoture d'acide salicylique **17**. L'indole propargylique **16** et l'azoture **17** sont ensuite couplés par réaction de click chemistry conduisant à l'obtention du conjugué protégé **18**. Le composé **18** est ensuite déprotégé en deux étapes successives i/ de la fonction amine en milieu acide ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) et ii/ de la fonction acide carboxylique par hydrogénolyse catalytique conduisant au conjugué **20**.

2.2.1.1- Réaction de protection de la fonction amine du L-tryptophane commercial

2.2.1.1.1- Présentation des conditions opératoires

La première étape de cette voie de synthèse va consister à protéger de façon sélective la fonction amine du chlorhydrate de L-tryptophanate de méthyle commercial. Cette protection est réalisée en présence de triéthylamine et de dicarbonate de di-*tert*-butyle. Afin de la réaliser, nous avons suivi les conditions opératoires décrites par Nappi *et al*³⁹⁹ et Ruiz-Sanchis *et al*⁴⁰⁰ (Schéma 28).

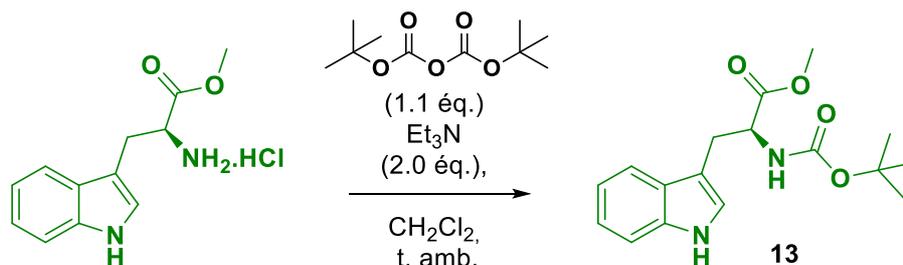


Schéma 28. Conditions opératoires de la réaction de protection de la fonction amine du tryptophane commercial.

2.2.1.1.2- Résultats expérimentaux des réactions de protection de la fonction amine

Les différentes réactions de protection de la fonction amine du L-tryptophanate de méthyle ont permis d'obtenir le composé **13** avec des rendements compris entre **85** et **97** %. La structure du composé a pu être confirmée par une analyse en RMN ¹H par la présence d'un singulet intégrant pour neuf protons à 1.45 ppm correspondant aux trois groupements méthyle du groupement *tert*-butyle. La formation du carbamate est également confirmée par la présence d'un doublet intégrant pour un proton à 5.11 ppm correspondant au NH du carbamate. La présence d'un singulet intégrant pour un proton à 8.19 ppm correspondant au NH de l'indole, confirmant que la protection de la fonction amine en position α a été sélective.

2.2.1.2- Réaction de saponification de l'ester méthylique du composé **13**

2.2.1.2.1- Présentation des conditions opératoires

La seconde étape de la voie de synthèse est une saponification de l'ester méthylique du composé **13**, réalisée en présence d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans un mélange méthanol/eau décrites par Roush *et al*⁴⁰¹ (Schéma 29).

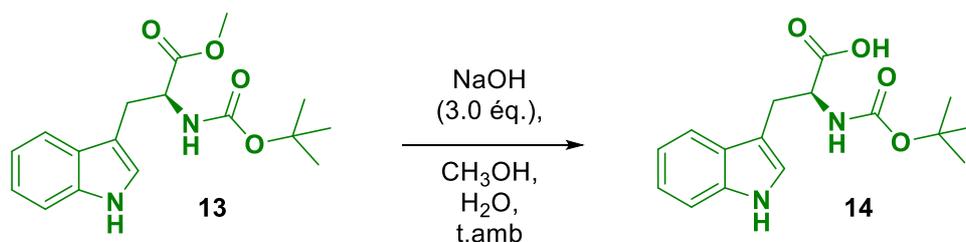


Schéma 29. Conditions opératoires de la réaction de saponification de l'ester méthylique du tryptophane protégé **13** (adaptées de Roush *et al*⁴⁰¹).

2.2.1.2.2- Résultat expérimental de la réaction de saponification

La réaction de saponification de l'ester méthylique a permis d'obtenir l'acide carboxylique **14** avec un rendement de **79 %**. La perte de l'ester méthylique a pu être confirmée par RMN ¹H par la disparition du singulet intégrant pour trois protons à 3.70 ppm sur le composé **13** et par l'apparition d'un singulet élargi intégrant pour un proton à 12.57 ppm correspondant au proton de l'acide carboxylique sur le spectre du composé **14**.

2.2.1.3- Réaction de benzylation de l'acide carboxylique **14**

2.2.1.3.1- Présentation des conditions opératoires

L'acide carboxylique **14** est ensuite protégé sous forme d'ester benzylique en milieu basique (K₂CO₃) en présence de bromure de benzyle. Les conditions opératoires s'apparentent à celles décrites dans les travaux d'alkylation de White³⁹². Les conditions opératoires de cette réaction décrites par Yu *et al*^{402,403} sont présentées sur le Schéma 30.

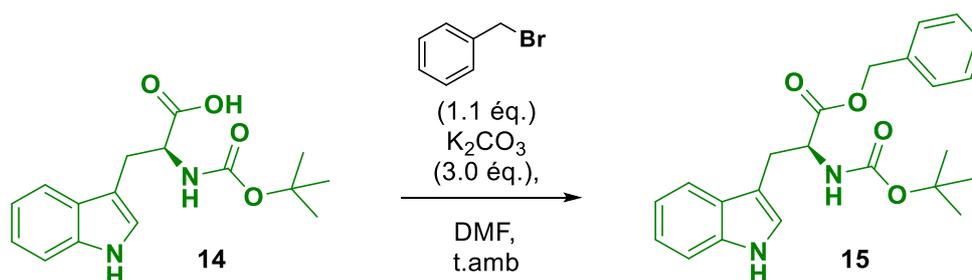


Schéma 30. Conditions opératoires de la réaction de benzylation de l'acide carboxylique **14** (adaptées de Yu *et al*^{402,403}).

2.2.1.3.2- Résultat expérimental de la réaction de benzylation de l'acide carboxylique **14**

L'ester benzylique du L-tryptophane **15** a pu être obtenu avec un rendement de **75 %**. La structure du composé **15** a pu être confirmée par RMN ¹H qui s'avère conforme aux données décrites dans la littérature^{402,403}.

2.2.1.4- Réaction de *N*-alkylation du noyau indolique du composé **15**

2.2.1.4.1- Présentation des conditions opératoires

Le composé **15** est ensuite engagé dans une réaction de *N*-alkylation en présence de bromure de propargyle et d'hydruure de sodium (NaH) adaptée des conditions de Henrottin⁴⁰⁴, Schultz⁴⁰⁵ et Junk⁴⁰⁶, (Schéma 31).

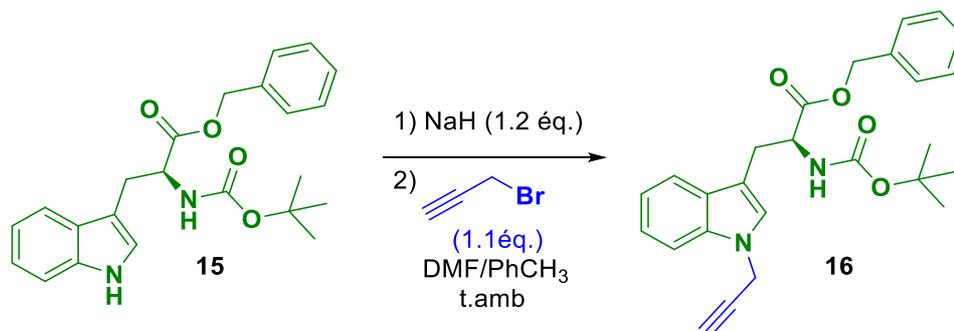


Schéma 31. Conditions opératoires de la réaction de *N*-alkylation du noyau indolique du L-tryptophane protégé **15** (adaptées de Henrottin⁴⁰⁴, Schultz⁴⁰⁵ et Junk⁴⁰⁶).

2.2.1.4.2- Résultat expérimental de la réaction de *N*-alkylation du noyau indolique

Le dérivé propargylique du tryptophane **16** a pu être isolé avec un rendement de **80 %**. La structure du composé **16** a pu être confirmée par une analyse RMN ¹H avec la disparition du singulet intégrant pour un proton à 8.11 ppm, correspondant au proton de l'indole du composé **15**. L'apparition de deux doublets à 2.36 ppm et 4.73 ppm intégrant respectivement pour un et deux protons confirme la présence du groupement propargyle sur l'atome d'azote de l'indole.

2.2.1.5- Synthèse de l'azoture d'AS **17** par substitution nucléophile *S_N2*

2.2.1.5.1- Présentation des conditions opératoires

Afin de pouvoir synthétiser le composé **18**, il est nécessaire de préparer l'azoture à partir du dérivé **7a'** obtenu précédemment à partir de l'acide salicylique (Schéma 20)^{390,391}. Cette réaction a ainsi été réalisée dans des conditions opératoires présentées par Ghaly *et al*⁴⁰⁷ (Schéma 32).

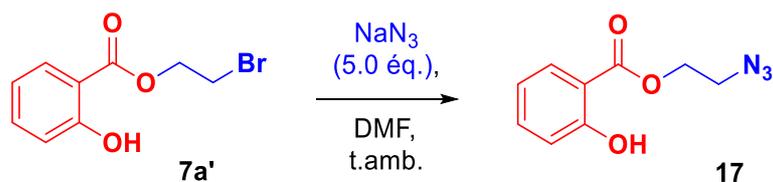


Schéma 32. Conditions opératoires de préparation de l'azoture d'acide salicylique **17** (adaptées de Ghaly *et al*⁴⁰⁷).

2.2.1.5.2- Résultat expérimental de la réaction de substitution nucléophile sur le composé **7a'**

Le composé **17** a été isolé avec un rendement **81 %**. La structure de ce dernier a pu être confirmée par des analyses RMN ^1H et ^{13}C . L'analyse RMN ^1H a permis de confirmer la présence de la chaîne éthylole de l'ester par deux triplets intégrants chacun pour deux protons à 3.64 et 4.53 ppm. Un singulet à 10.59 ppm ainsi que quatre signaux correspondant aux protons aromatiques entre 6.92 et 7.89 ppm permettent de confirmer la présence de l'AS. L'analyse RMN ^{13}C a permis de confirmer la présence du groupement carbonyle de l'ester par un signal à 169.8 ppm. La présence de six signaux dont quatre CH, compris entre 111.9 et 161.8 ppm permet de confirmer la présence du noyau aromatique de l'AS. La présence des groupements CH_2 de l'ester a également pu être confirmée par les deux signaux à 49.8 et 63.8 ppm.

2.2.1.6- Couplage des composés **16** et **17** par click-chemistry

2.2.1.6.1- Présentation des conditions opératoires

Le composé propargylique **16** et l'azoture d'acide salicylique **17** sont engagés dans une réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen³⁸⁰ afin de générer le conjugué protégé **18** par la formation du cycle 1,2,3-triazole. Les conditions opératoires employées sont décrites par Suryapeta *et al*⁴⁰⁸ (Schéma 33).

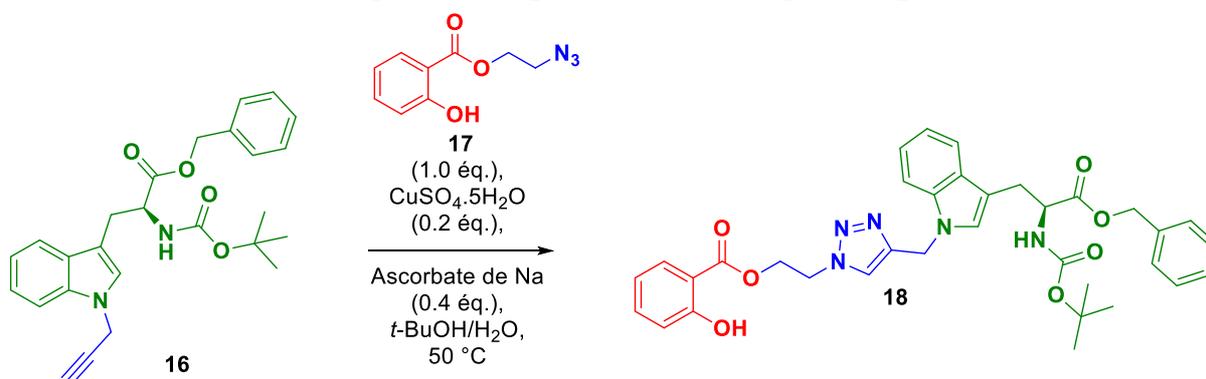


Schéma 33. Synthèse du conjugué protégé **18** par réaction de cycloaddition³⁸⁰ [3+2] entre le dérivé propargylique **16** et l'azoture d'AS **17** (adaptées de Suryapeta *et al*⁴⁰⁸).

2.2.1.6.2- Résultat expérimental de la réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen

Le composé **18** a pu être isolé avec un rendement de **86 %**. La structure du composé obtenu a pu être confirmée par RMN ^1H par des signaux compris entre 6.61 et 7.56 ppm intégrant pour quinze protons correspondant aux protons aromatiques du composé **18**. La présence du groupement phénol a également pu être confirmée par l'apparition d'un singulet intégrant pour un proton à 10.40 ppm. La présence des cinq groupements CH_2 a pu être confirmée par un multiplet à 3.23 ppm, deux triplets à 3.23 et 4.61 ppm et deux singulets à 5.05 et 5.29 ppm. La présence du CH de l'aminoacide a quant à elle pu être confirmée par un multiplet intégrant pour un proton à 4.66 ppm.

2.2.1.7- Déprotection de la fonction α -aminoacide du composé **18**

2.2.1.7.1- Présentation des conditions opératoires

Cette étape va débuter par la déprotection de la fonction amine en milieu acide puis de la fonction acide carboxylique par hydrogénolyse catalytique conduisant au conjugué **20** (Schéma 34).

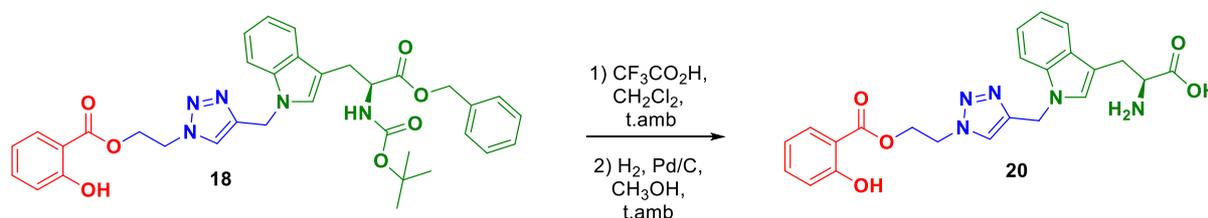


Schéma 34. Conditions opératoires de déprotection de la fonction α -aminoacide du composé **18**.

2.2.1.7.2- Résultat expérimental de l'étape de déprotection de la fonction aminoacide

Le composé **20** a pu être obtenu avec un rendement de **74 %** en deux étapes. Le composé a été analysé par des RMN (^1H et ^{13}C) et HRMS afin de confirmer la perte des groupements protecteurs *tert*-butyle et benzyle. L'analyse RMN ^1H a ainsi permis de confirmer la disparition du singulet de neuf protons correspondant aux groupements *tert*-butyle à 1.40 ppm et des signaux à 5.05 et 7.18 à 7.30 ppm correspondant aux groupement benzyle sur le spectre du composé **18**. La présence de dix protons aromatiques compris entre 6.89 et 8.16 ppm permet de confirmer la présence de l'AS, de l'espaceur triazole et de l'indole sur le bioprécurseur **20**. La présence des groupements CH_2 a pu être confirmée par quatre signaux observés à 3.23, 4.60, 4.72 et 5.39 ppm. La présence de la fonction aminoacide a également été confirmée par un multiplet intégrant pour un proton à 4.35 ppm.

L'analyse RMN ^{13}C a permis de confirmer la présence des deux groupements carbonyle du composé **20** à 171.3 et 168.3 ppm, correspondant aux fonctions ester de l'AS et acide carboxylique de l'acide aminé. La présence du groupement phénol a également pu être confirmée par le signal observé à 160.4 ppm. Les quinze signaux compris entre 107.8 et 144.1 ppm, dont dix CH permettent de confirmer la présence des cycles aromatiques (benzène, triazole et indole) sur le composé **20**. Les quatre signaux correspondant aux CH_2 observés à 26.6, 41.3, 48.9 et 63.9 ppm et un cinquième correspondant au CH à 53.4 ppm permettent de confirmer la présence de l'espaceur et de l'acide aminé. L'analyse HRMS a permis de valider la structure du conjugué **20** en mesurant une valeur m/z de 472.1580 correspondant à l'espèce chargée $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.2.1.8- Bilan des réactions de la voie de synthèse du conjugué **20**

Le conjugué **20** a pu être obtenu par la voie de synthèse proposée en huit étapes. Cette dernière, bien qu'elle présente un nombre important d'étapes a permis d'obtenir chacun des intermédiaires réactionnels (**13** à **19**) avec des rendements expérimentaux compris entre **75** et **97** %. Ainsi, le composé **20** a pu être obtenu avec un rendement global de synthèse de **23** % en huit étapes.

2.2.2- Synthèse de deux conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 et 1,5-dicarbonylés.

Nous nous sommes cette fois-ci intéressés à la synthèse de deux nouveaux bioprécurseurs associant l'AS et le L-tryptophane par des espaceurs 1,4 et 1,5-dicarbonylés (Figure 33). Ainsi, l'acide salicylique sera lié à l'espaceur par une fonction ester sur le groupement phénol et le tryptophane par une fonction amide sur l'atome d'azote du cycle indolique.

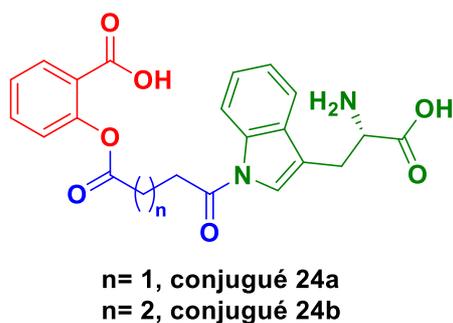


Figure 33. Structure des conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 ($n = 1$) et 1,5 ($n = 2$) dicarbonylés.

En plus de la fonction aminoacide, ces composés possèdent également une fonction acide carboxylique libre sur l'AS. Ainsi, en plus d'utiliser des transporteurs d'acides aminés, ces bioprécurseurs sont susceptibles de favoriser le franchissement de la membrane plasmique par un mécanisme de piégeage d'acide. Afin de réaliser la synthèse de ces deux conjugués, nous avons imaginé une voie de synthèse en quatre étapes à partir du dérivé de L-tryptophane protégé **15** et du composé **10b** obtenus antérieurement. La voie de synthèse des conjugués **24a** ($n = 1$) et **24b** ($n = 2$) est présentée ci-dessous (Schéma 35).

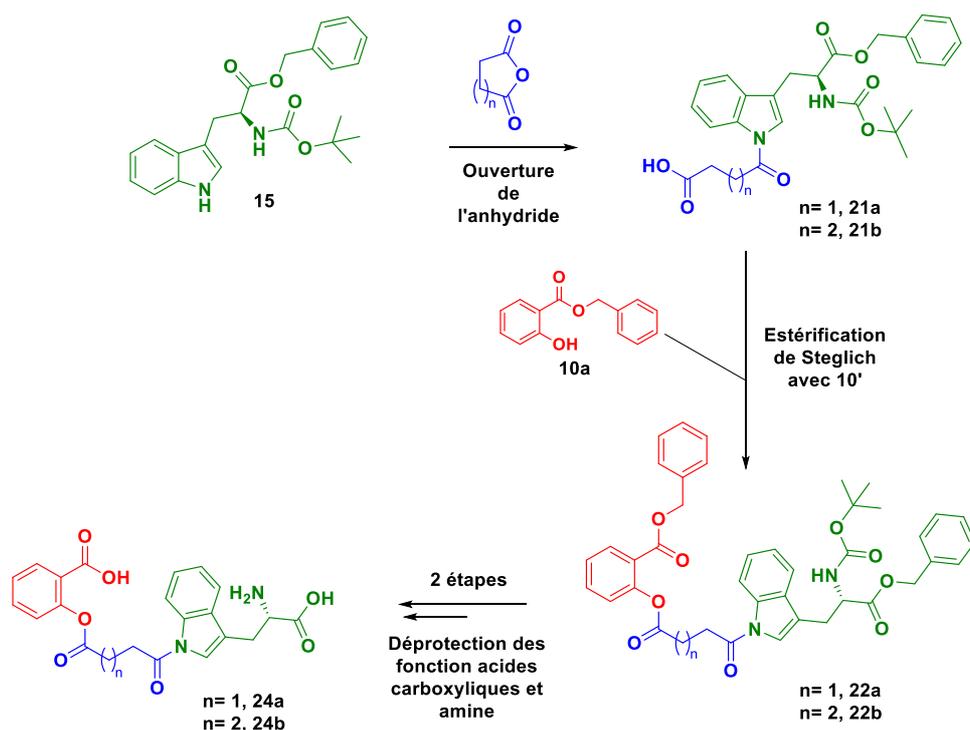


Schéma 35. Voie de synthèse des conjugués **24a** (n = 1) et **24b** (n = 2).

Cette voie de synthèse va débiter par une première étape correspondant à des réactions d'ouverture des anhydrides succinique (n = 1) et glutarique (n = 2). Cette première étape va permettre de générer les composés **21a** (n = 1) et **21b** (n = 2) avec une fonction acide carboxylique libre. Ces deux intermédiaires vont ensuite être engagés dans des réactions d'estérification de Steglich avec le groupement phénol du composé **10b** pour obtenir les conjugués protégés **22a** (n = 1) et **22b** (n = 2). Les composés **22a** et **22b** vont ensuite être engagés dans deux étapes successives de déprotection de leurs fonctions acides carboxyliques et amine afin d'obtenir les conjugués **24a** (n = 1) et **24b** (n = 2) désirés.

2.2.2.1- Réactions d'ouverture des anhydrides succinique (n = 1) et glutarique (n = 2)

2.2.2.1.1- Présentation des conditions opératoires

La première étape de cette voie de synthèse va correspondre à des réactions d'ouverture des anhydrides succinique (n = 1) et glutarique (n = 2) par le L-tryptophane protégé **15**. Le composé **15** va réagir par addition nucléophile du NH de l'indole sur les deux anhydrides conduisant aux intermédiaires **21a** (n = 1) et **21b** (n = 2). Cette première étape va permettre de former la liaison amide entre l'espaceur et le L-tryptophane mais également de générer la fonction acide carboxylique indispensable lors de l'étape suivante de la synthèse. Ces réactions ont été réalisées en adaptant les conditions opératoires présentées dans les travaux de Dai⁴⁰⁹, Sagnet⁴¹⁰ et Zhong⁴¹¹ (Schéma 36).

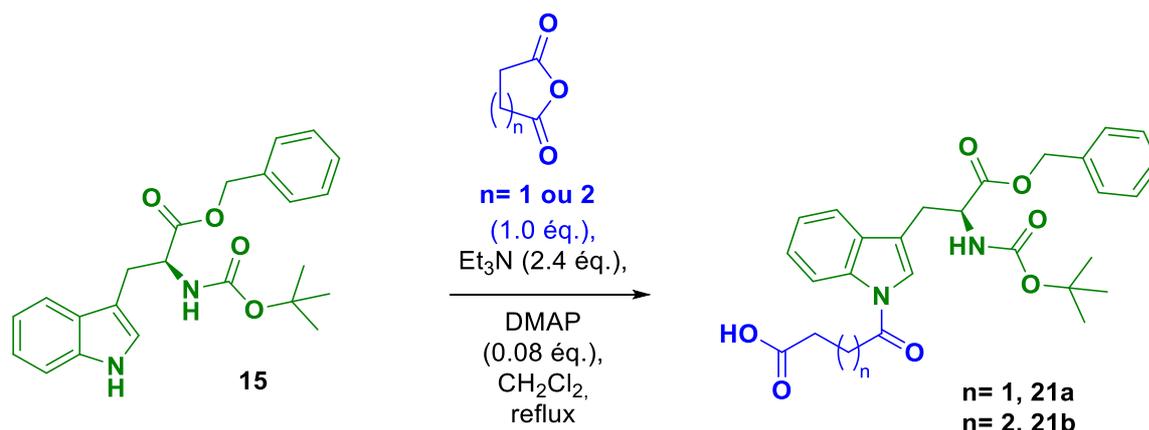


Schéma 36. Conditions opératoires des réactions d'ouverture des anhydrides succinique ($n = 1$) et glutarique ($n = 2$) par le dérivé **15** (adaptées de Dai⁴⁰⁹, Saget⁴¹⁰ et Zhong⁴¹¹).

2.2.2.1.2- Résultats expérimentaux des réactions d'ouverture des anhydrides succinique et glutarique

Tableau 10. Résultats expérimentaux des ouvertures d'anhydrides par le composé **15**.

Entrées	n ₁₅ (mmol)	Anhydride	Temps (h)	Rendement (%)
1	7,67	Succinique	4	95
2	0,89	Glutarique	24	66

Le composé **21a** ($n = 1$) et **21b** ($n = 2$) ont été isolés avec des rendements respectifs de **95 %** et **66 %**. Les structures des composés ont pu être confirmées par RMN ¹H avec la disparition du singulet intégrant pour un proton à 8.11 ppm, correspondant au NH de l'indole sur le spectre du composé **15**. La présence des espaceurs a pu être confirmée par un multiplet compris entre 3.19 et 3.38 ppm et un triplet à 2.81 ppm intégrant pour deux protons pour le composé **21a** et par trois signaux apparaissant sous forme de triplets intégrant chacun pour deux protons à 2.40, 2.51 et 3.03 ppm pour le composé **21b**. Les dix protons aromatiques observés entre 7.23 et 8.45 ppm permettent de confirmer la présence de l'indole et du groupement protecteur benzyle.

2.2.2.2- Réactions d'estérification de Steglich entre les composés **21a-b** et **10b**

2.2.2.2.1- Présentation des conditions opératoires

Cette étape correspond à des réactions d'estérification de Steglich³⁸⁶ entre la fonction acide carboxylique libre des composés **21a** et **21b** et la fonction phénol du composé **10b**. Ces réactions vont générer la liaison ester correspondante qui associe la substance active à l'espaceur (Schéma 37).

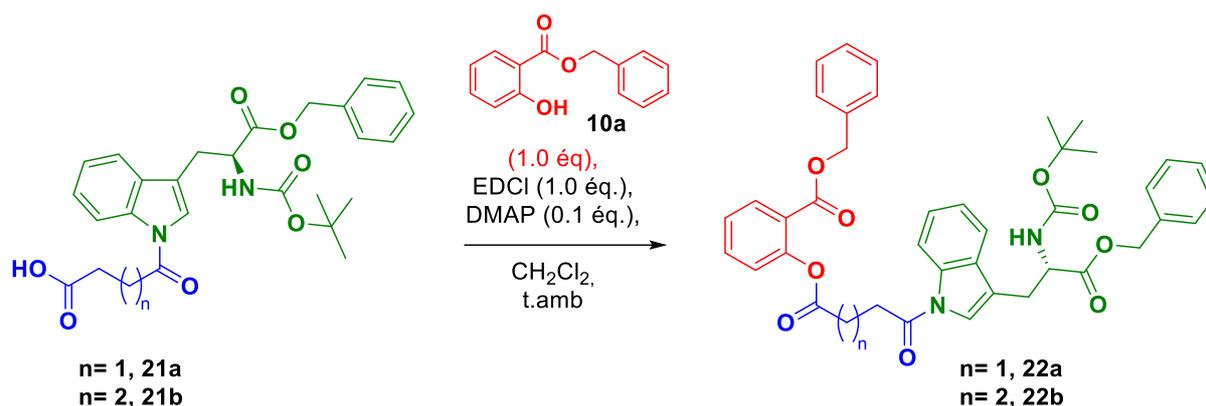


Schéma 37. Conditions opératoires des réactions d'estérifications de Steglich des composés **21a** ($n = 1$) et **21b** ($n = 2$) avec le composé **10b** ($R = \text{CH}_2\text{Ph}$).

2.2.2.2.2- Résultats expérimentaux des estérifications de Steglich

Tableau 11. Résultats expérimentaux des réactions d'estérifications de Steglich entre le composé **10a** et les dérivés **21a** et **21b**.

Entrées	Composé engagé	n (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	21a ($n = 1$)	6,52	17	79
2	21b ($n = 2$)	0,69	6	65

Les composés **22a** ($n = 1$) et **22b** ($n = 2$) ont été isolés avec des rendements respectifs de **79 %** et **65 %**. Leurs structures ont pu être confirmées par RMN ^1H qui nous informe de la présence de dix-neuf protons aromatiques entre 7.25 et 8.45 ppm pour **22a** et 7.13 et 8.48 pour **22b**, correspondant aux groupements protecteurs benzyle, à l'AS et au noyau indole. La présence des espaceurs a pu être confirmée par deux triplets à 2.91 et 3.20 ppm (**22a**) et par trois signaux apparaissant respectivement sous formes d'un multiplet à 2.14 ppm et de deux triplets à 2.66 et 2.85 ppm (**22b**) intégrant pour deux protons chacun. La présence de l'acide aminé a également pu être confirmée par les signaux à 3.25 et 4.68 ppm (**22a**) et 3.23 et 4.76 ppm (**22b**) correspondant au groupement CH_2 et au CH de l'acide aminé.

2.2.2.3- Déprotection de la fonction α -aminoacide des composés **22a** et **22b**

2.2.2.3.1- Présentation des conditions opératoires

Les composés **22a** et **22b** sont ensuite engagés dans des déprotections successives des fonctions acides carboxyliques par hydrogénolyse catalytique puis amine en milieu acide (Schéma 38).

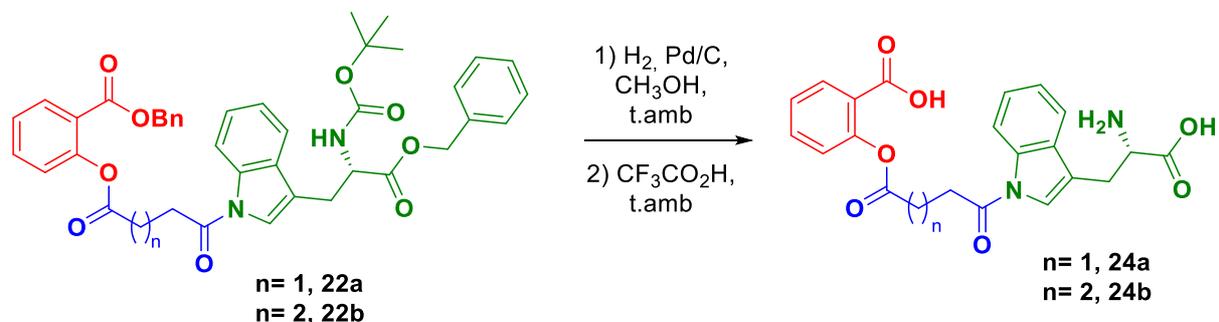


Schéma 38. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions acides carboxyliques et amine des composés **22a** et **22b**.

Les composés **23a-b** ne sont pas détaillés dans ce manuscrit. Ces derniers correspondent aux bioprécurseurs obtenus après hydrogénolyse catalytique des esters benzyles. La structure des des deux composés partiellement déprotégés est présentée sur la Figure 34.

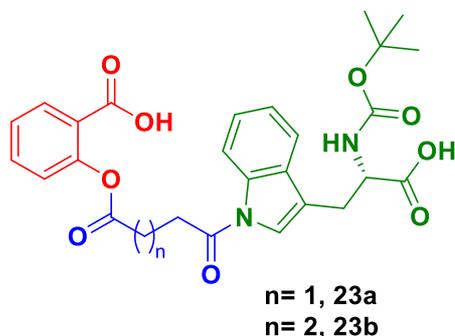


Figure 34. Structure des bioprécurseurs partiellement déprotégés **23a-b**.

2.2.2.3.2- Résultats expérimentaux des réactions de déprotection

Tableau 12. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés **22a** et **22b**.

Entrées	Composé engagé	n ₂₂ (mmol)	n ₂₄ (mmol)	Rendement (%)
1	22a (n = 1)	0,72	0,44	64
2	22b (n = 2)	0,35	0,27	78

Les réactions de déprotection ont permis d'obtenir le conjugué **24a** ($n=1$) avec un rendement de **64 %** en deux étapes. Des analyses RMN ^1H et HRMS ont permis de confirmer la structure du conjugué. L'analyse RMN ^1H a permis de confirmer la perte des groupements benzyle par la disparition des multiplets intégrant pour dix protons entre 7.28 et 7.52 ppm ainsi que le singulet et le doublet présents à 5.16 et 5.36 ppm sur le spectre du composé **22a**. La perte du groupement *tert*-butyle a également été confirmée par la disparition du singulet de neuf protons à 1.38 ppm. La structure du composé **24a** a pu être confirmée par les neuf protons aromatiques correspondant à l'AS et à l'indole, compris entre 7.22 et 8.37 ppm. La présence de l'espaceur et de l'acide aminé est également validée par les deux triplets présents respectivement à 3.03 et 3.26 ppm et deux multiplets à 3.39 et 4.17 ppm. Le composé **24b** ($n=2$) a été obtenu avec un rendement de **78 %** en deux étapes. La structure du bioprécurseur a également pu être confirmée par des données similaires à celles du composé **24a** excepté pour l'espaceur présentant trois triplets intégrant chacun pour deux protons à 2.08, 2.74 et 3.18 ppm. Les composés **24a-b** ont été analysés par HRMS, ce qui a permis de mesurer des valeurs m/z respectives de 425.1359 (**24a**) et 439.1506 (**24b**), correspondant aux espèces chargées $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.2.4- Bilan des réactions de la voie de synthèse des conjugués **24a** et **24b**

Les conjugués **24a** ($n=1$) et **24b** ($n=2$) ont ainsi pu être obtenus par cette voie de synthèse en quatre étapes. Ces derniers ont été obtenus avec des rendements globaux de synthèse de **48 %** pour le conjugué **24a** et **33 %** pour le composé **24b** en quatre étapes.

2.2.3- Bilan des synthèses de conjugués associant l'AS au L-tryptophane

Ces synthèses ont permis d'obtenir trois bioprécurseurs associant l'acide salicylique au L-tryptophane par trois espaceurs différents (Figure 35).

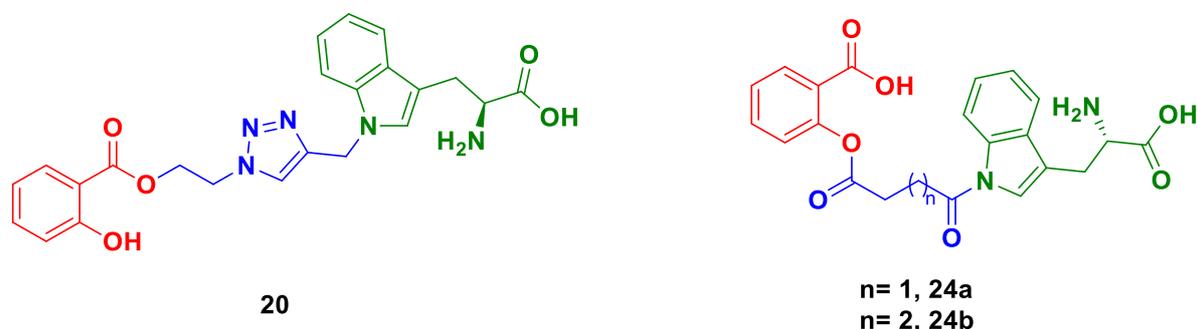


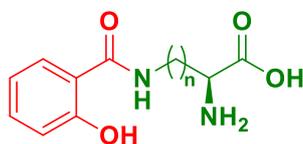
Figure 35. Structures des conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane par différents espaceurs.

2.3- Synthèse de conjugués associant l'AS à des aminoacides sans espaceur

2.3.1- Synthèse de conjugués associant l'AS à des acides diaminocarboxyliques

Après la synthèse des conjugués **24a** et **24b**, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une série de bioprécurseurs associant l'acide salicylique à des acides aminés présentant une fonction amine sur leur chaîne latérale et ne présentant pas d'espaceur. La structure simplifiée de ces conjugués est représentée sur la Figure 36.

Les trois conjugués présentés vont associer l'acide salicylique aux acides L-2,3-diaminopropionique ($n = 1$, **26a**), L-2,4-diaminobutyrique ($n = 2$, **26b**) et à de la L-lysine ($n = 4$, **26c**). Ces conjugués **26a-c** sont fonctionnalisés par une liaison amide entre la fonction acide carboxylique de l'AS et la fonction amine de la chaîne latérale de l'acide aminé engagé.



$n = 1$, **26a**

$n = 2$, **26b**

$n = 4$, **26c**

Figure 36. Structure des conjugués associant l'acide salicylique à des acides aminés présentant une fonction amine sur leur chaîne latérale. **26a**, Conjugué AS-acide L-2,3-diaminopropionique. **26b**, Conjugué AS-acide L-2,4-diaminobutyrique. **26c**, Conjugué AS-L-lysine.

Afin d'obtenir les conjugués **26a-c** en un nombre limité d'étapes, le groupement amine de la fonction α -aminoacide doit être protégé sélectivement. Nous avons pour cela employé des α -aminoacides commerciaux protégés sous forme de carbamates de *tert*-butyle (Boc). Afin de réaliser la synthèse de ces trois composés, nous avons utilisé les conditions opératoires décrites par Rentzea *et al*⁴¹² et de Wang *et al*⁴¹³. Pour ces réactions, nous avons transformé l'acide carboxylique en chlorure d'acide puis l'avons condensé avec la fonction amine libre des acides aminés. Nous avons ainsi pu proposer une synthèse en deux étapes pour obtenir les bioprécurseurs **26a-c** (Schéma 39).

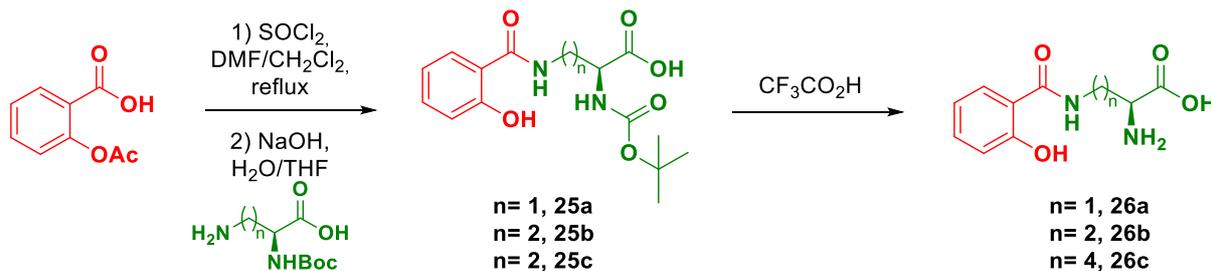


Schéma 39. Voie de synthèse des conjugués **26a-c** (adaptée de Rentzea⁴¹² et Wang⁴¹³).

La première étape de cette voie de synthèse correspond à une condensation peptidique en milieu basique entre le chlorure d'acide de l'aspirine et les acides aminés commerciaux. Cette étape va permettre d'obtenir les composés **25a-c** tout en déprotégeant le groupement acétyle présent sur la fonction phénol. Les composés **25a-c** vont ensuite être déprotégés de façon habituelle en milieu acide ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) conduisant aux bioprécurseurs **26a-c**.

2.3.1.1- Réactions de condensations peptidiques entre l'aspirine et les acides aminés commerciaux

2.3.1.1.1- Présentation des conditions opératoires

La première partie de cette étape correspond à la transformation de la fonction acide carboxylique de l'aspirine sous forme de chlorure d'acide. Afin de préparer le chlorure d'acide de l'aspirine [**25**], nous avons adapté les conditions opératoires décrites dans les travaux de He *et al*⁴¹⁴ et Lu *et al*⁴¹⁵. Une fois généré, le chlorure d'acide de l'aspirine est directement condensé avec les acides aminés commerciaux (Schéma 40) afin d'accéder aux composés **25a** ($n = 1$), **25b** ($n = 2$) et **25c** ($n = 4$).

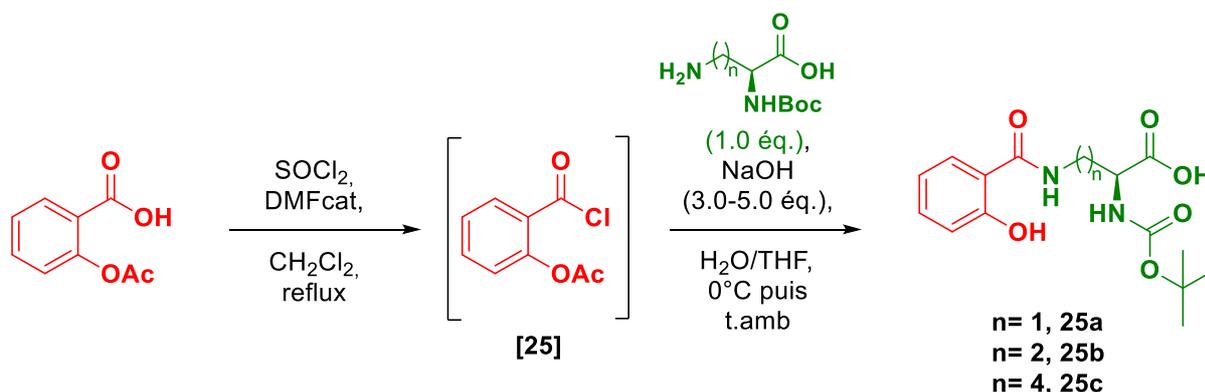


Schéma 40. Conditions opératoires des réactions de condensation entre l'aspirine et les acides aminés commerciaux.

2.3.1.1.2- Mécanisme réactionnel de formation des amides **25a-c** à partir du chlorure d'acide [**25**]

Le mécanisme réactionnel de la condensation peptidique entre le chlorure d'acide de l'aspirine [**25**] et les acides aminés commerciaux est présenté sur le Schéma 41. Ce mécanisme réactionnel va débiter par une réaction acido-basique entre l'hydroxyde de sodium et la fonction acide carboxylique libre de l'acide aminé engagé. Cette réaction acido-basique va générer le carboxylate **O** de l'acide aminé correspondant. La fonction amine libre de l'intermédiaire **O** va réagir avec le groupement carbonyle du chlorure d'acide par une étape d'addition-élimination. Seule cette fonction amine s'avère être assez nucléophile pour réagir avec le chlorure d'acide. Cette étape d'addition-élimination va générer l'intermédiaire tétraédrique **P**, qui par son instabilité va spontanément conduire à l'intermédiaire **Q** par élimination.

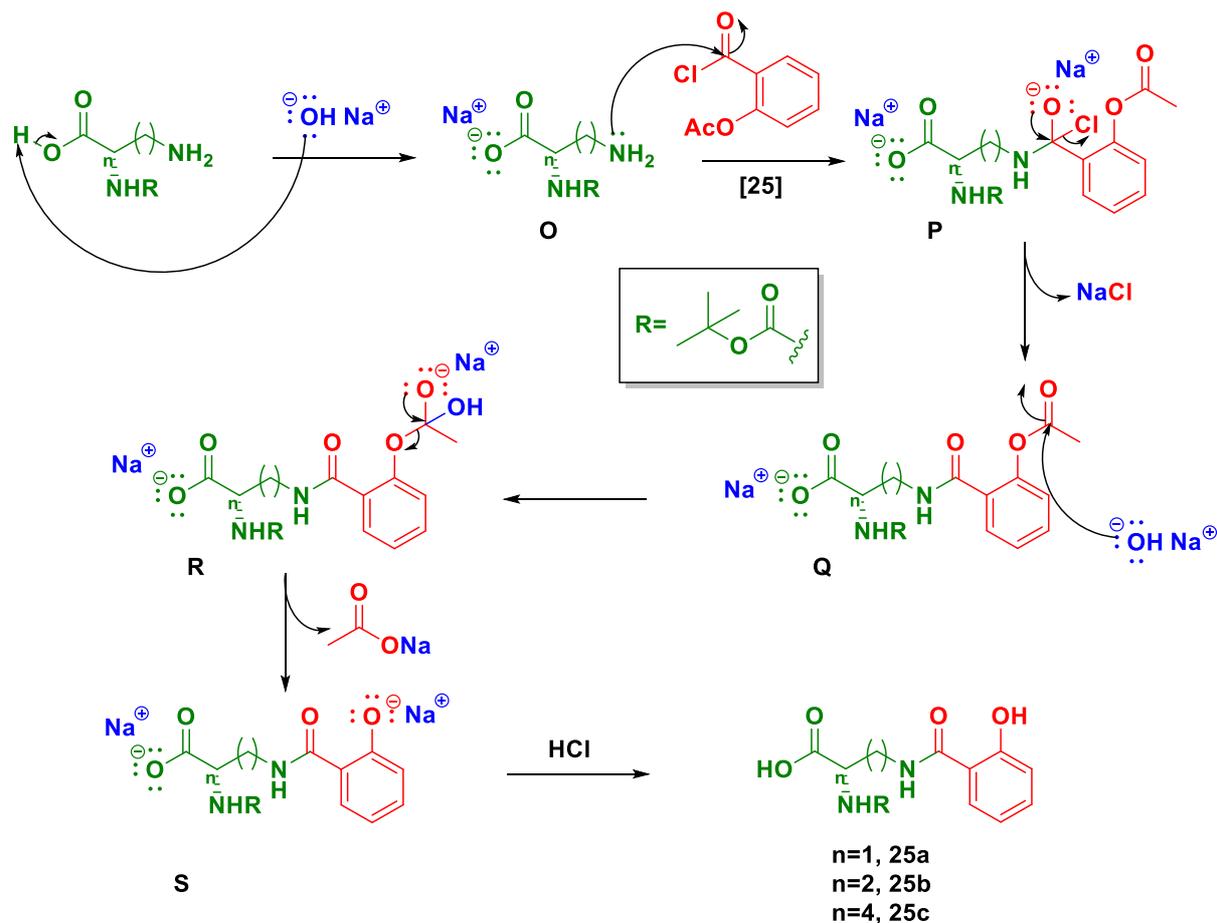


Schéma 41. Mécanisme réactionnel de la condensation peptidique entre le chlorure d'acide [25] et les acides aminés commerciaux.

Cette élimination va générer des ions chlorure qui vont se retrouver sous forme de chlorure de sodium. Cette étape d'addition-élimination permet d'établir la liaison amide souhaitée entre la substance active et l'acide aminé. Ces conditions opératoires vont également permettre de déprotéger la fonction phénol de l'acide salicylique. En effet, l'hydroxyde de sodium va ensuite réagir avec le groupement protecteur acétyle, présent sur la fonction phénol de l'intermédiaire **Q** via une addition nucléophile, afin de générer l'intermédiaire tétraédrique **R**. L'intermédiaire **R** va spontanément conduire au phénolate de sodium **S** par élimination du groupement acétate. L'intermédiaire **S** est ensuite neutralisé par une solution acide (HCl dilué) afin d'obtenir l'amide désiré (**25a-c**).

2.3.1.1.3- Résultats expérimentaux des réactions de condensations peptidiques en milieu basique

Tableau 13. Résultats expérimentaux des réactions de condensations peptidiques avec le chlorure d'acide de l'aspirine [25].

Entrées	Aminoacide	n _{aspirine} (mmol)	Équivalents NaOH	Temps (h)	Rendement (%)
1	L-Boc-ADAP (n = 1)	5,39	4,0	2	65
2	L-Boc-2,4- ADAB (n = 2)	2,27	4,0	2	68
3	L-Boc-Lys (n = 4)	9,05	5,0	19	55

Les composés **25a-c** ont été isolés avec des rendements compris entre **55** et **68** %. Ces trois composés ont été analysés par RMN ¹H afin de confirmer leurs structures. Ces analyses ont permis de nous informer : i/ de la perte du groupement acétyle de l'aspirine par l'apparition de singulets intégrant pour un proton entre 12.47 et 12.74 ppm. ii/ de la formation des liaisons amides par la présence de triplets intégrant pour un proton entre 8.65 et 8.82 ppm. iii/ de la présence de la substance active grâce aux quatre signaux correspondant aux protons aromatiques compris entre 6.84 et 7.86 ppm. iv/ de la présence des acides aminés par les signaux correspondant aux protons des fonctions α-aminoacide entre 3.89 et 3.98 ppm. v/ de la présence des chaînes aliphatiques de ces acides aminés. Ainsi, le composé **25a** présente un doublet de doublet intégrant pour deux protons à 3.46 ppm. Le composé **25b** présente quant à lui deux signaux intégrant pour quatre protons sous forme de deux doublets de doublet et d'un multiplet à 1.80, 2.02 et 3.36 ppm. Le composé **25c** présente quant à lui des signaux sous forme de multiplets intégrant pour huit protons compris entre 1.37 et 3.85 ppm. vi/ de la présence des groupements protecteurs par des singulets intégrant pour neuf protons à 1.37 et 1.38 ppm.

2.3.1.2- Réactions de déprotection des fonctions amines des composés **25a-c**

2.3.1.2.1- Présentation des conditions opératoires

Les composés **25a-c** sont engagés dans la déprotection des fonctions amines en milieu acide trifluoroacétique ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) afin d'obtenir les conjugués **26a-c** (Schéma 42).

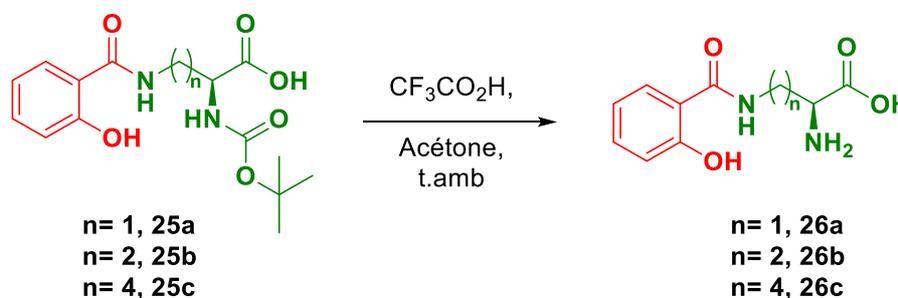


Schéma 42. Conditions opératoires de déprotection des fonctions amines des composés **25a-c**.

2.3.1.2.2- Résultats expérimentaux des déprotections des composés **25a-c**

Tableau 14. Résultats expérimentaux des réactions de déprotection des composés **25a-c** en milieu acide.

Entrées	Composé engagé	n ₂₅ (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	25a (n = 1)	1,00	3	77
2	25b (n = 2)	1,54	5	76
3	25c (n = 4)	2,17	24	78

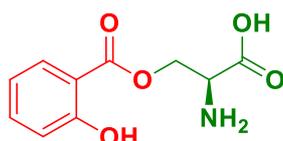
Les composés **26a-c** ont été obtenus avec des rendements compris entre **76** et **78** %. Les trois bioprécurseurs ont été analysés par RMN ^1H afin de confirmer la déprotection des fonctions amines. Les analyses ont permis de confirmer la perte des groupements *tert*-butyle par la disparition des singulets intégrant pour neuf protons à 1.37 et 1.38 ppm sur les spectres des composés **25a-c**. La présence de la fonction amine a pu également être confirmée pour le composé **26b** (n = 2) par l'apparition d'un singulet intégrant pour deux protons à 8.34 ppm. Les structures des trois composés ont également pu être confirmées par la présence de quatre protons aromatiques compris entre 6.76 et 7.87 ppm. Ces analyses ont également permis de confirmer la présence des acides aminés grâce aux signaux entre 3.69 et 3.79 ppm (**26a**), 2.01 et 4.08 ppm (**26b**) et 1.29 et 3.59 ppm (**26c**) correspondant aux protons des chaînes aliphatiques (CH_2) et de la fonction α -aminoacide. Afin de confirmer les structures de ces trois bioprécurseurs, ces derniers ont été analysés par HRMS. Les analyses ont permis de mesurer des valeurs m/z respectives de 225.0873 pour le composé **26a** (n = 1), 239.1027 pour le composé **26b** (n = 2) et 267.1347 pour le composé **26c** (n = 4). Ces valeurs correspondent aux espèces chargées $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.3.1.3- Bilan de synthèse des conjugués **26a-c**.

Les conjugués **26a** ($n = 1$), **26b** ($n = 2$) et **26c** ($n = 4$) ont pu être obtenus par la voie de synthèse en deux étapes à partir de l'aspirine et de dérivés commerciaux d'acides aminés protégés sur la fonction amine en position α . Les conjugués **26a-c** ont pu être obtenus avec des rendements globaux de synthèse de **50 % (26a)**, **52% (26b)** et **43% (26c)** en deux étapes. Cette voie de synthèse permet d'accéder de façon aisée à des conjugués associant l'AS à des α -aminoacides possédant une fonction amine sur leur chaîne latérale.

2.3.2- Synthèse d'un conjugué associant l'AS à un hydroxy α -aminoacide

Nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'un nouveau conjugué associant l'acide salicylique à un aminoacide possédant cette fois-ci une fonction alcool sur sa chaîne latérale. Le choix d'aminoacides possédant une fonction alcool s'avère limité entre la L-sérine et la L-thréonine. Nous avons fait le choix d'initier cette synthèse avec la L-sérine (Figure 37).



32

Figure 37. Structure du conjugué **32** associant l'acide salicylique à la L-sérine.

Afin de réaliser la synthèse du composé **32**, nous avons envisagé d'employer des conditions opératoires similaires à celles des composés **25a-c**. Cependant, la fonction ester générée s'avère sensible dans de telles conditions opératoires. De plus, ne disposant pas de dérivés commerciaux de L-sérine protégée, il est nécessaire de protéger la fonction α -aminoacide. De ce fait, nous avons envisagé une synthèse en six étapes à partir d'un dérivé commercial de l'acide salicylique : le salicylate de méthyle et de la L-sérine non protégée. Les différentes étapes de cette voie de synthèse sont présentées sur le Schéma 43.

Cette voie de synthèse va débiter par la protection de la fonction phénol du salicylate de méthyle. Ce dernier sera protégé sous la forme d'un éther benzylique **27**. Le composé **27** va ensuite être engagé dans une seconde étape de déprotection de la fonction acide carboxylique nécessaire à la formation du conjugué **32**. Cette étape de saponification va permettre d'obtenir le composé **28**. La seconde partie de la voie de synthèse va correspondre à deux étapes successives de protection des fonctions amine puis acide carboxylique de la L-sérine sous forme de carbamate et d'ester benzyliques. Ces deux étapes vont successivement conduire à la formation des composés **29** puis **30**.

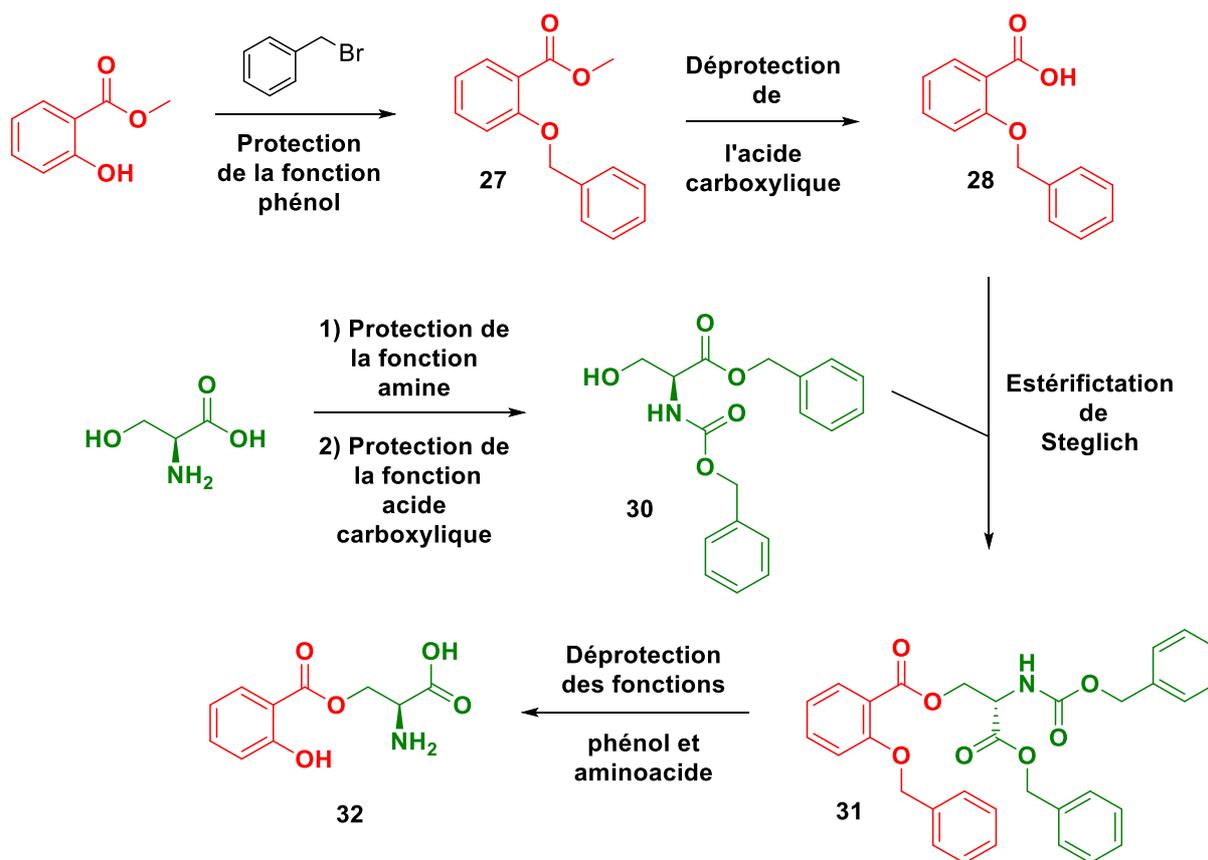


Schéma 43. Voie de synthèse proposée pour la préparation du conjugué **32**.

Les composés **28** et **30** vont par la suite, être engagés dans une réaction d'estérification de Steglich entre la fonction acide carboxylique de **28** et la fonction alcool primaire de **30**. Cette étape va permettre de générer le conjugué protégé **31**, qui sera par la suite engagé dans une étape finale de déprotection des fonctions acide carboxylique, amine et phénol afin d'obtenir le conjugué **32**.

2.3.2.1- Protection de la fonction phénol du salicylate de méthyle

2.3.2.1.1- Présentation des conditions opératoires

La première étape de la voie de synthèse correspond à une réaction de benzylation de la fonction phénol du salicylate de méthyle commercial. Cette première étape présente des conditions opératoires similaires à celle décrites par DeBerardinis⁴¹⁶, Kikkeri⁴¹⁷ et Shen⁴¹⁸ qui ont réalisé cette réaction en employant l'acétone comme solvant de réaction (Schéma 44).

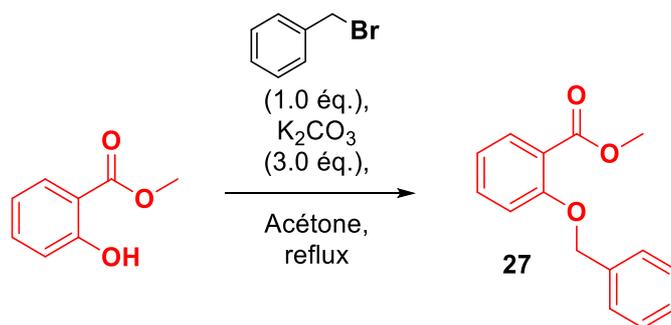


Schéma 44. Conditions opératoires de la réaction de benzylation de la fonction phénol du salicylate de méthyle (adaptées de DeBerardinis⁴¹⁶, Kikkeri⁴¹⁷ et Shen⁴¹⁸).

2.3.2.1.2- Résultat expérimental de la benzylation de la fonction phénol

Le composé **27** a pu être isolé avec un rendement de **76 %**. Ce dernier a été analysé par RMN ¹H afin de confirmer sa structure. L'analyse RMN ¹H a tout d'abord permis de confirmer la fonctionnalisation du groupement phénol par la disparition du singulet intégrant pour un proton à 10.78 ppm présent sur le spectre du salicylate de méthyle. La présence du groupement benzyle sur le composé **27** a pu être confirmée par l'apparition d'un singulet de deux protons à 5.15 ppm correspondant au CH₂ ainsi que par deux doublets à 7.29 et 7.48 ppm et d'un triplet à 7.37 ppm correspondant aux cinq protons aromatiques. La présence du groupement méthyle a pu également être confirmée grâce au singulet intégrant pour trois protons à 3.88 ppm.

2.3.2.2- Saponification de l'ester méthylique du composé 27

2.3.2.2.1- Présentation des conditions opératoires

Le composé **27** est saponifié par de l'hydroxyde de sodium dans un mélange méthanol/eau en employant les conditions opératoires de Shanzer *et al*⁴¹⁹ et de Bremmer *et al*⁴²⁰ (Schéma 45).

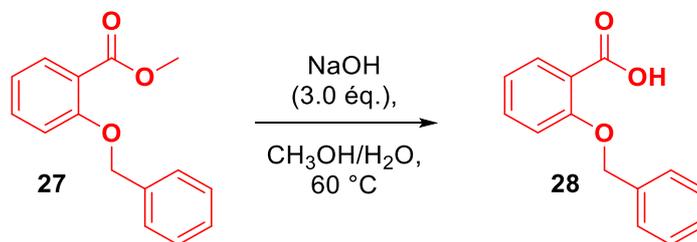


Schéma 45. Conditions opératoires de la réaction de saponification du produit d'alkylation **27** (adaptées de Shanzer⁴¹⁹ et Bremner⁴²⁰).

2.3.2.2- Résultat expérimental de la réaction de saponification de la fonction ester du composé **27**

Le composé **28** a été obtenu avec un rendement de **85 %**. Ce dernier a été analysé par RMN ^1H afin de confirmer la perte du groupement méthyle de l'ester et la formation de la fonction acide carboxylique. La disparition du singulet intégrant pour trois protons sur le spectre du composé **27** et l'apparition d'un singulet élargi sur le spectre RMN ^1H du composé **28**, intégrant pour un proton à 10.81 ppm permet de confirmer la saponification de l'ester méthylique.

2.3.2.3- Protection de la fonction amine de la L-sérine

2.3.2.3.1- Présentation des conditions opératoires

La réaction de protection de la fonction amine de la L-sérine sous forme de carbamate de benzyle est réalisée en présence de chloroformiate de benzyle en milieu basique selon les conditions opératoires décrites par Anžiček *et al*⁴²¹ et Yamamoto *et al*⁴²² (Schéma 46).

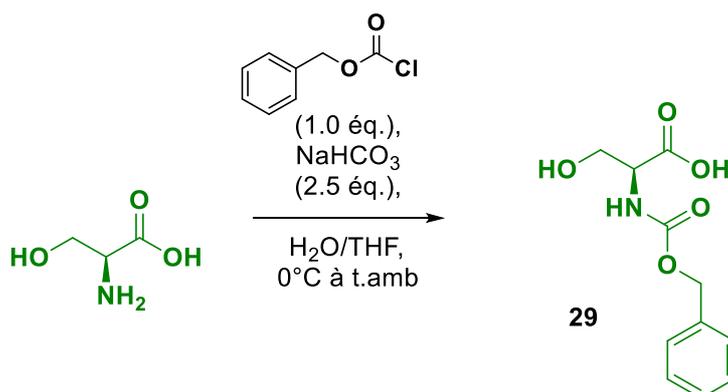


Schéma 46. Conditions opératoires de la réaction de protection de la fonction amine de la L-sérine sous forme de carbamate de benzyle (adaptées d'Anžiček⁴²¹ et Yamamoto⁴²²).

2.3.2.3.2- Résultat expérimental de la protection de la fonction amine de la L-sérine

Le composé **29** a pu être isolé avec un rendement de **46 %**. La structure du composé a été confirmée par RMN ^1H . L'apparition d'un singulet intégrant pour deux protons à 5.05 ppm et d'un multiplet intégrant pour cinq protons aromatiques entre 7.30 et 7.37 ppm sur le spectre RMN ^1H correspondent aux protons du groupement benzyle sur le composé obtenu. Une analyse RMN ^{13}C permet de nous confirmer la présence du groupement carbamate avec un signal caractéristique à 156.5 ppm.

2.3.2.4- Protection de la fonction acide carboxylique du composé **29**

2.3.2.4.1- Présentation des conditions opératoires

La fonction acide carboxylique du composé **29** est protégée sous forme d'ester benzylique. Cette réaction est réalisée dans des conditions opératoires similaires à celles présentées dans les travaux d'Anžiček *et al*⁴²¹ (Schéma 47). Ces conditions opératoires vont permettre d'obtenir le composé **30** possédant ses fonctions acide carboxylique et amine protégées sous forme d'ester et de carbamate de benzyle.

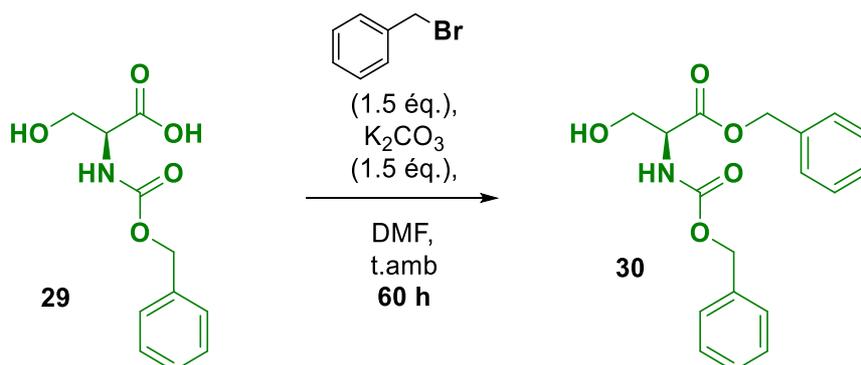


Schéma 47. Conditions opératoires de la benzylation de fonction acide carboxylique du composé **29** en milieu basique (adaptées d'Anžiček *et al*⁴²¹).

2.3.2.4.2- Résultat expérimental de la réaction de benzylation du composé **29**

Le composé **30** a été isolé avec un rendement de **25 %**. Ce résultat s'avère modeste et peut être justifié par la formation d'un second produit bien moins polaire au cours de la réaction, identifié sur CCM et appelé **30a**. Les deux composés **30** et **30a** ont été analysés par RMN ¹H.

Le spectre RMN ¹H du composé **30** permet de confirmer la structure présentant un proton de la fonction α -aminoacide à 4.46 ppm apparaissant sous la forme d'un multiplet. Les signaux compris entre 3.85 et 3.98 ppm, intégrant pour deux protons permettent de confirmer la présence du groupement CH₂ de la chaîne aliphatique de l'aminoacide. La protection de la fonction acide carboxylique est également validée par la présence de deux singulets intégrant chacun pour deux protons à 5.08 et 5.17 ppm mais également par la présence du multiplet de dix protons aromatiques compris entre 7.29 et 7.34 ppm.

Le composé **30a** a également été analysé en RMN ¹H afin de déterminer sa structure. Le spectre de ce dernier a permis d'identifier deux groupements benzyle sur les fonctions acide carboxylique et amine par la présence de deux singulets intégrant chacun pour deux protons à 5.15 et 5.24 ppm ainsi que par le multiplet intégrant pour dix protons aromatiques entre 7.23 et 7.37 ppm. Deux signaux ont également pu être observés à 5.84 et 6.26 ppm. Ces derniers apparaissent respectivement sous forme de doublet et de singulet intégrant chacun pour un proton. Ces éléments confirment que le composé **30a** correspond à l'alcène (Figure 38) résultant d'une déshydratation du composé **30**.

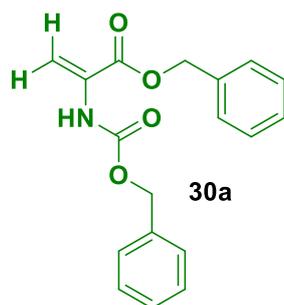


Figure 38. Structure proposée pour le composé **30a**.

Ce composé **30a**, également appelé déhydroalanine est obtenu par une réaction d'élimination (déshydratation) de la fonction alcool pouvant être ou non activée sous diverses formes (carbonates⁴²³, esters sulfoniques⁴²⁴⁻⁴²⁶). Le spectre RMN ¹H du composé **30a** s'avère conforme à la littérature⁴²³ nous permettant de proposer un mécanisme réactionnel conduisant aux formations successives des composés **30** puis **30a** (Schéma 48).

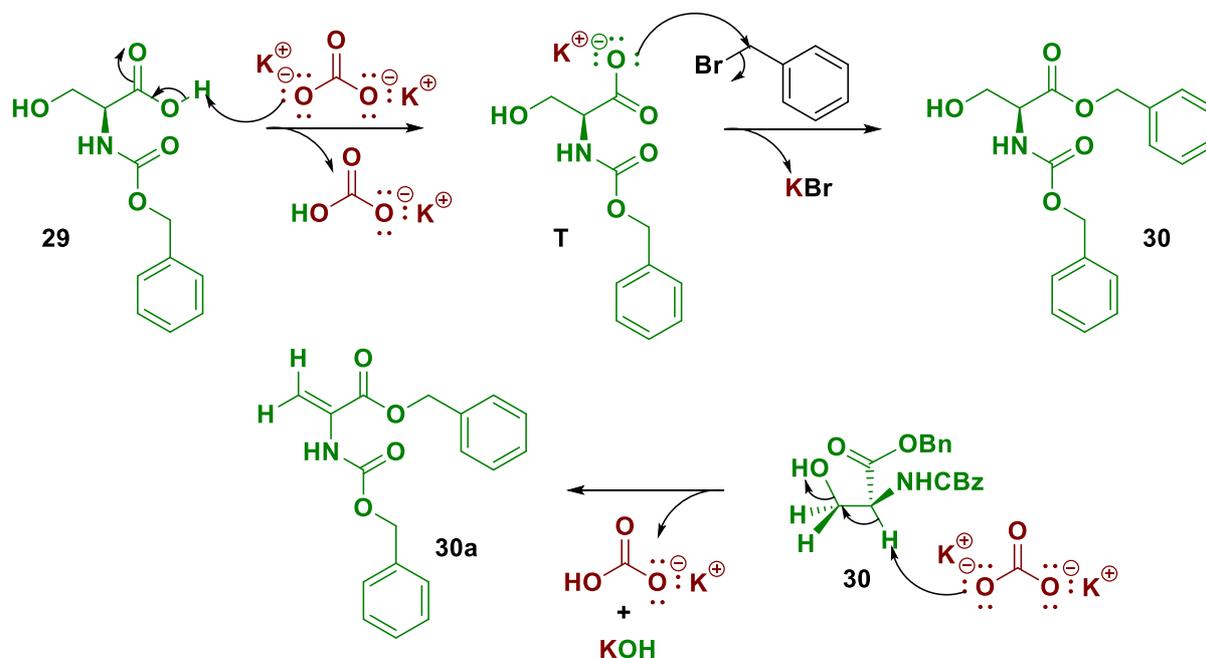


Schéma 48. Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des composés **30** et **30a**.

Ce mécanisme réactionnel va se décomposer en deux étapes qui correspondent : i/ à la formation du composé **30** et ii/ à la conversion du composé **30** en composé **30a**. La première étape va correspondre à une réaction acido-basique entre la fonction acide carboxylique du composé **29** et le carbonate de potassium. Cette réaction va conduire à la formation du carboxylate de potassium **T**, qui va ensuite réagir avec le bromure de benzyle pour former l'ester benzylique **30**. Dans un second temps, la base va réagir avec le proton de l'acide aminé du composé **30**. Cette réaction acido-basique va conduire à l'élimination du groupement hydroxyle en position β . Cette β -élimination va conduire à la formation du

composé **30a** observé en RMN ^1H . Afin d'éviter cette réaction de β -élimination, nous pourrions diminuer le temps de réaction, réduire la quantité de base employée ou bien engager une base faible.

2.3.2.5- Réaction d'estérification de Steglich entre les composés **28** et **30**

2.3.2.5.1- Présentation des conditions opératoires

Cette étape de synthèse correspond à une estérification de Steglich entre la fonction acide carboxylique du composé **28** et la fonction alcool de la L-sérine protégée **30** (Schéma 49).

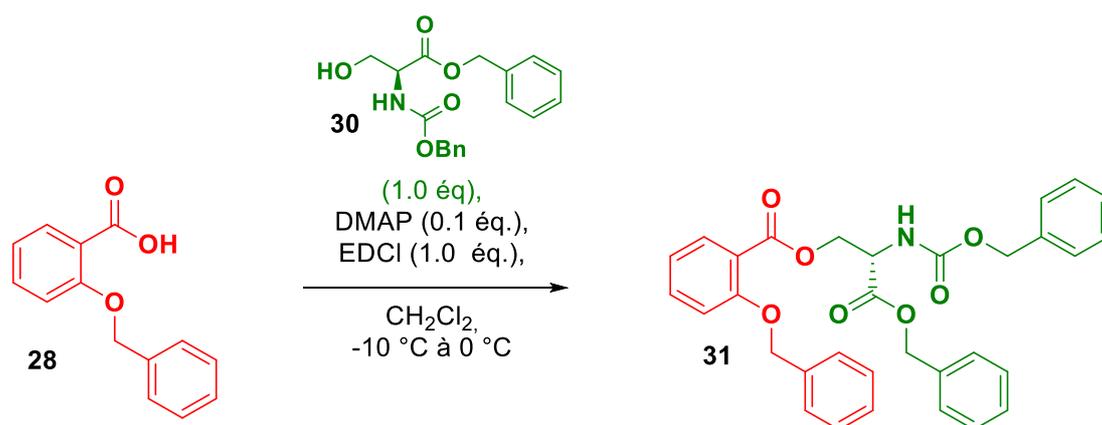


Schéma 49. Conditions opératoires de l'estérification de Steglich entre les composés **28** et **30**.

2.3.2.5.2- Résultat expérimental de l'estérification de Steglich entre les composés **28** et **30**

Les conditions opératoires de cette estérification ont permis d'isoler l'ester **31** avec un rendement de **75 %**. La structure du composé **31** a été confirmée par RMN ^1H . Le spectre RMN ^1H présente dix-neuf protons aromatiques situés entre 6.91 et 7.37 ppm, correspondant aux protons aromatiques de l'AS et des groupements protecteurs benzyle. La présence des groupements benzyle est également confirmée par les trois singulets intégrant chacun pour deux protons entre 5.09 et 5.17 ppm. La présence de la fonction aminoacide a quant à elle pu être confirmée par la présence du doublet de doublet à 4.59 ppm et du multiplet à 4.77 ppm intégrant respectivement pour un et deux protons.

2.3.2.6- Déprotection des groupements benzyle par hydrogénolyse catalytique

2.3.2.6.1- Présentation des conditions opératoires

Le composé **31** est ensuite engagé dans une déprotection des fonctions acide carboxylique, amine et phénol qui sont respectivement protégées sous formes d'ester, de carbamate et d'éther benzyliques. Afin de déprotéger ces trois fonctions, le composé **31** va être engagé dans une réaction d'hydrogénolyse catalytique en présence de palladium déposé sur charbon (Schéma 50).

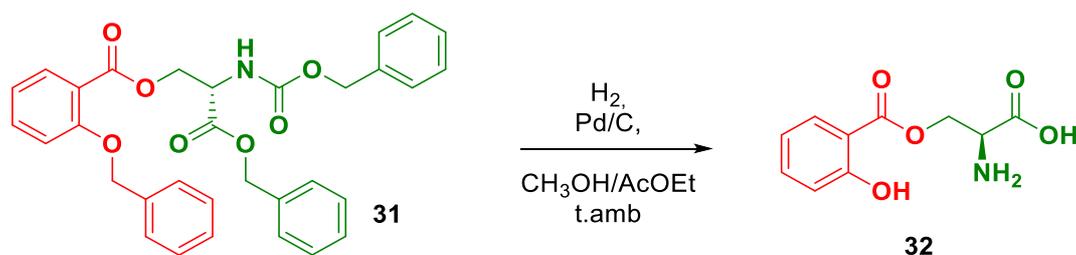


Schéma 50. Conditions opératoires de la réaction d'hydrogénolyse des fonctions α -aminoacide et phénol du composé **31**.

2.3.2.6.2- Résultat expérimental de la réaction d'hydrogénolyse catalytique du composé **31**

Le composé **32** a pu être obtenu avec un rendement de **26 %**. La structure du composé **32**, a été confirmée par RMN (^1H et ^{13}C) et spectrométrie de masse haute résolution (HRMS).

L'analyse RMN ^1H permet de confirmer la perte des groupements benzyle par l'absence des signaux compris entre 5.09 et 5.17 ppm et des protons aromatiques compris entre 7.25 et 7.67 ppm présents sur le spectre du composé **31**. Nous pouvons remarquer la présence de signaux intégrant pour quatre protons compris entre 6.93 et 7.98 ppm. Ces signaux correspondent aux quatre protons aromatiques de l'AS. La présence de trois doublets dédoublés à 3.79, 4.48 et 4.65 ppm, intégrant chacun pour un proton confirme la présence de l'acide aminé sur la structure du conjugué. L'analyse RMN ^{13}C permet également de confirmer la structure du composé par la présence des deux groupements carbonyle à 168.8 et 174.9 ppm, des six carbones aromatiques entre 113.3 et 160.5 ppm et des deux carbones de l'acide aminé présents respectivement à 53.2 (CH) et 65.1 ppm (CH₂).

Le conjugué **32** a ensuite été analysé par HRMS, qui a permis de mesurer une valeur m/z de 226.0258 correspondant à l'espèce chargée $[\text{M}+\text{H}]^+$. Cette valeur permet de confirmer la structure du conjugué associant **32** l'AS à la L-sérine sans espaceur.

2.3.2.7- Bilan global de la synthèse du conjugué **32**

Le conjugué **32** a été obtenu avec un rendement global de synthèse de **1 %** en six étapes. Cette valeur très modeste est justifiée par des très faibles rendements de synthèse obtenus lors des deux étapes de protection de la L-sérine et lors de l'étape finale de déprotection. Afin d'optimiser cette voie de synthèse, nous pourrions modifier les groupements protecteurs employés pour protéger la fonction aminoacide de la L-sérine par des groupements *tert*-butyle qui sont largement employés⁴²⁷⁻⁴²⁹ et peuvent être facilement déprotégés. Il serait également intéressant de réaliser l'étape finale de déprotection en employant un alcool plus encombré comme tel que l'isopropanol comme solvant de réaction afin de limiter la transestérification de la fonction ester entre l'AS et la sérine.

2.3.3- Bilan des synthèses de conjugués d'AS sans espaceur

Ces deux voies de synthèse ont permis d'aboutir à l'obtention de quatre conjugués associant l'AS à des acides aminés possédant des fonctions amine ou alcool. Ainsi, nous avons pu dans un premier temps, obtenir une série de trois conjugués d'AS fonctionnalisés par une liaison amide via une voie de synthèse en deux étapes. Ces conjugués **26a** ($n = 1$), **26b** ($n = 2$) et **26c** ($n = 4$) ont pu être obtenus de façon aisée. Le quatrième conjugué **32**, associant l'AS à la L-sérine a également pu être obtenu par une voie de synthèse en six étapes. Les structures des quatre conjugués obtenus sont présentées sur la Figure 39.

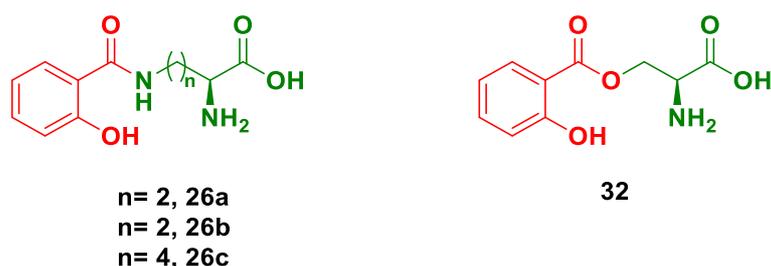


Figure 39. Structures des conjugués associant l'AS à des acides aminés sans espaceur.

3- Synthèse de conjugués associant l'AS (ou analogues) à un sucre

3.1- Synthèse de conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à du glucose par un espaceur triazolique

Suite à l'obtention des conjugués d'AS et analogues associés à différents acides aminés et compte tenu des résultats obtenus antérieurement au laboratoire^{347,368}, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués associant l'AS et ses analogues chlorés à du β -D glucose par un espaceur triazolique (Figure 40).

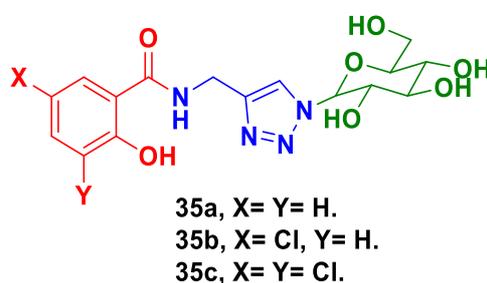


Figure 40. Structure des conjugués associant l'AS (et analogues) à du D-glucose par un espaceur triazolique. **35a**, Conjugué acide salicylique- β -D-glucose. **35b**, Conjugué acide 5-chlorosalicylique- β -D-glucose. **35c**, Conjugué acide 3,5-dichlorosalicylique- β -D-glucose.

Les conjugués **35a-c** associent l'AS ou ses analogues halogénés au β -D-glucose par un espaceur 1,2,3-triazole. Ainsi, la partie substance active est fonctionnalisée par une liaison amide propargylique tandis que le β -D-glucose portera la fonction azoture nécessaire à la cycloaddition conduisant au cycle triazole. Afin de préparer ces conjugués **35a-c**, nous avons proposé une voie de synthèse en trois étapes à partir des dérivés propargyliques d'acide salicylique **4a-c** (voir § 2.1.1.4, pages 67 à 70) et d'un dérivé commercial de glucose, le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle (Schéma 51).

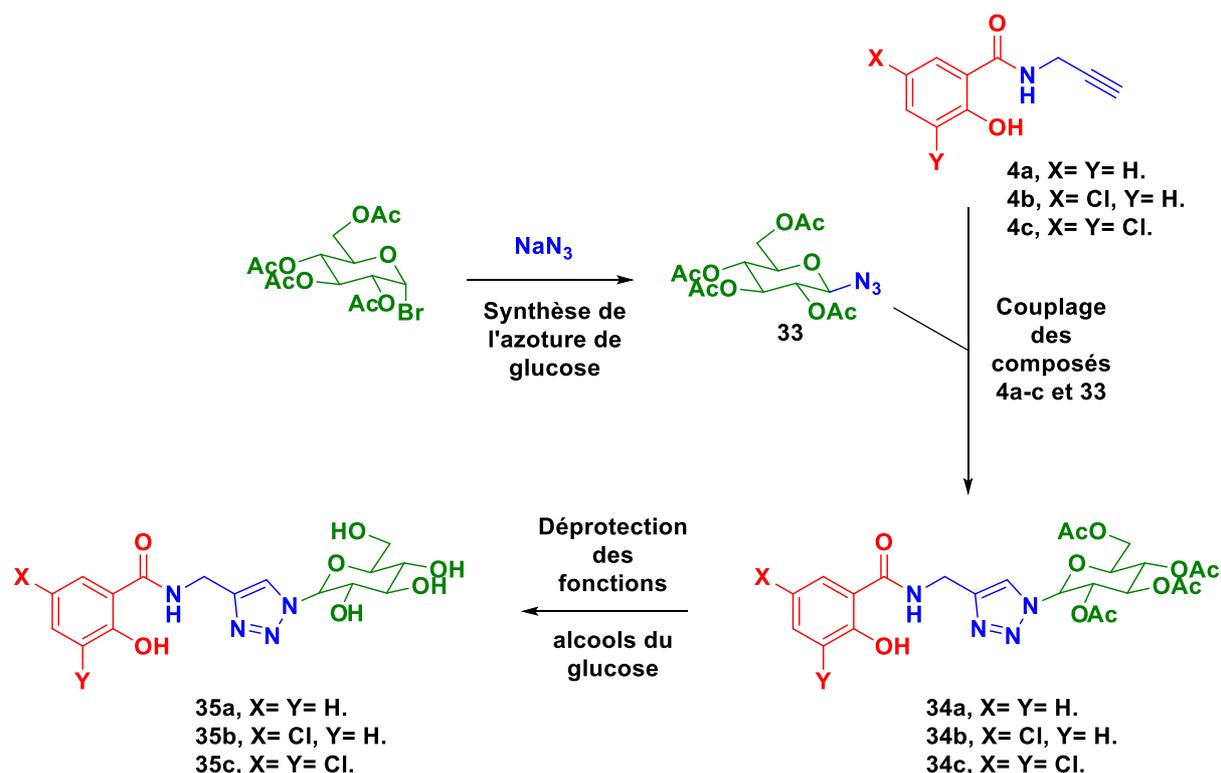


Schéma 51. Voie de synthèse proposée pour les conjugués associant l'AS ou ses analogues chlorés à du β -D-glucose par un espaceur triazolique.

Cette voie de synthèse va débiter par une réaction de substitution nucléophile du second ordre (S_N2) sur le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle par l'azoture de sodium afin d'obtenir l'azoture de glucose peracétylé **33**. L'azoture **33** est ensuite engagé dans des réactions de couplage par click chemistry avec les dérivés propargyliques d'AS (ou analogues) **4a-c**, préalablement synthétisés. Cette seconde étape va permettre d'obtenir les conjugués protégés **34a-c** par click chemistry. Ces conjugués pourront être déprotégés afin d'obtenir les fonctions alcools libres du sucre conduisant aux conjugués finaux **35a-c**.

3.1.1- Synthèse de l'azoture de glucose **33** par substitution nucléophile S_N2

Cette première étape va correspondre à une réaction de substitution nucléophile S_N2 sur la position anomérique du bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle afin d'obtenir l'azoture de glucose **33**. Cette étape a été réalisée en adaptant les conditions opératoires de Silva⁴³⁰, Jarrahpour⁴³¹, et Ibatullin⁴³² (Schéma 52). Ces conditions opératoires vont conduire à une inversion de configuration absolue du carbone en position anomérique du glucose. Ainsi, le composé **33** va être obtenu sous la forme de l'anomère β .

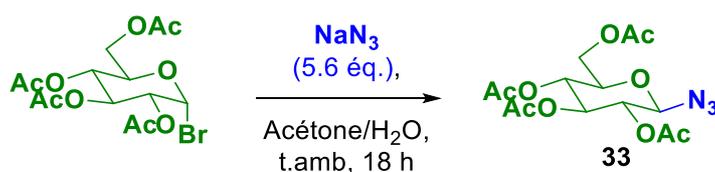


Schéma 52. Conditions opératoires pour la synthèse de l'azoture de glucose peracétylé **33** (adaptées de Silva⁴³⁰, Jarrahpour⁴³¹ et Ibatullin⁴³²).

L'azoture de β -D-glucopyranose **33** a pu être obtenu avec un rendement de **88 %**. Le composé a ensuite été analysé par RMN ¹H et ¹³C. Ces analyses RMN sont conformes aux données de la littérature⁴³³.

3.1.2- Couplage entre les dérivés propargyliques **4a-c** et l'azoture de glucose **33** par click chemistry

La seconde étape de cette voie de synthèse correspond à une réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre l'azoture de glucose **33** et les dérivés propargyliques **4a-c** conduisant à la formation des conjugués protégés **34a-c** (Schéma 53).

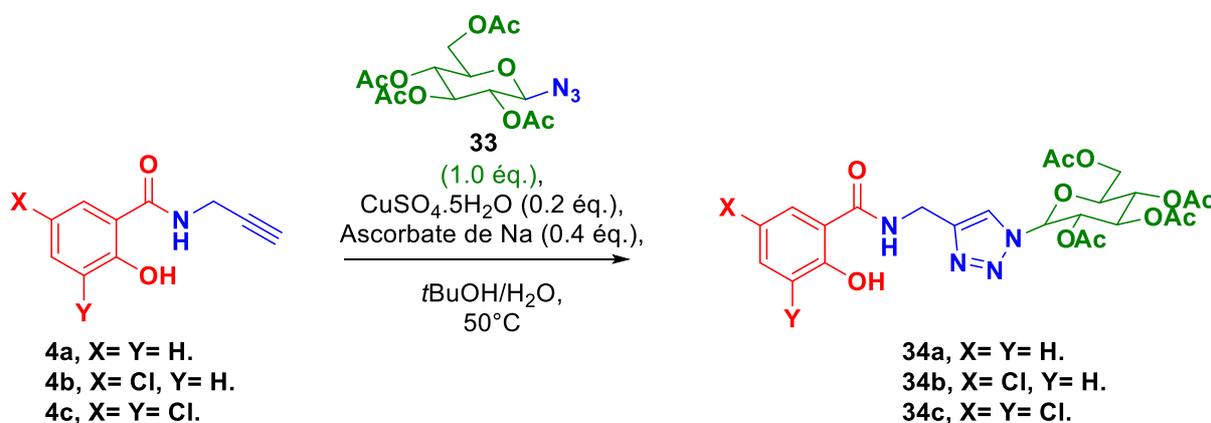


Schéma 53. Conditions opératoires des réactions de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre les dérivés d'AS propargyliques **4a-c** et l'azoture de glucose **33**.

Tableau 15. Résultats expérimentaux des réactions de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre l'azoture de glucose **33** et les dérivés propargyliques **4a-c**.

Entrées	Alcyne engagé	n ₃₃ (mmol)	Temps (h)	Rendement (%)
1	4a	5,71	1	83
2	4b	4,78	2	47
3	4c	2,04	6	40

Les composés **34a-c** ont été isolés avec des rendements respectifs de **83 %**, **47 %** et **40 %**. Les analyses RMN ¹H de ces composés ont permis de confirmer : i/ la formation du cycle triazole par la présence d'un singulet intégrant pour un proton à 7.89 (**34a**), 8.31 (**34b**) et 7.90 ppm (**34c**). ii/ la présence de la substance active avec des signaux entre 6.79 et 7.35 ppm (**34a**), 6.94 et 7.90 ppm (**34b**), 7.43 et 7.46 ppm (**34c**). iii/ la présence de la fonction phénol par un singulet intégrant pour un proton, observé respectivement à 12.21 (**34a**), 12.39 (**34b**) et 12.79 ppm (**34c**). iv/ la présence du sucre par des signaux intégrant pour un total de sept protons, compris entre 3.99 et 6.30 ppm correspondant aux CH et au CH₂ de l'ose. v/ la présence des groupements acétyle du sucre sous la forme quatre singulets intégrant chaque pour trois protons entre 1.80 et 2.08 ppm.

3.1.3- Déprotection des fonctions alcools du glucose en milieu basique

Les composés **34a-c** sont déprotégés par méthanolyse des groupements acétyle permettant d'obtenir les conjugués désirés. Afin d'obtenir ces fonctions alcools libres, la réaction de Zemplén⁴³⁴⁻⁴³⁶ s'avère intéressante. Cette dernière implique du méthanolate de sodium (CH₃ONa) qui est généré *in-situ* par réaction du méthanol avec du sodium métallique. Ces conditions opératoires sont décrites par Goyard *et al*⁴³⁷, Shukla *et al*³⁶⁹ et Yu *et al*⁴³⁸ (Schéma 54). Dans ces conditions, les alcoolates sont générés puis neutralisés par l'utilisation d'une résine échangeuse d'ion acide (Amberlite IRN-77) permettant d'accéder aux conjugués **35a-c**.

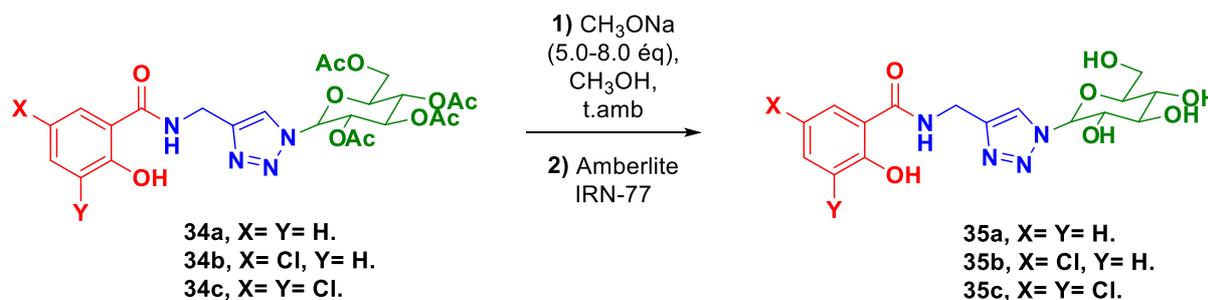


Schéma 54. Conditions opératoires des réactions de déprotection des fonctions alcools du glucose par méthanolyse (adaptées de Goyard *et al*⁴³⁷, Shukla *et al*³⁶⁹ et Yu *et al*⁴³⁸).

Tableau 16. Résultats expérimentaux des réactions de méthanolyse des composés **34a-c**.

Entrées	Composé engagé	n ₃₄ (mmol)	Équivalents Na ⁰	Temps (h)	Rendement (%)
1	34a	4,74	6,0	3	80
2	34b	2,26	5,0	2	38
3	34c	0,50	8,0	3	75

Les composés **35a-c** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de **80 %**, **38 %** et **75 %**. Ces composés ont été analysés par RMN ¹H afin de confirmer la structure de ces bioprécurseurs. Ces analyses montrent la perte des groupements acétyle par la disparition des quatres singulets intégrant chacun pour trois protons entre 1.80 et 2.08 ppm présents sur les spectres des composés **34a-c**. L'apparition de quatre signaux intégrant chacun pour un proton entre 4.60 et 5.35 ppm pour le composé **35a** et 4.63 et 5.36 ppm pour le composé **35b** confirme la présence des fonctions alcools sur les conjugués. Ces signaux n'ont cependant pas été observés pour le composé **35c**.

Ces trois composés ont été analysés par HRMS, afin de mesurer les valeurs m/z de ces derniers. Ainsi, les analyses ont permis de mesurer des valeurs respectives de 381.1429 (**35a**), 415.0993 (**35b**) et 447.0469 (**35c**). Ces valeurs correspondent aux espèces chargées [M+H]⁺ pour les composés **35a-b** et [M-H]⁻ pour le composé **35c**.

3.2- Bilan de la synthèse des conjugués 35a-c

Nous avons ainsi pu obtenir une nouvelle série de conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés au β-D-glucose par un espaceur 1,2,3-triazole. Les conjugués **35a-c** ont pu être obtenus par une voie de synthèse en trois étapes avec des rendements globaux de synthèse de **58 %** (**35a**), **16 %** (**35b**) et **26 %** (**35c**).

4- Perspectives : synthèse d'un conjugué associant l'acide salicylique à de la L-sérine par un espaceur triazole

Après avoir validé la synthèse de ces seize conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à différents nutriments acides aminés ou glucose, nous avons également pu initier la synthèse d'un nouveau conjugué. Ce conjugué associe l'acide salicylique à la L-sérine par un espaceur 1,2,3-triazole. La structure du conjugué est présentée sur la Figure 41.

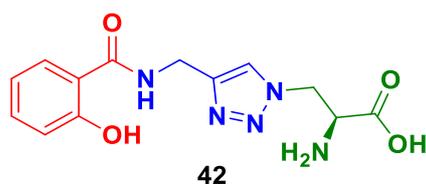
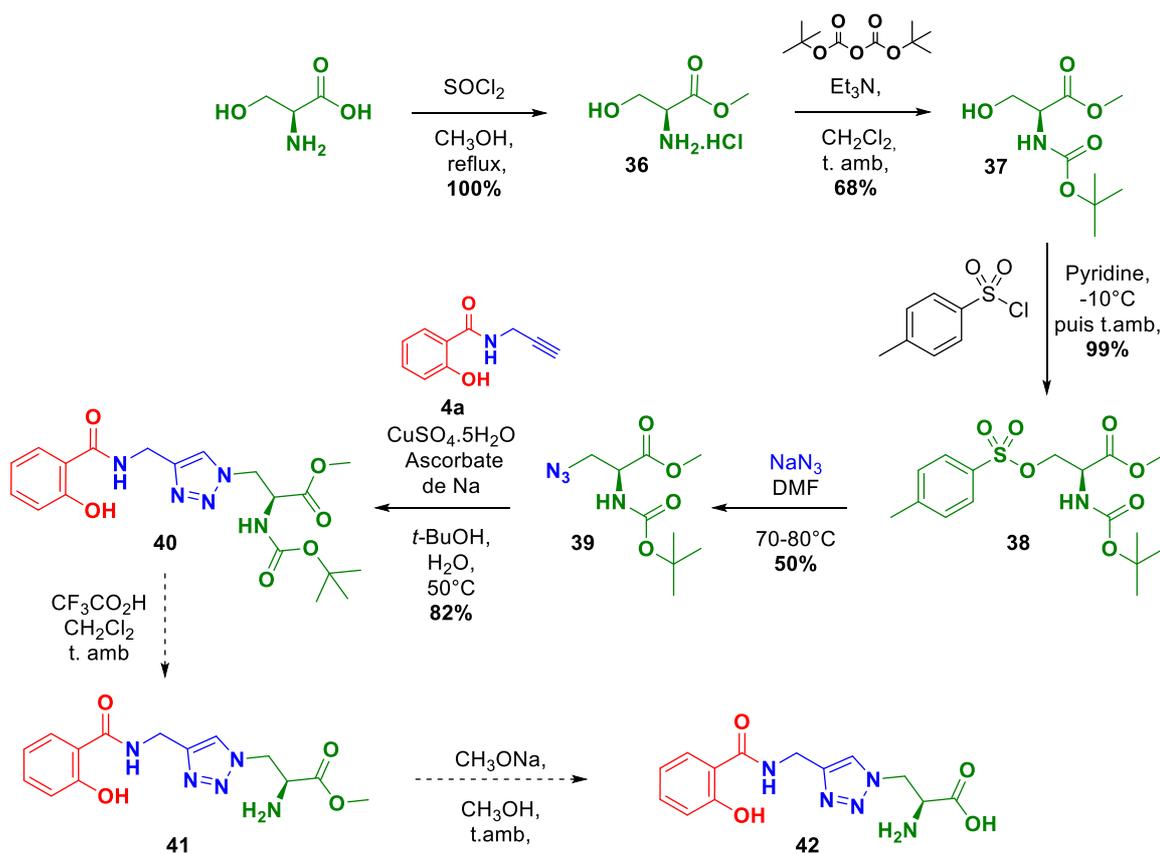


Figure 41. Structure du conjugué **42** associant l'acide salicylique à la L-sérine par un espaceur triazolique.

Ainsi, afin de synthétiser ce composé, une voie de synthèse en sept étapes peut être proposée à partir de la L-sérine non protégée et du dérivé propargylique de l'AS **4a**. Cette voie de synthèse est présentée sur le Schéma 55. La première étape correspond à la protection sélective de la fonction acide carboxylique de la L-sérine sous forme d'ester méthylique. Cette première étape a permis d'obtenir le chlorhydrate d'ester méthylique **36** avec un rendement quantitatif (**100 %**). Le composé **36** a ensuite été engagé dans une réaction de protection de sa fonction amine sous forme de carbamate de *tert*-butyle **37**. Le composé **37** a pu être isolé avec un rendement de **68 %** avant d'être engagé dans une troisième étape correspondant à l'activation de la fonction alcool libre en présence de chlorure de para-toluènesulfonyle (tosyle) afin de générer l'ester sulfonique **38**. Le composé **38** a pu être isolé à hauteur de **99 %**.



L'azoture **39** a pu être isolé avec un rendement de **50 %**. Le composé **39** et le dérivé propargylique **4a** ont ensuite été engagés dans une réaction de click chemistry afin d'obtenir le conjugué protégé **40** présentant l'espaceur triazolique. Ce dernier a pu être obtenu avec un rendement de **82 %**. La voie de synthèse n'a cependant pas pu aboutir à l'obtention du composé final par manque de temps et les étapes de déprotection de la fonction α -aminoacide restent à réaliser.

Une fois, le conjugué **42** synthétisé, nous pourrions initier la synthèse d'un nouveau conjugué associant l'acide salicylique à un hydroxyaminoacide afin de réaliser une nouvelle série de composés sans espaceur. Ainsi, la L-tyrosine serait associée à l'AS par sa fonction phénol (Figure 42).

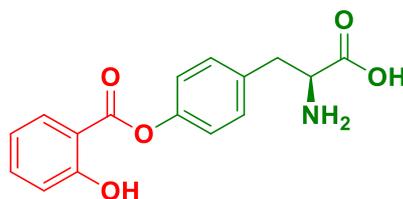


Figure 42. Structure du conjugué associant l'AS à la L-tyrosine sans espaceur.

Ainsi, au cours de ces travaux, nous avons obtenu seize bioprécurseurs associant l'acide salicylique ou ses analogues mono ou dichlorés à différents nutriments aminoacide ou glucose. Cela a permis de valider des voies de synthèse multi-étapes conduisant à des conjugués ou série de composés désirés. Cependant, la chiralité de ces molécules et de leurs intermédiaires réactionnels n'a pas été confirmée. En effet, au cours des différentes synthèses réalisées, nous avons employé des bases telles que la DMAP, la triéthylamine, de l'hydruure de sodium, de l'hydroxyde de sodium ou bien encore des bases carbonatées (K_2CO_3 , $NaHCO_3$).

L'emploi de ces bases conduit à la racémisation des centres stéréogènes tels que ceux présents sur les nutriments α -aminoacide ou glucose. Afin de confirmer la racémisation du centre stéréogène des nutriments, les formes finales des bioprécurseurs ainsi que leurs intermédiaires réactionnels seront analysés par chromatographie liquide chirale (HPLC chirale). Ces analyses de chiralité de nos composés s'avèrent donc primordiales avant de réaliser les études des propriétés biologiques de ces derniers.

Si la racémisation des composés est confirmée, nous devons réfléchir à des stratégies de synthèse limitant la perte de l'information chirale. Ainsi, nous pourrions dans un premier temps employer de l'hydroxybenzotriazole (HOBt) à la place de la DMAP lors des étapes de condensation avec l'EDCI. Il serait également intéressant d'employer des produits commerciaux dont la fonction α -aminoacide est déjà protégée. Cela réduirait le nombre d'étapes de synthèse et l'emploi de bases conduisant à la racémisation du centre stéréogène.

Chapitre 3 : Études de l'activité biologique potentielle de six bioprécurseurs associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à un acide aminé ou un sucre

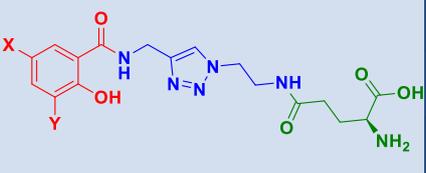
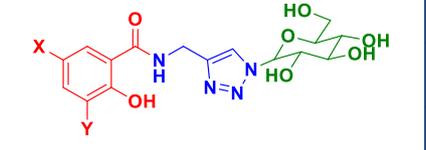
Présenté sous la forme d'un article scientifique soumis au journal *Pest Management Science* le 23/01/2022 puis après correction le 24/04/2022. *Synthesis, phloem mobility and induced plant resistance of synthetic salicylic acid amino acid or glucose conjugates*. Benoit GUICHARD, Hanxiang WU, Sylvain LA CAMERA, Richa HU, Cécile MARIVINGT-MOUNIR, Jean-François CHOLLET.

1- Introduction

Les six bioprécurseurs associant l'acide salicylique (AS) et ses deux analogues chlorés à l'acide L-glutamique (**6a-c**) ou au β -D-glucose (**35a-c**) avec un espaceur triazole ont fait l'objet d'une première étude de leurs propriétés biologiques. Leurs composés parents (acides salicylique, 5-chlorosalicylique et 3,5-dichlorosalicylique) ont été intégrés à cette étude comme base de comparaison. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une publication soumise au journal Pest Management Science.

Dans un premier temps, cet article décrit les synthèses des bioprécurseurs **6a-c** et **35a-c** (déjà présentées en parties **2.1.1**, pages 63 à 74 et **3.1**, pages 112 à 117). Les numérotations des conjugués sont différentes de celles utilisées dans les précédents chapitres du manuscrit. Les concordances de numéros attribués aux conjugués dans l'article sont mentionnées dans le Tableau 17. Nous utiliserons ci-après la nomenclature de l'article.

Tableau 17. Attribution des numéros des bioprécurseurs dans l'article scientifique

Structure des bioprécurseurs	Substituants	Numéro manuscrit	Numéro article
	X= Y= H	6a	8a
	X= Cl, Y= H	6b	8b
	X= Y= Cl	6c	8c
	X= Y= H	35a	9a
	X= Cl, Y= H	35b	9b
	X= Y= Cl	35c	9c

Les propriétés biologiques de ces six conjugués ont pu être étudiées grâce à une collaboration avec le Dr Hanxiang Wu travaillant au State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, situé à Beijing. L'article présente dans un premier temps les résultats de mobilité phloémienne des conjugués **8a-c**, **9a-c** et des composés parents réalisés sur des plantules de ricin. La seconde partie de ces études s'intéresse à l'activité fongicide directe de ces neuf molécules sur un pathosystème modèle, le champignon *Bipolaris maydis* responsable de l'helminthosporiose du maïs. La troisième partie est consacrée à l'activité des bioprécurseurs et de leurs molécules parentes à induire chez le maïs (*Zea mays*) une résistance contre *Bipolaridis maydis*. Enfin, lors de la dernière partie, la capacité des conjugués à induire l'expression de deux gènes de défense a été évaluée.

2- Matériel et méthodes

2.1- Produits chimiques

Les différents solvants employés pour les synthèses organiques ont été achetés auprès d'Acros Organics (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). Les réactifs utilisés ont été achetés à : i/ Acros Organics (bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle, acide 5-chlorosalicylique, sulfate de cuivre pentahydraté, ascorbate de sodium, azide de sodium). ii/ TCI Europe N.V. (Paris, France ; bromhydrate de 2-bromoéthylamine, acide 3,5-dichlorosalicylique, chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDCI), ester 1-tert-butyle d'acide N-Boc-L-glutamique, propargylamine). iii/ Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Allemagne ; 4-diméthylaminopyridine (DMAP), anhydride acétique, Amberlite IRN 77, acétate de sodium). iv/ Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne ; acide salicylique, aspirine, acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique monohydraté [tampon MES]). v/ Solarbio (Solarbio Science & Technology Co., Ltd., Beijing, Chine ; agent de surface Silwet-L77, Tween-20).

2.2- Synthèse des bioprécurseurs d'acide salicylique

Les réactions décrites dans cet article ont été réalisées sous atmosphère inerte d'azote. Toutes les réactions ont été suivies par analyse chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques à couche mince en gel de silice Merck 60F-254. La chromatographie sur colonne a été réalisée sur gel de silice Merck 60 (0,015-0,04 mm). Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à point de fusion Büchi B-540 et ne sont pas corrigés. Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisées dans le chloroforme deutéré (CDCl_3) ou le DMSO- d_6 à l'aide de spectromètres Bruker AVANCE 400 MHz ou Bruker UltrashieldTM 500 Avance NEO, respectivement à des fréquences de 400 ou 500 MHz pour les expériences ^1H et de 101 ou 126 MHz pour les expériences ^{13}C . Des expériences DEPT (90 et 135) et 2D (^1H - ^{13}C et ^1H - ^1H) ont été réalisées pour confirmer l'attribution des signaux RMN. Les déplacements chimiques sont rapportés comme des valeurs δ exprimées en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) comme standard interne et les constantes de couplage (J) sont données en hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire les profils de pic lorsque cela est approprié : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). Les spectres de masse à haute résolution ont été obtenus sur un spectromètre Bruker Q-TOF Impact HD utilisant une source d'ionisation électrospray (ESI).

2.3- Matériel végétal et souche fongique

2.3.1- Test de mobilité phloémienne (systémie)

Les graines de ricin (*Ricinus communis*) proviennent de l'Académie des sciences agricoles de Zibo (Shandong, Chine) et ont été placées dans de la ouate humide pendant vingt-quatre heures à 27°C ± 1°C avant d'être semées dans de la vermiculite arrosée avec de l'eau du robinet. Les semis ont été cultivés dans une atmosphère humide (80% ± 5%) à 28°C ± 1°C.

2.3.2- Activité sur la réponse de défense des plantes

Deux agents pathogènes ont été utilisés comme souches expérimentales lors de ces études. *Bipolaris maydis* est l'agent causal de la maladie de la brûlure (helminthosporiose) des feuilles du maïs. Ce dernier a été isolé à Gongzhulin dans la province du Jilin en Chine. *Fusarium graminearum* est quant à lui un agent pathogène du sol qui provoque la pourriture des tiges (fusariose) du maïs, qui a également été isolé à Gongzhulin en Chine. *B. maydis* et *F. graminearum* ont été cultivés respectivement sur des plaques de gélose à la farine d'avoine (OA dans l'article) et de gélose au dextrose de pomme de terre (PDA dans l'article) à 28°C avant de collecter les conidies pour l'inoculation. La lignée consanguine de maïs B73 a été cultivée dans une chambre de croissance Conviron à 28°C avec une photopériode de seize heures pendant deux à trois semaines.

2.4- Collecte et analyse de la sève phloémienne

La méthode de collecte de la sève était similaire à celle décrite précédemment⁴³⁹. La sève phloémienne a été analysée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur un chromatographe Agilent Technologies 1260 après dilution avec de l'eau de qualité UHQ (1:9 ; v/v). Une colonne en phase inverse Agilent SB-C18 (longueur 250 mm, diamètre interne 4,6 mm, 5 µM) a été utilisée à un débit de 0,8 mL/min selon la procédure indiquée dans le Tableau 1 (Table 1 page 136). Le volume d'injection était de 10 µL.

2.5- Évaluation de l'activité sur la réponse de défense des plantes

Les activités fongicides *in vitro* des bioprécurseurs d'AS contre *Bipolaris maydis* ont été évaluées sur des plaques OA. Le composé a été dissous dans 1 mL d'éthanol absolu et dilué avec 5 mL d'eau UHQ contenant 0,1% de Tween 80 à la concentration de 10 mM. Ensuite, 1 mL de la solution mélange a été ajouté à 9 mL de milieu OA. La concentration finale de chaque composé était de 1 mM dans les boîtes de Pétri. La même solution éthanolique sans composé testé a servi de contrôle. Les plaques ont été inoculées avec des bouchons de gélose (5 mm de diamètre) provenant d'une colonie de la souche *B. maydis* en croissance depuis six jours et incubées dans l'obscurité à 28°C. Le diamètre de la colonie a été mesuré six jours après l'inoculation avec trois répétitions pour chaque traitement.

Les essais d'infection du maïs ont été réalisés en utilisant la lignée consanguine de maïs B73. Le composé testé a été pulvérisé (2 mL par plante) sur les feuilles des plantules de maïs à une concentration de 1 mM. Ce dernier a été solubilisé dans de l'éthanol (5 % du volume final de la solution d'application) et dilué dans une solution tampon MES 10 mM (pH 5,0) contenant 0,15 % de Silwet-L77. La même solution d'application sans le composé testé a servi de contrôle. Après deux jours, les deux pathogènes ont été inoculés individuellement aux plantules de maïs prétraitées. Les essais de tacheture sur feuilles détachées ont été utilisés pour l'inoculation de *B. maydis* selon la méthode décrite précédemment⁴⁴⁰.

La suspension conidienne de *B. maydis* a été préparée à une concentration finale de 1×10^5 conidies/mL en inondant des plaques de culture de *B. maydis* âgées de douze jours avec de l'eau distillée stérile contenant 0,1 % (v/v) de Tween-20. Deux gouttelettes (10 µL chacune) de suspension conidienne ont été déposées sur une feuille de maïs détachée (10 cm de longueur) provenant de plantes prétraitées par un conjugué. La feuille inoculée a été conservée dans une boîte de Pétri contenant de l'eau stérile à 0,1 % de 6-benzylaminopurine, puis transférée dans une chambre à 28 °C et 90 % d'humidité relative pendant quatre jours. La taille des lésions a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ après avoir été photographiée.

L'inoculation artificielle de *F. graminearum* sur la tige de semis de maïs a été réalisée comme décrit précédemment par Sun *et al*⁴⁴¹. 10 µL de suspensions conidiennes de *F. graminearum* ($1,0 \times 10^6$ conidies/ml dans 0,1 % de Tween-20) ont été déposés au point blessé de la tige de semis à l'aide d'une pipette. Les semis ont été maintenus à 28°C et sous 90% d'humidité relative pendant trois jours sans être déplacés. Les évaluations de la gravité de la maladie ont été effectuées à l'aide d'une échelle allant de 1 à 5 décrite par Sun *et al*⁴⁴¹. La gravité de la maladie (%) = $\sum (\text{nombre de plantes dans cette catégorie} \times \text{la catégorie}) / (\text{nombre total de plantes évaluées} \times \text{la catégorie maximale}) \times 100$. Il y avait trois répétitions pour chaque traitement.

Pour l'analyse de l'expression des gènes liés à la défense, les plantules de maïs ont également été prétraitées avec les conjugués d'AS à 1 mM après l'application foliaire. Les plantes traitées avec une solution d'application vierge ont servi de contrôle. L'expression du non-expresser des gènes liés à la pathogenèse 1 (NPR1) et du gène marqueur de défense pathogenesis-related-1 (PR-1) a été mesurée à l'aide de la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) avec ou sans attaque de pathogènes. En l'absence de provocation, les feuilles aux mêmes positions des plantules ont été récoltées pour l'extraction de l'ARN vingt-quatre heures après le traitement chimique. Dans le groupe exposé à *B. maydis*, la suspension conidienne de *B. maydis* mentionnée ci-dessus (1×10^5 conidies/mL) a été pulvérisée sur les plantules de maïs (0,5 ml par plante) quarante huit heures après le traitement chimique, puis les feuilles inoculées aux mêmes positions ont été recueillies 24 h après l'inoculation. L'ARN total a été extrait à l'aide du kit d'isolation de l'ARN total des plantes (FOREGENE, Chengdu, Chine). Un ADNc

de premier brin a ensuite été synthétisé à l'aide d'un SuperMix One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis (TransGen Biotech). Les amorces pour *ZmNPR1* étaient 5'-ACAAACTGCTGATGGTGATACG-3' (amorce directe) et 5'-GCAACTTCACAAGCTCAACATC-3' (amorce inverse). Les amorces pour *ZmPRI* étaient 5'-CCACTACGGGGAGAACATCT-3' (amorce avant) et 5'-AGTTGCAGGTGATGAAGACG-3' (amorce inverse). La qRT-PCR a été réalisée par un système PCR en temps réel 7500 (Applied Biosystems, CA, USA) en utilisant le kit RealStar Green Fast Mixture (Genestar). Les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport à l'expression d'ACTIN1 en utilisant les amorces Actin1-F (5'-GATTCCTGGGATTGCCGAT-3') et Actin1-R (5'-TCTGCTGCTGAAAAGTGCTGAG-3'). Le niveau de transcription a été calculé à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$.³⁵ Les expériences ont été répétées trois fois.

2.6- Propriétés physicochimiques des molécules testées

Les propriétés physicochimiques et descripteurs des composés parents et des bioprécurseurs ont été prédits à l'aide du logiciel ACD / Labs Percept 2015 release (Build 2726) de Advanced Chemistry Development, Inc (Toronto, Canada). Les propriétés calculées des composés sont présentées dans le Tableau 2 (Table 2, page 139). Ces dernières ont été sélectionnées en fonction de leur influence sur le transport membranaire passif dans les plantes³¹⁰.

2.7- Analyses statistiques

Afin d'examiner l'activité *in vitro* des différents composés sur la croissance radiale de *Bipolaris maydis*, trois essais ont été réalisés pour chaque composé. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis couplé au test de comparaison multiple de Dunn a été utilisé pour évaluer les différences statistiquement significatives entre le contrôle et les neuf ensembles traités, en supposant une signification à $p \leq 0,05$.

Pour évaluer l'effet protecteur des composés parents et des bioprécurseurs contre les deux champignons (*Bipolaris maydis* et *Fusarium graminearum*) sur le maïs, des essais utilisant douze feuilles détachées ou trois pots avec cinq plantes ont été réalisés pour chaque produit, respectivement. Une ANOVA à sens unique suivie du test HSD de Tukey a été réalisée pour évaluer les différences statistiquement significatives entre le contrôle et les ensembles traités ou entre les différents composés testés pour *B. maydis*, en supposant une signification à $p \leq 0,05$.

Pour étudier l'expression des gènes *ZmNPR1* et *ZmPRI* liés à la défense dans les feuilles de maïs, une expérience représentative de trois échantillons a été sélectionnée parmi trois répétitions présentant la même tendance. Une ANOVA à sens unique suivie d'un test de comparaison multiple de Dunnett a été réalisée pour évaluer les différences statistiquement significatives entre le contrôle et les ensembles traités.

3- Résumé des résultats obtenus

3.1- Étude de la systémie phloémienne

La mobilité phloémienne des molécules parentes et des conjugués a été étudiée sur le modèle ricin, largement employé pour étudier la systémie de xénobiontes (Figure 3, page 146). L'acide salicylique (AS) présente une très bonne mobilité avec un facteur de concentration (rapport de la concentration dans la sève phloémienne / concentration dans le milieu d'incubation) de 5,7 dans la sève phloémienne, corroborant ainsi une étude antérieure réalisée au laboratoire (environ 6,9)²²¹. Les acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique ont des mobilités significativement plus faibles que celle de l'AS avec des facteurs de concentration respectifs de 2.7 et 0.6. Il apparaît clairement ici que la mobilité phloémienne est corrélée négativement au nombre d'atomes de chlore dans la structure de la molécule.

Parmi les six bioprécurseurs, les composés **8a** et **8c** présentent une mobilité phloémienne s'approchant de celle des molécules parents avec des facteurs de concentration respectifs de 3,4 et 0,52. La mobilité des conjugués de β -D-glucose (**9a-c**) est nettement plus faible que celles des conjugués d'acide aminé (**8a-c**) avec des facteurs de concentration respectifs de 0,04 ; 0,05 et 0,14. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'acides aminés est plus favorable que le glucose pour le transport des bioprécurseurs dans le phloème, en particulier pour le conjugué **8a** associant l'AS à l'acide L-glutamique qui présente une mobilité phloémienne remarquable chez le ricin.

3.2- Étude *in vitro* de l'activité fongicide

L'activité fongicide directe des molécules parentes et des conjugués a ensuite été évaluée *in vitro* sur l'helminthosporiose, une maladie du maïs provoquée par le champignon *Bipolaridis maydis*.

Les résultats obtenus (Figure 4, page 147) ont montré que l'acide salicylique, les conjugués d'acide aminé **6a-b** et le dérivé glucosé **9b** n'avaient pas d'activité antifongique directe sur le champignon à une concentration de 1 mM. En revanche, nous avons pu observer une inhibition significative de la croissance de *Bipolaridis maydis* de 47% et 56% pour les acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique, de 56% pour le conjugué d'acide aminé **8c** et de 39% pour les conjugués glucosés **9a** et **9c** (Figure 4, page 147). Ces cinq composés présentent donc une activité antifongique directe à une concentration de 1mM sur le développement *in vitro* de *B. Maydis*.

3.3- Évaluation *in vivo* de l'activité protectrice sur l'helminthosporiose du maïs

L'activité élicitrice des six bioprécurseurs et des trois molécules parents contre *Bipolaridis maydis* a été étudiée sur des feuilles de maïs (*Zea mays*). Les résultats ont mis en évidence une augmentation significative de la résistance du maïs à l'infection de l'agent fongique (Figure 5, page 149).

Les trois composés parents (AS et analogues) ont montré une bonne activité pour prévenir le développement de *B. maydis*, en particulier l'acide 3,5-dichlorosalicylique qui induit une réduction de la taille des lésions de 66%. Les traitements avec les conjugués d'acide aminé permettent une diminution de la taille des lésions de 42% pour **8a**, 43% pour **8b** et 32% pour **8c** (Figure 5, page 149). Les traitements avec les conjugués glucosés ont entraîné une diminution de la taille des lésions de 31% pour **9a**, 28% pour **9b** et 37% pour **9c**. Ces résultats nous indiquent que les conjugués d'acide aminé et de glucose ont un niveau d'activité comparable. Les conjugués **8a** et **9a** ont un niveau d'activité très proche de celui de leur composé parent (AS). Cela démontre que l'ajout d'un acide aminé ou un sucre n'a pas d'impact sur l'activité biologique de l'AS contre *Bipolaridis maydis*. Par ailleurs, en comparant le conjugué **8c** et les conjugués glucosés **9b-c** à leurs composés parents respectifs, nous avons pu constater une augmentation de la taille des lésions. Ceci suggère que la présence d'un acide aminé ou un sucre a un impact négatif sur l'activité des acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques.

3.4- Évaluation *in vivo* de l'activité protectrice à distance sur la fusariose du maïs

Le traitement des feuilles de maïs avec les composés parents et les six bioprécurseurs ne permet pas de distinguer si l'effet antifongique contre *Bipolaris maydis* résulte d'une résistance systémique induite dans les plantes ou de l'effet fongicide direct des composés. Ainsi, de nouveaux essais biologiques *in vivo* ont été réalisés afin d'évaluer l'effet protecteur à distance des bioprécurseurs d'AS (et analogues) sur la pourriture de la tige du maïs causée par le champignon *Fusarium graminearum* (Figure 6A, page 151). Ces manipulations ont mis en évidence que les acides salicylique et 3,5-dichlorosalicylique ne présentaient aucune activité protectrice contre *Fusarium graminearum* tandis que l'analogue 5-ClAS présente une atténuation de la gravité de la maladie de 13,4%. Le traitement avec les conjugués d'acides aminés **8a** et **8b** a significativement réduit la gravité de la maladie de 18,7% et 24% alors que les quatre autres bioprécurseurs ne présentent pas d'effet bénéfique (Figure 6B, page 151).

3.5- Étude de l'induction de l'expression de gènes liés à la défense du maïs

NPR1 et PR1 jouent des rôles importants dans la voie de signalisation de l'acide salicylique chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que NPR1 était le récepteur de l'AS, et la liaison de ce dernier à NPR1 était une condition préalable à la transcription de *PR1*⁴⁴⁰. L'étude de l'activité des molécules parentes et des conjugués d'AS a été réalisée sur deux gènes du maïs, les gènes *ZmNPR1* et *ZmPR1*. Les résultats obtenus (Figure 7, page 153) vingt-quatre heures après l'inoculation de *Bipolaridis maydis* ont mis en évidence que les bioprécurseurs sont capables d'induire des réponses de défense des plantes à l'exception des composés **8c** et **9a**. Concernant le gène *ZmNPR1*, une augmentation significative de 3,5 fois de l'expression de ce dernier a été observée par rapport au contrôle après le traitement avec le conjugué **9b** (Figure 7A-B, page 153). Les plantes traitées avec le conjugué **8b** présentaient la plus forte expression (2,3 fois) du gène marqueur *PR1* sensible à l'AS (Figure 7C-D, page 153). Les conjugués d'acides aminés **8a** et **8b** ont induit une régulation positive des deux gènes de

manière similaire à leurs composés parents vingt-quatre heures après inoculation de *Bipolaris maydis*, tandis que les conjugués de glucose **9b** et **9c** n'ont augmenté que l'expression de *ZmNPR1*, montrant des schémas différents de leurs composés parents au même moment.

Salicylic acid or chlorinated analogs conjugates with L-glutamic acid or β -D-glucose: synthesis, phloem mobility and first evaluation of the activity on plant defense responses

Synthesis and evaluation of salicylic acid conjugates on plant defense responses

Benoit GUICHARD^a, Hanxiang WU^b, Sylvain LA CAMERA^c, Richa HU^d, Cécile MARIVINGT-MOUNIR^{a,*}, Jean-François CHOLLET^{a,*}

^a Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers (IC2MP), Unité Mixte de Recherche CNRS 7285, Université de Poitiers, 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, F-86073 Poitiers cedex 9, France

^b State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China

^c Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, Unité Mixte de Recherche CNRS 7267, Université de Poitiers, 3 rue Jacques Fort, TSA 51106, F-86073 Poitiers Cedex 9, France

^d School of Nuclear Technology and Chemistry & Biology, Hubei University of Science and Technology, 88 Xianning Avenue, Xianning, Hubei, 437100, China

*co-last authors

Corresponding authors:

Jean-François CHOLLET, jean.francois.chollet@univ-poitiers.fr, +33 5 49 45 39 65

Cécile MARIVINGT-MOUNIR, cecile.marivingt.mounir@univ-poitiers.fr, +33 5 49 45 38 68

E-mail addresses: benoit.guichard@univ-poitiers.fr; wuhanxiang@caas.cn; sylvain.la.camera@univ-poitiers.fr; 2569124510@qq.com; cecile.marivingt.mounir@univ-poitiers.fr; jean.francois.chollet@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

BACKGROUND: The growing demand for food, combined with a strong social expectation for a diet produced with fewer conventional agrochemical inputs, has led to the development of new alternatives in plant protection worldwide. Among different possibilities, the stimulation of the plant innate immune system by chemicals represents a novel and promising way. The vectorization strategy of an active ingredient that we previously developed with fungicides can potentially extend to salicylic acid (SA) or its halogenated analogues.

RESULTS: Using the click chemistry method, six new conjugates combining SA or two mono- or di-halogenated analogues with L-glutamic acid or β -D-glucose via a 1,2,3-triazole nucleus have been synthesized. Conjugate **8a**, which is derived from SA and glutamic acid, showed high phloem mobility in the *Ricinus* model, similar to that of SA alone despite a much higher steric hindrance. *In vivo* bioassays of the six conjugates against two maize pathogenic fungi *Bipolaris maydis* and *Fusarium graminearum* revealed that, unlike SA, the amino acid conjugate **8a** with good phloem mobility exerted a protective effect not only locally at the application site, but also in distant stem tissues after foliar application. Moreover, compounds **8a** and **8b** induced up-regulation of both defense-related genes *ZmNPR1* and *ZmPRI* similar to their parent compounds upon challenge inoculation with *B. maydis*.

CONCLUSION: The vectorization of salicylic acid or its halogenated derivatives by coupling them with an α -amino acid can be a promising strategy to stimulate SA-mediated plant defenses responses against pathogens outside the application site.

KEYWORDS

Salicylic acid; Integrated pest management; defense elicitor; Vectorization strategy; Maize stalk rot; Southern corn leaf blight

1 INTRODUCTION

Over the last seven decades, the advent of organic chemistry and the emergence of plant protection products contributed to an increase in crop yields that was previously technically impossible. However, undesirable effects of agrochemicals on human health and the environment have soon become apparent.^{1, 2} In addition, repeated use of single-site acting compounds caused pesticide resistance in pests, which in turn resulted in raising the economic costs of agrochemical use.³ Fungicide resistance in some pathogens was detected after only 2 years of product introduction.⁴ Hence, there is an urgent necessity for the innovation of green pest management technologies,^{5, 6} including new and safer agrochemicals.⁷

In the long-term competitive host-pathogen coevolution, plants have formed multilevel defense mechanisms to combat pathogen infection, including increasing cell wall strength, synthesizing antibacterial secondary metabolites, expressing pathogenesis-related proteins and hypersensitivity response.^{8, 9} One particular inducible systemic immune response, known as systemic acquired resistance (SAR), mediates long-lasting broad-spectrum resistance to a wide range of pathogens in uninfected tissue to prevent second infection.^{10, 11} At present, the development of certain natural and synthetic chemical inducers that can trigger similar plant defense systems has become an important way to promote green plant protection.¹²⁻¹⁴

Exogenous application of defense-related hormone salicylic acid (SA) and SA analogs has been reported to induce SAR-like responses.¹² SA showed fungistatic effect for limiting the growth of parasitic fungi *in vitro*¹⁵ or *in vivo* when it is brought exogenously to the plants.¹⁶ However, it is rapidly metabolized,^{17, 18} which can limit its practical use. To overcome this problem, synthetic analogues have been proposed such as acibenzolar-S-methyl¹⁹ and 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA).²⁰⁻²² The strategy proposed here is different and involves the prodrug concept. In previous works, it was shown that by coupling an active ingredient to a nutrient, mainly an α -amino acid, the resulting conjugates could be recognized and manipulated by the plasma membrane transporters of the sieve element-companion cell complex and thus be translocated to new growth via the phloem sap.²³⁻²⁶ The nutrient moiety, amino

acid or sugar,^{27, 28} as well as the structure of the spacer arm that connects the active substance to the nutrient,²⁹ play key roles in the rate of conjugate translocation and bioactivation. In some cases, it has been shown that the conjugates released the active substance progressively and thus exhibited prodrug behavior.^{24, 25, 30}

The objective of this work was to synthesize new conjugates associating salicylic acid or two mono- or dichlorinated analogues with a nutrient promoiety. Regarding the latter, L-glutamic acid was first chosen because its additional carboxylic acid function was necessary to ensure the binding with the active ingredient while keeping free α -amino acid function,³¹ thus allowing the recognition by the amino acid transporters of the plasma membrane. In order to study the influence of the nutrient on the biological properties, a similar series with β -D-glucose was also prepared. The binding between salicylic acid or its halogenated analogues and the nutrient was achieved by a click chemistry procedure. The phloem systemicity of the six resulting conjugates was then estimated using the *Ricinus* model. Finally, the defense-inducing activities of the resulting conjugates were evaluated on maize seedlings inoculated with two pathogens that are responsible for southern corn leaf blight and maize stalk rot, respectively. The expression profiles of two defense-related genes *ZmNPR1* and *ZmPRI* were also studied after treatment with the conjugates.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

The different solvents used for the organic syntheses were purchased from Acros Organics (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). The reagents used were purchased from Acros Organics (2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide, 5-chlorosalicylic acid, copper sulfate pentahydrate, sodium ascorbate, sodium azide), TCI Europe N.V. (Paris, France; 2-bromoethylamine hydrobromide, 3,5-dichlorosalicylic acid, (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI), N-Boc-L-glutamic acid 1-tert-butyl ester, propargylamine), Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Germany; 4-dimethylaminopyridine (DMAP), acetic anhydride, Amberlite IRN 77, sodium acetate), Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; salicylic acid, aspirin, 2-(N-

morpholino)ethanesulfonic acid monohydrate [MES buffer]), Solarbio (Solarbio Science & Technology Co., Ltd., Beijing, China; surfactant Silwet-L77, Tween-20).

2.2 Synthesis

Some reactions were carried out under nitrogen. All reactions were monitored by TLC analysis using Merck silica gel 60F-254 thin-layer plates. Column chromatography was carried out on silica gel Merck 60 (0.015-0.04 mm). Melting points were determined on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were performed in CDCl_3 or $\text{DMSO-}d_6$ using a Bruker AVANCE 400 MHz or a Bruker Ultrashield™ 500 Avance NEO spectrometer, respectively at 400 or 500 MHz frequencies for ^1H experiments and 101 or 126 MHz for ^{13}C experiments. DEPT (90 and 135) and 2D experiments ($^1\text{H-}^{13}\text{C}$ and $^1\text{H-}^1\text{H}$) were used to confirm the NMR peak assignments. Chemical shifts are reported as δ values in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) as internal standard and coupling constants (J) are given in hertz (Hz). The following abbreviations are used to describe peak patterns when appropriate: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). High-resolution mass spectra were obtained on a Bruker Q-TOF Impact HD spectrometer using an electrospray ionization source (ESI).

2.3 Plant material and fungal strain

2.3.1 Systemicity test

Castor bean seeds (*Ricinus communis* L. cv Sanguineus), obtained from Zibo Academy of Agricultural Sciences (Shandong, China) were placed in wet cotton wool for 24 h at $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ prior to sowing in vermiculite watered with tap water. Seedlings were grown in a humid atmosphere ($80\% \pm 5\%$) at $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3.2 Activity on plant defense response

Two pathogens were used as an experimental strain. *Bipolaris maydis*, the causal agent of southern-corn leaf blight disease, was isolated in Gongzhulin, Jilin, China. *Fusarium graminearum* is a soil-born pathogen that causes stalk rot of maize, which was also isolated in Gongzhulin, Jilin, China. *B. maydis* and *F. graminearum* were grown on oat-meal agar (OA) and potato dextrose agar (PDA) medium plates at 28°C before collecting conidia for inoculation, respectively. Maize B73 inbred line

was grown in Conviron growth chamber at 28°C with a 16 h photoperiod for 2-3 weeks.

2.4 Phloem sap collection and analysis

The sap collection method was similar to that previously described³². The phloem sap was analyzed using an Agilent Technologies 1260 high-performance liquid chromatography after dilution with UHQ grade water (1:9; v/v). An Agilent SB-C18 reversed-phase column (length 250 mm, internal diameter 4.6 mm, 5 µM) was used at a flow rate of 0.8 mL/min in accordance with the procedure set out in Table 1. The injection volume was 10 µL.

Table 1. Chromatographic data for tested products

Product	Mobile phase (gradient)			UV detection (nm)	Retention time (min)
	Time (min)	Methanol (%)	Water + 0.1% TFA (%)		
SA	<i>t</i> = 0	30	70	234	
	<i>t</i> = 16	85	15		15.7
	<i>t</i> = 18	85	15		8.4
	<i>t</i> = 20	30	70		9.5
	<i>t</i> = 23	30	70		
5-CISA	<i>t</i> = 0	45	55	230	
	<i>t</i> = 16	90	10		16.3
	<i>t</i> = 18	90	10		8.2
	<i>t</i> = 20	45	55		9.5
	<i>t</i> = 23	45	55		
3,5-diCISA	<i>t</i> = 0	55	45	240	
	<i>t</i> = 16	90	10		17.1
	<i>t</i> = 18	90	10		9.0
	<i>t</i> = 20	55	45		10.4
	<i>t</i> = 23	55	45		

2.5 Evaluation of activity on plant defense response

The *in vitro* fungicidal activities of SA conjugates against *B. maydis* were evaluated on OA plates. The compound was dissolved in 1 mL of absolute ethanol and diluted with 5 mL of sterile water containing 0.1% Tween 80 at the concentration of 10 mM. Then, 1 mL of mixture solution was added to 9 mL OA medium. The final concentration of each compound was 1 mM in petri dishes. The same

ethanol solution without tested compound was served as control. The plates were inoculated with agar plugs (5 mm diameter) from a 6-day-old growing colony of *B. maydis* strain and incubated in the dark at 28°C. The colony diameter was measured 6 days after inoculation. There were three replications for each treatment.

Maize infection assays were performed using inbred line B73. Tested conjugate was sprayed (2 mL per plant) on the leaves of maize seedling at a concentration of 1 mM. The conjugate was solubilized in ethanol (5% of final volume of application solution) and diluted with 10 mM MES buffer solution (pH 5.0) containing 0.15% Silwet-L77. The same application solution without tested compound was served as control. After 2 days, the two pathogens were individually inoculated to pretreated maize seedlings. Detached-leaf-spotting assays were used for the inoculation of *B. maydis* according to previous described method.³³ The conidial suspension of *B. maydis* was prepared at a final concentration of 1×10^5 conidia/mL by flooding 12-day-old *B. maydis* culture plates with sterile distilled water containing 0.1% (v/v) Tween-20. Two droplets (10 μ L each) of conidial suspension were spotted on to a detached maize leaf, (10 cm in length) from conjugate pretreated plants. The inoculated leaf was kept in a Petri dish that contained 0.1% 6-benzylaminopurine sterile water and then transferred to a chamber at 28°C and 90% relative humidity for 4 days. The lesion size was determined using ImageJ software after photographing. Artificial inoculation of *F. graminearum* on maize seedling stem was performed as described previously by Sun et al.³⁴ 10 μ L of conidial suspensions of *F. graminearum* (1.0×10^6 conidia/ml in 0.1% Tween-20) was dropped to the wounded point of seedling stem using a pipette. The seedlings were maintained under a condition at 28°C and 90% relative humidity for 3 days without moving. Disease severity assessments were performed using a scale ranging from 1 to 5 described by Sun et al.³⁴ The disease severity (%) = \sum (Number of plants in that rating \times rating)/(total number of plants assessed \times maximum rating) \times 100. There were three replications for each treatment.

For the analysis of defense-related gene expression, maize seedlings were also pretreated with 1 mM SA conjugates following foliar application. Plants treated with blank application solution were used as control. The expression of the non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (*NPR1*) and the defense marker gene pathogenesis-related-1 (*PR-1*) was measured using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with or without pathogen challenge. In the absence of challenge, the leaves at the same positions of

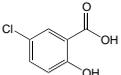
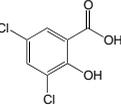
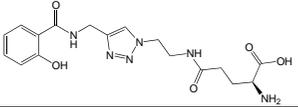
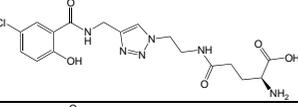
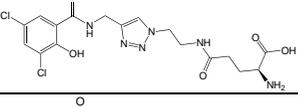
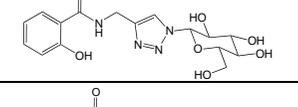
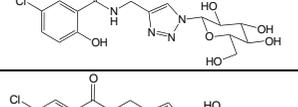
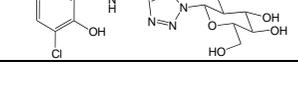
seedlings were harvested for RNA extraction 24 h after chemical treatment. In *B. maydis* challenged group, the abovementioned conidial suspension of *B. maydis* (1×10^5 conidia/mL) was sprayed on the maize plantlets (0.5 mL per plant) 48 h after chemical treatment, then the inoculated leaves at the same positions were collected 24 h post-inoculation. Total RNA was extracted using Plant Total RNA Isolation Kit (FOREGENE, Chengdu, China). First-strand cDNA was subsequently synthesized using a One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech). Primers for *ZmNPR1* were 5'-ACAAACTGCTGATGGTGATACG-3' (forward primer) and 5'-GCAACTTCACAAGCTCAACATC-3' (reverse primer). Primers for *ZmPRI* were 5'-CCACTACGGGGAGAACATCT-3' (forward primer) and 5'-AGTTGCAGGTGATGAAGACG-3' (reverse primer). qRT-PCR was performed by a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) using the kit of RealStar Green Fast Mixture (Genestar). The Expression values were normalized to the expression of *ACTIN1* using the primers *Actin1-F* (5'-GATTCCTGGGATTGCCGAT-3') and *Actin1-R* (5'-TCTGCTGCTGAAAAGTGCTGAG-3'). The transcription level was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.³⁵ The experiments were repeated three times.

2.6 Physicochemical properties

Physicochemical properties and descriptors were predicted using ACD / Labs Percepta 2015 release (Build 2726) software from Advanced Chemistry Development, Inc. (Toronto, Canada). The calculated properties (Table 2) were chosen according to their influence on passive membrane transport in plants

³⁶.

Table 2. Structures, chemical descriptors and physicochemical properties of the studied compounds computed with ACD/Labs Percepta 2015 release (Build 2726) software. The interpretation of the computed properties to predict crossing a biological membrane is given according to Lipinski's rule of five ($MW \leq 500$ Da; $HBD \leq 5$; $HBA \leq 10$; $\log P \leq 5.0$) and to Veber rule ($FRB \leq 10$; $PSA \leq 140 \text{ \AA}^2$). At biological pHs (from 5.0 to 8.0), the carboxylic acid functions of salicylic acid and its chlorinated analogues are predicted to be totally in their dissociated form ($pK_a = 3.0 \pm 0.1$ for SA, 2.6 ± 0.1 for 5-CISA and 2.0 ± 0.1 for 3,5-diCISA) and amino acid conjugates **8a-8c** are predicted to be under their zwitterionic form. *MW*: molecular weight; *HBD*: number of hydrogen bond donors; *HBA*: number of hydrogen bond acceptors; *FRB*: free rotatable bonds; *PSA*: polar surface area

Product name / number	Structure	MW	HBD	HBA	Log D (pH 5.0)	Log D (pH 8.0)	FRB	PSA (\AA^2)	Lipinski's rule of five violation	Veber rules violation
Salicylic acid (SA)		138.12	2	3	0.37	-1.68	1	57.53	0 / 4	0 / 2
5-chlorosalicylic acid (5-CISA)		172.57	2	3	0.82	-0.87	1	57.53	0 / 4	0 / 2
3,5-dichlorosalicylic acid (3,5-diCISA)		207.01	2	3	1.02	-0.22	1	57.53	0 / 4	0 / 2
8a		390.39	6	11	-0.66	-0.85	10	172.46	2 / 4	1 / 2
8b		424.84	6	11	0.26	-0.37	10	172.46	2 / 4	1 / 2
8c		459.28	6	11	0.97	0.05	10	172.46	2 / 4	1 / 2
9a		380.35	6	11	-0.62	-0.80	5	170.19	2 / 4	1 / 2
9b		414.80	6	11	0.34	-0.44	5	170.19	2 / 4	1 / 2
9c		449.24	6	11	1.09	-0.42	5	170.19	2 / 4	1 / 2

2.7 Statistical analyses

To examine the *in vitro* activity of the different products on the radial growth of *B. maydis*, three assays were performed for each compound. The Kruskal-Wallis nonparametric test coupled with Dunn's multiple comparison test was used to assess statistically significant differences between the control and the nine treated sets, assuming significance at $p \leq 0.05$.

To evaluate the protective effect of parent compounds and the conjugates against *B. maydis* and *F. graminearum* on maize, assays using twelve detached leaves or three pots with five plants were performed for every product, respectively. A one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test was performed to assess statistically significant differences between the control and the treated sets or among the different compounds tested for *B. maydis*, assuming significance at $p \leq 0.05$.

To investigate the expression of the defense-related genes *ZmNPR1* and *ZmPR1* in maize leaves, a representative experiment with 3 samples was selected from three replicates showing the same trend. A one-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison test was performed to assess statistically significant differences between the control and the treated sets.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Synthesis of L-glutamic acid and β -D-glucose conjugates

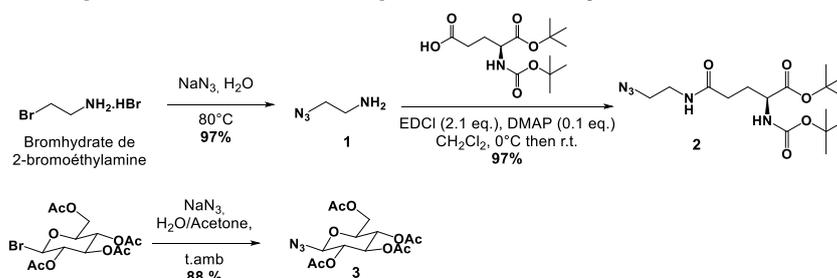
In previous work, we described the three-step synthesis of conjugates that associated fenpiclonil, a fungicide from the phenylpyrrole family, with a nutrient that could be an amino acid or a sugar. While an active transporter recognizes these compounds, they are manipulated in different ways. The fenpiclonil-glutamic acid conjugate showed a much more favorable phloem mobility than fenpiclonil-glucose conjugate.²⁷ Similarly, the structure of the spacer arm that connects fenpiclonil to the nutrient greatly influences the phloem mobility of the conjugate.²⁹ Surprisingly, the latter has proven to be an excellent tool to study the properties of sucrose carriers in plants.²⁸

In this work, we have developed a four-step method for the synthesis of new conjugates associating salicylic acid or two chlorinated analogues with L-glutamic acid or β -D-glucose: i/ the first step consisted in obtaining azides from glutamic acid or glucose whose reactive functions were protected to avoid unwanted side reactions in the following stages; ii/ the second step allowed to obtain propargyl derivatives from salicylic acid and its halogenated analogues that will be coupling partners for subsequent click chemistry reactions; iii/ in the third step, the two derivatives obtained during the previous stages were condensed by a click chemistry process to give the protected conjugates with a spacer arm containing a 1,2,3-triazole ring and finally, iv/ the α -amino acid function of glutamic acid or hydroxyl groups of glucose were deprotected to give the desired conjugates. The series of six compounds thus obtained is coherent for further structure-activity relationship studies: the active part of the conjugate is represented by salicylic acid or by two mono- or dichlorinated analogues, the part related

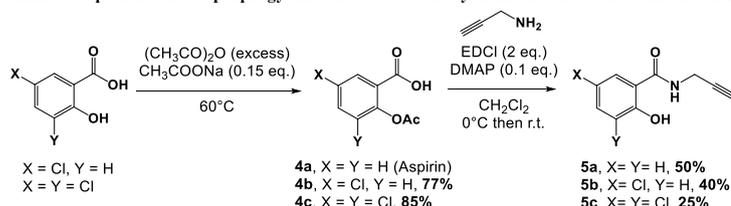
to the vectorization of the conjugate is a nutrient which can be an α -amino acid or a sugar, while in all cases the spacer arm is linked to the active part of the molecule by an amide bond and includes a 1,2,3-triazole ring in its structure

3.1.1 Synthesis of azido derivatives from protected amino acid or sugar (Figs. 1 and 2; compounds 2 and 3)

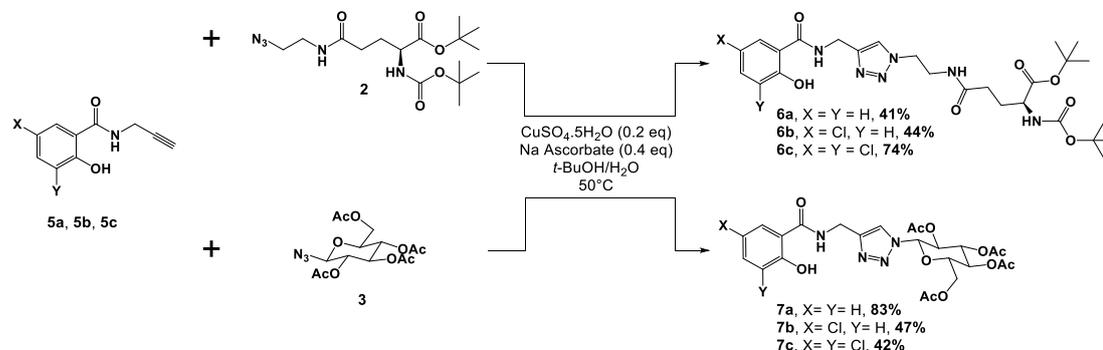
- First step: obtention of azido derivatives from protected amino acid or sugar



- Second step: obtention of propargyl derivatives from salicylic acid or its mono or dichlorinated analogs



- Third step: coupling azido derivatives from step 1 and propargyl derivatives from step 2 by click chemistry



- Fourth step: deprotection of the amino acid or glucose moieties

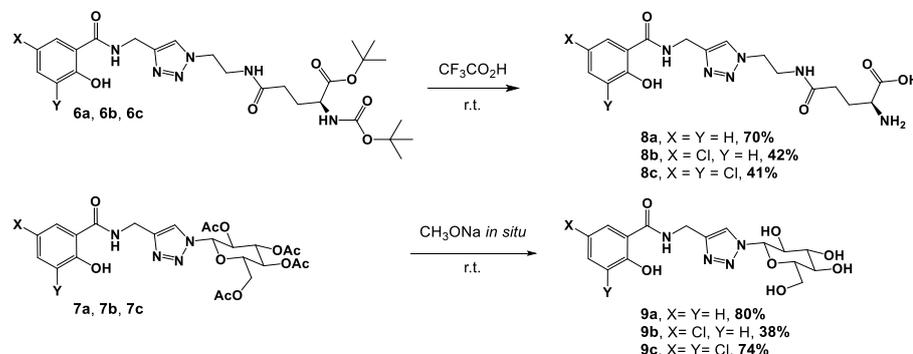


Figure 1. General reaction scheme showing the different steps in the synthesis of amino acid and glucose conjugates of salicylic acid or chlorinated analogs. DMAP: 4-dimethylaminopyridine; EDCl: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride.

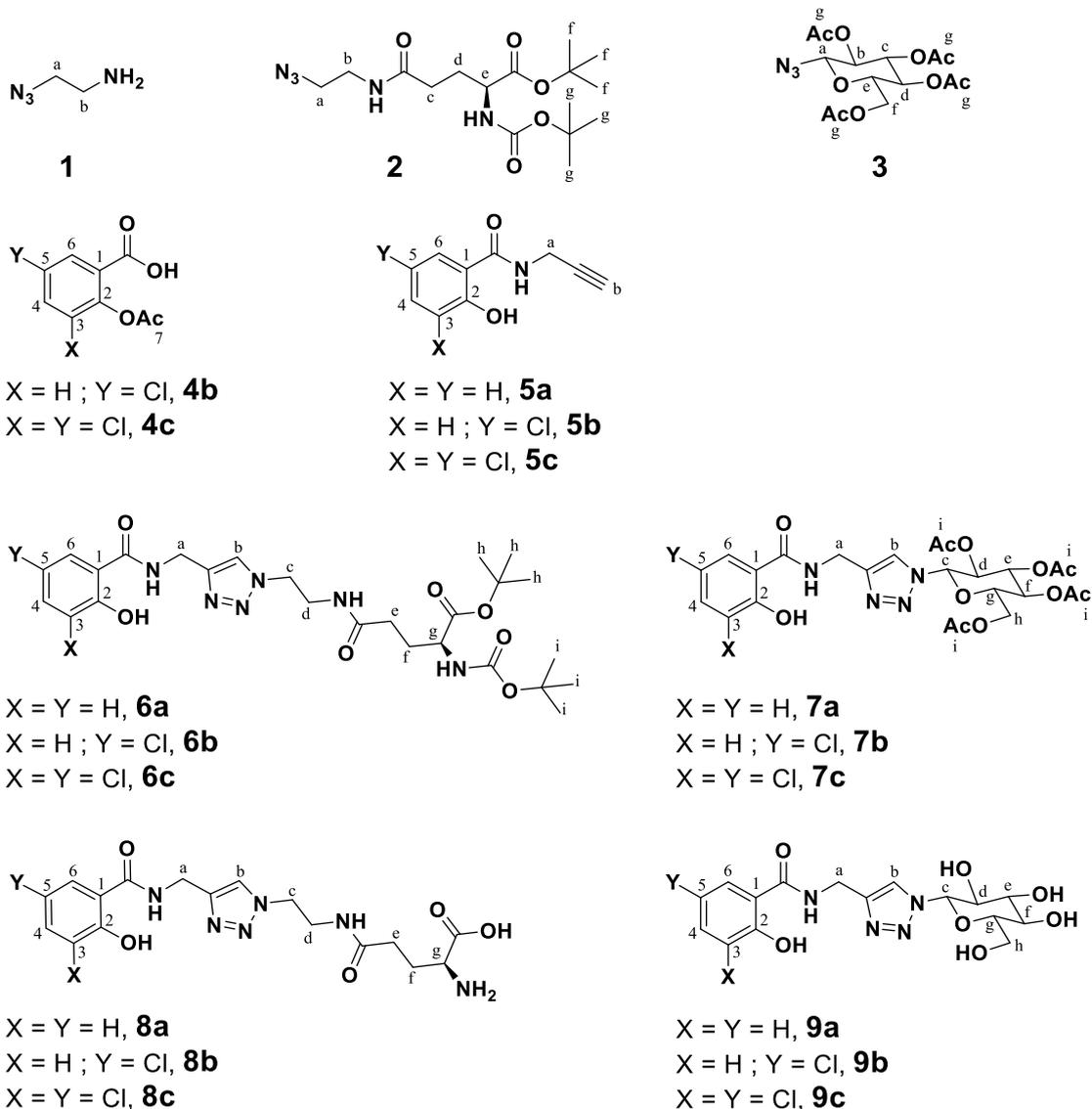


Figure 2. Azido and salicylic acid derivatives numbering for ^1H and ^{13}C assignments.

The azido derivative **2** was prepared from *N*-Boc-L-glutamic acid 1-*tert*-butyl ester and 2-azidoethanamine **1** with a yield of 97% as previously described.³⁶ The azido sugar **3** was prepared in 88% yield from 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide that reacted with sodium azide NaN_3 via a nucleophilic substitution ($\text{S}_{\text{N}}2$).

• *Experimental procedure for the synthesis of derivative 3*

To a solution of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide (2.02 g, 4.91 mmol, 1 equiv.) in an acetone/water mixture (60:10 mL), sodium azide (1.78 g, 27.4 mmol, 5.6 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h and then acetone was removed under vacuum. The aqueous layer was diluted and extracted three times using ethyl acetate. The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum to afford compound **3** as a yellow powder (1.62 g, 4.34 mmol, 88% yield).

2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-β-D-glucopyranosyl azide (3)

Rf = 0.62 (pentane/ethyl acetate 6:4); mp = 128–129°C (lit. mp = 129°C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 5.37 (t, 1H, ³J = ³J' = 9.3Hz, H_c), 5.18 (d, 1H, ³J = 9.3Hz, H_a), 5.02 (t, 1H, ³J = ³J' = 9.3Hz, H_d), 4.86 (t, 1H, ³J = ³J' = 9.3Hz, H_b), 4.2–4.10 (m, 3H, H_e and H_f), 2.08, 2.07, 2.03, 1.99 (4 s, 4 CH₃, H_g). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 170.0, 169.5, 169.2, 169.1 (4 CO), 86.2 (CH, C_a), 72.8 (CH, C_c), 71.8 (CH, C_e), 70.2 (CH, C_b), 67.7 (CH, C_d), 61.7 (CH₂, C_f), 20.5, 20.3, 20.3, 20.2 (4 CH₃, C_g). HRMS (ESI, CH₃CN): m/z calcd for C₁₄H₁₉N₃O₉ [M + Na]⁺ 396.1019, m/z found 396.1013.

3.1.2 Synthesis of the propargylic amides of salicylic acid and chlorinated analogues (Figs. 1 and 2; compounds 5a-c from aspirin and compounds 4b-c)

The second part of the synthesis was the preparation of salicylic acid alkynes **5a-c** in a one (**5a**) or two steps (**5b**, **5c**) from acetylated salicylic acid or its halogenated analogues. The first step was the acetylation reaction of 5-chloro and 3,5-dichlorosalicylic acids in the presence of a catalytic amount of sodium acetate in acetic anhydride under heating to afford compounds **4b** and **4c** in 77% and 85% yields, respectively. This hydroxyl group protection step was necessary to avoid the formation of the mesomeric form that occurs under basic conditions and significantly reduces the activation ability of (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) on the carboxylic acid function. Next, aspirin and its chlorinated analogues **4b-c** were condensed with propargylamine in a basic medium (DMAP) and in presence of the coupling agent EDCI to afford propargylamides **5a-c** in 50%, 40% and 25% (**c**) yields, respectively. The presence of one or two chlorine atoms was clearly correlated with lower yields, probably due to their electron withdrawing effect, which decreases the reactivity of the carboxylic acid function.

• Acetylation of 5-chloro or 3,5-dichlorosalicylic acids

To a suspension of 5-chlorosalicylic acid (4.00 g, 23.2 mmol, 1 equiv.) or 3,5-dichlorosalicylic acid (5.60 g, 27.0 mmol, 1 equiv.) in acetic anhydride (10 mL, 105.8 mmol, 4.6 or 3.9 equiv., respectively), sodium acetate (0.30 g, 3.66 mmol, 0.16 or 0.14 equiv., respectively) was added. The suspension was stirred under heating (60°C) for 3 hours. The mixture was then cooled to room temperature and washed with cold water. The resulting precipitate was isolated on a büchner funnel, washed with cold water and dried in an oven to obtain 2-(acetyloxy)-5-chlorobenzoic acid **4b** (3.85 g, 17.9 mmol, 77% yield) or 2-(acetyloxy)-3,5-dichlorobenzoic acid **4c** (5.75 g, 23.1 mmol, 85 % yield).

2-(Acetyloxy)-5-chlorobenzoic acid (4b)

White powder; Rf = 0.12 (CH₂Cl₂); mp = 142°C (lit. mp = 141°C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13.44 (br s, 1H, OH), 7.89 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.71 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 7.26 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₃), 2.25 (s, 3H, H₇). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 169.0, 164.5 (2 CO), 148.5 (C, C₂), 133.5 (CH, C₄), 130.7 (CH, C₆), 130.1 (C, C₁), 125.9 (C, C₅), 125.9 (CH, C₃), 20.7 (CH₃, C₇).

2-(Acetyloxy)-3,5-dichlorobenzoic acid (4c)

White powder; Rf = 0.09 (CH₂Cl₂); mp = 148°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13.83 (br s,

1H, OH), 8.06 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₆), 7.87 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₄), 2.32 (s, 3H, H₇). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 168.5, 164.2 (2 CO), 145.7 (C, C₂), 133.7 (CH, C₄), 131.2 (C, C₁), 130.2 (CH, C₆), 129.6, 127.9 (2 C, C₃ and C₅), 20.8 (CH₃, C₇).

• *Synthesis of alkynes 5a-c from aspirin or its halogenated analogues 4b-c*

2-Hydroxy-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (5a)

To a suspension of acetylsalicylic acid (6.54 g, 36.3 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous methylene chloride (100 mL) at 0°C and under nitrogen atmosphere, propargylamine (3.99 g, 72.4 mmol, 2.0 equiv.), EDCI (13.88 g, 72.4 mmol, 2.0 equiv.) and DMAP (0.45 g, 3.70 mmol, 0.1 equiv.) were added. The reaction medium was kept under stirring at 0°C for 1 hour, then stirred at room temperature for 23 hours. The mixture was washed four times with water and the aqueous layer was extracted once with dichloromethane. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using pentane/ethyl acetate (97:3) as eluent to afford **5a** (3.17 g, 18.1 mmol, 50% yield) as a yellowish solid. R_f = 0.55 (CH₂Cl₂); mp = 98°C (lit. mp = 99°C). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.29 (s, 1H, OH), 9.19 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 7.84 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H₆), 7.42 (td, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H₄), 6.91 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H₃), 6.89 (td, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H₅), 4.10 (dd, $^3J = 5.5$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 2H, H_a), 2.26 (t, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_b). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 168.5 (CO), 159.7 (C, C₂), 134.0 (CH, C₄), 128.1 (CH, C₆), 118.8 (CH, C₅), 117.4 (CH, C₃), 115.1 (C, C₁), 80.8 (C≡), 73.2 (CH, C_b), 28.3 (CH₂, C_a).

5-Chloro-2-hydroxy-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (5b)

Compound **5b** was obtained using the same procedure as described for compound **5a**, except for DMAP which was used at 0.2 equivalent relatively to the product **4b**. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using pentane/ethyl acetate (19:1) as eluent to afford **5b** (0.79 g, 3.77 mmol, 40% yield) as a white solid. R_f = 0.61 (CH₂Cl₂); mp = 167 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.27 (s, 1H, OH), 9.22 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 7.92 (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₆), 7.46 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₄), 6.98 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H₃), 4.10 (dd, $^3J = 5.4$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 2H, H_a), 3.20 (t, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_b). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 166.8 (CO), 158.0 (C, C₂), 133.4 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 122.5 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.9 (C, C₁), 80.5 (C≡), 73.4 (CH, C_b), 28.5 (CH₂, C_a).

3,5-Dichloro-2-hydroxy-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (5c)

Compound **5c** was obtained using the same procedure as described for compound **5b**, except for reaction conditions where, after 1 h at 0°C as described above, an additional 5 h reflux heating was required followed by cooling to room temperature overnight. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using pentane/ethyl acetate (19:1) as eluent to afford **5c** as a white solid in 25% yield. R_f = 0.66 (CH₂Cl₂); mp = 182°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 12.35 (s, 1H, OH), 7.49 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H₄), 7.34 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H₆), 6.68 (s, 1H, NH), 4.24 (dd, $^3J = 5.2$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 2H, H_a), 2.33 (t, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H_b). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 168.1 (CO), 156.1 (C, C₂),

134.3 (CH, C₄), 124.4 (C, C₃ or C₅), 124.1 (CH, C₆), 123.5 (C, C₃ or C₅), 115.7 (C, C₁), 78.2 (C≡), 73.0 (CH, C_b), 29.9 (CH₂, C_a).

3.1.3 Coupling azido derivatives **2** and **3** with propargyl derivatives of salicylic acid or its chlorinated analogues **5a-c** by click chemistry (Figs. 1 and 2; compounds **6a-c** and **7a-c**)

The third step of the synthesis pathway was to react the azido derivatives **2** and **3** with the propargylic amides **5a-c** via a click chemistry process. This 1,3-dipolar cycloaddition reaction leads to the introduction of a spacer arm between the parent molecule and the nutrient that includes a 1,2,3-triazole ring in its structure. The reaction is catalyzed by active Cu(I) generated *in situ* by reducing Cu(II) salts (copper sulfate) with sodium ascorbate in a heated *tert*-butanol/water medium. These reaction conditions allowed to get specifically the 1,4-disubstituted regioisomers **6a-c** and **7a-c**. The L-glutamic conjugates **6a-c** were obtained with 41%, 44% and 74% yields, respectively. The β-D glucose derivatives **7a-c** were obtained with 83%, 47% and 42% yields, respectively.

tert-Butyl 5-([4-[(2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl)amino)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoate (**6a**)

To a solution of **5a** (3.17 g, 18.1 mmol, 1.0 equiv.) in *tert*-butanol (100 mL) under nitrogen atmosphere, were added firstly azide **2** (6.72 g, 18.1 mmol, 1.0 equiv.), then copper sulfate pentahydrate (0.90 g, 3.61 mmol, 0.2 equiv.) and sodium ascorbate (1.43 g, 7.22 mmol, 0.4 equiv.) dissolved in water (40 mL). The reaction medium was stirred and heated at 50°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the resulting mixture was diluted with water. The aqueous layer was extracted four times with dichloromethane (50 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. Finally, the crude product was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/ethyl acetate (1:0 then 0:1) to afford **6a** (4.08 g, 7.46 mmol, 41% yield) as a white solid. R_f = 0.48 (EtOAc); mp = 86-87 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.46 (s, 1H, OH), 9.32 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H_b), 7.98 (t, ³J = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.87 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₆), 7.39 (td, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 7.08 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 6.91 – 6.86 (m, 2H, H₃ and H₅), 4.53 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, H_a), 4.37 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H_c), 3.74 (td, ³J = 8.0 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H_g), 3.45 (td, ³J = 6.0 Hz, ³J = 5.1 Hz, 2H, H_d), 2.10 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H_e), 1.85 (td, ²J = 13.3 Hz, ³J = 7.8 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H_f), 1.67 (td, ²J = 13.2 Hz, ³J = 5.2 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H_f), 1.38, 1.37 (2 s, 18H, H_h and H_i). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 171.7, 171.5, 168.7 (3 CO), 159.9 (C, C₂), 156.6 (CO), 144.6 (C), 133.8 (CH, C₄), 127.9 (CH, C₆), 123.3 (CH, C_b), 118.6 (CH, C₃), 117.3 (CH, C₅), 115.2 (C, C₁), 80.3, 78.0 (2 C), 59.7 (CH, C_g), 53.9 (CH₂, C_c), 48.6 (CH₂, C_a), 34.5 (CH₂, C_d), 31.5 (CH₂, C_e), 28.6, 27.6 (6 CH₃, C_h and C_i), 26.4 (CH₂, C_f).

tert-Butyl 5-([4-[(5-chloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl)amino)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoate (**6b**)

Compound **6b** was synthesized using the same procedure as described for compound **6a**, except for the heating time at 50°C which has been increased to 3 hours. The crude product was purified on

silica gel column chromatography using dichloromethane/ethyl acetate (1:0 then 0:1) to afford compound **6b** as a white solid in 44% yield. R_f = 0.52 (EtOAc); mp = 108-109 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.45 (s, 1H, OH), 9.37 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H_b), 7.99 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H, NH), 7.96 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 7.11 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 6.94 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H₃), 4.55 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, H_a), 4.39 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H_c), 3.74 (1H, m, H_g), 3.44 (q, ³J = 5.9 Hz, 2H, H_d), 2.10 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H_e), 1.86 (td, ³J = 7.7 Hz, 1H, H_f), 1.70 (td, ³J = 7.7 Hz, ³J = 4.8 Hz, 1H, H_f), 1.38 (s, 18H, H_h and H_i). ¹³C NMR (126 MHz, Acetone-d₆): δ 173.0, 172.3, 169.7 (3 CO), 161.1 (C, C₂), 156.4 (CO), 144.9 (C), 134.5 (CH, C₄), 127.3 (CH, C₆), 124.1 (CH, C_b), 123.6 (C, C₅), 120.4 (CH, C₃), 116.5 (C, C₁), 81.4, 79.1 (2 C), 55.0 (CH, C_g), 50.0 (CH₂, C_c), 40.2 (CH₂, C_a), 35.8 (CH₂, C_d), 32.6 (CH₂, C_e), 28.5, 28.1 (6 CH₃, C_h and C_i), 27.8 (CH₂, C_f).

tert-Butyl 5-({[4-[(3,5-dichloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl}amino)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoate (**6c**)

A synthesis and purification procedure identical to that used for compound **6b** resulted in compound **6c** as a white solid in 74% yield. R_f = 0.58 (EtOAc); mp = 115-116 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 13.63 (s, 1H, OH), 9.71 (t, ³J = 5.1 Hz, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H_b), 8.02 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.99 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.77 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, H₆), 7.09 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.54 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H_a), 4.36 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H_d), 3.76 (m, ³J = 5.2 Hz, 1H, H_g), 3.46 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H, H_d), 2.10 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H_e), 1.86 (m, ³J = 7.7 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1H, H_f), 1.67 (m, ³J = 7.7 Hz ³J = 5.3 Hz, 1H, H_f), 1.39, 1.38 (2 s, 18H, H_h and H_i). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 171.8, 171.5, 168.1 (3 CO), 155.8 (C, C₂), 155.5 (CO), 143.5 (C), 133.2 (CH, C_b), 125.8 (CH, C₄), 123.6 (CH, C₆), 122.4, 122.0 (2 C, C₃ and C₅), 116.3 (C, C₁), 80.3, 78.0 (2 C), 53.9 (CH, C_g), 48.7 (CH₂, C_c), 38.8 (CH₂, C_a), 34.8 (CH₂, C_d), 31.5 (CH₂, C_e), 28.2, 27.6 (6 CH₃, C_h and C_i), 26.4 (CH₂, C_f).

2-[4-[(2-Hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-6- (ethanoyloxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triethanoate (**7a**)

To a solution of compound **5a** (1.00 g, 5.71 mmol, 1.0 equiv.) in *tert*-butanol (25 mL), were added firstly azido β-D-glucose **3** (2.15 g, 5.71 mmol, 1.0 equiv.), then copper sulfate pentahydrate (0.28 g, 1.14 mmol, 0.2 equiv.) and sodium ascorbate (0.45 g, 2.27 mmol, 0.4 equiv.) dissolved in water (5 mL). The reaction medium was stirred under heating at 50 °C for 1 hour and after cooling to room temperature, diluted with water. The aqueous layer was extracted three times with dichloromethane (50 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a dichloromethane/ethyl acetate mixture (1:1) as eluent to afford compound **7a** (2.60 g, 4.74 mmol, 83% yield) as a yellow solid. R_f = 0.36 (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1, v/v); mp = 214-216 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 12.21 (s, 1H, OH), 7.89 (s, 1H, H_b), 7.45 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, NH and H₆), 7.35 (td, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 1H, H₄), 6.94 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H₃), 6.79 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, H₅), 5.85 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H_c), 5.45 – 5.40 (m, 2H, H_d and H_e), 5.22 (t, ³J = 9.5 Hz, 1H, H_f), 4.68 (qd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 5.0 Hz, 2H, H_a), 4.28 (dd, ²J = 12.7 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H, H_h), 4.12 (dd, ²J = 12.6 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H_h), 3.99 (ddd, ³J = 10.0 Hz, ³J

= 4.9 Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, H_g), 2.06, 2.05, 2.01, 1.83 (4 s, 4 CH₃, H_i). ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ 170.6, 170.2, 170.1, 169.4, 169.0 (5 CO), 161.6 (C, C₂), 144.8 (C), 134.5 (CH, C₄), 126.0 (CH, C₆), 121.4 (CH, C_b), 118.8 (CH, C₅), 118.6 (CH, C₃), 114.1 (C, C₁), 85.9 (CH, C_c), 75.3 (CH, C_g), 72.7 (CH, C_e), 70.4 (CH, C_d), 67.7 (CH, C_f), 61.6 (CH₂, C_h), 35.0 (CH₂, C_a), 20.9, 20.8, 20.7, 20.3 (4 CH₃, C_i).

2-[4-[(5-Chloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-6-(ethanoyloxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triethanoate (7b)

Compound **7b** was synthesized using the same procedure as described for compound **7a**, except that azido-β-D-glucose **3** had to be added in slight excess (1.3 equiv.) to alkyne **5b** to complete the reaction. For the same reason, the heating time at 50°C was extended to 1.5 hours. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a dichloromethane/ethyl acetate mixture (0:1 to 4:1) as eluent to afford compound **7b** as a white solid in 47% yield. R_f = 0.39 (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1, v/v); mp = 245-246 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.39 (s, 1H, OH), 9.39 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H_b), 7.90 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₄), 6.94 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H₃), 6.30 (d, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, H_c), 5.65 (t, $^3J = 9.4$ Hz, 1H, H_e), 5.52 (t, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H_d), 5.15 (t, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H_f), 4.54 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H_a), 4.33 (m, 1H, H_g), 4.09 (m, 2H, H_h), 2.00, 1.97, 1.94, 1.77 (4 s, 4 CH₃, H_i). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): 170.0, 169.5, 169.3, 168.4, 167.3 (5 CO), 158.4 (C, C₂), 145.0 (C), 133.4 (CH, C₄), 127.6 (CH, C₆), 122.4 (CH, C_b), 122.1 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.8 (C, C₁), 83.8 (CH, C_c), 73.2 (CH, C_g), 72.2 (CH, C_e), 70.1 (CH, C_d), 67.5 (CH, C_f), 61.8 (CH₂, C_h), 34.6 (CH₂, C_a), 20.5, 20.4, 20.2, 19.9 (4 CH₃, C_i).

2-[4-[(3,5-Dichloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-6-(ethanoyloxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triethanoate (7c)

Compound **7c** was synthesized using the same procedure as described for compound **7b**, but with a heating temperature raised to 60°C for a six-hour period in order to have a complete conversion. The purification procedure was also the same as described above for **7b** and this resulted in compound **7c** as a white solid in 42% yield. R_f = 0.43 (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1); mp = 225-226 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 13.60 (s, 1H, OH), 9.78 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H_b), 8.02 (d, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, H₆), 7.81 (d, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, H₄), 6.32 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H_c), 5.67 (t, $^3J = 9.4$ Hz, 1H, H_e), 5.54 (t, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H_d), 5.16 (t, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H_f), 4.56 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H_a), 4.35 (ddd, $^3J = 10.1$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H_g), 4.09 (m, 2H, H_h), 2.02, 1.99, 1.95, 1.78 (4 s, 4 CH₃, H_i). ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ 170.7, 170.1, 169.5, 169.2, 168.7 (5 CO), 156.2 (C, C₂), 144.5 (C), 134.0 (CH, C₄), 124.5 (CH, C₆), 124.0, 123.2 (2 C, C₃ and C₅), 121.7 (CH, C_b), 115.8 (C, C₁), 86.0 (CH, C_c), 75.3 (CH, C_g), 72.6 (CH, C_e), 70.5 (CH, C_d), 67.7 (CH, C_f), 61.5 (CH₂, C_h), 35.1 (CH₂, C_a), 20.8, 20.7, 20.3 (4 CH₃, C_i).

3.1.4 Deprotection of the amino acid or sugar moieties (Figs. 1 and 2; compounds **8a-c** and **9a-c**)

The last step in the synthesis leading to the desired conjugates is the removal of the protecting groups from the □-amino acid function on the **6a-c** products and from the glucose hydroxyl groups on the **7a-c** products. The *tert*-butyl protecting groups (ester and carbamate) of the amino acid function of the products **6a-c** were removed under acidic conditions with trifluoroacetic acid in dichloromethane to

afford the final amino acid conjugates **8a-c** in 70%, 42% and 41% yields, respectively. The acetyl protecting groups of the hydroxyl functions of the β -D glucose derivatives **7a-c** were removed with sodium methoxide generated *in situ*. Then, the resulting alkoxides were neutralized using an acidic cation exchange resin (Amberlite IRN 77), giving the final glucose conjugates **9a-c** in 80%, 38% and 74% yields, respectively.

2-Amino-5-[(2-{4-[(2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}ethyl)amino]-5-oxopentanoic acid (8a)

To a solution of **6a** (2.04 g, 3.73 mmol) in dry dichloromethane (15 mL), trifluoroacetic acid (7 mL) was added and the mixture was stirred for 3 hours at room temperature. After full conversion of **6a**, the reaction mixture was concentrated under vacuum to afford compound **8a** (1.02 g, 2.61 mmol, 70% yield) as a white solid. Rf = 0.11 (EtOAc/CH₃OH; 19:1); mp = 59-60 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 9.34 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, NH), 8.15 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H_b), 7.95 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.36 (td, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 6.96 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H, H₃), 6.85 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 1H, H₅), 4.55 (d, ³J = 5.4 Hz, 2H, H_a), 4.40 (t, ³J = 5.6 Hz, 2H, H_c), 3.39 – 3.50 (m, ³J = 5.6 Hz, 2H, H_d), 3.27 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, H_g), 2.10 (m, 2H, H_e), 1.95 (m, 2H, H_f). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 172.6, 170.8, 168.1 (3 CO), 159.8 (C, C₂), 144.8 (C), 133.8 (CH, C₄), 129.4 (CH, C₆), 123.9 (CH, C_b), 118.9 (CH, C₃), 117.8 (CH, C₄), 116.8 (C, C₁), 53.8 (CH, C_g), 49.0 (CH₂, C_c), 39.4 (CH₂, C_a), 35.1 (CH₂, C_d), 31.8 (CH₂, C_e), 27.1 (CH₂, C_f). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₇H₂₂N₆O₅ [M + H]⁺ 391.1724, m/z found 391.1739.

2-Amino-5-[(2-{4-[(3-chloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}ethyl)amino]-5-oxopentanoic acid (8b)

Compound **8b** was obtained from its precursor **6b** with the procedure used for product **8a** as a colorless hygroscopic solid in 42% yield. Rf = 0.13 (EtOAc/CH₃OH; 19:1). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.90 (s, 1H, OH), 9.39 (t, ³J = 5.2 Hz, 1H, NH), 8.14 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H_b), 7.95 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.43 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₄), 6.99 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H₃), 4.55 (d, ³J = 5.4 Hz, 2H, H_a), 4.39 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H_c), 3.71 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, H_g), 3.46 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H_d), 2.18 – 2.29 (m, ³J = 6.8 Hz, 2H, H_e), 1.93 (m, ³J = 6.8 Hz, 2H, H_f). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 171.6, 170.9, 166.6 (3 CO), 158.2 (C, C₂), 144.1 (C), 132.9 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 123.2 (CH, C_b), 122.6 (C, C₅), 119.1 (CH, C₃), 117.5 (C, C₁), 51.9 (CH, C_g), 48.4 (CH₂, C_c), 38.7 (CH₂, C_a), 34.5 (CH₂, C_d), 30.5 (CH₂, C_e), 25.8 (CH₂, C_f). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₇H₂₁ClN₆O₅ [M + H]⁺ 425.1335, m/z found 425.1336.

2-Amino-5-[(2-{4-[(3,5-dichloro-2-hydroxybenzamido)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}ethyl)amino]-5-oxopentanoic acid (8c)

Compound **8c** was obtained from the protected parent **6c** with the procedure used for product **8a** as a white hygroscopic solid in 41% yield. Rf = 0.10 (EtOAc/CH₃OH; 19:1). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 13.63 (s, 1H, OH), 9.73 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.24 (s, 2H, NH₂), 8.15 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H_b), 8.02 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H₄), 7.79 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H₆), 4.54 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H,

H_a), 4.38 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H_c), 3.90 (m, ³J = 5.6 Hz, 1H, H_g), 3.48 (q, ³J = 5.9 Hz, 2H, H_d), 2.37 – 2.16 (m, 2H, H_e), 2.02 – 1.92 (m, 2H, H_f). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 171.9, 171.3, 168.6 (3 CO), 156.3 (C, C₂), 144.2 (C), 133.7 (CH, C₆), 126.2 (CH, C₄), 124.0 (CH, C_b), 122.9, 122.6 (2 C, C₃ and C₅), 116.8 (C, C₁), 52.0 (CH, C_g), 49.1 (CH₂, C_c), 40.0 (CH₂, C_a), 35.3 (CH₂, C_d), 30.9 (CH₂, C_e), 26.2 (CH₂, C_f). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₇H₂₀Cl₂N₆O₅ [M + H]⁺ 459.0945, m/z found 459.0940.

2-Hydroxy-N-((1-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)benzamide (9a)

To a solution of compound **7a** (2.60 g, 4.74 mmol, 1.0 equiv.) in dry methanol (100 mL) at 0°C under nitrogen, sodium (0.65 g, 28.3 mmol, 6.0 equiv.) was slowly added over 30 minutes. The reaction mixture was stirred at room temperature for an additional 3 hours. The medium was then neutralized by Amberlite 77 resin and filtered through a pad of celite. The celite was washed with methanol and the filtrate was concentrated under vacuum to afford compound **9a** (1.45 g, 3.81 mmol, 80% yield) as a yellow hygroscopic compound. R_f = 0.01 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.49 (s, 1H, OH), 9.47 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H_b), 7.95 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.38 (td, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₄), 6.93 (dd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H₃), 6.86 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H₅), 5.50 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H, H_c), 5.35 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, OH), 5.26 (d, ³J = 3.9 Hz, 1H, OH), 5.14 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, OH), 4.59 (t, ³J = 4.6 Hz, 1H, OH), 4.55 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H_a), 3.75 (td, ³J = 9.1 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, H_d), 3.65 (d, ³J = 10.3 Hz, 1H, H_h), 3.43 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 5.7 Hz, 2H, H_f and H_h), 3.37 (m, 1H, H_e), 3.22 (t, ³J = 9.1 Hz, 1H, H_g). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 169.2 (CO), 160.3 (C, C₂), 144.9 (C), 134.3 (CH, C₄), 128.5 (CH, C₆), 122.7 (CH, C_a), 119.1 (CH, C₅), 117.8 (CH, C₃), 115.7 (C, C₁), 87.9 (CH, C_c), 80.4 (CH, C_f), 77.5 (CH, C_e), 72.4 (CH, C_d), 70.0 (CH, C_g), 61.2 (CH₂, C_h), 35.0 (CH₂, C_a). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₆H₂₀N₄O₇ [M + H]⁺ 381.1405, m/z found 381.1429.

5-Chloro-2-hydroxy-N-((1-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)benzamide (9b)

Compound **9b** was obtained in an identical manner to that used to get **9a**, as a white solid in 38% yield. R_f = 0.01 (EtOAc); mp = 75-76 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.46 (s, 1H, OH), 9.42 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.21 (s, 1H, H_a), 7.96 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₄), 6.95 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H₃), 5.51 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H, H_c), 5.36 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, OH), 5.28 (d, ³J = 4.9 Hz, 1H, OH), 5.16 (d, ³J = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.63 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, OH), 4.56 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, H_a), 3.76 (td, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 6.0 Hz, 1H, H_d), 3.68 (m, 1H, H_h), 3.44 (m, 2H, H_f and H_h), 3.35 (m, 1H, H_e), 3.20 (m, 1H, H_g). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 167.2 (CO), 158.4 (C, C₂), 144.2 (C), 133.4 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 122.4 (CH, C_b), 122.3 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.9 (C, C₁), 87.5 (CH, C_c), 80.0 (CH, C_f), 72.0 (CH, C_d), 69.6 (CH, C_g), 65.0 (CH, C_e), 60.7 (CH₂, C_h), 34.7 (CH₂, C_a). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₆H₁₉ClN₄O₇ [M + H]⁺ 415.1015, m/z found 415.0993.

3,5-Dichloro-2-hydroxy-N-((1-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)benzamide (9c)

Compound **9c** was obtained in an identical manner to that used to get **9a**, as a white solid in 74% yield. R_f = 0.01 (EtOAc); mp = 91-93 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 13.66 (s, 1H, OH), 9.83 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H_b), 8.08 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, H₆), 7.79 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, H₄), 5.50 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H, H_c), 5.35 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, OH), 5.26 (d, ³J = 4.8 Hz, 1H, OH), 5.14 (d, ³J = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.57 (m, ³J = 5.4 Hz, H_a and OH), 3.75 (t, ³J = 9.1 Hz, 1H, H_d), 3.68 (dd, ³J = 10.2 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, H_h), 3.41 (m, 2H, H_f and H_h), 3.37 (t, ³J = 8.9 Hz, 1H, H_e), 3.21 (t, ³J = 9.0 Hz, 1H, H_g). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 168.7 (CO), 156.2 (C, C₂), 144.3 (C), 133.7 (CH, C₄), 126.4 (CH, C₆), 122.8 (CH, C_a), 122.8, 122.5 (2 C, C₃ and C₅), 116.8 (C, C₁), 87.9 (CH, C_c), 80.4 (CH, C_g), 77.4 (CH, C_f), 72.4 (CH, C_d), 70.0 (CH, C_e), 61.2 (CH₂, C_h), 35.3 (CH₂, C_a). HRMS (ESI, CH₃OH): m/z calcd for C₁₆H₁₈Cl₂N₄O₇ [M - H]⁻ 447.0474, m/z found 447.0469.

3.2 Comparison of the phloem mobility of compounds **8a-c** and **9a-c** using the *Ricinus* model

After the cuticle, the plasma membrane is the second physical barrier that must be passed for the uptake and translocation of xenobiotics in plants. Systemic products must cross the cell plasma membrane at least once to enter the conducting cells of phloem.²⁵ Therefore, membrane permeation mechanisms are key factors for the long-distance transport and distribution of xenobiotics in plants. In this context, it became possible to modulate and control the distribution of an active ingredient within the plant by associating it with a vector, which is called the vectorization process. In the case of molecular vectorization used in this work, a vector group (α -amino acid, sugar) is associated with a biologically active molecule (i.e., salicylic acid), allowing the resulting conjugate to be recognized and manipulated by a membrane-based active nutrient transporters.²⁵ For example, the accumulation of Lys-2,4D, a synthesized α -amino acid conjugate, in roots was 5- to 10-times higher than that of its parent compound 2,4D after foliar application.²⁴

Given these considerations, the phloem mobility of conjugates was estimated on the *Ricinus* model, which is a widely used plant model to evaluate phloem systemicity of xenobiotics.²⁹ As shown in Fig. 3, SA exhibited very good phloem mobility in *Ricinus* seedling. The concentration factor in phloem sap (the ratio of the concentration in phloem sap / the concentration in the incubation medium) was about 5.7, which was consistent with our previous study (about 6.9).³² The phloem mobility of 5-ClSA and 3,5-diClSA was much lower than that of SA, showing a concentration factor of 2.7 and 0.6 in phloem sap, respectively. The differences in mobility between the three parent compounds can be attributed to their ability to cross the plasma membrane and to evaluate this, different chemical descriptors or physicochemical properties are commonly used to predict the diffusion of small molecules across human membranes. This approach was later extended to the plant field.³⁶ The chemical descriptors that are considered in the Lipinski³⁷ (Molecular weight < 500 Da; Hydrogen bond donors \leq 5; Hydrogen bond

acceptors ≤ 10 ; Log D ≤ 5.0) or Weber³⁸ (Free rotatable bonds ≤ 10 ; Polar surface area $\leq 140 \text{ \AA}^2$) rules differ little between the three compounds, with the exception of the distribution coefficient Log D that increases with the number of chlorine atoms in the molecule (Table 2). For the parent compounds, it is thus clear that their mobility in *Ricinus* is clearly negatively correlated with the number of chlorine atoms in their structure.

Among all of the conjugates, **8a** and **8c** showed almost the same level of phloem mobility with their parent compound, and the concentration factor in phloem sap was 3.4 and 0.52, respectively (Fig. 3). The phloem mobility of glucose conjugates (**9a-c**) displayed much lower levels (concentration factors 0.04; 0.05; 0.14, respectively) than amino acid conjugates **8a-c**, suggesting that the amino acid moiety was more favorable to phloem mobility than that of glucose moiety. This may be due to the higher substrate specificity of hexose transporters than that of amino acid transporters.^{27, 28} Furthermore, it has been shown that SA could be converted in the cytoplasm into several metabolites such as salicylic acid 2-O- β -D-glucoside (SAG), which is often the major metabolite. SAG is then compartmentalized in the vacuole by two active transport mechanisms, either through an ATP-binding cassette transporter mechanism in soybean cells,³⁹ either through an H⁺-antiport mechanism in tobacco cells.⁴⁰ Therefore, it cannot be excluded that the glucose conjugates **9a-c** were also readily compartmentalized in the vacuole in the same way.

Considering all the conjugates, their chemical descriptors are very similar (Table 2), with the main exception of Log D as before. Contrary to the parent compounds, no correlation between the number of chlorine atoms in the structure and mobility could be observed. Similarly, unlike SA and its chlorinated derivatives, two parameters of Lipinski rule were violated (HBD ≤ 5 ; HBA ≤ 10) as well as one for Veber rule (PSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$). Therefore, the results suggest that these six conjugates are unlikely to diffuse across the plasma membrane and carrier-mediated processes may contribute to phloem transport, in particular for the conjugate **8a** associating salicylic acid with an amino acid, which shows a remarkable mobility in the *Ricinus* model.

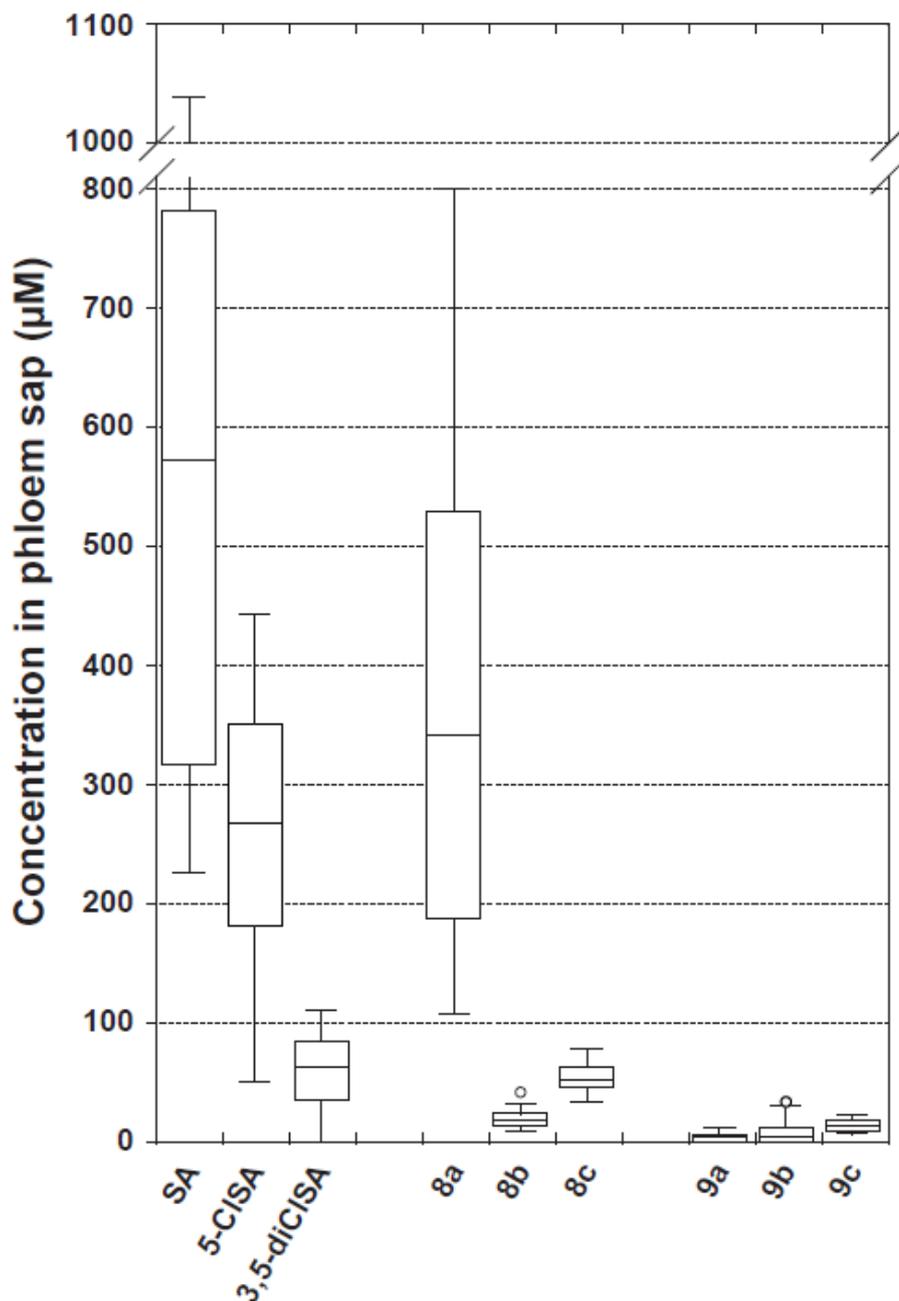


Figure 3. Phloem exudation of salicylic acid, 5-chlorosalicylic acid (**5-CISA**), 3,5-dichlorosalicylic acid (**3,5-diCISA**) and their amino acid (**8a-c**) or glucose conjugates (**9a-c**) using the *Ricinus* model. After 0.5 h preincubation in the standard medium, the conjugates were added to the incubation medium of cotyledons at 100 μM final concentration, pH 5.0. After 2 h of pre-treatment, the hypocotyl was severed and the sap was collected from hypocotyl during the third and the fourth hours of cotyledon incubation. For box plots, $8 \leq n \leq 16$.

3.3 Increased resistance to maize foliar and root pathogen following treatments

The *in vitro* and *in vivo* bioassays were conducted to evaluate the fungicidal and defense-inducing activity of SA conjugates against foliar pathogen *B. maydis*. The mycelial growth of *B. maydis* on the OA plate was not significantly inhibited by SA, amino acid conjugates **8a** and **8b** and glucose conjugate **9b**, indicating that these compounds have no direct fungicidal effect against *B. maydis* at the concentration of 1 mM (Fig. 4). In contrast, the growth of the fungus was inhibited by 43% by 5-CISA, 47% by 3,5-di-CISA, 56% by the amino acid conjugate **8c** and 39% by the glucose conjugates **9a** and **9c**. Thus, these products have a direct antifungal activity at 1 mM concentration on the growth of *B. maydis in vitro* (Fig. 4).

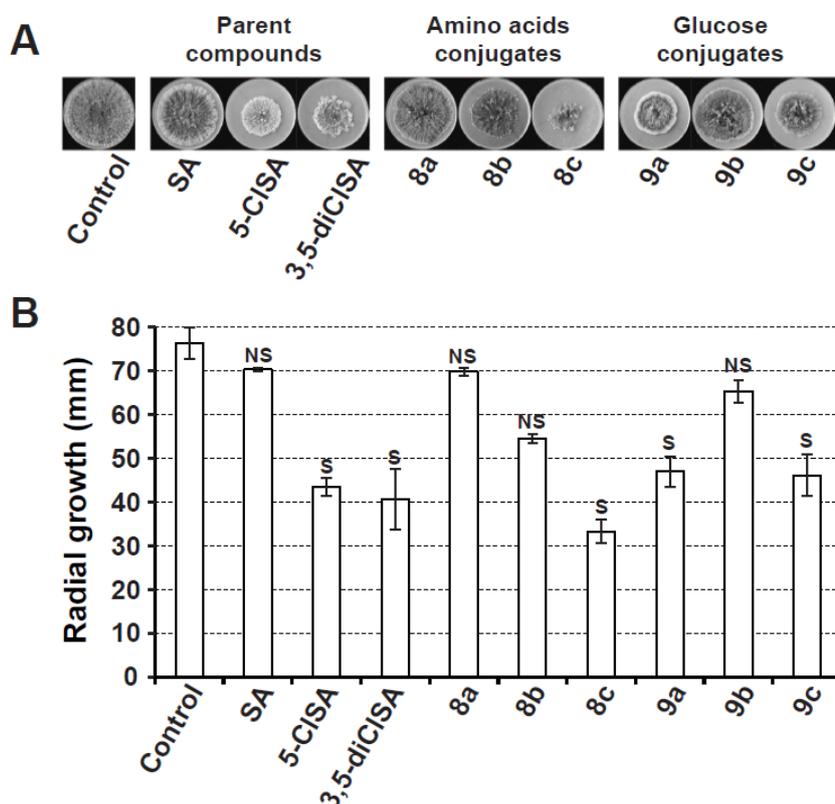


Figure 4. *In vitro* activity of salicylic acid (SA), 5-chlorosalicylic acid (5-CISA), 3,5-dichlorosalicylic acid (3,5-diCISA), their amino acid conjugates and their glucose conjugates on the *Bipolaris maydis* mycelial growth. The products were used at 1 mM concentration in the petri dishes and measurements were made 6 days after inoculation. **A**, Pictures of a representative experiment. **B**, Radial growth measurements of the colonies; n = 3, mean \pm CI 95%. The Kruskal-Wallis test was used to assess statistically significant differences between the control set and the product sets at the 5% probability level. S: significant ; NS: non significant.

In *in vivo* pot experiments, all compounds resulted in significantly increased resistance of maize to prevent *B. maydis* infection when comparing to the ethanol control (Fig. 5). The three parent compounds showed the highest antifungal activity *in vivo*, especially for 3,5-diClSA exhibiting 66% reduction of the lesion size. The decreasing rates of the lesion size for each conjugate were 42% for **8a**, 43% for **8b**, 32% for **8c**, 31% for **9a**, 28% for **9b** and 37% for **9c**, respectively, which indicated that amino acid or glucose conjugates had almost the same activity level (no significant difference in each separate group; Fig. 5). Conjugates **8a** and **9a** exhibited the same level of antifungal activity with their parent compound SA, demonstrating that the addition of amino acid or glucose moiety did not affect the defense-inducing activity of SA against *B. maydis*. However, the lesion size was found to be significantly increased when comparing amino acid conjugate **8c** and glucose conjugates **9b** and **9c** to their corresponding parent compounds 5-ClSA and 3,5-diClSA, suggesting that the amino acid or glucose moiety had negative impact on the activity of chlorinated SA analogues. This may be due to the fact that the chlorine atoms of the parent compounds reduce the affinity for the active sites of the enzymes that hydrolyze the amido bond of the conjugates, thus affecting the release of the chlorinated analogs of salicylic acid. It has been reported that SA can be conjugated with L-aspartate (SA-Asp) as the dominant form in grape (*Vitis vinifera*)⁴¹ and bean (*Phaseolus vulgaris*).⁴² SA-Asp is an inactive form of SA,⁴³ thus there are certain enzymes existing in plant to release SA from its amino acid conjugates. Future metabolic studies will be conducted to clarify this point.

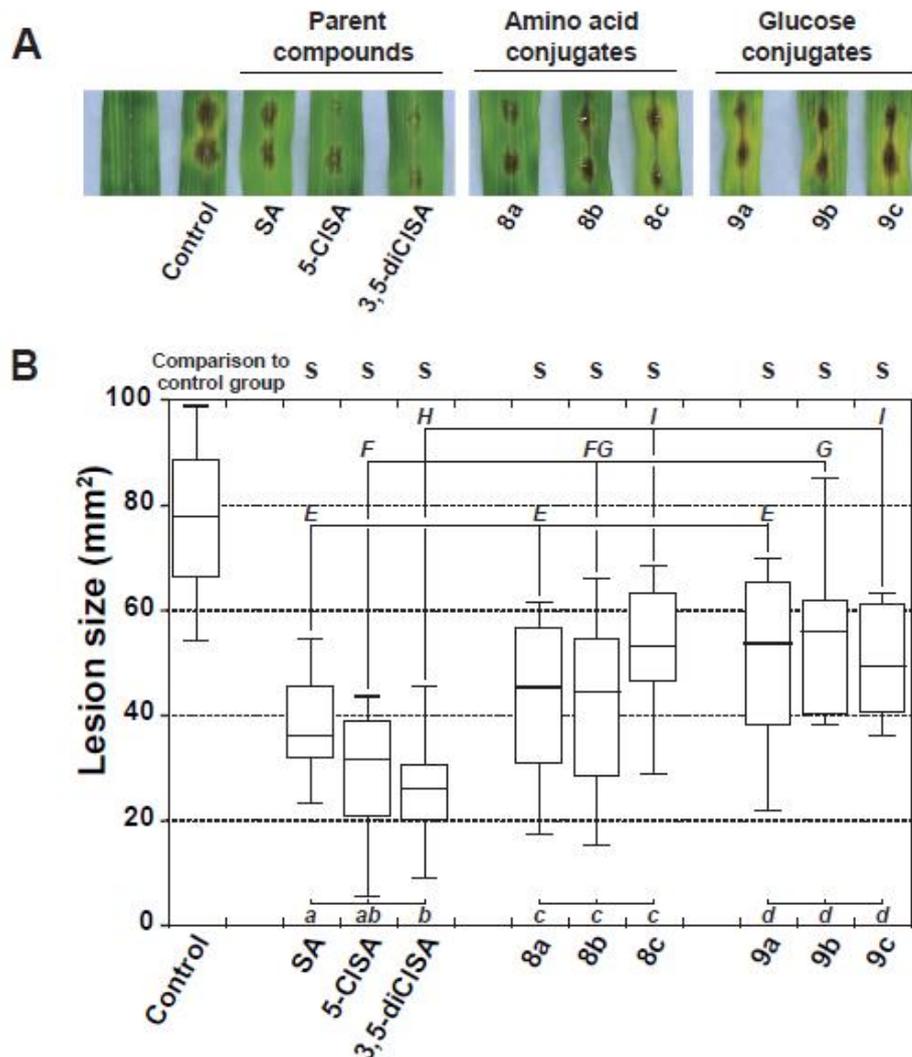


Figure 5. Evaluation of the protective effect of salicylic acid (SA), 5-chlorosalicylic acid (5-CISA), 3,5-di-chlorosalicylic acid (3,5-diCISA) and their amino acid conjugates (8a-c) and glucose conjugates (9a-c) against *Bipolaris maydis* on maize. Compounds were applied by spraying about 2 mL of a 1 mM concentration solution per plant. After two days, maize leaves were harvested and cut into pieces (8 cm). Two droplets of *B. Maydis* spore suspension were applied to the upper surface of each leaf. After three day of incubation, all leaves were photographed and lesion size was measured using ImageJ software. **A**, Effect of SA conjugates on pathogenicity of *B. maydis* in leaf-spot inoculation assay. **B**, The nine treated groups were compared with the untreated control by performing an ANOVA followed by Tukey's HSD test at the 5% probability level. S: significant. Different lower case letters (a, b, c, d) indicated significant differences within each group (parent compounds, amino acid conjugates, glucose conjugates) at the 5 % probability level by ANOVA followed by Tukey's HSD test. Different upper case letters (E, F, G, H, I) indicated significant differences regarding the chlorinated status of the compounds (0, 1 or 2 chlorine atoms) at the 5 % probability level by ANOVA followed by Tukey's HSD test

As the same leaves were treated with the tested compound and inoculated with *B. maydis*, it was difficult to discriminate whether the antifungal effect against *B. maydis* was the result of the induced systemic resistance in plants or the direct fungicidal effect of compound. Thus, further bioassays *in vivo* were conducted to investigate the protective effect of SA conjugates on maize stalk rot caused by *F. graminearum* (Fig. 6A). The spore suspensions of *F. graminearum* were inoculated on the stem base of maize seedling 2 days after chemical treatment on foliar tissues. As shown in Fig. 6, parent compounds SA and 3,5-diClSA did not show protect effect against *F. graminearum* under the present experimental conditions, and 5-ClSA slightly reduced the disease severity of inoculated plants by 13.4%. Conjugates **8a** and **8b** treatment significantly reduced the disease severity by 18.7% and 24.0%, respectively, while there was no beneficial effect for other conjugates (Fig. 6B). This is consistent with a previous study in which exogenous application of SA to foliar tissues did not activate defense gene expression in the roots of *Arabidopsis*⁴⁴ even though SA exhibited very good phloem mobility. This may be due to the fact that SA can be quickly metabolized in plants.¹⁷ Considering the phloem mobility of the conjugates (Fig. 3), the protective effect of conjugates **8a** and **8b** in the stem could be due to their basipetal transport through phloem. With poor phloem mobility, glucose conjugates **9a-c** cannot exert their defense-inducing activity outside the application sites. It is known that biological activity of pesticides can be significantly affected by the uptake and translocation of pesticide within plants, especially for the foliar-applied pesticides, of which the sites of action may be distant from the point of application.⁴⁵

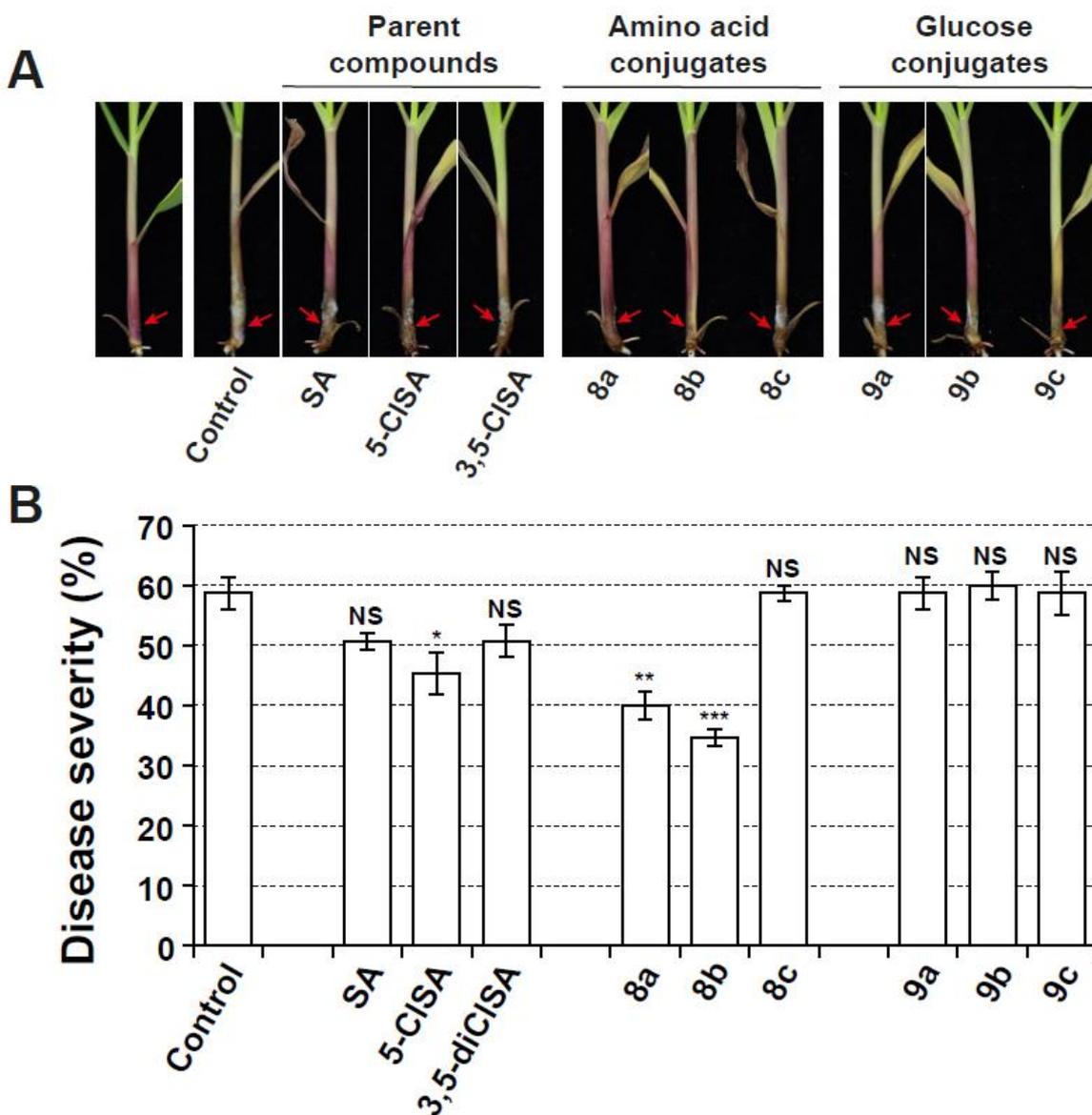


Figure 6. Evaluation of the protective effect of salicylic acid (SA), 5-chlorosalicylic acid (5-CISA), 3,5-dichlorosalicylic acid (3,5-diCISA) and their amino acid conjugates (8a-c) and glucose conjugates (9a-c) against *Fusarium graminearum* on maize. Compounds were applied by spraying about 2 mL of a 1 mM concentration solution per plant. After two days, *F. graminearum* conidial suspensions were dropped to the wounded point on the seedling stem (red arrow). **A**, Effect of SA conjugates on pathogenicity of *F. graminearum* after artificial inoculation on maize stem. **B**, Disease severity in the nine treated groups, which were compared with the untreated control by performing an ANOVA followed by Tukey's HSD Test. Bars represent means \pm SE (n = 3 pots of 5 plants). Asterisks indicate significant differences from control (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS: not significant).

3.4 SA conjugates induced the expression of defense-related gene *ZmNPR1* and *ZmPRI* upon pathogen challenge

The expression analysis of two defense-related genes was performed during the plant defense responses following the treatments of SA conjugates. NPR1 and PR1 play important roles in SA signaling pathway in plants. In *Arabidopsis*, NPR1 was found to be the receptor for SA, and the binding of SA to NPR1 was a prerequisite to the transcription of *PRI*.⁴⁶ As shown in Fig. 7, in the absence of pathogen challenge, only parent compounds directly enhanced the expression of *ZmNPR1* and *ZmPRI* 24 h after treatment, while almost no significant change of gene expression was induced by conjugates (Fig. 7A and C). However, following exposure to *B. maydis*, both parent compounds and conjugates increased the expression of *ZmNPR1* and/or *ZmPRI* in maize leaves at 24 h post-inoculation, demonstrating that SA conjugates were capable of inducing SA-mediated defense responses upon pathogen attack, except for conjugates **8c** and **9a**. A 3.5-fold significant increase in *ZmNPR1* expression was observed compared to control after conjugate **9b** treatment (Fig. 7B). The plants treated with conjugate **8b** had highest expression (2.3-fold) of the SA-responsive marker gene *PRI* (Fig. 7D). Amino acid conjugates **8a** and **8b** induced up-regulation of both genes similar to their parent compounds at 24 h post-inoculation, while glucose conjugate **9b** and **9c** only increased the expression of *ZmNPR1* showing different patterns with their parent compounds at the same time. These results may be due to the penetration ability of the conjugates across the plasma membrane. The absorption and translocation of glucose conjugates in plant tissues were slower than that of amino acid conjugates according to their physicochemical properties and phloem mobility. Thus, the expression profile induced by glucose conjugates may result from a delayed response.

NPR1 was well known as a key molecule involved in SA signaling, and the *npr1* mutant exhibited enhanced disease susceptibility.⁴⁷ The transcriptional level of *NPR1* increases 2- to 3- fold following infection with pathogens and SA treatment.⁴⁸ SA and its two halogenated analogues directly triggered stronger defense response than that of their conjugates over short time (24 h) at a concentration of 1 mM. However, conjugates **8a** and **8b** markedly increased the gene expression of two defense-related genes until the plants were exposed to a challenge infection, suggesting that these conjugates may trigger the plants into a priming phase. Defense priming is a physiological state in which a plant can display longer-lasting activation or attenuated repression of defense upon pathogen or pest attack than unprimed plants.⁴⁹ SA can directly induce defenses when applied at high doses, but at low doses it can trigger the establishment of defense priming.⁵⁰ Based on prodrug strategy, SA conjugate may act as a novel chemical priming agent, which could be safer to the plant than SA by minimizing fitness costs of resistance.

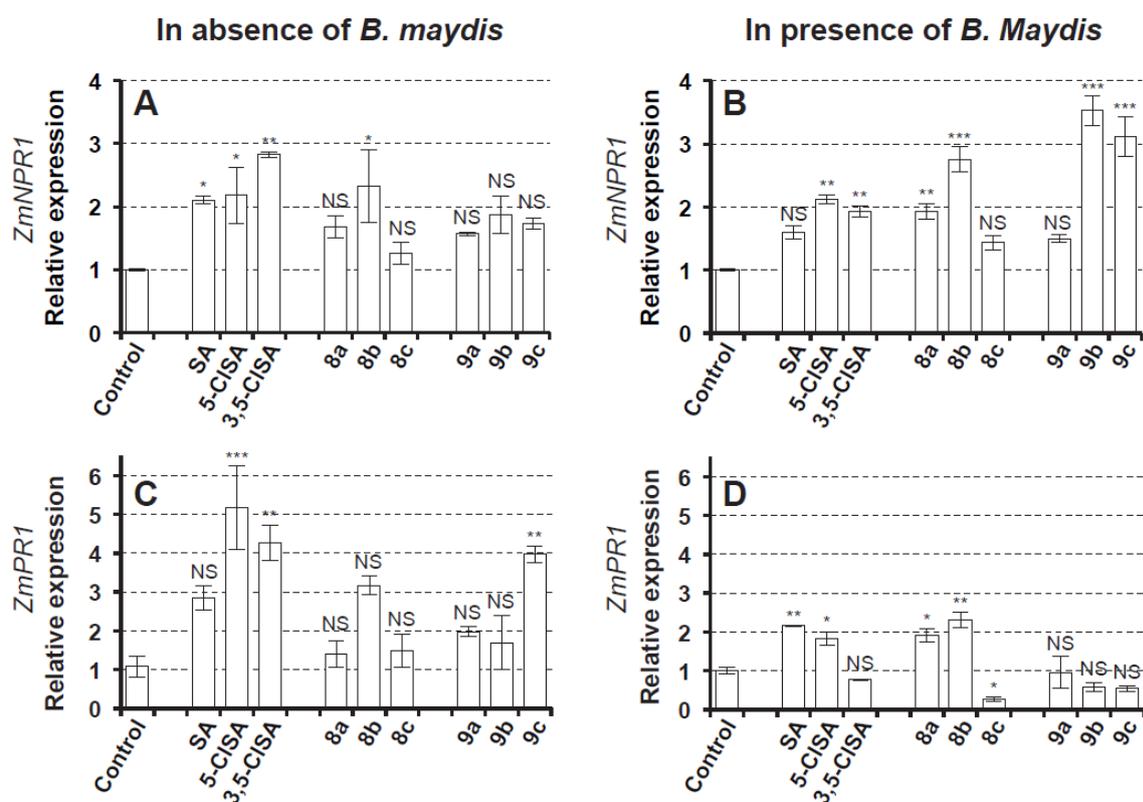


Figure 7. Expression level of defense-related genes ZmNPR1 (A,B) and ZmPR1 (C,D) in maize leaves treated by SA conjugates and their parent compounds, in the absence (A,C) or in presence (B,D) of *Bipolaris maydis*. The maize seedlings were pretreated with 1 mM SA conjugates or the blank solution (control). After 2 days, spore suspension (1×10^5 conidia/mL) of *B. maydis* was sprayed on the leaves. Samples were harvested at 24 h post-inoculation. The results were from one representative replicate among three independent experiments showing the same trends. Bars represent means \pm SE (n = 3 samples). Asterisks indicate significant differences from control in a Dunnett's multiple comparison test following a one-way ANOVA (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS: not significant).

4 CONCLUSION

In conclusion, six conjugates associating salicylic acid, or its analogues monochlorinated in position 5 or dichlorinated in positions 3,5, with glutamic acid or glucose were synthesized, the two moieties being in all cases separated by a spacer arm containing a 1,2,3-triazole ring. Depending on the conjugates, the syntheses were performed in 4 to 6 steps with generally satisfactory yields. Phloem mobility assays using the *Ricinus* model showed that the conjugates with an α -amino acid promoiety were more favorable to phloem systemicity than those with glucose promoiety. In addition, conjugates **8a** and **8c** retained a concentration factor in the phloem sap of the same order of magnitude as the parent compounds. Conjugate **8a** exhibited the best phloem mobility among all conjugates with a concentration factor of 3.4. Moreover, the amino acid conjugates **8a** and **8b**, as well as the glucose conjugate **9b**, had no direct action on the *in vitro* growth of *B. maydis*, the agent of southern corn leaf blight. In contrast, conjugates **8c**, **9a** and **9c** showed a moderate inhibitory effect on mycelial growth of *B. maydis*. All six conjugates showed a statistically significant protective effect on the size of necroses induced by *B. maydis* on maize seedlings, even the effect appeared to be weaker than the parent compounds especially for the chlorinated molecules. It should be noted that conjugate **8a** reduced necrosis size by 42%, showing similar activity with SA. When tested *in vivo* against *F. graminearum*, conjugates **8a** and **8b** also showed protective effect on stem-inoculated maize seedlings after foliar application. The expression of defense-related gene *ZmNPR1* and *ZmPRI* were up-regulated by SA conjugates upon pathogen challenge. Conjugates **8a** and **8b** increased almost the same level of gene expression as their parent compounds when maize plants were exposed to challenge inoculation with *B. maydis*. Future metabolism studies will be performed to clarify whether SA could be released from the conjugate. Anyway, combining the results of the different bioassays, it seems that the conjugate **8a** is the most promising candidate of this series to stimulate plant defenses, with very good phloem mobility in plant, a preventive effect against pathogens similar to that of salicylic acid and an inducing activity of defense gene at the same level as the parent molecule.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial support from the European Union (ERDF) and "Région Nouvelle Aquitaine", the National Natural Science Foundation of China (31801777).

REFERENCES

1. Hayes TB and Hansen M, From silent spring to silent night: Agrochemicals and the anthropocene. *Elementa-Sci Anthropol* **5**:24 (2017).
2. Epstein L, Fifty years since silent spring. *Annu Rev Phytopathol* **52**:377-402 (2014).
3. Pimentel D, Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the

- United States. *Environ Dev Sustainability* **7**:229-252 (2005).
4. Grimmer MK, van den Bosch F, Powers SJ and Paveley ND, Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Manage Sci* **71**:207-215 (2015).
 5. Carvalho FP, Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur* **6**:48-60 (2017).
 6. Jeschke P, Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. *Pest Manage Sci* **72**:433-455 (2016).
 7. Sparks TC and Bryant RJ, Crop protection compounds - trends and perspective. *Pest Manage Sci* **77**:3608-3616 (2021).
 8. Jones JDG and Dangl JL, The plant immune system. *Nature* **444**:323-329 (2006).
 9. Tang B, Liu C, Li Z, Zhang X, Zhou S, Wang GL, Chen XL and Liu W, Multilayer regulatory landscape during pattern-triggered immunity in rice. *Plant Biotechnol J* **19**:2629-2645 (2021).
 10. Fu ZQ and Dong X, Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**:839-863 (2013).
 11. Vlot AC, Dempsey DMA and Klessig DF, Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**:177-206 (2009).
 12. Bektas Y and Eulgem T, Synthetic plant defense elicitors. *Front Plant Sci*, **5**, article number 804 (2015).
 13. Benhamou N and Rey P, Elicitors of natural plant defense mechanisms: a new management strategy in the context of sustainable production. II. Interest for SDN in crop protection. *Phytoprotection* **92**:24-35 (2012).
 14. Delaunois B, Farace G, Jeandet P, Clement C, Baillieul F, Dorey S and Cordelier S, Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environ Sci Pollut Res* **21**:4837-4846 (2014).
 15. Amborabe BE, Fleurat-Lessard P, Chollet JF and Roblin G, Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiol Biochem* **40**:1051-1060 (2002).
 16. Martin JA, Solla A, Witzell J, Gil L and Garcia-Vallejo MC, Antifungal effect and reduction of *Ulmus minor* symptoms to *Ophiostoma novo-ulmi* by carvacrol and salicylic acid. *Eur J Plant Pathol* **127**:21-32 (2010).
 17. Schulz M, Schnabl H, Manthe B, Schweihofen B and Casser I, Uptake and detoxification of salicylic acid by *Vicia faba* and *Fagopyrum esculentum*. *Phytochemistry* **33**:291-294 (1993).
 18. Yalpani N, Balke NE and Schulz M, Induction of UDP-glucose - salicylic acid glucosyltransferase in oat roots. *Plant Physiol* **100**:1114-1119 (1992).
 19. Cole DL, The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protect* **18**:267-273 (1999).
 20. Conrath U, Chen ZX, Ricigliano JR and Klessig DF, 2 inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:7143-7147 (1995).

21. Durner J and Klessig DF, Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, 2 inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:11312-11316 (1995).
22. Vernooij B, Friedrich L, Goy PA, Staub T, Kessmann H and Ryals J, 2,6-Dichloroisonicotinic acid induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic-acid. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**:228-234 (1995).
23. Chollet JF, Deletage C, Faucher M, Miginiac L and Bonnemain JL, Synthesis and structure-activity relationships of some pesticides with an alpha-amino acid function. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1336**:331-341 (1997).
24. Deletage-Grandon C, Chollet JF, Faucher M, Rocher F, Komor E and Bonnemain JL, Carrier-mediated uptake and phloem system of a 350-dalton chlorinated xenobiotic with an alpha-amino acid function. *Plant Physiol* **125**:1620-1632 (2001).
25. Wu H, Xu H, Marivingt-Mounir C, Bonnemain JL and Chollet JF, Vectorizing agrochemicals: enhancing bioavailability via carrier-mediated transport. *Pest Manage Sci* **75**:1507-1516 (2019).
26. Wu HX, Yang W, Zhang ZX, Huang T, Yao GK and Xu HH, Uptake and phloem transport of glucose-fipronil conjugate in *Ricinus communis* involve a carrier-mediated mechanism. *J Agric Food Chem* **60**:6088-6094 (2012).
27. Wu H, Marhadour S, Lei ZW, Yang W, Marivingt-Mounir C, Bonnemain JL and Chollet JF, Vectorization of agrochemicals: amino acid carriers are more efficient than sugar carriers to translocate phenylpyrrole conjugates in the Ricinus system. *Environ Sci Pollut Res Int* **25**:14336-14349 (2018).
28. Wu H, Marhadour S, Lei ZW, Dugaro E, Gaillard C, Porcheron B, Marivingt-Mounir C, Lemoine R, Chollet JF and Bonnemain JL, Use of D-glucose-fenpiclonil conjugate as a potent and specific inhibitor of sucrose carriers. *J Exp Bot* **68**:5599-5613 (2017).
29. Marhadour S, Wu H, Yang W, Marivingt-Mounir C, Bonnemain JL and Chollet JF, Vectorisation of agrochemicals via amino acid carriers: influence of the spacer arm structure on the phloem mobility of phenylpyrrole conjugates in the Ricinus system. *Pest Manage Sci* **73**:1972-1982 (2017).
30. Wen YJ, Jiang XY, Yang C, Meng HY, Wang BF, Wu HX, Zhang ZX and Xu HH, The linker length of glucose-fipronil conjugates has a major effect on the rate of bioactivation by beta-glucosidase. *Pest Manage Sci* **75**:708-717 (2019).
31. Dufaud A, Chollet JF, Rudelle J, Miginiac L and Bonnemain JL, Derivatives of pesticides with an alpha-amino acid function - Synthesis and effect on threonine uptake. *Pestic Sci* **41**:297-304 (1994).
32. Rocher F, Chollet JF, Jousse C and Bonnemain JL, Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem. *Plant Physiol* **141**:1684-1693 (2006).
33. He M, Su J, Xu Y, Chen J, Chern M, Lei M, Qi T, Wang Z, Ryder LS, Tang B, Osés-Ruiz M, Zhu K, Cao Y, Yan X, Eisermann I, Luo Y, Li W, Wang J, Yin J, Lam SM, Peng G, Sun X, Zhu X, Ma B, Wang J, Liu J, Qing H, Song L, Wang L, Hou Q, Qin P, Li Y, Fan J, Li D, Wang Y, Wang X, Jiang L, Shui G, Xia Y, Gong G, Huang F, Wang W, Wu X, Li P, Zhu L, Li S, Talbot NJ and Chen X, Discovery of broad-spectrum fungicides that block septin-dependent infection processes of pathogenic fungi. *Nat Microbiol* **5**:1565-1575 (2020).
34. Sun Y, Ruan X, Ma L, Wang F and Gao X, Rapid screening and evaluation of maize seedling resistance to stalk rot caused by *Fusarium* spp. *Bio-protocol* **8**:e2859 (2018).

35. Livak KJ and Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402-408 (2001).
36. Rocher F, Roblin G and Chollet JF, Modifications of the chemical structure of phenolics differentially affect physiological activities in pulvinal cells of *Mimosa pudica* L. II. Influence of various molecular properties in relation to membrane transport. *Environ Sci Pollut Res Int* **24**:6910-6922 (2017).
37. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW and Feeney PJ, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **23**:3-25 (1997).
38. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW and Kopple KD, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **45**:2615-2623 (2002).
39. Dean JV and Mills JD, Uptake of salicylic acid 2-O-beta-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiol Plant* **120**:603-612 (2004).
40. Dean JV, Mohammed LA and Fitzpatrick T, The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**:287-296 (2005).
41. Steffan H, Ziegler A and Rapp A, N-salicyloyl-aspartic acid: a new phenolic compound in grapevines. *Vitis* **27**:79-86 (1988).
42. Bourne DJ, Barrow KD and Milborrow BV, Salicyloylaspartate as an endogenous component in the leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **30**:4041-4044 (1991).
43. Ding P and Ding Y, Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends Plant Sci* **25**:549-565 (2020).
44. Edgar CI, McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Maclean DC, Schenk PM and Kazan K, Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Australas Plant Pathol* **35**:581-591 (2006).
45. Satchivi NM, Stoller EW, Wax LM and Briskin DP, A nonlinear dynamic simulation model for xenobiotic transport and whole plant allocation following foliar application. III. Influence of chemical properties, plant characteristics, and environmental parameters on xenobiotic absorption and translocation. *Pestic Biochem Physiol* **71**:77-87 (2001).
46. Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V and Després C, The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep* **1**:639-647 (2012).
47. Canet JV, Dobón A, Roig A and Tornero P, Structure-function analysis of npr1 alleles in Arabidopsis reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant Cell Environ* **33**:1911-1922 (2010).
48. Vasyukova NI and Ozeretskoykaya OL, Induced plant resistance and salicylic acid: A review. *Appl Biochem Microbiol* **43**:367-373 (2007).
49. Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CMJ, Pozo MJ, Ton J, van Dam NM and Conrath U, Recognizing plant defense priming. *Trends Plant Sci* **21**:818-822 (2016).
50. Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E and Flors V, Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu Rev Plant Biol* **68**:485-512 (2017).

Conclusions et perspectives

Conclusions

1- Synthèse des bioprécurseurs d'acide salicylique

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons obtenu seize conjugués associant l'acide salicylique (AS) ou ses analogues chlorés à divers nutriments (acides aminés ou sucre). Chacun de ces composés et leurs intermédiaires de synthèse ont été caractérisés par des techniques usuelles d'analyse (RMN et HRMS). Les structures de tous ces conjugués d'acide salicylique ou de ses analogues chlorés sont présentées à la page 163. Parmi ces composés, treize conjugués incluent dans leur structure des acides aminés de série L et trois incluent un sucre.

Parmi ces seize molécules, figurent : i/ six composés associant l'AS ou ses analogues chlorés à l'acide L-glutamique *via* un espaceur 1,2,3-triazole disubstitué en positions 1,4 (composés **6a-c**) ou éthylène glycol (conjugués **9a-c**) ; ii/ trois conjugués associant l'AS au L-tryptophane *via* un espaceur triazole (composé **20**) ou dicarbonylé en positions 1,4 et 1,5 (composés **24a** et **24b**) ; iii/ quatre composés associant l'AS au nutriment par des fonctions amide ou ester sans espaceur ont été obtenus dont trois conjugués associant l'acide salicylique à des α -aminoacides possédant une fonction amine supplémentaire sur leur chaîne latérale tels que les acides L-2,3-diaminopropionique (**26a**, n= 1), L-2,4-diaminobutyrique (**26b**, n= 2) et la L-lysine (**26c**, n= 4) et un quatrième conjugué (composé **32**) associant l'AS à la L-sérine par une fonction ester ; iv/ trois conjugués (**35a-c**) associant l'AS et ses analogues 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique à un sucre (β -D-glucose) par un espaceur triazole ont également été préparés durant ces travaux.

Avant de réaliser de nouvelles études biologiques de ces bioprécurseurs d'AS, des analyses par HPLC chirale seront réalisées afin de confirmer la perte de l'information chirale (racémisation) sur les nutriments α -aminoacides et β -D-glucose. Si la racémisation des bioprécurseurs est confirmée, nous devons à nouveau réaliser les synthèses de ces composés en employant des conditions opératoires limitant cette réaction non désirée (dérivés commerciaux, HOBt, emploi de bases) pouvant impacter l'activité biologique de ces molécules.

2- Bilan des études biologiques

Les études biologiques ont été réalisées avec les bioprécurseurs associant l'AS ou ses analogues chlorés à l'acide L-glutamique (**6a-c**) ou au β -D-glucose (**35a-c**) *via* un espaceur triazolique. Les molécules parents ont été incluses dans ces études à des fins de comparaison. Différentes propriétés ont été évaluées : la mobilité phloémienne, l'activité fongicide *in vitro*, une potentielle activité *in vivo* de stimulation des défenses naturelles du maïs et la capacité à induire l'expression de gènes de défense impliqués dans la voie de signalisation de l'AS. Les résultats obtenus au cours de ces études préliminaires de l'activité biologique des bioprécurseurs **6a-c** et **35a-c** ont permis de mettre en évidence :

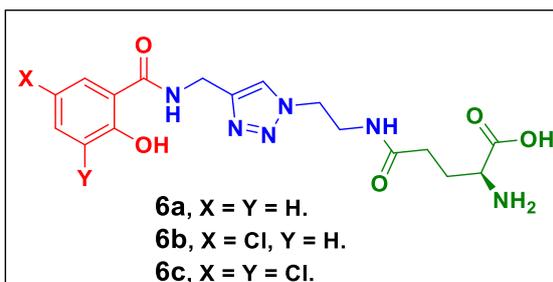
i/ la mobilité phloémienne des conjugués d'acides aminés **6a** et **6c** avec une systémie remarquable pour le composé **6a** ; ii/ une activité fongicide directe *in vitro* à la concentration de 1 mM des conjugués **6c**, **35a** et **35c** et une absence totale d'activité pour **6a**, **6b** et **35b** ; iii/ une activité protectrice des six bioprécurseurs contre *Bipolaridis maydis* responsable de l'helminthosporiose du maïs avec une efficacité maximale notée pour **6a** et **6b** ; iv/ une activité protectrice des bioprécurseurs d'acide aminé **6a** et **6b** contre *Fusarium graminearium* ; v/ une capacité de ces deux conjugués (**6a-b**) à induire une régulation positive des deux gènes liés à la défense *ZmNPR1* et *ZmPRI* et des conjugués glucosés **35b-c** sur le seul gène *ZmNPR1*.

Compte tenu de la mobilité dans la plante, de l'absence d'effet fongicide direct *in vitro*, de la capacité à réduire la taille des nécroses induites par *B. maydis* sur feuilles de maïs et de l'augmentation de l'expression de deux gènes de défenses liés à la voie de l'acide salicylique, les conjugués **6a** et **6b** sont les deux composés les plus prometteurs de la série étudiée pour stimuler les défenses naturelles des plantes.

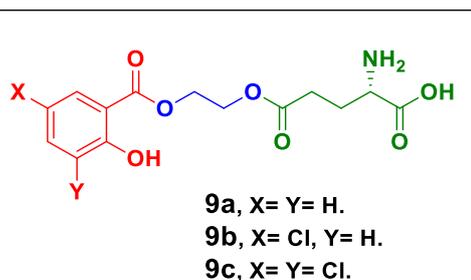
Conjugués associant l'acide salicylique, l'acide 5-chlorosalicylique ou l'acide 3,5-dichlorosalicylique à différents acides aminés ou du glucose

Conjugués à partir d'acide L-glutamique

Espaceur 1,2,3-triazole

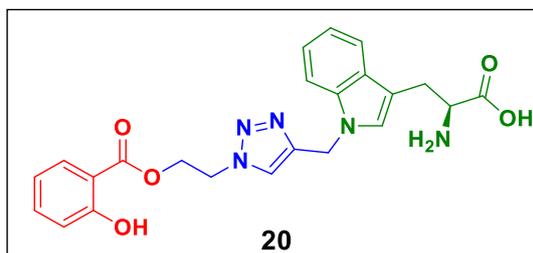


Espaceur éthylène glycol

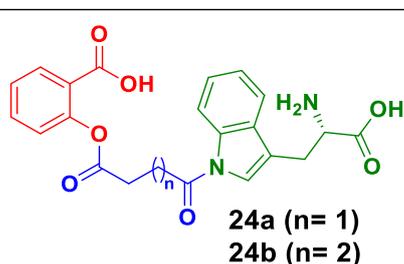


Conjugués à partir du L-tryptophane

Espaceur 1,2,3-triazole

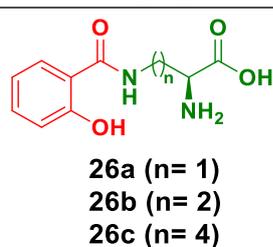


Espaceurs dicarboxylés

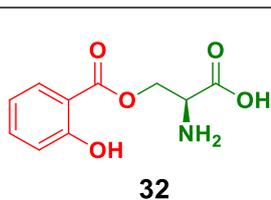


Conjugués à partir d'acides diamino-carboxyliques ou d'hydroxyaminoacides

Acides diamino-carboxyliques

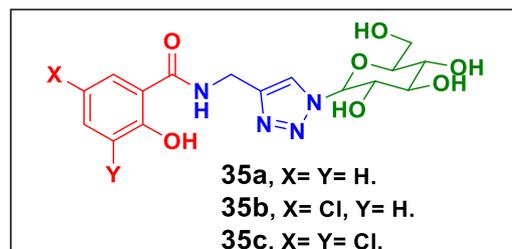


Hydroxyaminoacides



Conjugués à partir du β-D-glucose

Espaceur 1,2,3-triazole



Perspectives

Les études préliminaires réalisées sur les composés **6a-c** et **35a-c** ne nous permettent pas, à ce stade, de savoir si ces propriétés biologiques et systémiques sont engendrées par les bioprécurseurs eux-mêmes ou par une libération de la substance élicitrice provoquée par une hydrolyse enzymatique et/ou chimique des conjugués. Ainsi, afin d'élucider ce point, des études métaboliques de ces composés seront réalisées ultérieurement.

Lorsque ces études métaboliques des composés **6a-c** et **35a-c** auront été réalisées, nous pourrions nous intéresser aux dix bioprécurseurs restants qui ont été présentés dans ce manuscrit. Ainsi plusieurs études préliminaires évoquées dans les Perspectives ainsi que de futures études métaboliques de ces composés pourront être réalisées. En fonction des résultats obtenus avec ces différents composés, il pourrait être intéressant d'orienter les synthèses de conjugués d'AS afin d'optimiser la biodisponibilité de ces derniers dans la plante

Concernant les synthèses de nouveaux bioprécurseurs, nous pourrions poursuivre la synthèse du conjugué **42** (Figure 40, page 117) associant l'AS à la L-sérine par un espaceur triazole, où seules deux étapes de déprotection restent à réaliser. Puis, nous pourrions initier la synthèse du conjugué associant l'acide salicylique à la L-tyrosine (Figure 41, page 118) par une liaison ester entre la fonction acide carboxylique de l'AS et phénol de l'acide aminé.

Parmi les bioprécurseurs synthétisés, des compléments et de nouvelles études de relation structure-activité restent à entreprendre. En particulier, il serait intéressant :

i/ d'étudier l'influence de la nature des espaceurs (1,2,3-triazole et éthylène glycol) sur les conjugués d'acide L-glutamique **6a-c** et **9a-c**. Cette étude permettrait également d'étudier l'influence des atomes de chlore sur les propriétés systémiques et biologiques des bioprécurseurs et comparer ces dernières à celles des molécules parentes.

ii/ de réaliser la synthèse des conjugués d'acide 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique associés au L-tryptophane par un espaceur 1,2,3-triazole afin de faire une étude de relation structure-activité du bioprécurseur **20** et de ses deux analogues halogénés. Il serait également intéressant de synthétiser de nouveaux conjugués ayant des espaceurs dicarbonylés en positions 1,3 ($n = 1$) et 1,6 ($n = 4$) afin de réaliser une modulation de la longueur de chaîne de l'espaceur des bioprécurseurs **24a-b** et d'en étudier l'influence.

iii/ de finaliser la voie de synthèse de conjugués **26a-c** associant l'AS à des acides aminés possédant une fonction amine supplémentaire sur leur chaîne latérale en réalisant la synthèse du conjugué associant l'acide salicylique à la L-ornithine ($n = 3$). Cela permettrait de réaliser une étude de l'impact de la longueur de la chaîne latérale des acides aminés sur les propriétés de ces bioprécurseurs.

Il serait également intéressant de réaliser une étude de la relation structure-activité biologique entre les composés **26a** (n = 1) et **32** en évaluant conjointement la stabilité *in vivo* des liaisons amide et ester.

iv) de synthétiser des conjugués associant l'AS à des hydroxyaminoacides tels que la L-thréonine ou encore à des phénoxyaminoacides tels que la L-tyrosine. Ces molécules pourraient être intéressantes afin d'évaluer l'influence de la structure de l'acide aminé (ramification, cycle aromatique) sur la stabilité de la liaison ester entre l'acide salicylique et ce dernier.

v) de réaliser la synthèse d'une nouvelle série de conjugués associant l'AS ou ses analogues 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique au β -D-glucose par un espaceur éthylène glycol. Ces nouveaux bioprécurseurs permettraient d'étudier l'influence de l'espaceur (éthylène glycol et triazole) sur les propriétés en les comparant aux conjugués **35a-c**.

Nous pourrions par la suite réaliser des synthèses avec un nouveau composé éliciteur tel que l'acide jasmonique. Ce dernier joue au même titre que l'AS un rôle majeur dans divers processus biologiques et physiologiques des plantes. Il pourrait ainsi être intéressant de réaliser des synthèses de conjugués associant l'acide jasmonique à différents nutriments acides aminés (acide glutamique, tryptophane, sérine, acides diamino-carboxyliques, hydroxyaminoacides) ou glucose par différents espaceurs (1,2,3-triazole, éthylène glycol, espaceurs dicarboxylés) lorsque cela est nécessaire.

Chapitre 4 : Partie expérimentale

1- Matériels et méthodes

1.1- Suivi des réactions et purifications

Les produits chimiques et solvants utilisés et achetés pour réactions proviennent de différents fournisseurs comme Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Geel, Belgique), Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne), TCI Chemicals (Oxford, Royaume-Uni), Fischer Scientific (Illkirch, France). Ces réactifs ont pour la plupart été utilisés sans traitement spécifique. Certains réactifs sensibles à l'air ou à l'humidité et les solvants anhydres étaient prélevés sous septum et sous atmosphère protectrice d'azote.

L'avancement des réactions a pu être suivi grâce à des chromatographies sur couche mince de silice (CCM) déposées sur une plaque d'aluminium (plaques commerciales Merck Kieselgel 60 F254 d'une épaisseur de 0,2 mm de silice) grâce à une révélation par fluorescence dans l'ultra-violet à 254 nm puis/ou dans une solution éthanolique de ninhydrine à 1% ou dans une solution aqueuse de permanganate de potassium à 5% massique suivi d'un chauffage. Les purifications de produits ont été réalisées par chromatographie manuelle sur colonne avec un support de silice. La silice employée est une silice MACHEREY-NAGEL Kieselgel® 60 (15-40 μm) phase normale avec un mélange de solvants adapté à la polarité des composés à séparer.

1.2- Analyse des composés organiques :

1.2.1- Analyses RMN

Les produits purifiés ont été analysés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sur des spectromètres Bruker Avance 400DPX (4,5 T) et Bruker Ultrashield™ 500 Avance NEO. Les expériences RMN proton ^1H et carbone ^{13}C ont été réalisées à des fréquences respectives de 400 et 101 MHz ou 500 MHz et 126 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et calibrés sur le pic résiduel du solvant deutéré employé pour l'expérience tel que le chloroforme deutéré CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.16$ ppm), l'acétone- d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.05$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 29.84$ et 206.26 ppm), le DMSO- d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 39.52$ ppm) et D_2O ($\delta_{\text{H}} = 4.80$ ppm). Des abréviations ont été utilisées pour décrire la multiplicité des signaux observés en RMN ^1H : s= singulet ; se= singulet élargi ; d = doublet ; t = triplet ; q = quadruplet ; dd = doublet de doublet ; dt = doublet de triplet ; td = triplet de doublet ; m= multiplet. L'attribution de protons labiles (acides) sera effectuée en employant les abréviations OH pour les protons d'alcool, de phénol ou d'acide carboxylique et NH ou NH_2 pour les protons d'amine, d'amide et de carbamate.

Des expériences DEPT 90 et 135, complémentaires aux analyses RMN ^{13}C et 2D (COSY ^1H - ^1H et HSQC ^1H - ^{13}C) ont également été réalisées afin de confirmer l'attribution des signaux observés. L'attribution des carbones sera identifiée par C pour des atomes de carbone quaternaires et CO pour des

carbones de groupements carbonylés (acide carboxylique, amide, carbamates et esters), CH pour des carbones tertiaires, CH₂ pour des carbones secondaires et CH₃ pour des carbones primaires.

1.2.2- Analyses physico-chimiques

Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisées sur les composés finaux à l'aide d'un spectromètre Bruker QTOF Impact HD utilisant une source d'ionisation à électrospray en mode positif ou négatif (ESI+ ou ESI-) à la Plateforme Instrumentale d'Analyses (PLATINA) de l'université de Poitiers.

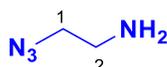
Les points de fusion ont été réalisés dans des capillaires en verre sur un appareil à point de fusion Büchi B-540.

2- Synthèse des conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés associés à des acides aminés de série L

2.1- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique ou ses analogues chlorés à de l'acide L-glutamique

2.1.1- Synthèse de conjugués présentant un espaceur 1,2,3-triazole

Composé 1: 2-azidoéthyl-1-amine³⁴⁷



$C_2H_6N_4$ M= 86,10 g/mol Liquide incolore

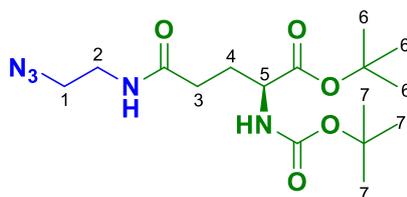
L'azoture de sodium NaN₃ (8.31 g, 127.8 mmol, 2.0 éq) est additionné au bromhydrate de 2-bromoéthylamine (13.09 g, 63.9 mmol, 1.0 éq) en solution aqueuse (100 mL) sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 18 heures puis refroidi à 0°C avant d'être neutralisé à pH 7 par addition progressive d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1M (65 mL, 65.0 mmol, 1.02 éq). Le milieu réactionnel est extrait au dichlorométhane CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite, sans chauffage afin d'obtenir le composé **1** (5.37 g, 62.4 mmol, **97%**) sous forme de liquide incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm) : 3.25 (t, ³J = 5.6 Hz, 2H, H₂), 2.76 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H, H₁), 1.29 (s, 2H, NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm): 54.9 (CH₂, C₂), 41.5 (CH₂, C₁).

CCM (AcOEt/EtOH 6/4), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.35

Composé 2: 5-(2-azidoéthylamino)-2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-5-oxopentanoate de *tert*-butyle³⁴⁷



C₁₆H₂₉N₅O₅
M= 371,44 g/mol
Huile incolore

La 2-azidoéthylamine **1** (6.92 g, 80.4 mmol, 2.0 éq) est additionnée à l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (12.19 g, 40.2 mmol, 1.0 éq) en solution dans du dichlorométhane anhydre (100 mL) refroidi à 0°C, sous azote. L'EDCI (16.10 g, 84.0 mmol, 2.1 éq) et la DMAP (0.49 g, 4.02 mmol, 0.1 éq) sont successivement additionnés à la solution et le milieu réactionnel est maintenu pendant 2 heures sous agitation à 0°C avant d'être ramené à température ambiante durant 20 heures. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau distillée (3 x 30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est ensuite purifié sur gel de silice (AcOEt) pour obtenir le composé **2** (14.70 g, 39.6 mmol, **97%**) sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz), δ (ppm) : 8.10 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.15 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 3.79 (m, 1H, H₅), 3.38 – 3.24 (m, 4H, H₁ et H₂), 2.18 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H₃), 1.97 – 1.71 (m, 2H, H₄), 1.43, 1.42 (2 s, 18H, H₆ et H₇).

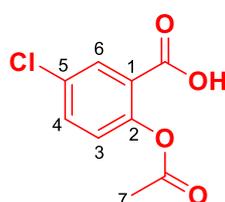
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 171.7, 171.6 (2 CO), 155.5 (CO_{carbamate}), 80.3 et 78.0 (2 C_{*tert*-butyle}), 54.0 (CH, C₅), 49.9 (CH₂, C₁), 38.2 (CH₂, C₂), 31.6 (CH₂, C₃), 28.2 et 27.6 (6 CH₃, C₆ et C₇), 26.5 (CH₂, C₄).

CCM (AcOEt), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.52

Procédure 1 : Acétylation des fonctions phénols des acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicyliques³⁷⁸

L'acétate de sodium (0.1 éq) est additionné à l'acide 5-chlorosalicylique (4.00 g, 23.2 mmol, 1.0 éq) ou 3,5-dichlorosalicylique (5.60 g, 27.0 mmol, 1.0 éq) en suspension dans de l'anhydride acétique. La suspension est chauffée à 60°C sur une période de 3 heures. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à température ambiante et lavé à l'eau distillée refroidie. Le précipité formé est isolé par filtration sur büchner, lavé à l'eau distillée refroidie et séché à l'étuve pour obtenir l'acide 2-acétyloxy-5-chlorobenzoïque **3b** (3.85 g, 17.9 mmol, 77%) ou l'acide 2-acétyloxy-3,5-dichlorobenzoïque **3c** (5.75 g, 23.1 mmol, 85%) sous forme de poudres blanches.

Composé 3b : Acide 2-acétyloxy-5-chlorobenzoïque



C₉H₇ClO₄
M= 214,60 g/mol
Poudre blanche

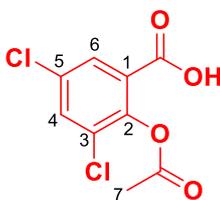
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 13.44 (se, 1H, OH), 7.89 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.71 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 7.26 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₃), 2.25 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 169.0, 164.5 (2 CO), 148.5 (C, C₂), 133.5 (CH, C₄), 130.7 (CH, C₆), 130.1 (C, C₁), 125.9 (C, C₅), 125.9 (CH, C₃), 20.7 (CH₃, C₇).

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt 8/2), révélation UV: R_f = 0.18

Point de fusion : 142°C.

Composé 3c : Acide 2-acétyloxy-3,5-dichlorobenzoïque



C₉H₆Cl₂O₄
M= 249,03 g/mol
Poudre blanche

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 13.83 (se, 1H, OH), 8.06 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₆), 7.87 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₄), 2.32 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 168.5, 164.2 (2 CO), 145.7 (C, C₂), 133.7 (CH, C₄), 131.2 (C, C₁), 130.2 (CH, C₆), 129.6, 127.9 (2 C, C₃ et C₅), 20.8 (CH₃, C₇).

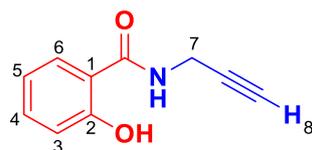
CCM (CH₂Cl₂/AcOEt 8/2), révélation UV : R_f = 0.16

Point de fusion : 148°C.

Procédure 2 : Condensation peptidique entre les dérivés acétylés d'AS ou analogues halogénés et la propargylamine³⁴⁷

La propargylamine (2.0 éq) est additionnée au dérivé acétylé **3a-c** (1.0 éq) en suspension dans du dichlorométhane anhydre sous azote et refroidi à 0°C. L'EDCI (2.0 éq) et de la DMAP (0.1 éq) sont successivement additionnés à la suspension. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 0°C pendant une heure avant d'être amené à température ambiante et y être maintenu durant vingt et une à vingt quatre heures. Le milieu réactionnel est ensuite lavé à l'eau distillée (4 x 50 mL). La phase aqueuse est extraite une fois au dichlorométhane (30 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur une colonne de silice dans un éluant Pentane/AcOEt 19 :1 afin d'obtenir les composés **4a-c**.

Composé **4a** : 2-Hydroxy-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide



C₁₀H₉NO₂
M= 175,19 g/mol
Solide jaunâtre

Le composé **4a** (3.17 g, 18.1 mmol, **50%**) est obtenu sous la forme d'un solide jaunâtre en engageant le composé **3a** (6.54 g, 36.3 mmol, 1.0 éq) après vingt-trois heures de réaction à température ambiante.

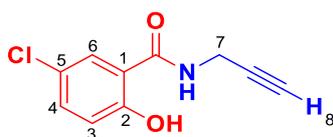
RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm): 12.29 (s, 1H, OH), 9.19 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.84 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₆), 7.42 (td, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₄), 6.91 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₃), 6.89 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₅), 4.10 (dd, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 2H, H₇), 2.26 (t, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H₈).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 126 MHz), δ (ppm): 168.5 (CO), 159.7 (C, C₂), 134.0 (CH, C₄), 128.1 (CH, C₆), 118.8 (CH, C₅), 117.4 (CH, C₃), 115.1 (C, C₁), 80.8 (C_{alkyne}), 73.2 (CH, C₈), 28.3 (CH₂, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation sous lampe UV : R_f = 0.55

Point de fusion : 96 – 99 °C.

Composé 4b : 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide



C₁₀H₈ClNO₂
M= 209,63 g/mol
Poudre blanche

Le composé **4b** (0.79 g, 3.77 mmol, **40%**) est obtenu sous la forme d'une poudre blanche à partir du composé **3b** (2.00 g, 9.32 mmol, 1.0 éq) en suivant la Procédure 2 excepté pour la DMAP engagée à 0.2 équivalent à la place de 0.1 équivalent.

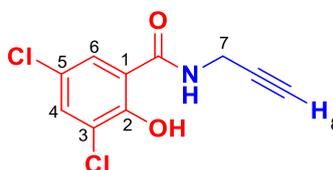
RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (ppm) : 12.27 (s, 1H, OH), 9.22 (t, ³J = 5.2 Hz, 1H, NH), 7.92 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.46 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 6.98 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H₃), 4.10 (dd, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 2H, H₇), 3.20 (t, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H₈).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 126 MHz) δ (ppm) : 166.8 (CO), 158.0 (C, C₂), 133.4 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 122.5 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.9 (C, C₁), 80.5 (C_{alkyne}), 73.4 (CH, C₈), 28.5 (CH₂, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV : R_f = 0.61

Point de fusion : 167 °C.

Composé 4c: 3,5-dichloro-2-Hydroxy-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide.



C₁₀H₇Cl₂NO₂
M= 244,27 g/mol
Poudre jaune

Le composé **4c** (0.50 g, 2.03 mmol, **25%**) est obtenu sous forme de poudre jaune à partir du composé **3c** (2.00 g, 8.03 mmol, 1.0 éq) en suivant la Procédure 2 avec un chauffage additionnel du milieu réactionnel à reflux durant cinq heures après seize heures à température ambiante.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 12.35 (s, 1H, OH), 7.49 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, H₆), 7.34 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, H₄), 6.68 (s, 1H, NH), 4.24 (dd, ³J = 5.2 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, H₇), 2.33 (t, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 168.1 (CO), 156.1 (C, C₂), 134.3 (CH, C₄), 124.4 (C, C₃ ou C₅), 124.1 (CH, C₆), 123.5 (C, C₃ ou C₅), 115.7 (C, C₁), 78.2 (C, C_{alkyne}), 73.0 (CH, C₈), 29.9 (CH₂, C₇).

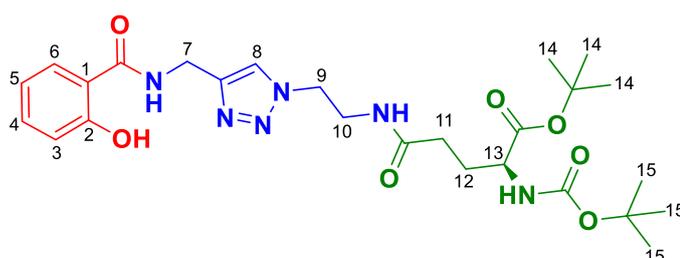
CCM (CH₂Cl₂), révélation UV : R_f = 0.66

Point de fusion : 182°C.

Procédure 3 : Couplage entre les dérivés propargyliques 4a-c et l'azoture d'acide L-glutamique protégé par click chemistry³⁴⁷

L'azoture d'acide glutamique **2** (1.0 éq) est additionné aux composés propargyliques **4a-c** (1.0 éq) en solution dans du *t*-BuOH sous atmosphère inerte d'azote. Le sulfate de cuivre pentahydraté (0.2 éq) et l'ascorbate de sodium (0.4 éq) dissouts dans de l'eau distillée, sont additionnés à la solution. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé et maintenu sous agitation à 50°C jusqu'à observer une conversion complète des deux réactifs. Le milieu est ramené à température ambiante et extrait au dichlorométhane (4 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne sur gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 1:0 puis 0:1) afin d'obtenir les composés **5a-c**.

Composé 5a : 5-(4-[(2-hydroxybenzamido)méthyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthylamino)-2*S*-[(*tert*-butoxycarbonylamino)]-5-oxopentanoate de *tert*-butyle.



C₂₆H₃₈N₆O₇
M= 546,63 g/mol
Poudre blanche

Le composé **5a** (4.08 g, 7.46 mmol, **41%**) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche à partir du composé **4a** (3.17 g, 18.0 mmol, 1.0 éq) et de l'azoture **2** (6.72 g, 18.0 mmol, 1.0 éq) après une heure de réaction à 50°C.

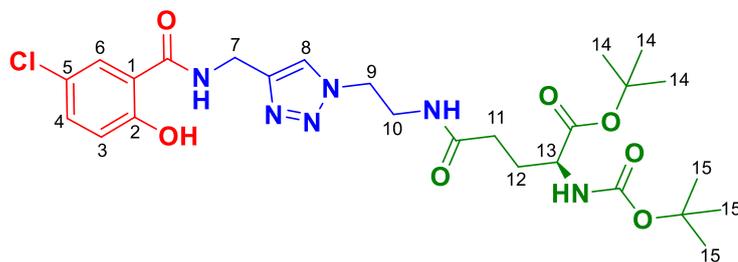
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 12.46 (s, 1H, OH), 9.32 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H₈), 7.98 (t, ³J = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.87 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₆), 7.39 (td, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 7.08 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 6.91 – 6.86 (m, 2H, H₃ et H₅), 4.53 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, H₇), 4.37 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₉), 3.74 (td, ³J = 8.0 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H₁₃), 3.45 (td, ³J = 6.0 Hz, ³J = 5.1 Hz, 2H, H₁₀), 2.10 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H₁₁), 1.85 (td, ²J = 13.3 Hz, ³J = 7.8 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H₁₂), 1.67 (td, ²J = 13.2 Hz, ³J = 7.8 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H₁₂), 1.38 et 1.37 (2 s, 18H, H₁₄ et H₁₅).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm): 171.7, 171.5 et 168.7 (3 CO), 159.9 (C, C₂), 156.6 (CO_{carbamate}), 144.6 (C, C_{triazole}), 133.8 (CH, C₄), 127.9 (CH, C₆), 123.3 (CH, C₈), 118.6 (CH, C₃), 117.3 (CH, C₅), 115.2 (C, C₁), 80.3, 78.0 (2 C_{tert-butyle}), 59.7 (CH, C₁₃), 53.9 (CH₂, C₉), 48.6 (CH₂, C₇), 34.5 (CH₂, C₁₀), 31.5 (CH₂, C₁₁), 28.6 et 27.6 (6 CH₃, C₁₄ et C₁₅), 26.4 (CH₂, C₁₂).

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.48

Point de fusion : 86 – 87 °C.

Composé 5b: 5-(4-[(5-chloro-2-hydroxybenzamido)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)éthylamino)-2S-[*tert*-butoxycarbonylamino]-5-oxopentanoate de *tert*-butyle



C₂₆H₃₇ClN₆O₇
M= 581,07 g/mol
Poudre blanche

Le composé **5b** (1.35 g, 2.32 mmol, **44%**) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche en engageant les composés **4b** (1.10 g, 5.25 mmol, 1.0 éq) et **2** (1.95 g, 5.25 mmol, 1.0 éq) chauffés à 50°C pendant trois heures.

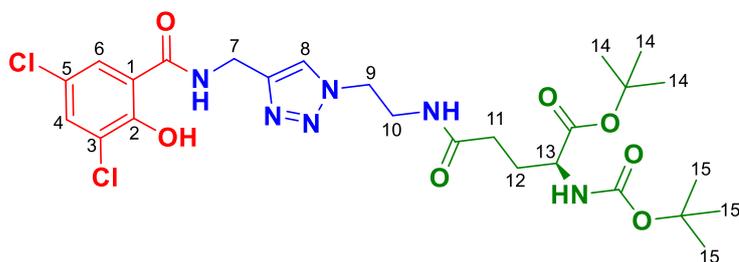
RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (ppm): 12.45 (s, 1H, OH), 9.37 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H₈), 7.99 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.96 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 7.11 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 6.94 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H₃), 4.55 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, H₇), 4.39 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₉), 3.74 (m, 1H, H₁₃), 3.44 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₁₀), 2.10 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H₁₁), 1.86 (m, 1H, H₁₂), 1.70 (m, 1H, H₁₂), 1.38 (s, 18H, H₁₄ et H₁₅).

RMN ¹³C (Acétone-d₆, 126 MHz) δ (ppm): 173.0, 172.3, 169.7 (3 CO), 161.1 (C, C₂), 156.4 (CO_{carbamate}), 144.9 (C, C_{triazole}), 134.5 (CH, C₄), 127.3 (CH, C₆), 124.1 (CH, C₈), 123.6 (C, C₅), 120.4 (CH, C₃), 116.5 (C, C₁), 81.4, 79.1 (2 C_{tert-butyle}), 55.0 (CH, C₁₃), 50.0 (CH₂, C₉), 40.2 (CH₂, C₇), 35.8 (CH₂, C₁₀), 32.6 (CH₂, C₁₁), 28.5, 28.1 (6 CH₃, C₁₄ et C₁₅), 27.8 (CH₂, C₁₂).

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.52

Point de fusion : 108 – 109 °C.

Composé 5c : 5-([4-[(3,5-dichloro-2-hydroxybenzamido)méthyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]éthylamino)-2*S*-[*tert*-butoxycarbonylamino]-5-oxopentanoate de *tert*-butyle



$C_{26}H_{36}Cl_2N_6O_7$
M= 615,51 g/mol
Poudre blanche

Le composé **5c** (1.38 g, 2.24 mmol, **74%**) a été isolé sous la forme d'une poudre blanche en engageant les composés **4c** (0.74 g, 3.03 mmol, 1.0 éq) et **2** (1.30 g, 3.50 mmol, 1.15 éq) chauffés à 50°C pendant deux heures.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 13.63 (s, 1H, OH), 9.71 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H₈), 8.02 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H₆), 7.99 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, NH), 7.77 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H₄), 7.09 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 4.54 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, H₇), 4.36 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H₉), 3.76 (m, 1H, H₁₃), 3.46 (q, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H₁₀), 2.10 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, H₁₁), 1.86 (m, 1H, H₁₂), 1.67 (m, 1H, H₁₂), 1.39, 1.38 (2 s, 18H, H₁₄ et H₁₅).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.8, 171.5, 168.1 (3 CO), 155.8 (C, C₂), 155.5 (CO_{carbamate}), 143.5 (C, C_{triazole}), 133.2 (CH, C₄), 125.8 (CH, C₆), 123.6 (CH, C₈), 122.4, 122.0 (2 C, C₃ et C₅), 116.3 (C, C₁), 80.3, 78.0 (2 C_{tert-butyle}), 53.9 (CH, C₁₃), 48.7 (CH₂, C₉), 38.8 (CH₂, C₇), 34.8 (CH₂, C₁₀), 31.5 (CH₂, C₁₁), 28.2, 27.6 (6 CH₃, C₁₄ et C₁₅), 26.4 (CH₂, C₁₂).

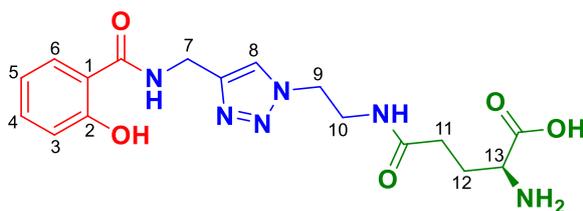
CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.58

Point de fusion : 115 – 116 °C.

Procédure 4: Déprotection de la fonction α -aminoacide des composés 5a-c en milieu acide

De l'acide trifluoroacétique $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (5-7 mL) est additionné au composé **5a-c** en solution dans du dichlorométhane anhydre (5-15 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante jusqu'à la conversion totale du réactif. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite afin d'obtenir le conjugué **6a-c**.

Composé 6a : Acide 5-([4-[(2-hydroxybenzamido)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]éthylamino)-2S-amino-5-oxopentanoïque



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5$ M= 390,40 g/mol Poudre blanche

Le conjugué **6a** (1.02 g, 2.61 mmol, **70%**) été obtenu sous la forme d'une poudre blanche en engageant le composé **5a** (2.04 g, 3.73 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (7 mL) et de dichlorométhane (15 mL) après trois heures de réaction.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 12.46 (s, 1H, OH), 9.34 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 8.15 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H₈), 7.95 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H₆), 7.36 (td, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H₄), 6.96 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₃), 6.85 (td, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₅), 4.55 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, H₇), 4.40 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H₉), 3.39 – 3.50 (m, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H₁₀), 3.27 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, H₁₃), 2.10 (m, 2H, H₁₁), 1.95 (m, 2H, H₁₂).

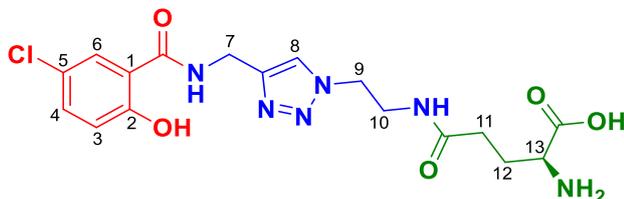
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm): 172.6, 170.8, 168.1 (3 CO), 159.8 (C, C₂), 144.8 (C, C_{triazole}), 133.8 (CH, C₄), 129.4 (CH, C₆), 123.9 (CH, C₈), 118.9 (CH, C₃), 117.8 (CH, C₅), 116.8 (C, C₁), 53.8 (CH, C₁₃), 49.0 (CH₂, C₉), 39.4 (CH₂, C₇), 35.1 (CH₂, C₁₀), 31.8 (CH₂, C₁₁), 27.1 (CH₂, C₁₂).

HRMS (ESI+) calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_5$ [M+H]⁺ : 391.1724, **mesurée** : 391.1739.

CCM (AcOEt/CH₃OH 19/1) révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.11

Point de fusion : 59 – 60°C.

Composé 6b : Acide 5-({[4-[(5-chloro-2-hydroxybenzamido)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]éthyl]amino)-2-amino-5-oxopentanoïque



$C_{17}H_{21}ClN_6O_5$
M= 424,84 g/mol
Solide blanc
hygroscopique

Le composé **6b** (0.40 g, 0.94 mmol, **42%**) a été obtenu sous forme d'un solide hygroscopique blanc après trois heures de réaction. Ce dernier a été obtenu à partir du composé **5b** (1.30 g, 2.24 mmol, 1.0 éq) et de CF_3CO_2H (2 mL) dans du dichlorométhane anhydre (5 mL).

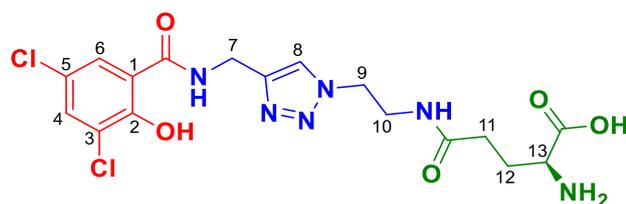
RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 12.90 (s, 1H, OH), 9.39 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 8.14 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H₈), 7.95 (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₆), 7.43 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₄), 6.99 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H₃), 4.55 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, H₇), 4.39 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H₉), 3.71 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, H₁₃), 3.46 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H₁₀), 2.18 – 2.29 (m, 2H, H₁₁), 1.93 (m, 2H, H₁₂).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.6, 170.9, 166.6 (3 CO), 158.2 (C, C₂), 144.1 (C, C_{triazole}), 132.9 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 123.2 (CH, C₈), 122.6 (C, C₅), 119.1 (CH, C₃), 117.5 (C, C₁), 51.9 (CH, C₁₃), 48.4 (CH₂, C₉), 38.7 (CH₂, C₇), 34.5 (CH₂, C₁₀), 30.5 (CH₂, C₁₁), 25.8 (CH₂, C₁₂).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{17}H_{22}ClN_6O_5$ $[M+H]^+$: 425.1334, **mesurée :** 425.1336

CCM (AcOEt/CH₃OH 19/1), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.13

Composé 6c : Acide 5-([4-[(3,5-dichloro-2-hydroxybenzamido)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]éthylamino)-2-amino-5-oxopentanoïque



$C_{17}H_{20}Cl_2N_6O_5$
M= 459,28 g/mol
Solide hygroscopique
blanc

Le composé **6c** (0.40 g, 0.87 mmol, **41%**) a été obtenu sous la forme d'un solide hygroscopique blanc après trois heures de réaction. Ce dernier a été obtenu à partir du composé **5c** (1.30 g, 2.11 mmol, 1.0 éq) et d'acide trifluoroacétique (2 mL) dans du dichlorométhane anhydre (5 mL).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 13.63 (s, 1H, OH), 9.73 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, NH), 8.24 (se, 2H, NH_2), 8.15 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H_8), 8.02 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_6), 7.79 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_4), 4.54 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H_7), 4.38 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H_9), 3.90 (m, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, H_{13}), 3.48 (q, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, H_{10}), 2.37 – 2.16 (m, 2H, H_{11}), 2.02 – 1.92 (m, 2H, H_{12}).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.9, 171.3, 168.6 (3 CO), 156.3 (C, C_2), 144.2 (C, C_{triazole}), 133.7 (CH, C_6), 126.2 (CH, C_4), 124.0 (CH, C_8), 122.9, 122.6 (2 C, C_3 et C_5), 116.8 (C, C_1), 52.0 (CH, C_{13}), 49.1 (CH $_2$, C_9), 40.0 (CH $_2$, C_7), 35.3 (CH $_2$, C_{10}), 30.9 (CH $_2$, C_{11}), 26.2 (CH $_2$, C_{12}).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{17}H_{21}Cl_2N_6O_5$ $[M+H]^+$: 459.0945, **mesurée :** 459.0940

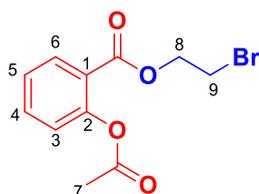
CCM (AcOEt/CH $_3$ OH 19/1), révélations UV et ninhydrine: Rf = 0.10

2.1.2- Synthèse de conjugués possédant un espaceur éthylène glycol

Procédure 5 : Estérification de Steglich entre les dérivés acétylés d'AS et le 2-bromoéthanol³⁸⁶

Du 2-bromoéthanol (1.0 éq) est additionné aux dérivés acétylés **3a-c** (1.0 éq) en suspension dans du dichlorométhane anhydre refroidi à 0°C. La DMAP (0.1 éq) et l'EDCI (1.0-1.5 éq) sont successivement additionnés à la suspension qui est maintenue à 0°C pendant une heure. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante et maintenu sous agitation jusqu'à la conversion complète des composés **3a-c**. Le milieu réactionnel est ensuite lavé à l'eau distillée (3 x 50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (Pentane/CH₂Cl₂ 7:3 puis 0:1) afin d'obtenir les composés **7a-c**.

Composé **7a**: 2-Acétyloxybenzoate de 2-bromoéthyle



C₁₁H₁₁BrO₄
M= 287,11 g/mol
Huile incolore

Le composé **7a** (3.63 g, 12.7 mmol, **67%**) a été isolé sous la forme d'une huile incolore en engageant le composé **3a** (3.40 g, 18.9 mmol, 1.0 éq) et le 2-bromoéthanol (2.36 g, 18.9 mmol, 1.0 éq) après soixante heures de réaction.

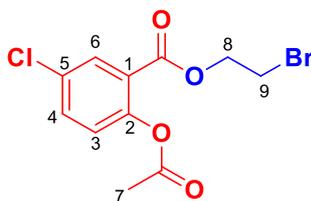
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 8.05 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.57 (td, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₄), 7.33 (td, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.11 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H₃), 4.57 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H₈), 3.70 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H₉), 2.36 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.8, 164.0 (2 CO), 151.0 (C, C₂), 134.4 (CH, C₄), 132.0 (CH, C₆), 126.2 (CH, C₅), 124.0 (CH, C₃), 122.7 (C, C₁), 64.5 (CH₂, C₈), 28.6 (CH₂, C₉), 21.2 (CH₃, C₇).

HRMS (ESI+) calculée pour C₁₁H₁₁BrO₄Na [M+Na]⁺: 308.9733, mesurée : 308.9737

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV : R_f = 0.90

Composé 7b : 2-Acétyleoxy-5-chlorobenzoate de 2-bromoéthyle



C₁₁H₁₀ClBrO₄
M= 321,55 g/mol
Huile incolore

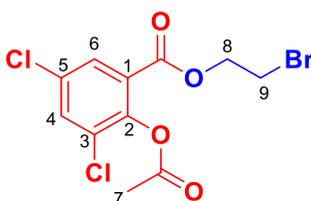
Le composé **7b** (0.51 g, 1.82 mmol, **34%**) a été isolé sous forme d'une huile incolore après vingt-quatre heures de réaction. Ce dernier a été obtenu à partir du composé **3b** (1.15 g, 5.36 mmol, 1.0 éq) et de 2-bromoéthanol (0.67 g, 5.36 mmol, 1.0 éq).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 8.02 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₆), 7.54 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₄), 7.07 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, H₃), 4.59 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H₈), 3.61 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, H₉), 2.36 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.5, 162.7 (2 CO), 149.4 (C, C₂), 134.1 (CH, C₄), 132.0 (C, C₅), 131.6 (CH, C₆), 125.4 (CH, C₃), 124.0 (C, C₁), 64.7 (CH₂, C₈), 28.2 (CH₂, C₉), 21.0 (CH₃, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.84

Composé 7c : 2-acétoxy-3,5-dichlorobenzoate de 2-bromoéthyle



C₁₁H₉Cl₂BrO₄
M = 355,99 g/mol
Huile incolore

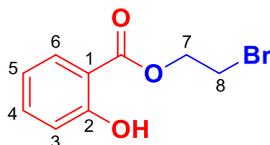
Le composé **7c** (1.15 g, 3.21 mmol, **50%**) a été isolé sous forme d'une huile incolore après vingt-quatre heures de réaction. Ce produit a été obtenu en engageant le composé **3c** (1.60 g, 6.43 mmol, 1.0 éq) et le 2-bromoéthanol (0.80 g, 6.43 mmol, 1.0 éq).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 7.93 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₆), 7.66 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H₄), 4.59 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₈), 3.61 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₉), 2.41 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 168.2, 162.1 (2 CO), 146.1 (C, C₂), 134.2 (CH, C₄), 131.8, 130.2 (2 C, C₃ et C₅), 130.1 (CH, C₆), 125.5 (C, C₁), 65.0 (CH₂, C₈), 28.2 (CH₂, C₉), 20.6 (CH₃, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.87

Composé 7a': 2-Hydroxybenzoate de 2-bromoéthyle



C₉H₉BrO₃
M= 245,07 g/mol
Liquide incolore

*Réaction avec un acide de Brønsted*³⁹⁰ :

L'acide sulfurique (1.9 mL, 35.0 mmol, 3.5 éq) est additionné goutte à goutte à de l'acide salicylique (1.38 g, 10.0 mmol, 1.0 éq) en solution dans du 2-bromoéthanol (5 mL, 70.0 mmol, 7.0 éq) sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pendant 24 heures. Le mélange est ensuite neutralisé (pH 7) par une solution saturée de NaHCO₃ (25 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de silice (Pentane/AcOEt 9 :1) afin d'obtenir le composé **7a'** (0.60 g, 2.44 mmol, **24%**) sous forme de liquide incolore.

*Réaction avec un acide de Lewis*³⁹¹ :

Le diéthylétherate de trifluorure de bore BF₃.Et₂O (0.50 g, 3.52 mmol, 0.4 éq) est additionné goutte à goutte à de l'acide salicylique (1.38 g, 10.00 mmol, 1.0 éq) en solution dans du 2-bromoéthanol (5.0 mL, 70.00 mmol, 7.0 éq) sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pendant 8 heures. Le mélange est ensuite dilué dans une solution saturée de NaCl (40 mL) puis extrait au dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de silice (Pentane/AcOEt 9:1) afin d'obtenir le composé **7a'** (1.26 g, 5.14 mmol, **51%**) sous forme de liquide incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 10.57 (s, 1H, OH), 7.89 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.49 (td, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₄), 7.00 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 1H, H₃), 6.91 (td, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, H₅), 4.63 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₇), 3.66 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, H₈).

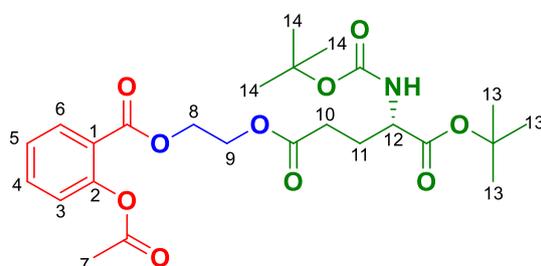
RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.6 (CO), 161.8 (C, C₂), 136.1 (CH, C₄), 130.1 (CH, C₆), 119.4 (CH, C₅), 117.7 (CH, C₃), 111.9 (C, C₁), 64.4 (CH₂, C₇), 28.3 (CH₂, C₈).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV : R_f = 0.91

Procédure 6: Substitution nucléophile des dérivés bromés **7a-c** par l'acide L-glutamique commercial³⁹²

Le carbonate de potassium (2.0-4.0 éq) est additionné à l'acide (4*S*)-5-*tert*-butoxy-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (1.0 éq) en solution dans du DMF (15 mL) anhydre refroidi à 0°C. La solution est maintenue sous agitation 20 minutes à 0°C, puis le dérivé bromé **7a-c** (1.0 éq) est additionné au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite ramené à température ambiante et maintenu sous agitation jusqu'à la conversion totale du dérivé bromé **7a-c** engagé. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans de l'acétate d'éthyle et lavé par une solution saturée de NaCl (4 x 50 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est alors purifié sur colonne de silice (Pentane/CH₂Cl₂ 7 :3 à 0 :1) afin d'obtenir le composé **8a-c**.

Composé 8a: 5-([2-[(2-acétoxybenzoyl)oxy]éthyl]-2*S*-[*tert*-butoxycarbonylamino]-oxopentanoate de *tert*-butyle.



<p>C₂₅H₃₅NO₁₀ M= 509,55 g/mol Huile jaune</p>
--

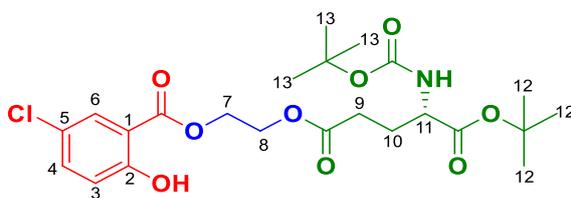
Le composé **8a** (3.36 g, 6.60 mmol, **98%**) a été isolé sous la forme d'une huile jaune en suivant la Procédure 6. Ce dernier a été obtenu en engageant le composé **7a** (1.94 g, 6.75 mmol, 1.0 éq) et l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (2.03 g, 6.75 mmol, 1.0 éq) en présence de K₂CO₃ (1.87g, 13.5 mmol, 2.0 éq), maintenus sous agitation dans du DMF anhydre (15 mL) à température ambiante pendant dix-huit heures.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 8.02 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₆), 7.55 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₄), 7.30 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₅), 7.09 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₃), 5.11 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.45 (m, 2H, H₈ ou H₉), 4.37 (m, 2H, H₈ ou H₉), 4.19 (m, 1H, H₁₂), 2.41 (m, 2H, H₁₀), 2.33 (s, 3H, H₇), 2.16 (m, 1H, H₁₁), 1.87 (m, 1H, H₁₁), 1.43, 1.41 (2 s, 18H, H₁₃ et H₁₄)

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 172.6, 171.3, 169.6, 164.1 (4 CO), 155.4 (C, C₂), 150.8 (CO_{carbamate}), 134.2 (CH, C₄), 131.9 (CH, C₆), 126.1 (CH, C₅), 123.9 (CH, C₃), 122.7 (C, C₁), 82.1, 79.7 (2 C_{tert-butyle}), 62.7, 62.2 (2 CH₂, C₈ et C₉), 53.3 (CH, C₁₂), 30.2 (CH₂, C₁₀), 28.3 (3 CH₃, C₁₃ ou C₁₄), 28.0 (CH₂, C₁₁), 27.9 (3 CH₃, C₁₃ ou C₁₄), 21.0 (CH₃, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: 0.79

Composé 8b' : 5-([2-[(5-chloro-2-hydroxybenzoyl)oxy]éthyl]-2*S*-[*tert*-butoxycarbonylamino]-oxopentanoate de *tert*-butyle.



C₂₃H₃₂ClNO₉
M= 501,96 g/mol
Huile incolore

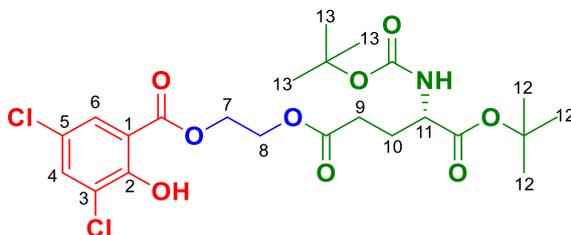
Le composé désacétylé **8b'** (0.20 g, 0.39 mmol, **9%**) a été isolé sous forme d'une huile incolore après seize heures de réaction. Ce composé a été obtenu à partir du composé **7b** (1.37 g, 4.26 mmol, 1.0 éq) et de l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (1.28 g, 4.26 mmol, 1.0 éq).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 10.56 (s, 1H, OH), 7.81 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₆), 7.42 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H₄), 6.95 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H₃), 5.10 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 4.56 (t, ³J = 4.8 Hz, 2H, H₇ ou H₈), 4.47 – 4.41 (m, 2H, H₇ ou H₈), 4.23 (m, 1H, H₁₁), 2.53 – 2.36 (m, 2H, H₉), 2.18 (m, 1H, H₁₀), 1.91 (m, 1H, H₁₀), 1.46, 1.43 (2 s, 18H, H₁₂ et H₁₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 172.7, 171.3, 168.9 (3 CO), 160.3 (C, C₂), 155.4 (CO_{carbamate}), 136.0 (CH, C₄), 129.2 (CH, C₆), 124.0 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 113.0 (C, C₁), 82.3, 79.8 (2 C_{tert-butyle}), 63.5, 61.9 (2 CH₂, C₇ et C₈), 53.2 (CH, C₁₁), 30.1 (CH₂, C₉), 28.3 (CH₃, C₁₂ ou C₁₃), 28.1 (CH₂, C₁₀), 28.0 (CH₃, C₁₂ ou C₁₃).

CCM (Pentane/AcOEt 9:1), révélation UV: R_f = 0.68

Composé 8c': 5-([2-[(3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)oxy]éthyl]-2*S*-[*tert*-butoxycarbonylamino]-oxopentanoate de *tert*-butyle.



$C_{23}H_{31}Cl_2NO_9$ $M = 536,40\text{g/mol}$ Huile incolore
--

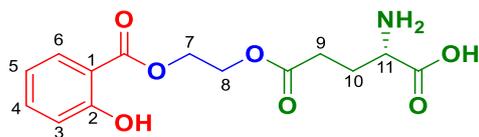
Le composé **8c'** (0.10 g, 0.19 mmol, **14%**) a été isolé sous forme d'une huile incolore après vingt-quatre heures de réaction. Ce composé a été obtenu en engageant le composé **7c** (0.47 g, 1.32 mmol, 1.0 éq) et l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (0.40 g, 1.32 mmol, 1.0 éq).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 11.12 (s, 1H, OH), 7.75 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_6), 7.56 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, H_4), 5.08 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 4.58 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 2H, H_7 ou H_8), 4.51 – 4.34 (m, 2H, H_7 ou H_8), 4.22 (m, 1H, H_{11}), 2.52 – 2.33 (m, 2H, H_9), 2.17 (m, 1H, H_{10}), 1.90 (m, 1H, H_{10}), 1.45, 1.42 (2s, 18H, H_{12} et H_{13}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 101 MHz) δ (ppm): 172.6, 171.2, 168.7 (3 CO), 156.3 (C, C_2), 155.4 ($\text{CO}_{\text{carbamate}}$), 135.7 (CH, C_6), 127.9 (CH, C_4), 123.9, 123.4 (2 C, C_3 et C_5), 113.8 (C, C_1), 82.3, 79.8 (2 $C_{\text{tert-butyle}}$), 64.0, 61.7 (2 CH_2 , C_7 et C_8), 53.2 (CH, C_{11}), 30.1 (CH_2 , C_9), 28.3 (CH_3 , C_{12} ou C_{13}), 28.1 (CH_2 , C_{10}), 28.0 (CH_3 , C_{12} ou C_{13}).

CCM (CH_2Cl_2), révélations UV et ninhydrine: $R_f = 0.63$

Composé 9a: Acide 2*S*-amino-5-(2-((2-hydroxybenzoyl)oxy)éthoxy)-5-oxopentanoïque



C₁₄H₁₇NO₇
M= 311,29 g/mol
Poudre blanche

Le composé **9a** (0.17 g, 0.55 mmol, **79%**) a été obtenu sous la forme après quarante huit heures de réaction. Le produit a été obtenu en engageant le composé **8a** (0.35 g, 0.68 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (5 mL) maintenus sous agitation dans du dichlorométhane anhydre (10 mL).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (ppm) : 10.54 (s, 1H, OH), 8.51 (s, 2H, NH₂), 7.85 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.52 (td, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₄), 6.98 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 6.93 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₅), 4.32 (t, ³J = 4.8 Hz, 2H, H₇ ou H₈), 3.90 (m, 1H, H₁₁), 3.70 (t, ³J = 4.8 Hz, 2H, H₇ ou H₈), 2.47 (m, 1H, H₉), 2.37 (m, 1H, H₉), 2.00 (m, 2H, H₁₀)

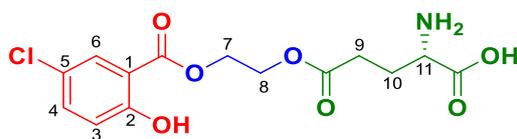
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 126 MHz) δ (ppm) : 172.6, 168.8, 160.6 (3 CO), 154.8 (C, C₂), 136.1 (CH, C₄), 130.7 (CH, C₆), 119.8 (CH, C₅), 117.9 (CH, C₃), 113.7 (C, C₁), 67.4, 59.3 (2 CH₂, C₇ et C₈), 51.9 (CH, C₁₁), 29.6 (CH₂, C₉), 25.1 (CH₂, C₁₀).

HRMS (ESI+) calculée pour C₁₄H₁₈NO₇[M + H]⁺ : 312.1083, **mesurée :** 312.1071.

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.04

Point de fusion: 73 – 76°C.

Composé 9b : Acide 2*S*-amino-5-(2-((5-chloro-2-hydroxybenzoyl)oxy)éthoxy)-5-oxopentanoïque



$C_{14}H_{16}ClNO_7$
M= 345,73 g/mol
Poudre blanche

Le composé **9b** (0.085 g, 0.24 mmol, **63%**) a été obtenu sous forme d'une poudre blanche après une heure de réaction. Ce dernier a été obtenu en engageant le composé **8b'** (0.20 g, 0.39 mmol, 1.0 éq) dans de l'acide trifluoroacétique (4 mL).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 7.86 (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₆), 7.58 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, H₄), 7.04 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H₃), 4.32 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H₇ ou H₈), 4.06 (m, 1H, H₁₁), 3.73 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H₇ ou H₈), 2.42 – 2.32 (m, 1H, H₁₀), 2.18 (m, 2H, H₉), 2.06 – 1.98 (m, 1H, H₁₀).

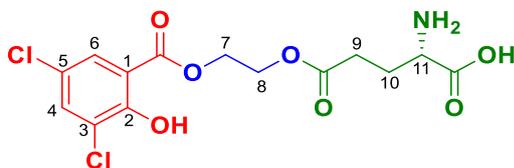
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm): 177.4, 174.9, 167.8 (3 CO), 156.2 (C, C₂), 135.6 (CH, C₄), 129.8 (CH, C₆), 123.2 (C, C₅), 120.0 (CH, C₃), 114.6 (C, C₁), 67.8, 59.2 (2 CH₂, C₇ et C₈), 55.2 (CH, C₁₁), 29.8 (CH₂, C₉), 25.2 (CH₂, C₁₀).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{14}H_{17}ClNO_7 [M+H]^+$: 346.0688, mesurée : 346.0695

CCM (Pentane/AcOEt/AcOH 5:4:2), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.12

Point de fusion : 84 – 87°C.

Composé 9c: Acide 2*S*-amino-5-(2-((3,5-dichloro-2-hydroxybenzoyl)oxy)éthoxy)-5-oxopentanoïque



$C_{14}H_{15}Cl_2NO_7$
 $M = 380,17 \text{ g/mol}$
Poudre blanche

Le composé **9c** (0.068 g, 0.17 mmol, **96%**) après trois heures de réaction. Il a ainsi pu être obtenu en engageant le composé **8c'** (0.10 g, 0.19 mmol, 1.0 éq) dans de l'acide trifluoroacétique (2 mL).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 7.92 (d, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 7.72 (d, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H₄), 4.54 (t, $^3J = 4.4 \text{ Hz}$, 2H, H₇ ou H₈), 4.41 (t, $^3J = 4.4 \text{ Hz}$, 2H, H₇ ou H₈), 3.72 (m, 1H, H₁₁), 2.63 – 2.46 (m, 2H, H₉), 2.08 – 1.92 (m, 2H, H₁₀).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm): 172.4, 171.0, 167.4 (3 CO), 155.0 (C, C₂), 135.4 (CH, C₄), 128.3 (CH, C₆), 123.4, 123.2 (2 C, C₃ et C₅), 116.3 (C, C₁), 64.5, 62.3 (2 CH₂, C₇ et C₈), 52.2 (CH, C₁₁), 29.8 (CH₂, C₉), 25.8 (CH₂, C₁₀).

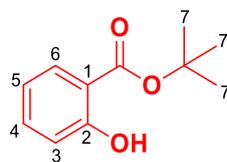
HRMS (ESI⁺) calculée pour $C_{14}H_{16}Cl_2NO_7[M+H]^+$: 380.0304, **mesurée :** 380.0230

CCM (Pentane/AcOEt/AcOH 5:4:2), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.08

Point de fusion : 92 – 94°C.

2.1.3- Synthèse d'un conjugué associant l'AS à l'acide L-glutamique sans espaceur

Composé 10a : 2-hydroxybenzoate de *tert*-butyle^{393,394}



C₁₁H₁₄O₃
M= 194,23 g/mol
Liquide incolore

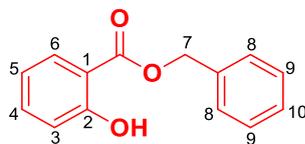
La DMAP (0.45 g, 3.68 mmol, 0.1 éq) est ajoutée à l'acide salicylique (5.08 g, 36.8 mmol, 1.0 éq) en solution dans du *tert*-butanol (80 mL) sous agitation. La solution est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes puis, la DCC (11.38 g, 55.2 mmol, 1.5 éq) en solution dans du THF anhydre (50 mL) est additionnée goutte à goutte sur une période de trente minutes. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation, à température ambiante pendant dix-huit heures. Ce dernier est filtré sur célite puis, le filtrat obtenu est concentré sous pression réduite puis dilué dans de l'eau distillée (30 mL). La phase aqueuse est extraite à AcOEt (3 x 60 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (Na₂SO₄), filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (pentane) afin d'obtenir le composé **10a** (0.57 g, 2.93 mmol, **8%**) sous la forme d'un liquide incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 11.05 (s, 1H, OH), 7.78 (dd, ³J = 6.2 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.42 (m, 1H, H₄), 6.95 (dd, ³J = 6.2 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 6.85 (td, ³J = 6.2 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₅), 1.61 (s, 9H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.8 (CO), 161.7 (C, C₂), 135.2 (CH, C₄), 130.1 (CH, C₆), 118.9 (CH, C₅), 117.5 (CH, C₃), 113.9 (C, C₁), 82.8 (C_{tert-butyle}), 28.2 (3 CH₃, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.94

Composé 10b: 2-Hydroxybenzoate de benzyle^{395,396}



C₁₄H₁₂O₃
M= 228,25 g/mol
Huile incolore

L'hydrogénocarbonate de sodium (2.74 g, 32.6 mmol, 1.5 éq) est additionné à de l'acide salicylique (3.00 g, 21.7 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (20 mL) sous agitation. La solution est maintenue sous agitation pendant quinze minutes à température ambiante. Le bromure de benzyle (5.57 g, 32.6 mmol, 1.5 éq) est ajouté en solution puis, le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant quarante heures. Le milieu est ensuite filtré sur célite puis le filtrat est dilué dans une solution saturée de NaCl (100 mL) avant d'être extrait à Et₂O (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées par une solution de NaCl (3 x 30 mL) avant d'être séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le composé **10b** (3.85 g, 16.9 mmol, **78%**) sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 10.79 (s, 1H, OH), 7.91 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.51–7.38 (m, 6H, H₄ et H₇ à H₉), 7.02 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H₃), 6.90 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₅), 5.24 (2H, s, H₇).

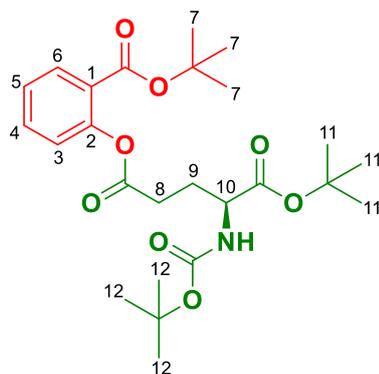
RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 170.0 (CO), 161.8 (C, C₂), 135.8 (CH, C₄), 135.3 (C_{benzyle}), 130.0 (CH, C₆), 128.7 (2 CH, C₈ ou C₉), 128.6 (CH, C₁₀), 128.3 (2 CH, C₈ ou C₉), 119.2 (CH, C₅), 117.6 (CH, C₃), 112.4 (C, C₁) 67.0 (CH₂, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.97

Procédure 7: Estérfication de Steglich entre des composés **10a-b** avec l'acide L-glutamique commercial correspondant³⁸⁶

L'acide 4*S*-5-*tert*-butoxy-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque ou 4*S*-5-benzyloxy-4-[(*tert*-benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (1.0 éq) et la DMAP (0.1 éq) sont additionnés au salicylate **10a** ou **10b** (1.0 éq) en solution dans du dichlorométhane anhydre (35 mL) refroidi à 0°C, sous azote. L'EDCI (2.0 éq) est additionné au milieu réactionnel qui est maintenu à température ambiante toute la nuit puis chauffé à reflux pendant deux heures. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau distillée (3x 40 mL). La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) afin d'obtenir le composé **11a** ou **11b**.

Composé 11a: 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-5-(2-(*tert*-butoxycarbonyl)phényl)-oxopentanoate de 1-*tert*-butyle



$C_{25}H_{37}NO_8$ M= 479,26 g/mol Huile incolore

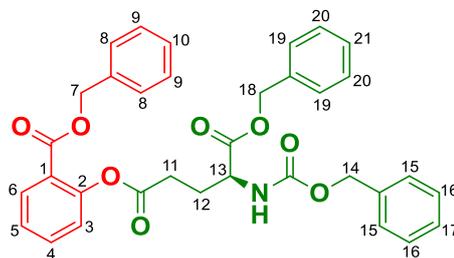
Le composé **11a** (1.33 g, 2.78 mmol, **95%**) a été isolé sous forme d'huile incolore après vingt heures de réaction. Ce dernier a été obtenu en engageant le salicylate **10a** (0.57 g, 2.93 mmol, 1.0 éq) et l'acide 5-*tert*-butoxy-4*S*-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (0.89 g, 2.93 mmol, 1.0 éq).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) : 7.90 (dd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.50 (td ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₄), 7.28 (t, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 7.10 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₅), 5.20 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 4.29 (m, 1H, H₁₀), 2.78 – 2.46 (m, 2H, H₈), 2.31 (m, 1H, H₉), 2.06 (m, 1H, H₉), 1.55, 1.49, 1.45 (3 s, 27H, H₇, H₁₁ et H₁₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 171.5, 171.4, 163.8 (3 CO), 155.5 (CO_{carbamate}), 150.7 (C, C₂), 133.1 (CH, C₄), 131.4 (CH, C₆), 125.8 (CH, C₅), 125.1 (C, C₁), 123.6 (CH, C₃), 82.2, 81.6, 79.8 (3 C_{tert-butyle}), 53.3 (CH, C₁₀), 30.4 (CH₂, C₈), 28.3, 28.2, 28.0 (9 CH₃, C₇, C₁₁ et C₁₂), 27.9 (CH₂, C₉).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.31

Composé 11b : 2*S*-(benzyloxycarbonylamino)-5-(2-(benzyloxycarbonyl)phényl)-oxopentanoate de benzyle



$C_{34}H_{31}NO_8$
 $M = 581,62 \text{ g/mol}$
 Huile incolore

Le composé **11b** (1.00 g, 1.72 mmol, **64%**) a été isolé sous forme d'huile incolore après vingt-quatre heures de réaction. Ce composé a été obtenu en engageant le salicylate **10b** (0.61 g, 2.69 mmol, 1.0 éq) et l'acide 4*S*-5-benzyloxy-4-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5-oxopentanoïque (1.00 g, 2.69 mmol, 1.0 éq).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : 8.04 (dd, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 7.51 (td, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H₄), 7.32 (m, 16H, H₅, H₈ à H₁₀, H₁₅ à H₁₇ et H₁₈ à H₂₀), 7.04 (d, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 5.42 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.23 (s, 2H, H₇ ou H₁₈), 5.17 (s, 2H, H₇ ou H₁₈), 5.11 (d, $^4J = 1.9 \text{ Hz}$, 2H, H₁₄), 4.44 (m, 1H, H₁₃), 2.43 (m, 2H, H₁₁), 2.23 (m, 1H, H₁₂), 2.01 – 1.91 (m, 1H, H₁₂).

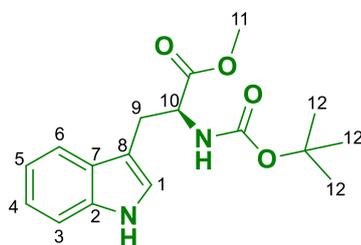
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz) δ (ppm) : 175.0, 171.4, 164.8 (3 CO), 160.2 (C, C₂), 154.7 (CO_{carbamate}), 136.2, 135.8 (2 C_{benzyle}), 134.1 (CH, C₄), 132.0 (C, C_{benzyle}), 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9 (16 CH, C₆, C₈ à C₁₀, C₁₅ à C₁₇ et C₁₉ à C₂₁), 126.2 (CH, C₅), 124.0 (CH, C₃), 123.9 (C, C₁), 67.3, 67.1, 67.0 (3 CH₂, C₇, C₁₄ et C₁₈), 53.1 (CH, C₁₃), 29.1 (CH₂, C₁₁), 27.0 (CH₂, C₁₂).

CCM (CH_2Cl_2) révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.42

2.2- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique au L-tryptophane

2.2.1- Synthèse d'un conjugué présentant un espaceur triazolique

Composé 13 : 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propionate de méthyle^{399,400}



C₁₇H₂₂N₂O₄
M= 318,37 g/mol
Poudre blanche

La triéthylamine (1.22 g, 12.1 mmol, 2.0 éq) est additionnée à du chlorhydrate de L-tryptophanate de méthyle (1.54 g, 6.05 mmol, 1.0 éq) en suspension dans du dichlorométhane anhydre (20 mL) sous agitation. Le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.45 g, 6.64 mmol, 1.1 éq) est additionné au milieu réactionnel qui est maintenu sous agitation, à température ambiante pendant trois heures. Le milieu réactionnel est dilué dans du dichlorométhane (30 mL) avant d'être lavé par une solution de HCl 0,5 M (3 x 50 mL). La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite afin d'obtenir le composé **13** (1.84 g, 5.81 mmol, **96%**) sous forme de poudre blanche.

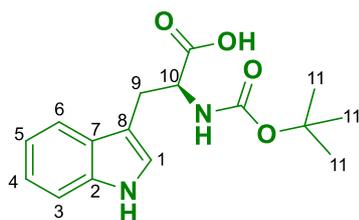
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.19 (s, 1H, NH), 7.58 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.37 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₃), 7.20 (td, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H₄), 7.13 (td ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.02 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H₁), 5.11 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.67 (m, 1H, H₁₀), 3.70 (s, 3H, H₁₁), 3.31 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 2H, H₉), 1.45 (s, 9H, H₁₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm): 172.8 (CO), 155.2 (CO_{carbamate}), 136.2 (C, C₂), 127.5 (C, C₇), 122.7 (CH, C₁), 122.2 (CH, C₄), 119.6 (CH, C₅), 118.8 (CH, C₆), 111.2 (CH, C₃), 110.3 (C, C₈), 79.8 (C_{tert-butyle}), 54.2 (CH, C₁₀) 52.2 (CH₃, C₁₁), 28.3 (3 CH₃, C₁₂), 28.0 (CH₂, C₉).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.19

Point de fusion : 145 – 147°C.

Composé 14 : Acide 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propionique⁴⁰¹



C₁₆H₂₀N₂O₄
M= 304,35 g/mol
Poudre jaunâtre

Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 4M (11.5 mL, 46.0 mmol, 3.0 éq) est additionnée au composé **13** (4.87 g, 15.3 mmol, 1.0 éq), en solution dans du méthanol 60 mL) sous agitation. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant deux heures. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite puis dilué dans de l'eau distillée (50 mL) et acidifié à pH 3-4 par une solution de HCl 0.5 M (40 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le composé **14** (3.68 g, 12.1 mmol, **79%**) sous forme d'une poudre jaunâtre sans purification.

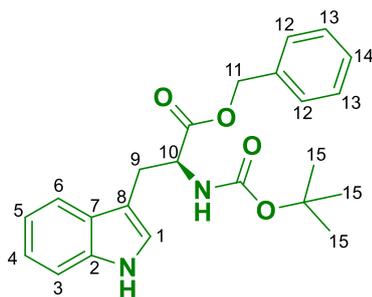
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 12.57 (s, 1H, OH), 10.84 (s, 1H, NH), 7.53 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₆), 7.34 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₃), 7.15 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H₁), 7.07 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₄), 7.02 – 6.97 (m, 2H, H₅ et NH), 4.15 (td, ³J = 9.1 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, H₁₀), 3.14 (dd, ²J = 14.5 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1H, H₉), 2.98 (dd, ²J = 14.6 Hz, ³J = 9.4 Hz, 1H, H₉), 1.33 (s, 9H, H₁₁).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 174.5 (CO), 155.9 (CO_{carbamate}), 136.5 (C, C₂), 127.6 (C, C₇), 124.1 (CH, C₁), 121.4 (CH, C₄), 118.8 (CH, C₅), 118.6 (CH, C₆), 111.8 (CH, C₃), 110.6 (C, C₈), 78.4 (C, C_{tert-butyle}), 55.0 (CH, C₁₀), 28.6 (3 CH₃, C₁₁), 27.2 (CH₂, C₉).

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt 9/1), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.02

Point de fusion : 135 – 138°C. (**litt**: 136 – 139°C)⁴⁴²

Composé 15 : 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propionate de benzyle⁴⁰³



C₂₃H₂₆N₂O₄
M= 394,47 g/mol
Solide jaunâtre

Le carbonate de potassium (4.89 g, 35.4 mmol, 3.0 éq) est additionné au composé **14** (3.59 g, 11.8 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (40 mL) sous agitation. Le bromure de benzyle (2.22 g, 13.0 mmol, 1.1 éq) est additionné au milieu réactionnel qui est maintenu sous agitation à température ambiante, pendant vingt heures. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans de l'éther ditéthylique (80 mL) et lavé par une solution de NaCl saturée (3 x 60 mL). Les phases aqueuses sont rassemblées puis extraites au diéthyléther (3x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le composé brut est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) afin d'obtenir le composé **15** (3.46 g, 8.77 mmol, **75%**) sous forme d'un solide jaunâtre.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 8.11 (s, 1H, NH), 7.58 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.38 – 7.33 (m, 4H, H₁₂ et H₁₃), 7.26 (m, 2H, H₃ et H₁₄), 7.22 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H₄), 7.14 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, H₅), 6.82 (d, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₁), 5.15 – 5.07 (d, ²J = 12.3 Hz, 3H, H₁₁ et NH), 4.73 (m, 1H, H₁₀), 3.32 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H₉), 1.45 (s, 9H, H₁₅).

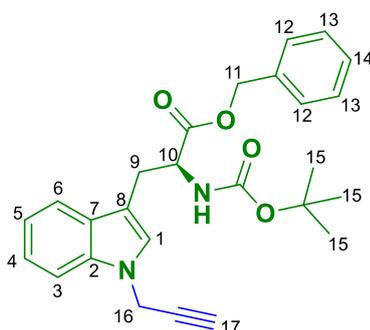
RMN ¹³C (CDCl₃, 126 MHz) δ (ppm) : 172.2 (CO), 155.3 (CO_{carbamate}), 136.1, 135.4 (2C, C₂ et C_{benzyle}), 128.6, 128.5 (4 CH, C₁₂ et C₁₃), 128.4 (CH, C₁₄), 127.7 (C, C₇), 122.9 (CH, C₁), 122.2 (CH, C₄), 119.6 (CH, C₅), 118.8 (CH, C₆), 111.2 (CH, C₃), 110.0 (C, C₈), 79.9 (C, C_{tert-butyle}), 67.1 (CH₂, C₁₁), 54.3 (CH, C₁₀), 28.4 (CH₂, C₉) 28.0 (3 CH₃, C₁₅).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.22

Point de fusion : 142 – 144°C. (litt : 141 – 142°C)⁴⁴³

Composé 16: 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-((2-*propyn-1-yl*)-indol-3-yl)propionate de benzyle⁴⁰⁴⁻

406



$C_{26}H_{28}N_2O_4$
M= 432,52 g/mol
Solide jaune
hygroscopique

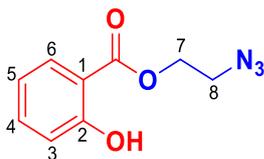
L'hydrure de sodium NaH à 60% massique (0.18 g, 4.56 mmol, 1.2 éq) est additionné au composé **15** (1.50 g, 3.80 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (10 mL) refroidi à 0°C, sous atmosphère d'azote. La solution est maintenue sous agitation pendant 30 minutes à 0°C puis du bromure de propargyle à 80% massique (0.30 mL, 2.26 mmol, 1.1 éq) en solution dans du toluène est additionné goutte à goutte sur une période de dix minutes. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 0°C pendant une heure puis vingt quatre heures à température ambiante. Le milieu est ensuite dilué dans de l'eau distillée (80 mL) puis extrait au diéthyloéther (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) afin d'obtenir le composé **16** (1.32 g, 3.05 mmol, **80%**) sous forme d'un solide jaune hygroscopique.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 7.54 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H₆), 7.40 – 7.31 (m, 4H, H₁₂ et H₁₃), 7.28 – 7.21 (m, 3H, H₃, H₄ et H₁₄), 7.13 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H₅), 6.74 (s, 1H, H₁), 5.15 (d, ²J = 12.2 Hz, 1H, H₁₁), 5.12 – 5.02 (m, 2H, H₁₁ et NH), 4.73 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 2H, H₁₆), 4.71 – 4.63 (m, 1H, H₁₀), 3.28 (d, ³J = 5.3 Hz, 2H, H₉), 2.48 – 2.36 (t, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H₁₇), 1.43 (s, 9H, H₁₅).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 172.1 (CO), 155.2 (CO_{carbamate}), 136.0, 135.4 (2 C, C₂ et C_{benzyle}), 128.8 (C, C₇), 128.6 (4 CH, C₁₂ et C₁₃), 128.4 (CH, C₁₄), 126.0 (CH, C₁), 122.1 (CH, C₄), 119.8 (CH, C₅), 119.2 (CH, C₆), 109.7 (C, C₁₁) 109.4 (CH, C₈), 79.8 (C, C_{tert-butyle}), 77.7 (C, C_{alcyne}), 77.3 (CH, C₁₇), 67.1 (CH₂, C₁₁), 54.3 (CH, C₁₀), 35.7 (CH₂, C₁₆), 28.3 (3 CH₃, C₁₅), 27.9 (CH₂, C₉).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.48

Composé 17: 2-(hydroxy)benzoate de 2-azidooéthyle⁴⁰⁷



C₉H₉N₃O₃
M= 207,19 g/mol
Liquide incolore

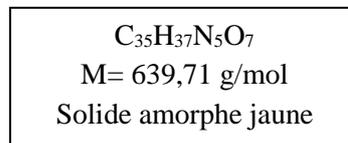
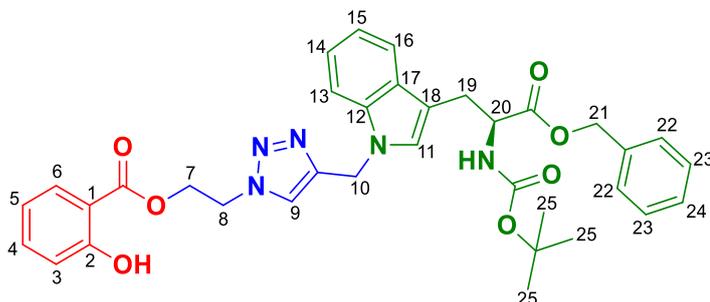
L'azoture de sodium NaN₃ (1.59 g, 24.5 mmol, 5.0 éq) est additionné au composé **7a'** (1.20 g, 4.90 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (25 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant dix huit heures à température ambiante. La solution est diluée dans de l'eau distillée (80 mL) puis extraite au diéther (3 x 20 mL). Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (Pentane/CH₂Cl₂ 1:0 puis 1:1) afin d'obtenir le composé **17** (0.82 g, 3.96 mmol, **81%**) sous forme de liquide incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 10.63 (s, 1H, OH), 7.89 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₆), 7.50 (td, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₄), 7.01 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₅), 6.92 (td, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 4.53 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, H₇), 3.64 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.8 (CO), 161.8 (C, C₂), 136.1 (CH, C₄), 130.0 (CH, C₆), 119.4 (CH, C₅), 117.7 (CH, C₃), 111.9 (C, C₁), 63.8 (CH₂, C₇), 49.8 (CH₂, C₈).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.85

Composé 18: 2-(hydroxy)benzoate de 2-(4-((3-(3-(benzyloxy)-2*S*-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyle⁴⁰⁸



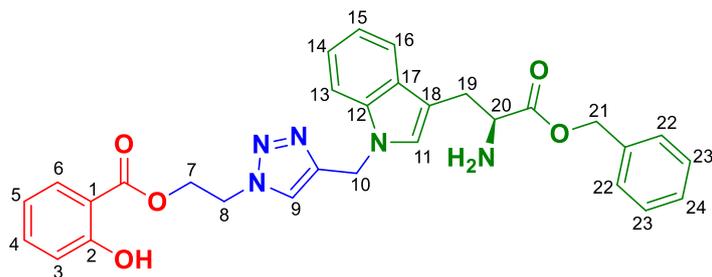
Le composé **18** (1.40 g, 2.19 mmol, **86%**) a été isolé après purification sur colonne de sicile ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 1:0 à 9:1) sous forme d'un solide amorphe jaune en suivant la Procédure 3. Le composé a été obtenu en engageant les composés **16** (1.10 g, 2.54 mmol, 1.0 éq) et **17** (0.53 g, 2.54 mmol, 1.0 éq) en présence d'ascorbate de sodium (0.4 éq) et de sulfate de cuivre pentahydraté (0.2 éq) dans un mélange *tert*-butanol/eau (35:10 mL) chauffé à 50°C pendant trois heures sous atmosphère protectrice.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 10.40 (s, 1H, OH), 7.56 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H₆), 7.53 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₁₆), 7.45 (m, 1H, H₄), 7.30 (m, 3H, H₂₃ et H₂₄), 7.25 – 7.18 (m, 3H, H₁₄ et H₂₂), 7.14 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, H₁₅), 7.09 (m, 1H, H₁₃), 7.05 (s, 1H, H₉), 6.96 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H₃), 6.80 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H₅), 6.61 (s, 1H, H₁₁), 5.29 (s, 2H, H₁₀), 5.05 (m, 3H, H₁₉ et NH), 4.69 – 4.63 (m, ³J = 5.0 Hz, 3H, H₇ et H₂₀), 4.61 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, H₈), 3.23 (qd, ²J = 14.5 Hz, ³J = 5.1 Hz, 2H, H₁₉), 1.40 (s, 9H, H₂₅).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 172.0, 169.4 (2 CO) 161.7 (C, C₂), 155.1 (CO_{carbamate}), 145.6 (C, C_{triazole}), 136.3 (CH, C₄), 136.0, 135.3 (2 C, C₁₂ et C_{benzyle}), 129.7 (CH, C₆), 128.7 (C, C₁₇), 128.6 (4 CH, C₂₂ et C₂₃), 128.5 (CH, C₂₄), 126.5 (CH, C₁₁), 122.2 (CH, C₁₄), 122.1 (CH, C₉), 119.7 (CH, C₁₅), 119.5 (CH, C₅), 119.2 (CH, C₁₆), 117.7 (CH, C₃), 111.5 (C, C₁), 109.9 (C, C₂₀), 109.4 (CH, C₁₃), 79.9 (C, C_{tert-butyle}), 67.0 (CH₂, C₂₁), 62.9 (CH₂, C₇), 54.7 (CH, C₂₀), 49.0 (CH₂, C₈), 42.1 (CH₂, C₁₀), 28.3 (3 CH₃, C₂₅), 28.0 (CH₂, C₁₉).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.43

Composé 19: 2-hydroxybenzoate de 2-(4-((3-(2*S*-amino-3-(benzyloxy)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyle



<p>$C_{30}H_{29}N_5O_5$ $M = 539,59 \text{ g/mol}$ Solide jaune hygroscopique</p>
--

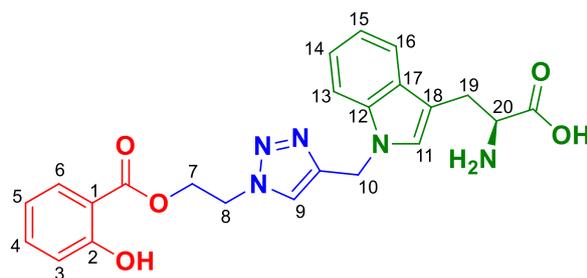
Le composé **19** (0.30 g, 0.55 mmol, **88%**) a été obtenu sous la forme d'un solide jaune hygroscopique en suivant la Procédure 4. Ce composé a été obtenu en engageant le composé **18** (0.40 g, 0.62 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (2 mL) dans du dichlorométhane anhydre (5 mL), maintenu sous agitation pendant deux heures.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 10.34 (s, 1H, OH), 8.49 (s, 2H, NH_2), 8.14 (s, 1H, H_9), 7.60 (dd, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 7.56 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_{16}), 7.54 – 7.47 (m, 2H, H_4 et H_{13}), 7.35 – 7.28 (m, 3H, H_{23} et H_{24}), 7.23 (s, 1H, H_{11}), 7.15 (dd, $^3J = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J = 2.9 \text{ Hz}$, 2H, H_{22}), 7.10 (td, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, $^4J = 1.0 \text{ Hz}$, 1H, H_{15}), 7.03 (td, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 0.9 \text{ Hz}$, 1H, H_{14}), 6.98 (dd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J = 0.6 \text{ Hz}$, 1H, H_3), 6.89 (td, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, H_5), 5.39 (d, $^2J = 15.6 \text{ Hz}$, 2H, H_{10}), 5.13 (d, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, 1H, H_{21}), 5.02 (d, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, 1H, H_{21}), 4.72 (t, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, 2H, H_7), 4.60 (t, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, 2H, H_8), 4.35 (m, 1H, H_{20}), 3.23 (m, 2H, H_{19}).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 169.8, 168.4 (2 CO), 160.4 (C, C_2), 143.9 (C, C_{triazole}), 136.4 (C, C_{12} ou C_{benzyle}), 136.3 (CH, C_4), 135.3 (C, C_{12} ou C_{benzyle}), 130.5 (CH, C_6), 128.9 (2 CH, C_{23}), 128.8 (CH, C_{11}), 128.7 (2 CH, C_{22}), 128.6 (CH, C_{24}), 127.9 (C, C_{17}), 124.3 (CH, C_9), 121.9 (CH, C_{15}), 119.8 (CH, C_5), 119.5 (CH, C_{14}), 118.8 (CH, C_{13}), 117.9 (CH, C_3), 113.2 (C, C_1), 110.7 (CH, C_{16}), 106.9 (C, C_{18}), 67.6 (CH_2 , C_{21}), 63.9 (CH_2 , C_7), 53.2 (CH, C_{20}), 48.8 (CH_2 , C_8), 41.2 (CH_2 , C_{10}), 26.7 (CH_2 , C_{19}).

CCM (CH_2Cl_2 /AcOEt 4:1), révélations UV et ninhydrine : $R_f = 0.18$

Composé 20: 1-((1-(2-((2-hydroxybenzoyl)oxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)-L-tryptophane



$C_{23}H_{23}N_5O_5$
M= 449,47 g/mol
Solide beige

Le palladium sur charbon à 5% massique (0.015 g) est additionné au composé **19** (0.20 g, 0.37 mmol, 1.0 éq) en solution dans du méthanol anhydre (10 mL) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé sous atmosphère d'hydrogène et le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant cinq heures. Le milieu est ensuite filtré sur célite puis, le filtrat est concentré sous pression réduite afin d'obtenir le composé **20** (0.14 g, 0.31 mmol, **84%**) sous la forme d'un solide beige.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 8.16 (s, 1H, H₉), 7.61 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H₆), 7.57 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H₁₆), 7.51 (m, 2H, H₄ et H₁₃), 7.32 (s, 1H, H₁₁), 7.08 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H₁₅), 7.02 (t, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, H₃ et H₁₄), 6.89 (td, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₅), 5.41 (s, 2H, H₁₀), 4.75 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H₇), 4.62 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H₈), 4.01 (m, 1H, H₂₀), 3.20 (m, 2H, H₁₉).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.3, 168.3 (2 CO), 160.4 (C, C₂), 144.1 (C, C_{triazole}), 136.3 (C, C₁₂), 136.1 (CH, C₄), 130.6 (CH, C₆), 128.6 (CH, C₁₁), 128.1 (C, C₁₇), 124.4 (CH, C₉), 121.8 (CH, C₁₅), 119.7 (CH, C₅), 119.4 (CH, C₁₄), 119.1 (CH, C₁₆), 117.9 (CH, C₃), 113.5 (C, C₁), 110.5 (CH, C₁₃), 107.8 (C, C₁₈), 63.9 (CH₂, C₇), 53.4 (CH, C₂₀), 48.9 (CH₂, C₈), 41.3 (CH₂, C₁₀), 26.6 (CH₂, C₁₉).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{23}H_{23}N_5O_5Na$ [M+Na] $^+$: 472.1596, **mesurée :** 472.1580.

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.03

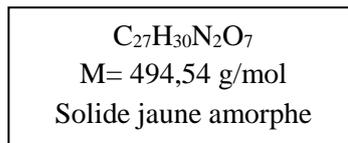
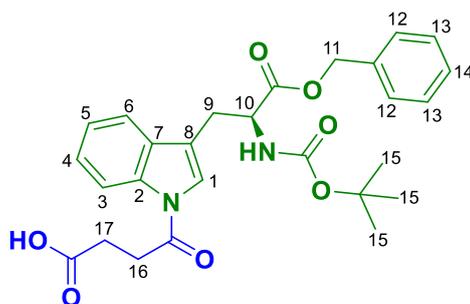
Point de fusion: 176 – 178°C.

2.2.2- Synthèse de deux conjugués associant l'AS au L-tryptophane par des espaceurs 1,4 et 1,5-dicarbonylés

Procédure 8: Ouverture des anhydrides succinique^{409,411} (n=1) et glutarique⁴¹⁰ (n=2).

La DMAP (0.08 éq) et la triéthylamine (2.4 éq) sont successivement additionnées au composé **15** (1.0 éq) en solution dans du dichlorométhane anhydre sous agitation. De l'anhydride succinique ou glutarique (1.0 éq) est additionné au milieu réactionnel qui est porté à reflux jusqu'à la conversion complète du composé **15**. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite et dilué dans de l'acétate d'éthyle avant d'être lavé trois fois par une solution de HCl 0.5 M. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite avant d'être purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂ puis AcOEt) afin d'obtenir les composé **20a** (n=1) et **20b** (n= 2).

Composé 21a : Acide 4-(3-(3-(benzyloxy)-2*S*-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)-4-oxobutanoïque



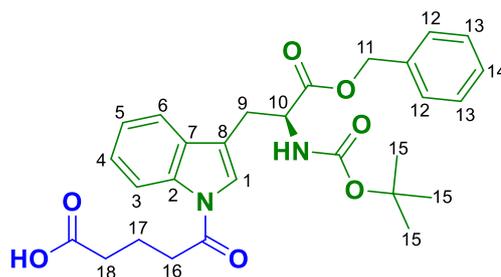
Le composé **21a** (3.62 g, 7.32 mmol, **95%**) a été isolé sous la forme d'un solide jaune après quatre heures de réaction. Il a été obtenu en engageant le composé **15** (3.03 g, 7.67 mmol, 1.0 éq) et l'anhydride succinique (0.77 g, 7.67 mmol, 1.0 éq).

RMN ¹H (Acétone-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 10.76 (se, 1H, OH), 8.42 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₆), 7.69 (s, 1H, H₁), 7.65 (dd, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 7.49 – 7.22 (m, 7H, H₄, H₅ et H₁₂ à H₁₄), 6.42 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.16 (d, ⁴J = 1.7 Hz, 2H, H₁₁), 4.66 (dd, ³J = 14.0 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₁₀), 3.26 (m, 4H, H₉ et H₁₆ ou H₁₇), 2.81 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, H₁₆ ou H₁₇), 1.38 (s, 9H, H₁₅).

RMN ¹³C (Acétone-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 172.8, 171.7, 170.2 (3 CO), 155.4 (CO_{carbamate}), 136.1, 136.0 (2 C, C₂ et C_{benzyle}), 130.5 (C, C₇), 128.4 (2 CH, C₁₂ ou C₁₃), 128.0 (CH, C₁₄), 127.9 (2 CH, C₁₂ ou C₁₃), 124.8 (CH, C₅), 123.6 (CH, C₁), 123.3 (CH, C₄), 118.9 (CH, C₃), 117.5 (C, C₈), 116.3 (CH, C₆), 78.6 (C_{tert-butyle}), 66.3 (CH₂, C₁₁), 53.9 (CH, C₁₀), 30.4 (CH₂, C₉), 27.7 (CH₂, C₁₆ ou C₁₇), 27.6 (3 CH₃, C₁₅), 27.2 (CH₂, C₁₆ ou C₁₇).

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.18

Composé 21b : Acide 5-(3-(3-(benzyloxy)-2*S*-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)-5-oxopentanoïque



$C_{28}H_{32}N_2O_7$
 $M = 508,57 \text{ g/mol}$
 Solide marron amorphe

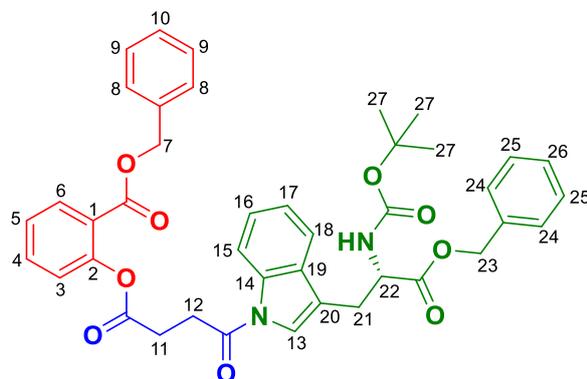
Le composé **21b** (0.30 g, 0.59 mmol, **66%**) a été isolé sous la forme d'un solide marron amorphe après vingt quatre heures de réaction. Le dérivé a été obtenu en engageant le composé **15** (0.35 g, 0.89 mmol, 1.0 éq) et l'anhydride glutarique (0.10 g, 0.89 mmol, 1.0 éq).

RMN 1H (Acétone- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 8.45 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 7.62 (m, 2H, H₁ et H₃), 7.43 – 7.23 (m, 7H, H₄, H₅ et H₁₂ à H₁₄), 6.43 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.15 (d, $^4J = 3.7 \text{ Hz}$, 2H, H₁₁), 4.65 (m, 1H, H₁₀), 3.26 (dd, $^2J = 14.8 \text{ Hz}$, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H₉), 3.03 (t, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H₁₆ ou H₁₈), 2.51 (t, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H₁₆ ou H₁₈), 2.40 (t, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H₁₇), 1.38 (s, 9H, H₁₅).

RMN ^{13}C (Acétone- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 173.6, 173.5, 171.8 (3 CO), 155.4 (CO_{carbamate}), 136.1, 135.9 (2 C, C₂ et C_{benzyle}), 135.0 (C, C₇), 128.4 (2 CH, C₁₂ ou C₁₃), 128.0 (CH, C₁₄), 127.9 (2 CH, C₁₂ ou C₁₃), 124.8 (CH, C₄), 123.8 (CH, C₁), 123.2 (CH, C₅), 118.9 (CH, C₃), 117.3 (C, C₈), 116.4 (CH, C₆), 78.7 (C, C_{tert-butyle}), 66.3 (CH₂, C₁₁), 53.9 (CH, C₁₀), 34.3 (CH₂, C₁₆ ou C₁₈), 32.4 (CH₂, C₁₇), 32.3 (CH₂, C₁₆ ou C₁₈), 27.7 (3 CH₃, C₁₅), 27.2 (CH₂, C₉).

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt 9/1), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.26

Composé 22a : 2-((4-(3-(3-(benzyloxy)-2S-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)-4-oxobutanoyl)oxy) benzoate de benzyle³⁸⁶



C₄₁H₄₀N₂O₉
M= 704,78 g/mol
Solide jaune

Le composé **22a** (3.62 g, 5.14 mmol, **79%**) a été isolé sous la forme d'un solide jaune après purification sur gel de silice (CH₂Cl₂) en suivant la Procédure 5. Ce dernier a été obtenu en engageant les composés **10a** (1.49 g, 6.52 mmol, 1.0 éq) et **21a** (1.25 g, 6.52 mmol, 1.0 éq) maintenus sous agitation dans du dichlorométhane anhydre (50 mL) pendant dix-sept heures.

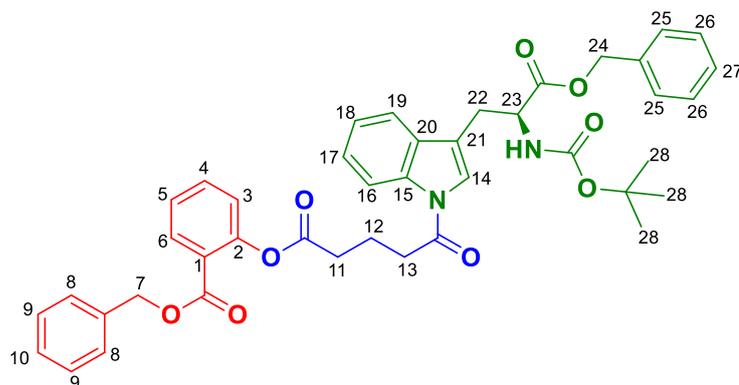
RMN ¹H (Acétone-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 8.45 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₁₅), 8.06 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6Hz, 1H, H₆), 7.75 – 7.58 (m, 3H, H₄, H₁₆ et H₁₈), 7.52 (m, 2H, H₈ ou H₉), 7.45 – 7.38 (m, 4H, H₅, H₁₀, H₁₃ et H₂₆), 7.36 – 7.28 (m, 7H, H₈ ou H₉, H₁₇, H₂₄ et H₂₅), 7.25 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₃), 6.44 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.36 (s, 2H, H₇ ou H₂₃), 5.16 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, H₇ ou H₂₃), 4.68 (m, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₂₂), 3.39 – 3.25 (m, 2H, H₂₁), 3.20 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, H₁₁ ou H₁₂), 2.91 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, H₁₁ ou H₁₂), 1.38 (s, 9H, H₂₇).

RMN ¹³C (Acétone-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 171.8, 170.7, 169.8, 164.2 (4 CO), 155.4 (CO_{carbamate}), 150.7 (C, C₂), 136.2, 136.1, 135.9 (3C, 2 C_{benzyle} et C₁₄), 134.0 (CH, C₄), 131.6 (CH, C₆), 130.6 (C, C₁₉), 128.6, 128.5, 128.4, 128.3 (8 CH, C₈, C₉, C₂₄ et C₂₅), 128.0, 127.9 (2 CH, C₁₀ et C₂₆), 126.1 (CH, C₅), 124.9 (CH, C₁₃), 124.1 (CH, C₃), 123.7 (C, C₁), 123.6 (CH, C₁₆), 123.4 (CH, C₁₇), 119.0 (CH, C₁₈), 117.7 (C, C₂₀), 116.3 (CH, C₁₅), 78.7 (C_{tert-butyle}), 66.7, 66.4 (2 CH₂, C₇ et C₂₃), 53.9 (CH, C₂₂), 30.2, 28.3 (2 CH₂, C₁₁ et C₁₂), 27.7 (3 CH₃, C₂₇), 27.2 (CH₂, C₂₁).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.58

Point de fusion : 208 – 210°C.

Composé 22b : 2-(5-(3-(3-(benzyloxy)-2*S*-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopropyl)-1*H*-indol-1-yl)-5-oxopentanoyloxy)benzoate de benzyle



$C_{42}H_{42}N_2O_9$
 $M = 718,80 \text{ g/mol}$
 Solide jaune

Le composé **22b** (0.32 g, 0.44 mmol, **65%**) a été isolé sous forme de solide jaune après purification (CH_2Cl_2) en suivant la Procédure 5. Ce dernier a été obtenu en engageant les composés **10a** (0.16 g, 0.69 mmol, 1.0 éq) et **21b** (0.35 g, 0.69 mmol, 1.0 éq) dans du dichlorométhane anhydre (10 mL), maintenu sous agitation à température ambiante pendant six heures.

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm) : 8.48 (d, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{16}), 8.08 (dd, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 7.58 (td, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 7.53 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H, H_{19}), 7.39 (m, 5H, H_8 ou H_9 , H_{17} et H_{25} ou H_{26}), 7.36 – 7.29 (m, 6H, H_5 , H_{14} , H_8 ou H_9 et H_{25} ou H_{26}), 7.21 (m, 3H, H_{10} , H_{18} et H_{27}), 7.13 (d, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H_3), 5.25 (s, 2H, H_7 ou H_{24}), 5.17 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.11 (dd, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, 2H, H_7 ou H_{24}), 4.76 (m, 1H, H_{23}), 3.23 (dd, $^2J = 14.8 \text{ Hz}$, $^3J = 5.8 \text{ Hz}$, 2H, H_{22}), 2.85 (t, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H_{11} ou H_{13}), 2.66 (t, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H_{11} ou H_{13}), 2.14 (m, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H_{12}), 1.44 (s, 9H, H_{28}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz) δ (ppm) : 171.8, 171.7, 170.5, 164.3 (4 CO), 155.1 ($CO_{\text{carbamate}}$), 150.7 (C, C_2), 135.8, 135.6, 135.1 (3 C, 2 C_{benzyle} et C_{15}), 134.0 (CH, C_4), 132.0 (CH, C_6), 130.5 (C, C_{20}), 128.7, 128.6 (4 CH, C_8 ou C_9 et C_{25} ou C_{26}), 128.5 (CH, C_{10} ou C_{27}), 128.4 (4 CH, C_8 ou C_9 et C_{25} ou C_{26}), 128.2 (CH, C_{10} ou C_{27}), 126.1 (CH, C_5), 125.5 (CH, C_{14}), 123.9 (CH, C_3), 123.6 (CH, C_{17}), 123.1 (C, C_1), 122.8 (CH, C_{18}), 118.9 (CH, C_{19}), 117.0 (C, C_{21}), 116.7 (CH, C_{16}), 80.1 (C, $C_{\text{tert-butyle}}$), 67.2, 66.9 (2 CH_2 , C_7 et C_{24}), 53.6 (CH, C_{23}), 34.4, 32.7 (2 CH_2 , C_{11} et C_{13}), 28.3 (3 CH_3 , C_{28}), 28.1, 19.2 (2 CH_2 , C_{12} et C_{22}).

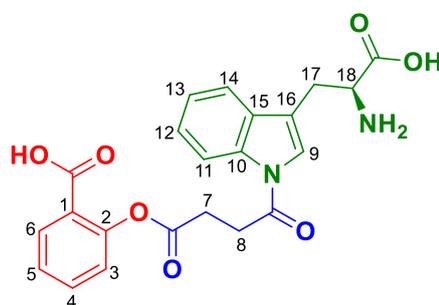
CCM (CH_2Cl_2), révélations UV et ninhydrine : $R_f = 0.63$

Point de fusion : 226 – 229°C.

Procédure 9: Déprotection des fonctions aminoacides des composés 22a-b en une étape

Le composé **22a** (0.51 g, 0.72 mmol, 1.0 éq) ou **22b** (0.25 g, 0.35 mmol, 1.0 éq) est additionné au palladium sur charbon à 5% massique (catalytique) en suspension dans du méthanol anhydre (10 mL) sous agitation. Le milieu réactionnel est purgé sous atmosphère d'hydrogène et maintenu sous agitation pendant trois (**22b**) à six (**22a**) heures. Le milieu réactionnel est filtré sur célite et concentré sous pression réduite puis dissout dans de l'acide trifluoroacétique (3 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant une ou deux heures à température ambiante avant d'être concentré sous pression réduite afin d'obtenir le composé **24a** (0.19 g, 0.45 mmol, **63%** en deux étapes) ou **24b** (0.12 g, 0.27 mmol, **78%** en deux étapes) sous forme de solides respectivement vert et beige.

Composé 24a : Acide 2-((4-(1-*L*-tryptophano)-4-oxobutanoyl)oxy)benzoïque



$C_{22}H_{20}N_2O_7$ $M = 424,41 \text{ g/mol}$ Solide vert

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 8.37 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H₁₁), 7.95 (d, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 7.83 (s, 1H, H₉), 7.66 (m, 2H, H₄ et H₁₄), 7.39 – 7.33 (m, 2H, H₅ et H₁₃), 7.31 (t, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 7.22 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H₁₂), 4.17 (m, 1H, H₁₈), 3.39 (m, 2H, H₁₇), 3.30 – 3.21 (t, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H₇), 3.03 (t, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H₈).

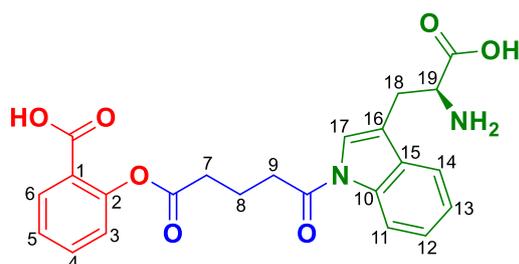
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.6, 171.0, 166.2, 161.8 (4 CO), 150.5 (C, C₂), 134.9 (C, C₁₀), 134.4 (CH, C₄), 131.9 (CH, C₆), 130.7 (C, C₁₅), 126.8 (CH, C₁₃), 125.7 (CH, C₉), 125.5 (C, C₁), 125.6 (CH, C₅), 124.2 (CH, C₃), 124.0 (CH, C₁₂), 119.5 (CH, C₁₄), 117.1 (C, C₁₆), 116.4 (CH, C₁₁), 52.6 (CH, C₁₈), 30.6 (CH₂, C₇), 28.8 (CH₂, C₁₇), 26.1 (CH₂, C₈).

HRMS (ESI⁺) calculée pour $C_{22}H_{21}N_2O_7$ [M+H]⁺ : 425.1343, **mesurée :** 425.1359

CCM (AcOEt/CH₃OH 9:1), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.02

Point de fusion : 172 – 174°C.

Composé 24b : Acide 2-((5-(1-*L*-tryptophano)-5-oxopentanoyl)oxy)benzoïque



$C_{23}H_{22}N_2O_7$
M= 438,44 g/mol
Solide beige

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 8.38 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₁), 7.97 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H₆), 7.83 (s, 1H, H₁₇), 7.69 – 7.59 (m, 2H, H₄ et H₁₄), 7.37 (m, 2H, H₁₂ et H₁₃), 7.33 – 7.28 (t, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, H₅), 7.20 (dd, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₃), 4.05 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, H₁₉), 3.25 (m, 2H, H₁₈), 3.18 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, H₇), 2.74 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, H₉), 2.08 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, H₈).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 172.0, 171.9, 171.0, 166.3 (4 CO), 150.7 (C, C₂), 135.6 (C, C₁₀), 133.8 (CH, C₄), 131.9 (CH, C₆), 130.7 (C, C₁₅), 126.5 (CH, C₁₃), 125.9 (CH, C₁₇), 125.4 (C, C₁), 125.3 (CH, C₅), 124.1 (CH, C₃), 123.7 (CH, C₁₂), 119.4 (CH, C₁₄), 116.4 (CH, C₁₁), 115.2 (C, C₁₆), 53.0 (CH, C₁₉), 34.4 (CH₂, C₇), 33.1 (CH₂, C₉), 25.9 (CH₂, C₁₈), 19.5 (CH₂, C₈).

HRMS (ESI⁺) calculée pour $C_{23}H_{23}N_2O_7$ [M+H]⁺ : 439.1500, **mesurée** : 439.1506.

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.02

Point de fusion : 190 – 192°C.

2.3- Synthèse de conjugués associant l'AS à des acides aminés sans espaceur

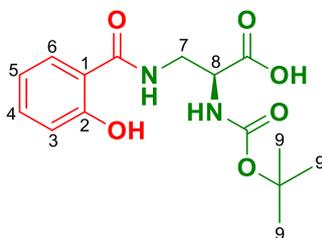
2.3.1- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique à des acides diaminocarboxyliques

Procédure 10 : Condensation entre le chlorure d'acide d'aspirine et les acides diaminocarboxyliques commerciaux^{412,413}.

Du DMF anhydre (0.1 mL) est additionné à de l'aspirine (1.0 éq) en suspension dans du dichlorométhane anhydre. Du chlorure de thionyle (5.0 éq) est additionné à la suspension et le milieu réactionnel est porté à reflux jusqu'à la fin du dégagement gazeux observé en sortie de réfrigérant. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis solubilisé dans du THF anhydre. L'acide N- α -Boc-diaminocarboxylique (1.0 éq) est additionné à de l'hydroxyde de sodium (4.0-5.0 éq) en solution aqueuse. La solution contenant le chlorure d'acide [25] est additionnée goutte à goutte à la solution aqueuse. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante jusqu'à la conversion complète des deux réactifs. Le milieu réactionnel est acidifié (pH 3) par une solution de HCl 1M puis extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées

et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de silice (Pentane/AcOEt 4:1) afin d'obtenir le composé **25a-c**.

Composé 25a : Acide 2*S*-((*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(2-hydroxybenzamido)propionique



$C_{15}H_{20}N_2O_6$ M= 324,33 g/mol Huile jaune
--

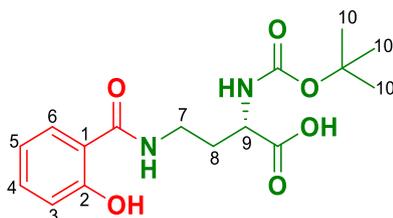
Le composé **25a** (1.14 g, 3.50 mmol, **65%**) a été isolé sous la forme d'une huile jaune. Le produit a été obtenu en engageant le chlorure d'acide de l'aspirine (1.0 éq) et l'acide 2*S*-((*tert*-butoxycarbonylamino)-3-aminopropionique (1.10 g, 5.39 mmol, 1.0 éq) en présence d'hydroxyde de sodium (4.0 éq) dans un mélange THF/H₂O (10:35 mL), maintenu sous agitation à température ambiante pendant deux heures.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 14.10 (se, 1H, OH), 12.47 (s, 1H, OH), 8.65 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.87 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.45 (td, ³J = 8.2 Hz, 1H, H₄), 7.16 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H₆), 6.97 (m, 2H, H₃ et H₅), 3.89 (m, 1H, H₈), 3.46 (dd, ²J = 12.0 Hz, ³J = 5.3 Hz, 2H, H₇), 1.38 (s, 9H, H₉).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 172.2, 169.5 (2 CO), 160.4 (C, C₂), 156.3 (CO_{carbamate}), 133.8 (CH, C₄), 128.4 (CH, C₆), 118.6 (CH, C₅), 117.4 (CH, C₃), 115.3 (C, C₁), 78.8 (C_{tert-butyle}), 52.4 (CH, C₈), 37.4 (CH₂, C₇), 28.9 (3 CH₃, C₉).

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.24

Composé 25b : Acide 2*S*-((*tert*-butoxycarbonylamino)-4-(2-hydroxybenzamido)butyrique



$C_{16}H_{22}N_2O_6$
M= 338,36 g/mol
Huile orange

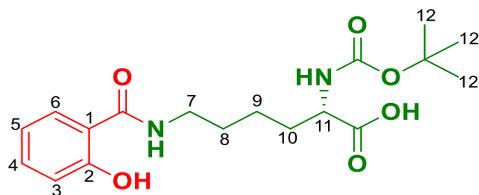
Le composé **25b** (0.52 g, 3.50 mmol, **68%**) a été isolé sous la forme d'une huile orange en suivant la Procédure 10. Le produit a été obtenu en engageant le chlorure d'acide de l'aspirine (1.0 éq) et l'acide 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-aminobutyrique (0.50 g, 2.27 mmol, 1.0 éq) en présence d'hydroxyde de sodium (4.0 éq) dans un mélange THF/H₂O (10:35 mL), maintenu sous agitation à température ambiante pendant deux heures.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 12.59 (s, 2H, 2 OH), 8.80 (t, ³J = 5.0 Hz, 1H, NH), 7.84 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, NH), 7.50 – 7.30 (td, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₄), 7.16 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H₆), 6.88 (m, 2H, H₃ et H₅), 3.98 (m, 1H, H₉), 3.36 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 6.4 Hz, 2H, H₇), 2.02 (m, 1H, H₈), 1.80 (m, 1H, H₈), 1.38 (s, 9H, H₁₀).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 174.3, 169.5 (2 CO), 160.6 (C, C₂), 156.0 (CO_{carbamate}), 134.1 (CH, C₄), 128.1 (CH, C₆), 118.9 (CH, C₅), 117.8 (CH, C₃), 115.6 (C, C₁), 78.5 (C_{tert-butyle}), 51.8 (CH, C₉), 36.6 (CH₂, C₇), 30.8 (CH₂, C₈), 28.7 (3 CH₃, C₁₀).

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.32

Composé 25c : Acide 2*S*-((*tert*-butoxycarbonylamino)-6-(2-hydroxybenzamido)hexanoïque



$C_{18}H_{26}N_2O_6$
M= 366,41 g/mol
Huile orange

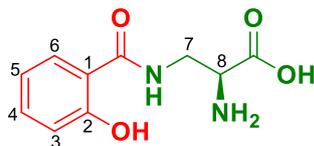
Le composé **25c** (1.82 g, 4.58 mmol, **55%**) a été isolé sous la forme d'une huile orange en suivant la Procédure 10. Le produit a été obtenu en engageant le chlorure d'acide de l'aspirine (1.0 éq) et l'acide 2*S*-((*tert*-butoxycarbonylamino)-6-amino)hexanoïque (2.23 g, 9.05 mmol, 1.0 éq) en présence d'hydroxyde de sodium (5.0 éq) dans un mélange THF/H₂O (15:50 mL), maintenu sous agitation à température ambiante pendant dix-neuf heures.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 12.74 (s, 1H, OH), 12.43 (se, 1H, OH), 8.82 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.86 – 7.81 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.40 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 7.06 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.94 – 6.84 (m, 2H, H₃ et H₅), 3.85 (m, 1H, H₁₁), 3.28 (m, 2H, H₇), 1.79 – 1.50 (m, 4H, H₈ et H₁₀), 1.37 (m, 11H, H₉ et H₁₂).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 174.7, 169.5 (2 CO), 160.8 (C, C₂), 156.1 (CO_{carbamate}), 134.1 (CH, C₄), 127.9 (CH, C₆), 118.1 (CH, C₅), 117.9 (CH, C₃), 115.5 (C, C₁), 78.4 (C_{tert-butyle}), 53.8 (CH, C₁₁), 39.2 (CH₂, C₇), 30.9, 28.9 (2 CH₂, C₈ et C₁₀), 28.7 (3 CH₃, C₁₂), 23.6 (CH₂, C₉).

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine : R_f = 0.29

Composé 26a : Acide 2*S*-amino-3-(2-hydroxybenzamido)propionique



$C_{10}H_{12}N_2O_4$
M= 224,22 g/mol
Solide beige

Le composé **26a** (0.17 g, 0.77 mmol, **77%**) a été obtenu sous la forme d'un solide beige en suivant la Procédure 4. Le produit **26a** a été obtenu en engageant le composé **25a** (0.34g, 1.00 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (2 mL) en solution dans de l'acétone (10 mL), maintenue sous agitation à température ambiante pendant deux heures.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 9.21 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H₆), 7.39 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H₄), 6.97 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H₃), 6.88 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H₅), 3.79 (m, 2H, H₇ et H₈), 3.69 (m, 1H, H₇).

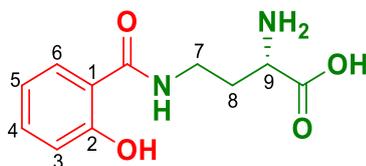
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 169.6, 169.4 (2 CO), 160.0 (C, C₂), 134.0 (CH, C₆), 129.0 (CH, C₄), 119.0 (CH, C₅), 117.8 (CH, C₃), 116.3 (C, C₁), 53.5 (CH, C₈), 40.3 (CH₂, C₇).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{10}H_{13}N_2O_4[M+H]^+$: 225.0870, **mesurée**: 225.0873

CCM (AcOEt), révélationsUV et ninhydrine: R_f = 0.03

Point de fusion: 92 – 94°C.

Composé 26b : Acide 2*S*-amino-4-(2-hydroxybenzamido)butyrique



$C_{11}H_{14}N_2O_4$
M= 238,24 g/mol
Solide beige

Le composé **26b** (0.28 g, 1.17 mmol, **76%**) a été obtenu sous la forme d'un solide beige en suivant la Procédure 4. Le produit **26b** a été obtenu en engageant le composé **25b** (0.52 g, 1.54 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (3 mL) en solution dans de l'acétone (10 mL), maintenue sous agitation à température ambiante pendant cinq heures.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 14.10 (se, 1H, OH), 12.41 (s, 1H, OH), 8.95 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 8.34 (s, 2H, NH_2), 7.82 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1H, H_6), 7.40 (td, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H_4), 6.94 – 6.87 (m, 2H, H_3 et H_5), 4.08 – 3.88 (m, 1H, H_9), 3.53 – 3.40 (m, 2H, H_7), 2.11 – 2.01 (m, 2H, H_8).

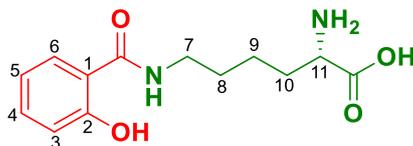
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 171.4, 169.5 (2 CO), 160.65 (C, C_2), 134.0 (CH, C_4), 128.3 (CH, C_6), 118.9, 117.8 (2 CH, C_3 et C_5), 115.7 (C, C_1), 52.7 (CH, C_9), 37.1 (CH_2 , C_7), 30.7 (CH_2 , C_8).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{11}H_{15}N_2O_4[M+H]^+$: 239.1026, mesurée: 239.1027

CCM (AcOEt), révélations UV et ninhydrine: $R_f = 0.02$

Point de fusion : 108 – 110°C.

Composé 26c : Acide 2*S*-amino-6-(2-hydroxybenzamido)hexanoïque



$C_{13}H_{18}N_2O_4$
M= 266,30 g/mol
Solide beige

Le composé **26c** (0.46 g, 1.69 mmol, **78%**) a été obtenu sous la forme d'un solide beige en suivant la Procédure 4. Le produit **26c** a été obtenu en engageant le composé **25c** (0.81 g, 2.20 mmol, 1.0 éq) en présence d'acide trifluoroacétique (5 mL) en solution dans de l'acétone (20 mL), maintenue sous agitation à température ambiante pendant vingt-quatre heures.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 8.92 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 7.87 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, H₆), 7.38 (td, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, H₄), 7.01 – 6.76 (m, 2H, H₃ et H₅), 3.59 – 3.40 (m, 1H, H₁₁), 3.34 – 3.19 (m, 2H, H₇), 1.89 – 1.65 (m, 2H, H₁₀), 1.62 – 1.51 (m, 2H, H₈), 1.49 – 1.29 (m, 2H, H₉).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 171.4, 169.3 (2 CO), 160.6 (C, C₂), 134.0 (CH, C₄), 128.2 (CH, C₆), 118.9, 117.8 0 (2 CH, C₃ et C₅), 115.7 0 (C, C₁), 53.8 0 (CH, C₁₁), 39.2 (CH₂, C₇), 30.8 (CH₂, C₁₀), 29.0 (CH₂, C₈), 22.7 (CH₂, C₉).

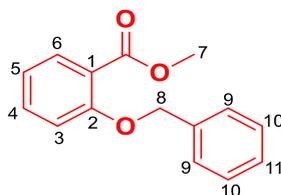
HRMS (ESI+) calculée pour $C_{13}H_{19}N_2O_4[M+H]^+$: 237.1339, **mesurée**: 237.1347

CCM (AcOEt), révélationsUV et ninhydrine: R_f = 0.04

Point de fusion : 145 – 147°C.

2.3.2- Synthèse d'un conjugué associant l'acide salicylique à un hydroxyaminoacide

Composé 27 : 2-(benzyloxy)benzoate de méthyle⁴¹⁶⁻⁴¹⁸



$C_{15}H_{14}O_3$
M= 242,27 g/mol
Huile incolore

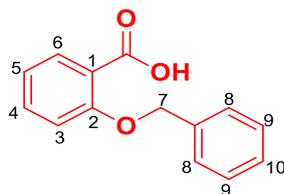
Le carbonate de potassium (14.55 g, 105.3 mmol, 3.0 éq) est additionné au salicylate de méthyle (5.34 g, 35.1 mmol, 1.0 éq) en solution dans de l'acétone (65 mL). Le bromure de benzyle (6.01 g, 35.1 mmol, 1.0 éq) est ensuite additionné à la solution et le milieu réactionnel est porté à reflux pendant vingt quatre heures avant d'être ramené à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré sur célite et le filtrat est concentré sous pression réduite avant d'être purifié sur colonne de silice (Pentane/ CH_2Cl_2 1:1) afin d'obtenir le composé **27** (6.48 g, 26.7 mmol, **76%**) sous la forme d'une huile incolore.

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : 7.81 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H₆), 7.48 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, H₉), 7.40 (td, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, H₄), 7.37 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H₁₀), 7.29 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H₁₁), 6.97 (m, 2H, H₃ et H₅), 5.15 (s, 2H, H₈), 3.88 (s, 3H, H₇).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz) δ (ppm) : 166.8 (CO), 158.1 (C, C₂), 136.8 (C, C_{benzyle}), 133.5 (CH, C₄), 131.8 (CH, C₆), 128.6, 127.8, 126.8 (5 CH, C₉, C₁₀ et C₁₁), 120.7 (C, C₁), 120.6 (CH, C₅), 113.9 (CH, C₃), 70.5 (CH₂, C₈), 52.1 (CH₃, C₇).

CCM(CH_2Cl_2), révélations UV: R_f = 0.90

Composé 28 : Acide 2-(benzyloxy)benzoïque^{419,420}



C₁₄H₁₂O₃
M= 228,25 g/mol
Solide blanc

Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 4M (20 mL, 80.0 mmol, 3.0 éq) est additionnée au composé **27** (6.43 g, 26.5 mmol, 1.0 éq) en solution dans du méthanol (50 mL) sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé 60°C et maintenu sous agitation pendant dix heures avant d'être ramené à température ambiante et concentré sous pression réduite. Ce dernier est ensuite dilué dans de l'eau distillée (100 mL), acidifié à pH 3 par une solution de HCl 1M (35 mL) puis extrait à AcOEt (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) afin d'obtenir le composé **28** (5.12 g, 22.4 mmol, **85%**) sous la forme d'un solide blanc.

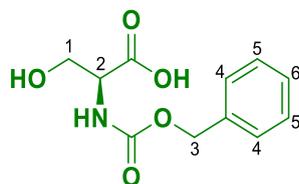
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 10.81 (s, 1H, OH), 8.21 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H₆), 7.56 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H₄), 7.45 – 7.41 (m, 5H, H₈ à H₁₀), 7.16 (td, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₅), 7.13 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H₃), 5.30 (s, 2H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 165.2 (CO), 157.4 (C, C₂), 135.0 (CH, C₄), 134.3 (C, C_{benzyle}), 134.0 (CH, C₆), 129., 129.2, 128.0 (5 CH, C₈, C₉ et C₁₀), 122.5 (CH, C₅), 118.1 (C, C₁), 113.1 (CH, C₃), 72.3 (CH₂, C₇).

CCM (CH₂Cl₂), révélation UV: R_f = 0.23

Point de fusion : 72 – 75°C. (litt : 73 – 75°C)⁴⁴⁴

Composé 29 : Acide 2*S*-(benzyloxycarbonylamino)-3-hydroxypropionique^{421,422}



$C_{11}H_{13}NO_5$
M= 239,23 g/mol
Solide blanc

L'hydrogénocarbonate de sodium (7.12 g, 84.7 mmol, 2.5 éq) est additionné à une solution aqueuse (130 mL) de *L*-sérine (3.56 g, 33.9 mmol, 1.0 éq) sous agitation. Le chloroformiate de benzyle (5.78 g, 33.9 mmol, 1.0 éq), en solution dans du THF (10 mL) est additionné goutte à goutte à la solution aqueuse sur une période de 10 minutes. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant dix-huit heures. Le milieu réactionnel est ensuite extrait à AcOEt (3 x 60 mL). Les phases organiques sont séchées (Na_2SO_4), filtrées et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le composé **29** (3.72 g, 15.5 mmol, **46%**) sous forme de poudre blanche.

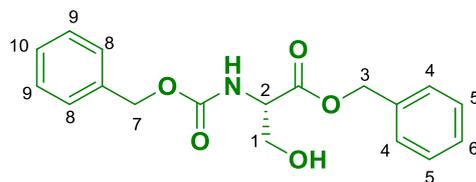
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 7.37 – 7.30 (m, 5H, H_4 à H_6), 5.05 (s, 2H, H_3), 4.07 (m, 1H, H_2), 3.67 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 2H, H_1).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 172.6 (CO), 156.5 ($CO_{\text{carbamate}}$), 137.4 (C, C_{benzyle}), 128.8, 128.3, 128.2 (5 CH, C_4 à C_6), 65.9 (CH_2 , C_3), 61.8 (CH_2 , C_1), 57.1 (CH, C_2).

CCM (Hexane/AcOEt/AcOH 6/4/1), révélation à la ninhydrine: $R_f = 0.21$

Point de fusion : 117 – 119°C. (litt : 120°C)⁴⁴⁵

Composé 30 : 2*S*-(benzyloxycarbonylamino)-3-hydroxypropionate de benzyle⁴²¹



C₁₈H₁₉NO₅
M= 329,35 g/mol
Solide blanc

Le carbonate de potassium (2.78 g, 20.1 mmol, 1.5 éq) est additionné au composé **29** (3.21 g, 13.4 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (50 mL). Le bromure de benzyle (3.44 g, 20.1 mmol, 1.5 éq) est ensuite additionné au milieu réactionnel qui est maintenu sous agitation à température ambiante pendant soixante heures. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau distillée (100 mL) et extrait à AcOEt (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur colonne de silice par gradient d'éluion (CH₂Cl₂/AcOEt 1:0 à 0:1) afin d'obtenir le composé **30** (1.10 g, 3.34 mmol, **25%**) sous la forme d'un solide blanc.

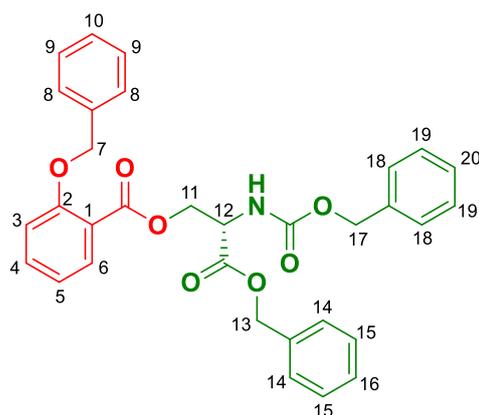
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 7.34 (m, 10H, H₄ à H₆ et H₈ à H₁₀), 5.81 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, NH), 5.19 (s, 2H, H₃ ou H₇), 5.10 (s, 2H, H₃ ou H₇), 4.46 (m, 1H, H₂), 3.97 (dd, ²J = 11.2 Hz, ³J = 3.4 Hz, 1H, H₁), 3.88 (dd, ²J = 11.2 Hz, ³J = 3.3 Hz, 1H, H₁), 2.30 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 170.5 (CO), 156.3 (CO_{carbamate}), 136.1, 135.2 (2 C_{benzyle}), 128.7, 128.5, 128.3, 128.2, 127.6, 127.0 (10 CH, C₄ à C₆ et C₈ à C₁₀), 67.5, 67.2 (2 CH₂, C₃ et C₇), 63.2 (CH₂, C₁), 56.2 (CH, C₂).

CCM (AcOEt), révélation à la ninhydrine: R_f = 0.81

Point de fusion: 80 – 83°C. (litt: 82 – 83°C)⁴⁴⁶

Composé 31 : 2-(benzyloxy)benzoate de 3-(benzyloxy)-2*S*-((benzyloxy)carbonylamino)-3-oxopropyle



$C_{32}H_{29}NO_7$
M= 539,58 g/mol
Solide blanc

Le composé **31** (1.07 g, 1.99 mmol, **75%**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc après purification sur colonne de silice (CH_2Cl_2) en suivant la Procédure 5. Le produit a été obtenu en engageant les composés **28** (0.60 g, 2.64 mmol, 1.0 éq) et **30** (0.87 g, 2.64 mmol, 1.0 éq) en présence de DMAP (0.1 éq) et d'EDCI (1.0 éq) dans du dichlorométhane anhydre (50 mL) maintenu sous agitation à $-10^\circ C$ puis $0^\circ C$ pendant deux heures.

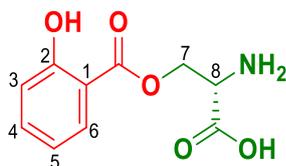
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : 7.66 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H_6), 7.44 – 7.33 (m, 4H, H_8 et H_9), 7.34 – 7.25 (m, 12H, H_4 , H_{10} , H_{14} à H_{16} et H_{18} à H_{20}), 6.94 (m, 2H, H_3 et H_5), 5.71 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, H_7 ou H_{13} ou H_{17}), 5.16 (s, 2H, H_7 ou H_{13} ou H_{17}), 5.09 (s, 2H, H_7 ou H_{13} ou H_{17}), 4.76 (m, 2H, H_{11}), 4.58 (dd, $^2J = 12.3$ Hz, $^3J = 4.3$ Hz, 1H, H_{12}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz) δ (ppm) : 169.5, 165.6 (2 CO), 158.3 (C, C_2), 155.9 ($CO_{\text{carbamate}}$), 136.6, 136.0, 135.0 (3 C_{benzyle}), 133.9 (CH, C_4), 132.0 (CH, C_6), 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 126.8 (15 CH, C_8 à C_{10} , C_{14} à C_{16} et C_{18} à C_{20}), 120.5 (CH, C_5), 119.6 (C, C_1), 113.7 (CH, C_3), 70.4, 67.7, 67.2 (3 CH_2 , C_7 , C_{13} et C_{17}), 64.6 (CH_2 , C_{11}), 53.6 (CH, C_{12}).

CCM (CH_2Cl_2), révélations UV et ninhydrine: Rf = 0.43

Point de fusion : 123 – 125°C.

Composé 32 : O-(2-hydroxybenzoyl)-L-sérine



$C_{10}H_{11}NO_5$
M= 225,20 g/mol
Solide blanc

Le composé **31** (0.98 g, 1.82 mmol, 1.0 éq) est additionné au palladium sur charbon à 5% massique (0.02 g) en suspension dans un mélange méthanol/acétate d'éthyle (10:2 mL). Le milieu réactionnel est ensuite purgé par un ballon d'hydrogène et maintenu sous agitation pendant 4 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré sur célite avant d'être concentré sous pression réduite afin d'obtenir le composé **32** (0.11 g, 0.48 mmol, **26%**) sous la forme d'un solide blanc.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 7.97 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H₆), 7.53 (td, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H₄), 6.97 (td, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₅), 6.94 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, H₃), 4.65 (dd, $^2J = 11.7$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, H₇), 4.49 (dd, $^2J = 11.7$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, H₇), 3.79 (dd, $^3J = 6.7$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, H₈).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 174.9, 168.8 (2 CO), 160.5 (C, C₂), 136.3 (CH, C₄), 131.4 (CH, C₆), 119.6 (CH, C₅), 117.8 (CH, C₃), 113.3 (C, C₁), 65.1 (CH₂, C₇), 53.2 (CH, C₈).

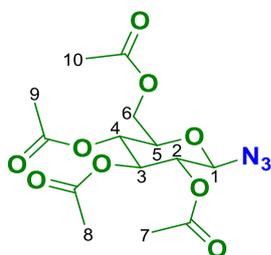
HRMS (ESI+) calculée pour $C_{10}H_{11}NO_5$ [M+H]⁺: 226.0715, **mesurée** : 226.2058

CCM (AcOEt), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.01

Point de fusion : 84 – 86°C.

3- Synthèse de conjugués associant l'acide salicylique et ses analogues chlorés à du β -D-glucose par un espaceur triazole

Composé 33 : 1-azido-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranose⁴³⁰⁻⁴³²



$C_{14}H_{19}N_3O_9$ M= 373,32 g/mol Solide jaune

De l'azoture de sodium NaN_3 (1.78 g, 27.4 mmol, 5.6 éq) est additionné à du bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle (2.02 g, 4.91 mmol, 1.0 éq) en solution dans un mélange acétone/eau (60 :10 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant dix huit heures à température ambiante. L'acétone est ensuite évaporée du milieu réactionnel sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir l'azoture **33** (1.62 g, 4.34 mmol, **88%**) sous la forme d'un solide jaune.

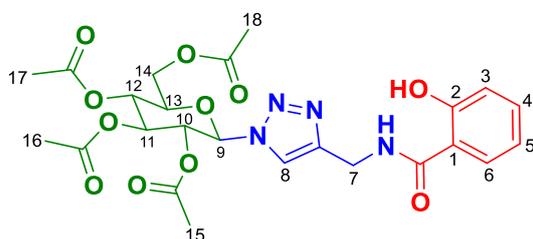
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : 5.19 (t, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, H_3), 5.07 (t, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, H_4), 4.93 (t, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, H_2), 4.63 (d, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, H_1), 4.25 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, H_6), 4.14 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 2.0$ Hz, 1H, H_6), 3.78 (m, 1H, H_5), 2.08, 2.05, 2.00 et 1.99 (4 s, 12H, H_7 à H_{10}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101MHz) δ (ppm) : 170.7, 170.2, 169.4, 169.3 (4 CO), 87.9 (CH, C_1), 74.0 (CH, C_5), 72.6 (CH, C_3), 70.6 (CH, C_2), 67.8 (CH, C_4), 61.4 (CH $_2$, C_6), 20.7, 20.6, 20.6, 20.4 (4 CH $_3$, C_7 à C_{10}).

CCM (CH_2Cl_2 /AcOEt 6:4), révélation au $KMnO_4$: Rf = 0.62.

Point de fusion : 128 – 129°C. (litt : 126 – 128°C)⁴⁴⁷

Composé 34a : 2-hydroxy-*N*-[(1-(1'-déoxy-2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -Dglucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



$C_{24}H_{28}N_4O_{11}$ $M = 548,51 \text{ g/mol}$ Solide jaune

Le composé **34a** (2.60 g, 4.74 mmol, **83%**) a été isolé sous la forme d'un solide jaune après purification sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 1 : 1) en suivant la Procédure 3. Ce dernier a été obtenu en engageant les composés **4a** (1.00 g, 5.71 mmol, 1.0 éq) et **33** (2.13 g, 5.71 mmol, 1.0 éq) en présence de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.2 éq) et d'ascorbate de sodium (0.4 éq) dans un mélange *t*-BuOH/ H_2O (25 :5 mL) chauffé à 50°C pendant une heure.

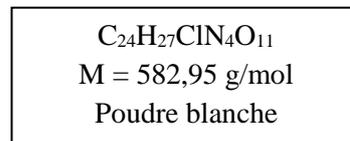
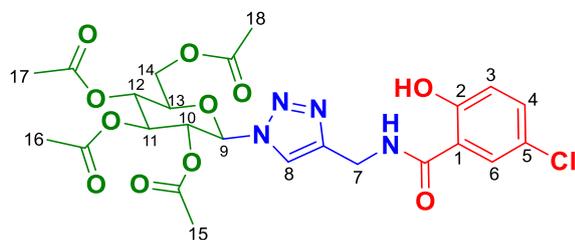
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ (ppm) : 12.21 (s, 1H, OH), 7.89 (s, 1H, H₈), 7.45 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, H₆ et NH), 7.35 (td, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H₄), 6.94 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H₃), 6.79 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H₅), 5.85 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, H₉), 5.45 – 5.40 (m, 2H, H₁₀ et H₁₁), 5.22 (t, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H₁₂), 4.75 – 4.62 (dd, $^2J = 15.0$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, H₇), 4.31 – 4.26 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H₁₄), 4.15 – 4.09 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 2.0$ Hz, 1H, H₁₄), 3.99 (ddd, $^3J = 10.0$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, H₁₃), 2.06, 2.05, 2.01 et 1.83 (4 s, 12H, H₁₅ à H₁₈).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz), δ (ppm) : 170.6, 170.2, 170.1, 169.4, 169.0 (5 CO), 161.6 (C, C₂), 144.8 (C, C_{triazole}), 134.5 (CH, C₄), 126.0 (CH, C₆), 121.4 (CH, C₈), 118.8 (CH, C₅), 118.6 (CH, C₃), 114.1 (C, C₁), 85.9 (CH, C₉), 75.3 (CH, C₁₃), 72.7 (CH, C₁₁), 70.4 (CH, C₁₀), 67.7 (CH, C₁₂), 61.6 (CH₂, C₁₄), 35.0 (CH₂, C₇), 20.9, 20.8, 20.7, 20.3 (4 CH₃, C₁₅ à C₁₈).

CCM ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 9:1), révélation UV: R_f = 0.36

Point de fusion : 214 – 216°C.

Composé 34b : 2-hydroxy-5-chloro-*N*-[(1-(1'-déoxy-2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -Dglucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



Le composé **34b** (1.32 g, 2.27 mmol, **47%**) a été isolé sous la forme d'une poudre blanche après purification sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 1 :0 puis 4 :1) en suivant la Procédure 3. Le composé a été obtenu en engageant les composés **4b** (1.00 g, 4.78 mmol, 1.0 éq) et **33** (1.78 g, 4.78 mmol, 1.0 éq) en présence de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.2 éq) et d'ascorbate de sodium (0.4 éq) dans un mélange *t*-BuOH/ H_2O (15 :5 mL) chauffé à 50°C pendant deux heures.

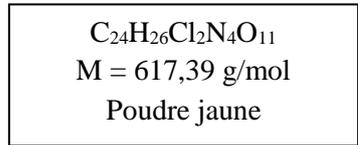
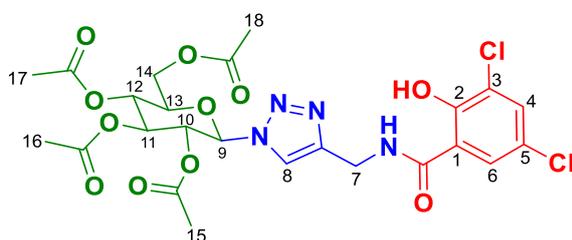
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 12.39 (s, 1H, OH), 9.39 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H₈), 7.90 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H₄), 6.94 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H₃), 6.30 (d, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, H₉), 5.65 (t, $^3J = 9.4$ Hz, 1H, H₁₁), 5.52 (t, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H₁₀), 5.15 (t, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H₁₂), 4.54 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, H₇), 4.33 (m, 1H, H₁₃), 4.09 (m, 2H, H₁₄), 2.00, 1.97, 1.94 et 1.77 (4 s, 12H, H₁₅ à H₁₈).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 170.0, 169.5, 169.3, 168.4, 167.3 (5 CO), 158.4 (C, C₂), 145.0 (C, C_{triazole}), 133.4 (CH, C₄), 127.6 (CH, C₆), 122.4 (CH, C₈), 122.1 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.8 (C, C₁), 83.8 (CH, C₉), 73.2 (CH, C₁₃), 72.2 (CH, C₁₁), 70.1 (CH, C₁₀), 67.5 (CH, C₁₂), 61.8 (CH₂, C₁₄), 34.6 (CH₂, C₇), 20.5, 20.4, 20.2, 19.9 (4 CH₃, C₁₅ à C₁₈).

CCM ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 9:1), révélation UV : R_f = 0.39

Point de fusion: 245 – 246°C.

Composé 34c : 2-hydroxy-3,5-dichloro-*N*-[(1-(1'-déoxy-2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -Dglucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



Le composé **34c** (0.50 g, 0.81 mmol, **40%**) a été isolé sous la forme d'une poudre jaune après purification sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 1 :0 puis 4 :1) en suivant la Procédure 3. Le produit a été obtenu en engageant les composés **4c** (0.50 g, 2.04 mmol, 1.0 éq) et **33** (0.76 g, 2.04 mmol, 1.0 éq) en présence de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.2 éq) et d'ascorbate de sodium (0.4 éq) dans un mélange *t*-BuOH/ H_2O (10 :5 mL) chauffé à 50°C pendant six heures.

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm) : 12.79 (s, 1H, OH), 7.90 (s, 1H, H_8), 7.68 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, NH), 7.46 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, H_6), 7.43 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, H_4), 5.87 (dd, $^3J = 9.8$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, H_9), 5.43 (m, 2H, H_{10} et H_{11}), 5.25 (td, $^3J = 9.8$ Hz, $^4J = 3.0$ Hz, 1H, H_{12}), 4.77 – 4.66 (dd, $^2J = 15.3$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, H_7), 4.30 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H_{14}), 4.16 (dd, $^2J = 12.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H_{14}), 4.01 (m, $^3J = 10.2$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, H_{13}), 2.08, 2.07, 2.03 et 1.80 (4 s, 12H, H_{15} à H_{18}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz) δ (ppm) : 170.7, 170.1, 169.5, 169.2, 168.7 (5 CO), 156.2 (C, C_2), 144.5 (C, C_{triazole}), 134.0 (CH, C_4), 124.5 (CH, C_6), 124.0, 123.2 (2C, C_3 et C_5), 121.7 (CH, C_8), 115.8 (C, C_1), 86.0 (CH, C_9), 75.3 (CH, C_{13}), 72.6 (CH, C_{11}), 70.5 (CH, C_{10}), 67.7 (CH, C_{12}), 61.5 (CH₂, C_{14}), 35.1 (CH₂, C_7), 20.8, 20.7, 20.7 et 20.3 (4 CH₃, C_{15} à C_{18}).

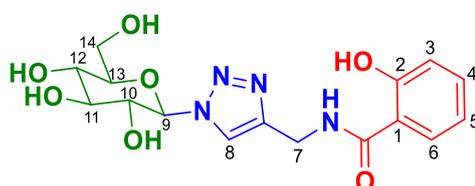
CCM ($CH_2Cl_2/AcOEt$ 9/1), révélation UV : $R_f = 0.43$

Point de fusion : 225 – 226°C.

Procédure 11 : Méthanolyse des groupements acétyle présents sur le glucose^{369,437,438}

Le sodium métallique Na⁰ (5.0-8.0 éq) est progressivement additionné aux composé **34(a-c)** en solution dans du méthanol anhydre refroidi à 0°C. Une fois le sodium additionné, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et maintenu sous agitation jusqu'à la conversion complète du composé **34(a-c)**. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé (pH 7) par une résine acide Ambelite IRN77. La solution est ensuite filtrée sur célite puis le filtrat est concentré sous pression réduite afin d'obtenir le composé **35(a-c)**.

Composé 35a: 2-hydroxy-*N*-[(1-(1'-déoxy- β -D-glucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



C₁₆H₂₀N₄O₇
M= 380,36 g/mol
Solide jaune
hygroscopique

Le composé **35a** (1.45 g, 3.81 mmol, **80%**) a été obtenu sous la forme d'un solide jaune hygroscopique après trois heures de réaction. Le produit a été obtenu en engageant le composé **34a** (2.60 g, 4.74 mmol, 1.0éq) en présence de sodium métallique (6.0 éq) dans du méthanol anhydre (100 mL).

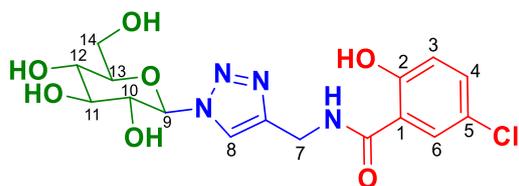
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) : 12.49 (s, 1H, OH), 9.47 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H₈), 7.95 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.38 (td, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, H₄), 6.93 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H₃), 6.86 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, H₅), 5.50 (d, ³J = 9.3 Hz, 1H, H₉), 5.35 (d, ³J = 5.6 Hz, 1H, OH), 5.25 (s, 1H, OH), 5.14 (d, ³J = 3.8 Hz, 1H, OH), 4.60 (s, 1H, OH), 4.55 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H₇), 3.75 (t, ³J = 9.1 Hz, 1H, H₁₀), 3.65 (d, ²J = 10.3 Hz, 1H, H₁₄), 3.48 – 3.36 (m, 3H, H₁₂, H₁₃ et H₁₄), 3.22 (t, ³J = 9.1 Hz, 1H, H₁₁).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 101 MHz) δ (ppm) : 169.2 (CO), 160.3 (C, C₂), 144.9 (C, C_{triazole}), 134.3 (CH, C₄), 128.5 (CH, C₆), 122.7 (CH, C₈), 119.1 (CH, C₅), 117.8 (CH, C₃), 115.7 (C, C₁), 87.9 (CH, C₉), 80.4 (CH, C₁₂), 77.5 (CH, C₁₃), 72.4 (CH, C₁₀), 70.0 (CH, C₁₁), 61.2 (CH₂, C₁₄), 35.0 (CH₂, C₇).

HRMS (ESI+) calculée pour C₁₆H₂₁N₄O₇ [M+H]⁺ : 381.1405, **mesurée :** 381.1429

CCM (AcOEt), révélation UV: R_f = 0.01

Composé 35b: 2-hydroxy-5-chloro-*N*-[(1-(1'-déoxy- β -D-glucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



$C_{16}H_{19}ClN_4O_7$
 $M = 414,09 \text{ g/mol}$
Poudre blanche

Le composé **35b** (0.36 g, 0.87 mmol, **38%**) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche après deux heures de réaction. Ce produit a été obtenu en engageant le composé **34b** (1.32 g, 2.26 mmol, 1.0 éq) en présence de sodium métallique (5.0 éq) dans du méthanol anhydre (50 mL).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 12.46 (s, 1H, OH), 9.42 (t, $^3J = 5,6 \text{ Hz}$, 1H, NH), 8.21 (s, 1H, H₈), 7.96 (d, $^4J = 2.76 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 7.44 (dd, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H₄), 6.95 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 5.51 (d, $^3J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H₉), 5.36 (d, $^3J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, OH), 5.28 (d, $^3J = 4.9 \text{ Hz}$, 1H, OH), 5.16 (d, $^3J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H, OH), 4.63 (t, $^3J = 5.6 \text{ Hz}$, 1H, OH), 4.56 (d, $^3J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H₇), 3.76 (td, $^3J = 9.1 \text{ Hz}$, $^4J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, H₁₀), 3.68 (m, 1H, H₁₄), 3.44 (m, 2H, H₁₃ et H₁₄), 3.35 (m, 1H, H₁₁), 3.20 (m, 1H, H₁₂).

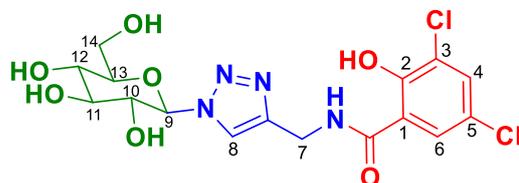
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) δ (ppm) : 167.2 (CO), 158.4 (C, C₂), 144.2 (C_{triazole}), 133.4 (CH, C₄), 127.7 (CH, C₆), 122.4 (CH, C₈), 122.3 (C, C₅), 119.3 (CH, C₃), 116.9 (C, C₁), 87.5 (CH, C₉), 80.0 (CH, C₁₃), 77.0 (CH, C₁₀), 72.0 (CH, C₁₁), 69.6 (CH, C₁₂), 65.0 (CH₂, C₁₄), 34.7 (CH₂, C₇).

HRMS (ESI+) calculée pour $C_{16}H_{19}ClN_4O_7$ [M+H]⁺ : 415.1015, **mesurée :** 415.0993

CCM (AcOEt), révélation UV : R_f = 0.03

Point de fusion : 75 – 76°C.

Composé 35c : 2-hydroxy-3,5-dichloro-*N*-[(1-(1'-déoxy- β -D-glucopyranos-1'-yl)]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthylbenzamide



$C_{16}H_{18}Cl_2N_4O_7$
 $M = 449,24$ g/mol
Poudre rose

Le composé **35c** (0.17 g, 0.38 mmol, **75%**) a été obtenu sous la forme d'une poudre rose après trois heures de réaction. Le produit a été obtenu en engageant le composé **34c** (0.30 g, 0.50 mmol, 1.0 éq) en présence de sodium métallique (8.0 éq) dans du méthanol anhydre (10 mL).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 13.66 (s, 1H, OH), 9.83 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H₈), 8.08 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, H₆), 7.79 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, H₄), 5.50 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H₉), 4.57 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 2H, H₇), 3.75 (t, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, H₁₀), 3.68 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz, 1H, H₁₄), 3.41 (m, 2H, H₁₃ et H₁₄), 3.37 (t, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H₁₂), 3.21 (t, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H₁₁).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) : 168.7 (CO), 156.2 (C, C₂), 144.3 (C, C_{triazole}), 133.7 (CH, C₄), 126.4 (CH, C₆), 122.8 (CH, C₈), 122.8, 122.5 (2 C, C₃ et C₅), 116.8 (C, C₁), 87.9 (CH, C₉), 80.4 (CH, C₁₃), 77.4 (CH, C₁₂), 72.4 (CH, C₁₀), 70.0 (CH, C₁₁), 61.2 (CH₂, C₁₄), 35.3 (CH₂, C₇).

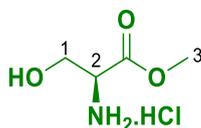
HRMS (ESI-) calculée pour $C_{16}H_{19}Cl_2N_4O_7$ [M-H]⁻: 447.0474, **mesurée** : 447.0469

CCM (AcOEt), révélation UV : R_f = 0.04

Point de fusion : 91 – 93°C.

4- Perspectives : Synthèse d'un conjugué associant l'AS à de la L-sérine par un espaceur triazolique

Composé 36 : Chlorhydrate de 2S-amino-3-hydroxypropionate de méthyle^{448,449}



C₄H₁₀ClNO₃
M= 155,58 g/mol
Poudre blanche

La L-sérine (5.88 g, 55.9 mmol, 1.0 éq) est mise en suspension dans du méthanol anhydre (120 mL) refroidi à 0°C par un bain de glace. La suspension est maintenue sous agitation pendant l'addition goutte à goutte de chlorure de thionyle SOCl₂ (13.31 g, 111.9 mmol, 2.0 éq). Une fois l'addition terminée, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante avant d'être porté à reflux pendant cinq heures. Ce dernier est ensuite concentré sous pression réduite afin d'obtenir le chlorhydrate **36** (8.70 g, 55.9 mmol, **100%**) sous forme d'une poudre blanche.

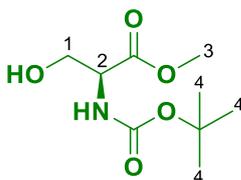
RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ (ppm) : 4.13 (t, ³J = 3.6 Hz, 1H, H₂), 3.96 (dd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 4.2 Hz, 1H, H₁), 3.85 (dd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 3.6 Hz, 1H, H₁), 3.71 (s, 3H, H₃).

RMN ¹³C (D₂O, 126 MHz) δ (ppm) : 168.9 (CO), 59.2 (CH₂, C₁), 54.7 (CH, C₂), 53.7 (CH₃, C₃).

CCM (AcOEt/AcOH 9:1), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.14

Point de fusion : 159 – 162 °C. (litt : 161 – 162°C)⁴⁵⁰

Composé 37 : 3-hydroxy-2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionate de méthyle⁴⁵¹



C₉H₁₇NO₅
M= 219,24 g/mol
Huile jaune

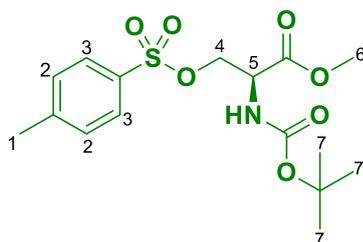
Le composé **36** (8.00 g, 51.4 mmol, 1.0 éq) est mis en suspension dans du dichlorométhane anhydre (120 mL) refroidi à 0°C. De la triéthylamine (11.45 g, 113.3 mmol, 2.2 éq) est additionnée goutte à goutte à la suspension puis, du dicarbonate de di-*tert*-butyle (11.22 g, 51.4 mmol, 1.0 éq) est ensuite additionné au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite ramené à température ambiante pour y être maintenu sous agitation pendant vingt quatre heures. Le mélange réactionnel est lavé par une solution de HCl 0,5 M (4 x 40 mL). Les phases aqueuses sont rassemblées puis extraites à l'AcOEt (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (Na₂SO₄), filtrées et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le composé **37** (7.66 g, 34.9 mmol, **68%**) sous la forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 5.47 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.39 (m, 1H, H₂), 3.97 (dd, ²J = 11.1 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, H₁), 3.85 (dd, ²J = 11.1 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, H₁), 3.79 (s, 3H, H₃), 1.46 (s, 9H, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 171.5 (CO), 155.9 (CO_{carbamate}), 80.3 (C, C_{tert-butyle}), 63.3 (CH₂, C₁), 55.8 (CH, C₂), 52.6 (CH₃, C₃), 28.3 (3 CH₃, C₄).

CCM (AcOEt), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.73

Composé 38: 3-(*para*-toluènesulfonyloxy)-2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionate de méthyle⁴⁵²



C₁₆H₂₃NO₇S
M= 373,42 g/mol
Solide jaunâtre amorphe

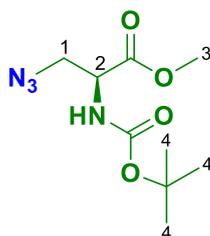
Le chlorure de *para*-toluènesulfonyle (5.50 g, 28.8 mmol, 1.5 éq) est mis en solution dans de la pyridine (35 mL) refroidie à -10°C. La solution est maintenue sous agitation pendant vingt minutes puis le composé **37** (4.20 g, 19.2 mmol, 1.0 éq), en solution dans du dichlorométhane anhydre (5 mL) est additionné à la pyridine. Le milieu réactionnel est maintenu à -10°C pendant une heure avant de revenir progressivement à température ambiante sur une période de dix-sept heures. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau distillée (50 mL) puis extrait au dichlorométhane (3 x 25 mL). Les phases organiques sont ensuite rassemblées puis lavées par une solution de HCl 1M (3 x 50 mL) avant d'être séchées (Na₂SO₄), filtrées et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le composé **38** (7.10 g, 19.0 mmol, **99%**) sous la forme d'un solide jaunâtre amorphe.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 7.74 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H₃), 7.34 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H₂), 5.29 (d, ³J = 6.5 Hz, 1H, NH), 4.49 (m, 1H, H₅), 4.39 (dd, ²J = 10.1 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, H₄), 4.27 (dd, ²J = 10.1 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, H₄), 3.69 (s, 3H, H₆), 2.45 (s, 3H, H₁), 1.41 (s, 9H, H₇).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 169.1 (CO), 155.0 (CO_{carbamate}), 145.3 (C, C_{SO2}), 132.4 (C, C_{CH3}), 130.1 (2 CH, C₂), 128.1 (2 CH, C₃), 80.6 (C_{tert-butyle}), 69.6 (CH₂, C₄), 53.6 (CH₃, C₆), 53.0 (CH, C₅), 28.4 (3 CH₃, C₁₀), 21.8 (CH₃, C₁).

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt 8:2), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.71

Composé 39 : 3-azido, 2*S*-((*tert*-butoxycarbonyl)amino) propanoate de méthyle



C₉H₁₆N₄O₄
M= 244,25 g/mol
Huile incolore

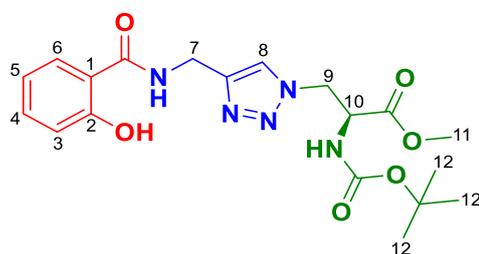
L'azoture de sodium NaN₃ (3.00 g, 46.2 mmol, 4.4 éq) est additionné au composé **38** (3.89 g, 10.4 mmol, 1.0 éq) en solution dans du DMF anhydre (15 mL). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 70°C pendant quarante cinq minutes. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante puis dilué dans AcOEt (40 mL) et lavé à l'eau distillée (3 x 60 mL). Les phases aqueuses sont ensuite rassemblées puis extraites au CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). Les phases organiques sont à leur tour rassemblées puis séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées afin d'obtenir le produit brut qui est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂ puis CH₂Cl₂/MeOH 9 :1). Le composé **39** (1.28 g, 5.24 mmol, **50%**) a ainsi pu être obtenu la sous forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 5.37 (d, ³J = 6.7 Hz, 1H, NH), 4.48 (td, ³J = 7.3 Hz, ³J = 3.5 Hz, 1H, H₂), 3.80 (s, 3H, H₃), 3.72 (d, ³J = 3.5 Hz, 2H, H₁), 1.45 (s, 9H, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ (ppm) : 170.4 (CO), 155.2 (CO_{carbamate}), 80.6 (C, C_{tert-butyle}), 53.6 (CH, C₂), 53.0 (CH₃, C₃), 52.8 (CH₂, C₁), 28.4 (3 CH₃, C₄).

CCM (CH₂Cl₂), révélation à la ninhydrine : R_f = 0.13

Composé 40 : 2*S*-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-(4-((2-hydroxybenzamido)méthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) propanoate de méthyle



$C_{19}H_{25}N_5O_6$ M= 419,44 g/mol Solide blanc

Le composé **40** (1.20 g, 2.85 mmol, **82%**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc après purification sur colonne de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 8:2 à 0:1). Le produit désiré a été obtenu en suivant la Procédure 3, en engageant les composés **4a** (0.61 g, 3.48 mmol, 1.0 éq) et **39** (0.85 g, 3.48 mmol, 1.0 éq) en présence de CuSO₄·5H₂O (0.2 éq) et d'ascorbate de sodium (0.4 éq) chauffés à 60°C dans un mélange *t*-BuOH/H₂O (15:10 mL) durant deux heures.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 12.32 (s, 1H, OH), 7.89 (s, 1H, NH), 7.65 (s, 1H, H₈), 7.52 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₆), 7.37 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₄), 6.95 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, H₃), 6.82 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₅), 5.47 (d, ³J = 6.4 Hz, 1H, NH), 4.82 (s, 2H, H₇), 4.73 (m, 1H, H₁₀), 4.66 (m, 2H, H₉), 3.77 (s, 3H, H₁₁), 1.42 (s, 9H, H₁₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ (ppm) : 170.1, 168.8 (2 CO), 160.0 (C, C₂), 155.1 (CO_{carbamate}), 144.3 (C, C_{triazole}), 133.8 (CH, C₄), 127.9 (CH, C₆), 123.9 (CH, C₈), 118.6 (CH, C₃), 117.4 (CH, C₅), 115.1 (C, C₁), 78.8 (C, C_{tert-butyle}), 53.7 (CH, C₁₀), 52.3 (CH₃, C₁₁), 49.3 (CH₂, C₉), 34.5 (CH₂, C₇), 28.0 (3 CH₃, C₁₂).

CCM (CH₂Cl₂), révélations UV et ninhydrine: R_f = 0.04

Point de fusion: 134 – 136°C.

Références bibliographiques

- (1) Baromètre Ipsos / SPF : la précarité déborde encore une fois en 2021 <https://www.secourspopulaire.fr/barometre-pauvrete-ipsos> (accessed 2021 -11 -15).
- (2) United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights. ST/ESA/SER.A/423. (accessed 2021 -08 -01).
- (3) Tschardtke, T.; Clough, Y.; Wanger, T. C.; Jackson, L.; Motzke, I.; Perfecto, I.; Vandermeer, J.; Whitbread, A. Global Food Security, Biodiversity Conservation and the Future of Agricultural Intensification. *Biol. Conserv.* **2012**, *151* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>.
- (4) Vollset, S. E.; Goren, E.; Yuan, C.-W.; Cao, J.; Smith, A. E.; Hsiao, T.; Bisignano, C.; Azhar, G. S.; Castro, E.; Chalek, J. Fertility, Mortality, Migration, and Population Scenarios for 195 Countries and Territories from 2017 to 2100: A Forecasting Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **2020**, *396* (10258), 1285–1306. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30677-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30677-2)
- (5) Tilman, D.; Balzer, C.; Hill, J.; Befort, B. L. Global Food Demand and the Sustainable Intensification of Agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (50), 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>.
- (6) Dawson, T. P.; Perryman, A. H.; Osborne, T. M. Modelling Impacts of Climate Change on Global Food Security. *Clim. Change* **2016**, *134* (3), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1277-y>.
- (7) Molotoks, A.; Smith, P.; Dawson, T. P. Impacts of Land Use, Population, and Climate Change on Global Food Security. *Food Energy Secur.* **2021**, *10* (1), e261. <https://doi.org/10.1002/fes3.261>.
- (8) Bebber, D. P.; Holmes, T.; Gurr, S. J. The Global Spread of Crop Pests and Pathogens. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **2014**, *23* (12), 1398–1407. <https://doi.org/10.1111/geb.12214>.
- (9) Shaw, D. J. *World Food Security*; Palgrave Macmillan UK: London, **2007**. <https://doi.org/10.1057/9780230589780>.
- (10) Hayes, T. B.; Hansen, M. From Silent Spring to Silent Night: Agrochemicals and the Anthropocene. *Elem. Sci. Anthr.* **2017**, *5* (57). <https://doi.org/10.1525/elementa.246>.
- (11) Epstein, L. Fifty Years Since *Silent Spring*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52* (1), 377–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045900>.
- (12) Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G. Environmental and Food Applications of LC–Tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: An Overview. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23* (1), 45–85. <https://doi.org/10.1002/mas.10071>.
- (13) Pico, Y.; Alfarhan, A. H.; Barcelo, D. How Recent Innovations in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Have Improved Pesticide Residue Determination: An Alternative Technique to Be in Your Radar. *Trends Anal. Chem.* **2020**, *122*, 115720. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115720>.

- (14) Phillips, M. W. A. Agrochemical Industry Development, Trends in R&D and the Impact of Regulation. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76* (10), 3348–3356. <https://doi.org/10.1002/ps.5728>.
- (15) Sparks, T. C.; Bryant, R. J. Crop Protection Compounds – Trends and Perspective. *Pest Manag. Sci.* **2021**, *77* (8), 3608–3616. <https://doi.org/10.1002/ps.6293>.
- (16) Pesticide Use by Country - Worldometer <https://www.worldometers.info/food-agriculture/pesticides-by-country/> (accessed 2021 -08 -02).
- (17) Nicolopoulou-Stamati, P.; Maipas, S.; Kotampasi, C.; Stamatis, P.; Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front. Public Health* **2016**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.
- (18) Carvalho, F. P. Pesticides, Environment, and Food Safety. *Food Energy Secur.* **2017**, *6* (2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>.
- (19) Jeschke, P. Progress of Modern Agricultural Chemistry and Future Prospects: Progress of Modern Agricultural Chemistry and Future Prospects. *Pest Manag. Sci.* **2016**, *72* (3), 433–455. <https://doi.org/10.1002/ps.4190>.
- (20) Westwood, J. H.; Charudattan, R.; Duke, S. O.; Fennimore, S. A.; Marrone, P.; Slaughter, D. C.; Swanton, C.; Zollinger, R. Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. *Weed Sci.* **2018**, *66* (3), 275–285. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.78>.
- (21) Lacey, L. A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D. I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M. S. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Back to the Future. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *132*, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- (22) Samada, L. H.; Tambunan, U. S. F. Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status. *OnLine J. Biol. Sci.* **2020**, *20* (2), 66–76. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76>.
- (23) Thakore, Y. The Biopesticide Market for Global Agricultural Use. *Ind. Biotechnol.* **2006**, *2* (3), 194–208. <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.194>.
- (24) Glare, T.; Caradus, J.; Gelernter, W.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Köhl, J.; Marrone, P.; Morin, L.; Stewart, A. Have Biopesticides Come of Age? *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (5), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>.
- (25) Chaignon, V.; Sanchez-Neira, I.; Herrmann, P.; Jaillard, B.; Hinsinger, P. Copper Bioavailability and Extractability as Related to Chemical Properties of Contaminated Soils from a Vine-Growing Area. *Environ. Pollut.* **2003**, *123* (2), 229–238. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00374-3).
- (26) Delaunois, B.; Farace, G.; Jeandet, P.; Clément, C.; Baillieul, F.; Dorey, S.; Cordelier, S. Elicitors as Alternative Strategy to Pesticides in Grapevine? Current Knowledge on Their Mode of Action from Controlled Conditions to Vineyard. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21* (7), 4837–4846. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>.

- (27) Benhamou, N.; Rey, P. Elicitors of Natural Plant Defense Mechanisms: A New Management Strategy in the Context of Sustainable Production. II. Interest for SDN in Crop Protection. *Phytoprotection* **2012**, *92* (1), 24–35. <https://doi.org/10.7202/1013299ar>.
- (28) Gimenez, E.; Salinas, M.; Manzano-Agugliaro, F. Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture. *Sustainability* **2018**, *10* (2), 391. <https://doi.org/10.3390/su10020391>.
- (29) He, M.; He, C.-Q.; Ding, N.-Z. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>.
- (30) Song, J.; Wang, B. Using Euhalophytes to Understand Salt Tolerance and to Develop Saline Agriculture: Suaeda Salsa as a Promising Model. *Ann. Bot.* **2015**, *115* (3), 541–553. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu194>.
- (31) Kazan, K. Diverse Roles of Jasmonates and Ethylene in Abiotic Stress Tolerance. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20* (4), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.001>.
- (32) Ahuja, I.; de Vos, R. C. H.; Bones, A. M.; Hall, R. D. Plant Molecular Stress Responses Face Climate Change. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15* (12), 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002>.
- (33) Wani, S. H.; Kumar Sah, S. Biotechnology and Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Rice Res. Open Access* **2014**, *2* (2). <https://doi.org/10.4172/jrr.1000e105>.
- (34) Blanchard, A.; Limache, F. Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). **2005**.
- (35) Benhamou, N.; Rey, P. Elicitors of Natural Plant Defense Mechanisms: A New Management Strategy in the Context of Sustainable Production. I. Principles of Induced Resistance. *Phytoprotection* **2012**, *92* (1), 1–23.
- (36) Flor, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1971**, *9* (1), 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.
- (37) Tavernier, E.; Wendehenne, D.; Blein, J. P.; Pugin, A. Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* **1995**, *109* (3), 1025–1031. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.1025>.
- (38) White, P. J.; Broadley, M. R. Calcium in Plants. *Ann. Bot.* **2003**, *92* (4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>.
- (39) Sakano, K. Metabolic Regulation of PH in Plant Cells: Role of Cytoplasmic PH in Defense Reaction and Secondary Metabolism. In *International Review of Cytology*; Academic Press, **2001**, *206*, 1–44. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)06018-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)06018-1).
- (40) Ebel, J.; Mithöfer, A. Early Events in the Elicitation of Plant Defence. *Planta* **1998**, *206*, 335–348. <https://doi.org/10.1007/s004250050409>.

- (41) Appu, M.; Ramalingam, P.; Sathiyarayanan, A.; Huang, J. An Overview of Plant Defense-Related Enzymes Responses to Biotic Stresses. *Plant Gene* **2021**, *27*, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100302>.
- (42) Oku, H.; Shiraishi, T.; Ouchi, S. The Role of Phytoalexin as the Inhibitor of Infection Establishment in Plant Disease. *Sci. Nat.* **1975**, *62* (10), 486–487. <https://doi.org/10.1007/BF00600508>.
- (43) Darvill, A. G.; Albersheim, P. Phytoalexins and Their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1984**, *35* (1), 243–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001331>.
- (44) Dixon, R. A.; Maxwell, C. A.; Ni, W.; Oommen, A.; Paiva, N. L. Genetic Manipulation of Lignin and Phenylpropanoid Compounds Involved in Interactions with Microorganisms. In *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*; Ellis, B. E., Kuroki, G. W., Stafford, H. A., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1994; pp 153–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2544-8_6.
- (45) Sudisha, J.; Sharathchandra, R. G.; Amruthesh, K. N.; Kumar, A.; Shetty, H. S. Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In *Plant Defence: Biological Control*; Mérillon, J. M., Ramawat, K. G., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012; pp 379–403. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_17.
- (46) Bol, J. F.; Linthorst, H. J. M.; Cornelissen, B. J. C. Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1990**, *28* (1), 113–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.000553>.
- (47) Van Loon, L. C.; Van Kammen, A. Polyacrylamide Disc Electrophoresis of the Soluble Leaf Proteins from *Nicotiana Tabacum* Var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’: II. Changes in Protein Constitution after Infection with Tobacco Mosaic Virus. *Virology* **1970**, *40* (2), 199–211. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90395-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90395-8).
- (48) Sels, J.; Mathys, J.; De Coninck, B. M. A.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C. Plant Pathogenesis-Related (PR) Proteins: A Focus on PR Peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46* (11), 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>.
- (49) Silverman, P.; Wilson, T. M. A.; Kleier, D. A. Salicylic Acid Is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *10*.
- (50) Kombrink, E.; Somssich, I. E. Pathogenesis-Related Proteins and Plant Defense. In *Plant Relationships: Part A*; Carroll, G. C., Tudzynski, P., Eds.; The Mycota; Springer: Berlin, Heidelberg, 1997; pp 107–128. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10370-8_7.
- (51) Theis, T.; Stahl, U. Antifungal Proteins: Targets, Mechanisms and Prospective Applications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2004**, *61* (4), 437–455. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3231-4>.

- (52) Ryan, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1990**, *28* (1), 425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>.
- (53) Hartl, M.; Giri, A. P.; Kaur, H.; Baldwin, I. T. The Multiple Functions of Plant Serine Protease Inhibitors: Defense against Herbivores and Beyond. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6* (7), 1009–1011. <https://doi.org/10.4161/psb.6.7.15504>.
- (54) Jamal, F.; Pandey, P. K.; Singh, D.; Khan, M. Y. Serine Protease Inhibitors in Plants: Nature's Arsenal Crafted for Insect Predators. *Phytochem. Rev.* **2013**, *12* (1), 1–34. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9231-y>.
- (55) Martínez, M.; Cambra, I.; González-Melendi, P.; Santamaría, M. E.; Díaz, I. C1A Cysteine-Proteases and Their Inhibitors in Plants. *Physiol. Plant.* **2012**, *145* (1), 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01569.x>.
- (56) Flinn, B. S. Plant Extracellular Matrix Metalloproteinases. *Funct. Plant Biol.* **2008**, *35* (12), 1183. <https://doi.org/10.1071/FP08182>.
- (57) Schimoler-O'Rourke, R.; Richardson, M.; Selitrennikoff, C. P. Zeamatin Inhibits Trypsin and α -Amylase Activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (5), 2365–2366. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2365-2366.2001>.
- (58) Orr, G. L.; Strickland, J. A.; Walsh, T. A. Inhibition of Diabrotica Larval Growth by a Multicystatin from Potato Tubers. *J. Insect Physiol.* **1994**, *40* (10), 893–900. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90023-X).
- (59) Kessler, A.; Baldwin, I. T. Plant Responses To Insect Herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53* (1), 299–328. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207>.
- (60) Boller, T. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, *46* (1), 189–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001201>.
- (61) M. Al Khayri, J.; M. Naik, P. Impact of Abiotic Elicitors on In Vitro Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *J. Adv. Res. Biotechnol.* **2016**, *1* (2), 1–7. <https://doi.org/10.15226/2475-4714/1/2/00102>.
- (62) Nasim, S. A.; Dhir, B. Heavy Metals Alter the Potency of Medicinal Plants. *Rev. Env. Contam. Toxicol.* **2010**, *203*, 139–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4_5.
- (63) Wang, J. W.; Wu, J. Y. Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. In *Biotechnology of Hairy Root Systems*; Doran, P. M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 55–89. https://doi.org/10.1007/10_2013_183.
- (64) Cai, Z.; Kastell, A.; Speiser, C.; Smetanska, I. Enhanced Resveratrol Production in Vitis Vinifera Cell Suspension Cultures by Heavy Metals Without Loss of Cell Viability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171* (2), 330–340. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0354-4>.

- (65) Angelova, Z.; Georgiev, S.; Roos, W. Elicitation of Plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2006**, *20* (2), 72–83. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>.
- (66) Pitta–Alvarez, S. I.; Spollansky, T. C.; Giuliotti, A. M. The Influence of Different Biotic and Abiotic Elicitors on the Production and Profile of Tropane Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Brugmansia Candida*. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26* (2–4), 252–258. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00137-4).
- (67) Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N. Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, *7* (2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- (68) Charles, M. T.; Goulet, A.; Arul, J. Physiological Basis of UV-C Induced Resistance to Botrytis Cinerea in Tomato Fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *47* (1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.019>.
- (69) Charles, M.; Benhamou, N.; Arul, J. Physiological Basis of UV-C Induced Resistance to Botrytis Cinerea in Tomato Fruit: III. Ultrastructural Modifications and Their Impact on Fungal Colonization. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *47*, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.015>.
- (70) Wu, J.; Lin, L. Enhancement of Taxol Production and Release in *Taxus Chinensis* Cell Cultures by Ultrasound, Methyl Jasmonate and in Situ Solvent Extraction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62* (2–3), 151–155. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1275-x>.
- (71) Lin, L.; Wu, J. Enhancement of Shikonin Production in Single- and Two-Phase Suspension Cultures Of *Lithospermum Erythrorhizon* Cells Using Low-Energy Ultrasound. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78* (1), 81–88. <https://doi.org/10.1002/bit.10180>.
- (72) Kneissl, M.; Rass, J. *UV-B Elicitation of Secondary Plant Metabolites. III-Nitride Ultraviolet Emitters.*, Springer International Publishing.; Springer series in materials science; 2016; Vol. 227.
- (73) Hao, G.; Du, X.; Zhao, F.; Shi, R.; Wang, J. Role of Nitric Oxide in UV-B-Induced Activation of PAL and Stimulation of Flavonoid Biosynthesis in *Ginkgo Biloba* Callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2009**, *97* (2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9513-2>.
- (74) Binder, B. Y. K.; Peebles, C. A. M.; Shanks, J. V.; San, K.-Y. The Effects of UV-B Stress on the Production of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus Roseus* Hairy Roots. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25* (3), 861–865. <https://doi.org/10.1002/btpr.97>.
- (75) Ku, K.-L.; Chang, P.-S.; Cheng, Y.-C.; Lien, C.-Y. Production of Stilbenoids from the Callus of *Arachis Hypogaea*: A Novel Source of the Anticancer Compound Piceatannol. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3877–3881. <https://doi.org/10.1021/jf050242o>.
- (76) Xu, A.; Zhan, J.-C.; Huang, W.-D. Effects of Ultraviolet C, Methyl Jasmonate and Salicylic Acid, Alone or in Combination, on Stilbene Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Vitis*

- Vinifera L. Cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2015**, 122 (1), 197–211. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0761-z>.
- (77) Yu, M.; Liu, H.; Shi, A.; Liu, L.; Wang, Q. Preparation of Resveratrol-Enriched and Poor Allergic Protein Peanut Sprout from Ultrasound Treated Peanut Seeds. *Ultrason. Sonochem.* **2016**, 28. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.08.008>.
- (78) Rezaei, A.; Ghanati, F.; Amini Dehaghi, M. Stimulation of Taxol Production by Combined Salicylic Acid Elicitation and Sonication in *Taxus Baccata* Cell Culture. **2011**, 3.
- (79) Liu, C.-Z.; Cheng, X.-Y. Enhancement of Phenylethanoid Glycosides Biosynthesis in Cell Cultures of *Cistanche Deserticola* by Osmotic Stress. *Plant Cell Rep.* **2008**, 27 (2), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0443-3>.
- (80) Kehie, M.; Kumaria, S.; Tandon, P. Manipulation of Culture Strategies to Enhance Capsaicin Biosynthesis in Suspension and Immobilized Cell Cultures of *Capsicum Chinense* Jacq. Cv. Naga King Chili. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, 37 (6), 1055–1063. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1076-2>.
- (81) Gupta, P.; Sharma, S.; Saxena, S. Biomass Yield and Steviol Glycoside Production in Callus and Suspension Culture of *Stevia Rebaudiana* Treated with Proline and Polyethylene Glycol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, 176 (3), 863–874. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1616-0>.
- (82) Zahra Haghighi,. Enhancement of Compatible Solute and Secondary Metabolites Production in *Plantago Ovata* Forsk. by Salinity Stress. *J. Med. Plants Res.* **2012**, 6 (18). <https://doi.org/10.5897/JMPR12.159>.
- (83) Selmar, D. Potential of Salt and Drought Stress to Increase Pharmaceutical Significant Secondary Compounds in Plants. **2008**, 6.
- (84) Fatima, S.; Mujib, A.; Tonk, D. NaCl Amendment Improves Vinblastine and Vincristine Synthesis in *Catharanthus Roseus*: A Case of Stress Signalling as Evidenced by Antioxidant Enzymes Activities. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2015**, 121 (2), 445–458. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0715-5>.
- (85) Ni, J.; Yang, X.; Zhu, J.; Liu, Z.; Ni, Y.; Wu, H.; Zhang, H.; Liu, T. Salinity-Induced Metabolic Profile Changes in *Nitraria Tangutorum* Bobr. Suspension Cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2015**, 122 (1), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0744-0>.
- (86) Li, W. D.; Hou, J. L.; Wang, W. Q.; Tang, X. M.; Liu, C. L.; Xing, D. Effect of Water Deficit on Biomass Production and Accumulation of Secondary Metabolites in Roots of *Glycyrrhiza Uralensis*. *Russ. J. Plant Physiol.* **2011**, 58 (3), 538–542. <https://doi.org/10.1134/S1021443711030101>.
- (87) Hadrami, A. E.; Daayf, F.; Hadrami, I. E. In Vitro Selection for Abiotic Stress in Date Palm. In *Date Palm Biotechnology*; Jain, S. M., Al-Khayri, J. M., Johnson, D. V., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; pp 237–252. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5_12.

- (88) Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology. 2nd Edition*; Massachusetts: Sinauer Associates; 1998.
- (89) Asgher, Mohd.; Khan, M. I. R.; Anjum, N. A.; Khan, N. A. Minimising Toxicity of Cadmium in Plants—Role of Plant Growth Regulators. *Protoplasma* **2015**, *252* (2), 399–413. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0710-4>.
- (90) Zhao, Y. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61* (1), 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>.
- (91) Saini, S.; Sharma, I.; Kaur, N.; Pati, P. K. Auxin: A Master Regulator in Plant Root Development. *Plant Cell Rep.* **2013**, *32* (6), 741–757. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1430-5>.
- (92) Lewis, D. R.; Negi, S.; Sukumar, P.; Muday, G. K. Ethylene Inhibits Lateral Root Development, Increases IAA Transport and Expression of PIN3 and PIN7 Auxin Efflux Carriers. *Development* **2011**, *138* (16), 3485–3495. <https://doi.org/10.1242/dev.065102>.
- (93) Tivendale, N. D.; Ross, J. J.; Cohen, J. D. The Shifting Paradigms of Auxin Biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19* (1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.012>.
- (94) Korasick, D. A.; Enders, T. A.; Strader, L. C. Auxin Biosynthesis and Storage Forms. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64* (9), 2541–2555. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>.
- (95) Tao, Y.; Ferrer, J.-L.; Ljung, K.; Pojer, F.; Hong, F.; Long, J. A.; Li, L.; Moreno, J. E.; Bowman, M. E.; Ivans, L. J.; Cheng, Y.; Lim, J.; Zhao, Y.; Ballaré, C. L.; Sandberg, G.; Noel, J. P.; Chory, J. Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell* **2008**, *133* (1), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.049>.
- (96) Costacurta, A.; Keijers, V.; Vanderleyden, J. Molecular Cloning and Sequence Analysis of an *Azospirillum Brasilense* Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1994**, *243* (4), 463–472. <https://doi.org/10.1007/BF00280477>.
- (97) Koga, J.; Adachi, T.; Hidaka, H. Purification and Characterization of Indolepyruvate Decarboxylase. A Novel Enzyme for Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Enterobacter Cloacae*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (22), 15823–15828. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49609-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49609-9).
- (98) Seo, M.; Akaba, S.; Oritani, T.; Delarue, M.; Bellini, C.; Caboche, M.; Koshiba, T. Higher Activity of an Aldehyde Oxidase in the Auxin-Overproducing Superroot1 Mutant of *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Physiol.* **1998**, *116* (2), 687–693.
- (99) Dai, X.; Hayashi, K.; Nozaki, H.; Cheng, Y.; Zhao, Y. Genetic and Chemical Analyses of the Action Mechanisms of Sirtinol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (8), 3129–3134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500185102>.
- (100) Comai, L.; Kosuge, T. Cloning Characterization of IaaM, a Virulence Determinant of *Pseudomonas Savastanoi*. *J. Bacteriol.* **1982**, *149* (1), 40–46. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.40-46.1982>.

- (101) Camilleri, C.; Jouanin, L. The TR-DNA Region Carrying the Auxin Synthesis Genes of the Agrobacterium Rhizogenes Agropine-Type Plasmid PRiA4: Nucleotide Sequence Analysis and Introduction into Tobacco Plants. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **1991**, *4* (2), 155–162. <https://doi.org/10.1094/mpmi-4-155>.
- (102) Pollmann, S.; DÜchting, P.; Weiler, E. W. Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by ‘IAA-Synthase’ Proceeds via Indole-3-Acetamide. *Phytochemistry* **2009**, *70* (4), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.021>.
- (103) Pollmann, S.; Neu, D.; Weiler, E. W. Molecular Cloning and Characterization of an Amidase from Arabidopsis Thaliana Capable of Converting Indole-3-Acetamide into the Plant Growth Hormone, Indole-3-Acetic Acid. *Phytochemistry* **2003**, *62* (3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00563-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00563-0).
- (104) Mano, Y.; Nemoto, K. The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63* (8), 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>.
- (105) Enders, T. A.; Strader, L. C. Auxin Activity: Past, Present, and Future. *Am. J. Bot.* **2015**, *102* (2), 180–196. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>.
- (106) Howden, A. J. M.; Preston, G. M. Nitrilase Enzymes and Their Role in Plant–Microbe Interactions. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2* (4), 441–451. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00111.x>.
- (107) Schmidt, R.-C.; Müller, A.; Hain, R.; Bartling, D.; Weiler, E. W. Transgenic Tobacco Plants Expressing the Arabidopsis Thaliana Nitrilase II Enzyme. *Plant J.* **1996**, *9* (5), 683–691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9050683.x>.
- (108) Bowers, A. K.; Zhao, Y. Recent Advances in Auxin Biosynthesis and Conjugation. In *Recent Advances in Phytochemistry*; Elsevier, 2006; Vol. 40, 271–285. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(06\)80045-6](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(06)80045-6).
- (109) Malka, S. K.; Cheng, Y. Possible Interactions between the Biosynthetic Pathways of Indole Glucosinolate and Auxin. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 2131. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02131>.
- (110) Sugawara, S.; Hishiyama, S.; Jikumaru, Y.; Hanada, A.; Nishimura, T.; Koshiha, T.; Zhao, Y.; Kamiya, Y.; Kasahara, H. Biochemical Analyses of Indole-3-Acetaldoxime-Dependent Auxin Biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (13), 5430–5435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811226106>.
- (111) Tromas, A.; Perrot-Rechenmann, C. Recent Progress in Auxin Biology. *C. R. Biol.* **2010**, *333* (4), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.01.005>.
- (112) Simon, S.; Petrášek, J. Why Plants Need More than One Type of Auxin. *Plant Sci.* **2011**, *180* (3), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.007>.

- (113) Porter, W. L.; Thimann, K. V. Molecular Requirements for Auxin Action—I: Halogenated Indoles and Indoleacetic Acid. *Phytochemistry* **1965**, *4* (2), 229–243. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86169-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86169-5).
- (114) Ludwig-Müller, J. Indole-3-Butyric Acid in Plant Growth and Development. 12.
- (115) Zimmerman, P.; Wilcoxon, F. Several Chemical Growth Substances Which Cause Initiation of Roots and Other Responses in Plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **1935**, *7* (3), 209–229.
- (116) Koepfli, J. B.; Thimann, K. V.; Went, F. W. PHYTOHORMONES: STRUCTURE AND PHYSIOLOGICAL ACTIVITY. I. *J. Biol. Chem.* **1938**, *122* (3), 763–780. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)74205-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74205-1).
- (117) Busi, R.; Goggin, D. E.; Heap, I. M.; Horak, M. J.; Jugulam, M.; Masters, R. A.; Napier, R. M.; Riar, D. S.; Satchivi, N. M.; Torra, J.; Westra, P.; Wright, T. R. Weed Resistance to Synthetic Auxin Herbicides. *Pest Manag. Sci.* **2018**, *74* (10), 2265–2276. <https://doi.org/10.1002/ps.4823>.
- (118) Demole, E.; Lederer, E.; Mercier, D. Isolement et Détermination de La Structure Du Jasmonate de Méthyle, Constituant Odorant Caractéristique de l'essence de Jasmin. *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45* (2), 675–685. <https://doi.org/10.1002/hlca.19620450233>.
- (119) Aldridge, D. C.; Galt, S.; Giles, D.; Turner, W. B. Metabolites of *Lasiodiplodia Theobromae*. *J. Chem. Soc. C Org.* **1971**, 1623. <https://doi.org/10.1039/j39710001623>.
- (120) Holbrook, L.; Tung, P.; Ward, K.; Reid, D. M.; Abrams, S.; Lamb, N.; Quail, J. W.; Moloney, M. M. Importance of the Chiral Centers of Jasmonic Acid in the Responses of Plants (Activities and Antagonism between Natural and Synthetic Analogs). *Plant Physiol.* **1997**, *114* (2), 419–428.
- (121) Wang, J.; Wu, D.; Wang, Y.; Xie, D. Jasmonate Action in Plant Defense against Insects. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70* (13), 3391–3400. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz174>.
- (122) Howe, G. A.; Jander, G. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59* (1), 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.
- (123) Browse, J.; Howe, G. A. New Weapons and a Rapid Response against Insect Attack. *Plant Physiol.* **2008**, *146* (3), 832–838. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115683>.
- (124) Glazebrook, J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43* (1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>.
- (125) Halim, V. A.; Vess, A.; Scheel, D.; Rosahl, S. The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogen Defence. *Plant Biol.* **2006**, *8* (3), 307–313. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924025>.
- (126) Pena-Cortes, H.; Barrios, P.; Dorta, F.; Polanco, V.; Sanchez, C.; Sanchez, E.; Ramírez, I. Involvement of Jasmonic Acid and Derivatives in Plant Responses to Pathogens and Insects and in Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* **2004**, *23*. <https://doi.org/10.1007/BF02637265>.
- (127) Pedranzani, H.; Racagni, G.; Alemano, S.; Miersch, O.; Ramírez, I.; Peña-Cortés, H.; Taleisnik, E.; Machado-Domenech, E.; Abdala, G. Salt Tolerant Tomato Plants Show Increased Levels of

- Jasmonic Acid. *Plant Growth Regul.* **2003**, *41* (2), 149–158. <https://doi.org/10.1023/A:1027311319940>.
- (128) Mewis, I.; Schreiner, M.; Nguyen, C. N.; Krumbein, A.; Ulrichs, C.; Lohse, M.; Zrenner, R. UV-B Irradiation Changes Specifically the Secondary Metabolite Profile in Broccoli Sprouts: Induced Signaling Overlaps with Defense Response to Biotic Stressors. *Plant Cell Physiol.* **2012**, *53* (9), 1546–1560. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs096>.
- (129) Balbi, V.; Devoto, A. Jasmonate Signalling Network in *Arabidopsis Thaliana*: Crucial Regulatory Nodes and New Physiological Scenarios. *New Phytol.* **2008**, *177* (2), 301–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02292.x>.
- (130) Wasternack, C.; Goetz, S.; Hellwege, A.; Forner, S.; Strnad, M.; Hause, B. Another JA/COI1-Independent Role of OPDA Detected in Tomato Embryo Development. *Plant Signal. Behav.* **2012**, *7* (10), 1349–1353. <https://doi.org/10.4161/psb.21551>.
- (131) De Geyter, N.; Gholami, A.; Goormachtig, S.; Goossens, A. Transcriptional Machineries in Jasmonate-Elicited Plant Secondary Metabolism. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17* (6), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>.
- (132) Pelacho, A. M.; Mingo-Castel, A. M. Jasmonic Acid Induces Tuberization of Potato Stolons Cultured *in Vitro*. *Plant Physiol.* **1991**, *97* (3), 1253–1255. <https://doi.org/10.1104/pp.97.3.1253>.
- (133) Pieterse, C. M. J.; Van Wees, S. C. M.; Ton, J.; Van Pelt, J. A.; Van Loon, L. C. Signalling in Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Biol.* **2002**, *4* (5), 535–544. <https://doi.org/10.1055/s-2002-35441>.
- (134) Pieterse, C. M. J.; Van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; Van Wees, S. C. M. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28* (1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>.
- (135) Seltmann, M. A.; Stingl, N. E.; Lautenschlaeger, J. K.; Krischke, M.; Mueller, M. J.; Berger, S. Differential Impact of Lipoxygenase 2 and Jasmonates on Natural and Stress-Induced Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2010**, *152* (4), 1940–1950. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153114>.
- (136) Pangesti, N.; Reichelt, M.; van de Mortel, J. E.; Kapsomenou, E.; Gershenzon, J.; van Loon, J. J. A.; Dicke, M.; Pineda, A. Jasmonic Acid and Ethylene Signaling Pathways Regulate Glucosinolate Levels in Plants During Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance Against a Leaf-Chewing Herbivore. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42* (12), 1212–1225. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0787-7>.
- (137) Onkokesung, N.; Baldwin, I. T.; Gális, I. The Role of Jasmonic Acid and Ethylene Crosstalk in Direct Defense of *Nicotiana Attenuata* Plants against Chewing Herbivores. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5* (10), 1305–1307. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.13124>.

- (138) Ding, L.-N.; Yang, G.-X.; Yang, R.-Y.; Cao, J.; Zhou, Y. Investigating Interactions of Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Pathways in Monocots Wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2016**, *93*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.002>.
- (139) Schweiger, R.; Heise, A.-M.; Persicke, M.; Müller, C. Interactions between the Jasmonic and Salicylic Acid Pathway Modulate the Plant Metabolome and Affect Herbivores of Different Feeding Types. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37* (7), 1574–1585. <https://doi.org/10.1111/pce.12257>.
- (140) Mueller, M. J. Enzymes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis. *Physiol. Plant.* **1997**, *100* (3), 653–663. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03072.x>.
- (141) Thines, B.; Katsir, L.; Melotto, M.; Niu, Y.; Mandaokar, A.; Liu, G.; Nomura, K.; He, S. Y.; Howe, G. A.; Browse, J. JAZ Repressor Proteins Are Targets of the SCFCO11 Complex during Jasmonate Signalling. *Nature* **2007**, *448* (7154), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>.
- (142) Chini, A.; Fonseca, S.; Fernández, G.; Adie, B.; Chico, J. M.; Lorenzo, O.; García-Casado, G.; López-Vidriero, I.; Lozano, F. M.; Ponce, M. R.; Micol, J. L.; Solano, R. The JAZ Family of Repressors Is the Missing Link in Jasmonate Signalling. *Nature* **2007**, *448* (7154), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>.
- (143) Campos, M. L.; Kang, J.-H.; Howe, G. A. Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40* (7), 657–675. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3>.
- (144) Thurow, C.; Krischke, M.; Mueller, M. J.; Gatz, C. Induction of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile)-Dependent JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) Genes in NaCl-Treated Arabidopsis Thaliana Roots Can Occur at Very Low JA-Ile Levels and in the Absence of the JA/JA-Ile Transporter JAT1/AtABCG16. *Plants* **2020**, *9* (12), 1635. <https://doi.org/10.3390/plants9121635>.
- (145) Farmer, E. E. Jasmonate Perception Machines. *Nature* **2007**, *448* (7154), 659–660. <https://doi.org/10.1038/448659a>.
- (146) Sato, C.; Aikawa, K.; Sugiyama, S.; Nabeta, K.; Masuta, C.; Matsuura, H. Distal Transport of Exogenously Applied Jasmonoyl-Isoleucine with Wounding Stress. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52* (3), 509–517. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr011>.
- (147) Gapper, N. E.; Norris, G. E.; Clarke, S. F.; Lill, R. E.; Jameson, P. E. Novel Jasmonate Amino Acid Conjugates in Asparagus Officinalis during Harvest-Induced and Natural Foliar Senescence. *Physiol. Plant.* **2002**, *114* (1), 116–124. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140116.x>.
- (148) Staswick, P.; Rowe, M.; Spalding, E. P.; Splitt, B. L. Jasmonoyl-L-Tryptophan Disrupts IAA Activity through the AUX1 Auxin Permease. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 736. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00736>.
- (149) Wasternack, C.; Strnad, M. Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (9), 2539. <https://doi.org/10.3390/ijms19092539>.

- (150) Disi, J. O.; Zebelo, S.; Ngumbi, E.; Fadamiro, H. Y. Cis-Jasmone Primes Defense Pathways in Tomato via Emission of Volatile Organic Compounds and Regulation of Genes with Consequences for *Spodoptera Exigua* Oviposition. *Arthropod-Plant Interact.* **2017**, *11* (4), 591–602. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9503-y>.
- (151) Neljubow, D. Über Die Horizontale Nutation Der Stengel von *Pisum Sativum* Und Einiger Anderen Pflanzen. **1901** *Beih Bot Zentralbl.* *10*, 128–139.
- (152) Khan, N. A. The Influence of Exogenous Ethylene on Growth and Photosynthesis of Mustard (*Brassica Juncea*) Following Defoliation. *Sci. Hortic.* **2005**, *105* (4), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.02.004>.
- (153) Fiorani, F.; Bögemann, G. M.; Visser, E. J. W.; Lambers, H.; Voesenek, L. A. C. J. Ethylene Emission and Responsiveness to Applied Ethylene Vary among *Poa* Species That Inherently Differ in Leaf Elongation Rates. *Plant Physiol.* **2002**, *129* (3), 1382–1390. <https://doi.org/10.1104/pp.001198>.
- (154) Voisin, A.-S.; Reidy, B.; Parent, B.; Rolland, G.; Redondo, E.; Gerentes, D.; Tardieu, F.; Muller, B. Are ABA, Ethylene or Their Interaction Involved in the Response of Leaf Growth to Soil Water Deficit? An Analysis Using Naturally Occurring Variation or Genetic Transformation of ABA Production in Maize. *Plant Cell Environ.* **2006**, *29* (9), 1829–1840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01560.x>.
- (155) Hunter, D. A.; Yoo, S. D.; Butcher, S. M.; McManus, M. T. Expression of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase during Leaf Ontogeny in White Clover1. *Plant Physiol.* **1999**, *120* (1), 131–142. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.131>.
- (156) Iqbal, N.; Khan, N. A.; Ferrante, A.; Trivellini, A.; Francini, A.; Khan, M. I. R. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Front. Plant Sci.* **2017**, *0*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>.
- (157) García, A.; Aguado, E.; Garrido, D.; Martínez, C.; Jamilena, M. Two Androecious Mutations Reveal the Crucial Role of Ethylene Receptors in the Initiation of Female Flower Development in *Cucurbita Pepo*. *Plant J.* **2020**, *103* (4), 1548–1560. <https://doi.org/10.1111/tpj.14846>.
- (158) Barry, C. S.; Giovannoni, J. J. Ethylene and Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* **2007**, *26* (2), 143–159. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9002-y>.
- (159) Chaves, A. L. S.; Mello-Farias, P. C. de. Ethylene and Fruit Ripening: From Illumination Gas to the Control of Gene Expression, More than a Century of Discoveries. *Genet. Mol. Biol.* **2006**, *29* (3), 508–515. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300020>.
- (160) Zhao, D.; Shen, L.; Fan, B.; Yu, M.; Zheng, Y.; Lv, S.; Sheng, J. Ethylene and Cold Participate in the Regulation of *LeCBF1* Gene Expression in Postharvest Tomato Fruits. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (20), 3329–3334. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.029>.
- (161) Li, C.-H.; Wang, G.; Zhao, J.-L.; Zhang, L.-Q.; Ai, L.-F.; Han, Y.-F.; Sun, D.-Y.; Zhang, S.-W.; Sun, Y. The Receptor-Like Kinase *SIT1* Mediates Salt Sensitivity by Activating *MAPK3/6*

- and Regulating Ethylene Homeostasis in Rice. *Plant Cell* **2014**, *26* (6), 2538–2553. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125187>.
- (162) Liu, J.; Liu, G.; Hou, L.; Liu, X. Ethylene-Induced Nitric Oxide Production and Stomatal Closure in Arabidopsis Thaliana Depending on Changes in Cytosolic PH. *Chin. Sci. Bull.* **2010**, *55* (22), 2403–2409. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4033-3>.
- (163) Adams, D. O.; Yang, S. F. Methionine Metabolism in Apple Tissue. *Plant Physiol.* **1977**, *60* (6), 892–896. <https://doi.org/10.1104/pp.60.6.892>
- (164) Lieberman, M.; Kunishi, A.; Mapson, L. W.; Wardale, D. A. Stimulation of Ethylene Production in Apple Tissue Slices by Methionine. *Plant Physiol.* **1966**, *41* (3), 376–382. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.376>
- (165) Xu, J.; Zhang, S. Ethylene Biosynthesis and Regulation in Plants. In *Ethylene in Plants*; Wen, C.-K., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, **2015**; pp 1–25. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9484-8_1.
- (166) Adams, D. O.; Yang, S. F. Methionine Metabolism in Apple Tissue: Implication of s-Adenosylmethionine as an Intermediate in the Conversion of Methionine to Ethylene. *Plant Physiol.* **1977**, *60* (6), 892–896. <https://doi.org/10.1104/pp.60.6.892>.
- (167) Yu, Y.-B.; Adams, D. O.; Yang, S. F. 1-Aminocyclopropanecarboxylate Synthase, a Key Enzyme in Ethylene Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *198* (1), 280–286. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-X).
- (168) Baur, A. H.; Yang, S. F. Methionine Metabolism in Apple Tissue in Relation to Ethylene Biosynthesis. *Phytochemistry* **1972**, *11* (11), 3207–3214. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86375-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86375-X).
- (169) Yang, S. F.; Hoffman, N. E. Ethylene Biosynthesis and Its Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1984**, *35* (1), 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>.
- (170) Miyazaki, J. H.; Yang, S. F. The Methionine Salvage Pathway in Relation to Ethylene and Polyamine Biosynthesis. *Physiol. Plant.* **1987**, *69* (2), 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04302.x>.
- (171) Shojima, S.; Nishizawa, N. K.; Fushiya, S.; Nozoe, S.; Kumashiro, T.; Nagata, T.; Ohata, T.; Mori, S. Biosynthesis of Nicotianamine in the Suspension-Cultured Cells of Tobacco (*Nicotiana Megalosiphon*). *Biol. Met.* **1989**, *2* (3), 142–145. <https://doi.org/10.1007/BF01142552>.
- (172) Yu, X.; Xu, Y.; Yan, S. Salicylic Acid and Ethylene Coordinately Promote Leaf Senescence. *J. Integr. Plant Biol.* **2021**, *63* (5), 823–827. <https://doi.org/10.1111/jipb.13074>.
- (173) Kolbe, H. Ueber Synthese Der Salicylsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, *113* (1), 125–127. <https://doi.org/10.1002/jlac.18601130120>.

- (174) Jack, D. B. One Hundred Years of Aspirin. *The Lancet* **1997**, 350 (9075), 437–439. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07087-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07087-6).
- (175) Maclagan, T. The Treatment of Acute Rheumatism by Salicin. *The Lancet* **1876**, 107 (2741), 383–384. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)32013-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)32013-0).
- (176) Desborough, M. J. R.; Keeling, D. M. The Aspirin Story – from Willow to Wonder Drug. *Br. J. Haematol.* **2017**, 177 (5), 674–683. <https://doi.org/10.1111/bjh.14520>.
- (177) Jones, A. W. Early Drug Discovery and the Rise of Pharmaceutical Chemistry. *Drug Test. Anal.* **2011**, 3 (6), 337–344. <https://doi.org/10.1002/dta.301>.
- (178) VANE, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature. New Biol.* **1971**, 231 (25), 232–235. <https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>.
- (179) Chiarito, M.; Sanz-Sánchez, J.; Cannata, F.; Cao, D.; Sturla, M.; Panico, C.; Godino, C.; Regazzoli, D.; Reimers, B.; De Caterina, R.; Condorelli, G.; Ferrante, G.; Stefanini, G. G. Monotherapy with a P2Y12 Inhibitor or Aspirin for Secondary Prevention in Patients with Established Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet* **2020**, 395 (10235), 1487–1495. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30315-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30315-9).
- (180) Kune, G. A.; Kune, S.; Watson, L. F. Colorectal Cancer Risk, Chronic Illnesses, Operations, and Medications: Case Control Results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* **1988**, 48 (15), 4399.
- (181) Rosenberg, L.; Palmer, J. R.; Zauber, A. G.; Warshauer, M. E.; Stolley, P. D.; Shapiro, S. A Hypothesis: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Reduce the Incidence of Large-Bowel Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83 (5), 355–358. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.5.355>.
- (182) Rothwell, P. M.; Wilson, M.; Price, J. F.; Belch, J. F.; Meade, T. W.; Mehta, Z. Effect of Daily Aspirin on Risk of Cancer Metastasis: A Study of Incident Cancers during Randomised Controlled Trials. *The Lancet* **2012**, 379 (9826), 1591–1601. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60209-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60209-8).
- (183) Haynes, W. M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics (92nd Ed.)*, New edition.; Taylor & Francis Inc, **2011**.
- (184) White, R. F. Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco. *Virology* **1979**, 99 (2), 410–412. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90019-9).
- (185) Ogawa, D.; Nakajima, N.; Seo, S.; Mitsuhashi, I.; Kamada, H.; Ohashi, Y. The Phenylalanine Pathway Is the Main Route of Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco Leaves. *Plant Biotechnol.* **2006**, 23 (4), 395–398. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.395>.
- (186) Hao, Q.; Wang, W.; Han, X.; Wu, J.; Lyu, B.; Chen, F.; Caplan, A.; Li, C.; Wu, J.; Wang, W.; Xu, Q.; Fu, D. Isochorismate-Based Salicylic Acid Biosynthesis Confers Basal Resistance to *Fusarium Graminearum* in Barley. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, 19 (8), 1995–2010. <https://doi.org/10.1111/mpp.12675>.

- (187) Kim, D. S.; Hwang, B. K. An Important Role of the Pepper Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene (PAL1) in Salicylic Acid-Dependent Signalling of the Defence Response to Microbial Pathogens. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65* (9), 2295–2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>.
- (188) Zhao, X.; Chen, S.; Wang, S.; Shan, W.; Wang, X.; Lin, Y.; Su, F.; Yang, Z.; Yu, X. Defensive Responses of Tea Plants (*Camellia Sinensis*) Against Tea Green Leafhopper Attack: A Multi-Omics Study. *Front. Plant Sci.* **2020**, *10*, 1705. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01705>.
- (189) Tripathi, D.; Raikhy, G.; Kumar, D. Chemical Elicitors of Systemic Acquired Resistance—Salicylic Acid and Its Functional Analogs. *Plant-Pathog. Interact. Their Control Conv. Vs Mod. Approach* **2019**, *17*, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>.
- (190) Wang, Y.; Liu, J.-H. Exogenous Treatment with Salicylic Acid Attenuates Occurrence of Citrus Canker in Susceptible Navel Orange (*Citrus Sinensis* Osbeck). *J. Plant Physiol.* **2012**, *169* (12), 1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.03.018>.
- (191) Zhang, Y.; Li, X. Salicylic Acid: Biosynthesis, Perception, and Contributions to Plant Immunity. *Biot. Interact.* **2019**, *50*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.004>.
- (192) Maksimov, I.; Yarullina, L. Salicylic Acid and Local Resistance to Pathogens. In *Salicylic Acid: A Plant Hormone*; 2007; pp 323–334. https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_11.
- (193) López-Gresa, M. P.; Lisón, P.; Yenush, L.; Conejero, V.; Rodrigo, I.; Bellés, J. Salicylic Acid Is Involved in the Basal Resistance of Tomato Plants to Citrus Exocortis Viroid and Tomato Spotted Wilt Virus. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0166938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>.
- (194) Horvath, D.; Chua, N. H. The Role of Salicylic Acid in Systemic Acquired Resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, *5*, 131–136. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(05\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(05)80025-4).
- (195) Zhang, Y.; Xu, S.; Ding, P.; Wang, D.; Cheng, Y. T.; He, J.; Gao, M.; Xu, F.; Li, Y.; Zhu, Z.; Li, X.; Zhang, Y. Control of Salicylic Acid Synthesis and Systemic Acquired Resistance by Two Members of a Plant-Specific Family of Transcription Factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (42), 18220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005225107>.
- (196) Klessig, D. F.; Choi, H. W.; Dempsey, D. A. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* **2018**, *31* (9), 871–888. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>.
- (197) Hayat, S.; Khan, N. A.; Alyemeni, M. *Salicylic Acid: Plant Growth and Development.*; 2013.
- (198) Arif, Y.; Sami, F.; Siddiqui, H.; Bajguz, A.; Hayat, S. Salicylic Acid in Relation to Other Phytohormones in Plant: A Study towards Physiology and Signal Transduction under Challenging Environment. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *175*, 104040. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104040>.
- (199) Rajjou, L.; Belghazi, M.; Huguet, R.; Robin, C.; Moreau, A.; Job, C.; Job, D. Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and

- Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiol.* **2006**, *141* (3), 910–923. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082057>.
- (200) Alonso-Ramírez, A.; Rodríguez, D.; Reyes, D.; Jiménez, J. A.; Nicolás, G.; López-Climent, M.; Gómez-Cadenas, A.; Nicolás, C. Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiol.* **2009**, *150* (3), 1335–1344. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139352>.
- (201) Anaya, F.; Fghire, R.; Wahbi, S.; Loutfi, K. Influence of Salicylic Acid on Seed Germination of Vicia Faba L. under Salt Stress. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2018**, *17* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.10.002>.
- (202) Lee, S.; Park, C.-M. Modulation of Reactive Oxygen Species by Salicylic Acid in Arabidopsis Seed Germination under High Salinity. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5* (12), 1534–1536. <https://doi.org/10.4161/psb.5.12.13159>.
- (203) Gutiérrez-Coronado, M. A.; Trejo-López, C.; Larqué-Saavedra, A. Effects of Salicylic Acid on the Growth of Roots and Shoots in Soybean. *Plant Physiol. Biochem.* **1998**, *36* (8), 563–565. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80003-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80003-X).
- (204) Zhang, C. X.; Feng, B. H.; Chen, T. T.; Zhang, X. F.; Tao, L. X.; Fu, G. F. Sugars, Antioxidant Enzymes and IAA Mediate Salicylic Acid to Prevent Rice Spikelet Degeneration Caused by Heat Stress. *Plant Growth Regul.* **2017**, *83* (2), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0296-x>.
- (205) Miura, K.; Lee, J.; Miura, T.; Hasegawa, P. M. SIZ1 Controls Cell Growth and Plant Development in Arabidopsis Through Salicylic Acid. *Plant Cell Physiol.* **2010**, *51* (1), 103–113. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp171>.
- (206) Gallego-Giraldo, L.; Escamilla-Trevino, L.; Jackson, L. A.; Dixon, R. A. Salicylic Acid Mediates the Reduced Growth of Lignin Down-Regulated Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (51), 20814–20819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117873108>.
- (207) Jabbarzadeh, Z.; Khosh-Khui, M.; Salehi, H. The Effect of Foliar-Applied Salicylic Acid on Flowering of African Violet. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **2009**, *3* (4), 4693–4696.
- (208) Promyou, S.; Ketsa, S.; van Doorn, W. G. Salicylic Acid Alleviates Chilling Injury in Anthurium (*Anthurium Andraeanum* L.) Flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *64* (1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.10.002>.
- (209) Uzunova, A. N.; Popova, L. P. Effect of Salicylic Acid on Leaf Anatomy and Chloroplast Ultrastructure of Barley Plants. *Photosynthetica* **2000**, *38* (2), 243–250. <https://doi.org/10.1023/A:1007226116925>.
- (210) Melotto, M.; Underwood, W.; Koczan, J.; Nomura, K.; He, S. Y. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **2006**, *126* (5), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>.

- (211) Pancheva, T. V.; Popova, L. P. Effect of Salicylic Acid on the Synthesis of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Barley Leaves. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152* (4), 381–386. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80251-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80251-4).
- (212) Slaymaker, D. H.; Navarre, D. A.; Clark, D.; del Pozo, O.; Martin, G. B.; Klessig, D. F. The Tobacco Salicylic Acid-Binding Protein 3 (SABP3) Is the Chloroplast Carbonic Anhydrase, Which Exhibits Antioxidant Activity and Plays a Role in the Hypersensitive Defense Response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (18), 11640. <https://doi.org/10.1073/pnas.182427699>.
- (213) Ananieva, E. A.; Alexieva, V. S.; Popova, L. P. Treatment with Salicylic Acid Decreases the Effects of Paraquat on Photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **2002**, *159* (7), 685–693. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0706>.
- (214) Krantev, A.; Yordanova, R.; Janda, T.; Szalai, G.; Popova, L. Treatment with Salicylic Acid Decreases the Effect of Cadmium on Photosynthesis in Maize Plants. *J. Plant Physiol.* **2008**, *165* (9), 920–931. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.014>.
- (215) Shah, J. The Salicylic Acid Loop in Plant Defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2003**, *6* (4), 365–371. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00058-X).
- (216) Vlot, A. C.; Dempsey, D. A.; Klessig, D. F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2009**, *47* (1), 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>.
- (217) Gaffney Thomas; Friedrich Leslie; Vernooij Bernard; Negrotto David; Nye Gordon; Uknes Scott; Ward Eric; Kessmann Helmut; Ryals John. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* **1993**, *261* (5122), 754–756. <https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>.
- (218) Métraux J. P.; Signer H.; Ryals J.; Ward E.; Wyss-Benz M.; Gaudin J.; Raschdorf K.; Schmid E.; Blum W.; Inverardi B. Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science* **1990**, *250* (4983), 1004–1006. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004>.
- (219) Singh, L. In Vitro Screening of Some Chemicals against Three Phytopathogenic Fungi. *J. Indian Bot. Soc.* **1978**, No. 57, 191–195.
- (220) Saint-Pierre, B.; Miville, L.; Dion, P. The Effects of Salicylates on Phenomena Related to Crown Gall. *Can. J. Bot.* **1984**, *62* (4), 729–734. <https://doi.org/10.1139/b84-106>.
- (221) Rocher, F.; Chollet, J.-F.; Jousse, C.; Bonnemain, J.-L. Salicylic Acid, an Ambimobile Molecule Exhibiting a High Ability to Accumulate in the Phloem. *Plant Physiol.* **2006**, *141* (4), 1684–1693. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082537>.
- (222) Lefevre, H.; Bauters, L.; Gheysen, G. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>.
- (223) Jagadeeswaran, G.; Raina, S.; Acharya, B. R.; Maqbool, S. B.; Mosher, S. L.; Appel, H. M.; Schultz, J. C.; Klessig, D. F.; Raina, R. Arabidopsis GH3-LIKE DEFENSE GENE 1 Is

- Required for Accumulation of Salicylic Acid, Activation of Defense Responses and Resistance to *Pseudomonas Syringae*. *Plant J.* **2007**, *51* (2), 234–246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03130.x>.
- (224) Torrens-Spence, M. P.; Bobokalonova, A.; Carballo, V.; Glinkerman, C. M.; Pluskal, T.; Shen, A.; Weng, J.-K. PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2019**, *12* (12), 1577–1586. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005>.
- (225) Lee, M. W.; Lu, H.; Jung, H. W.; Greenberg, J. T. A Key Role for the *Arabidopsis* WIN3 Protein in Disease Resistance Triggered by *Pseudomonas Syringae* That Secrete AvrRpt2. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® **2007**, *20* (10), 1192–1200. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1192>.
- (226) Arent, S.; Christensen, C. E.; Pye, V. E.; Nørgaard, A.; Henriksen, A. The Multifunctional Protein in Peroxisomal β -Oxidation: STRUCTURE AND SUBSTRATE SPECIFICITY OF THE *ARABIDOPSIS THALIANA* PROTEIN MFP2 *. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (31), 24066–24077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106005>.
- (227) Rylott, E. L.; Eastmond, P. J.; Gilday, A. D.; Slocombe, S. P.; Larson, T. R.; Baker, A.; Graham, I. A. The *Arabidopsis* Thaliana Multifunctional Protein Gene (MFP2) of Peroxisomal β -Oxidation Is Essential for Seedling Establishment. *Plant J.* **2006**, *45* (6), 930–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02650.x>.
- (228) León, J.; Shulaev, V.; Yalpani, N.; Lawton, M. A.; Raskin, I. Benzoic Acid 2-Hydroxylase, a Soluble Oxygenase from Tobacco, Catalyzes Salicylic Acid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (22), 10413. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10413>.
- (229) Dean, J. V.; Delaney, S. P. Metabolism of Salicylic Acid in Wild-Type, Ugt74f1 and Ugt74f2 Glucosyltransferase Mutants of *Arabidopsis Thaliana*. *Physiol. Plant.* **2008**, *132* (4), 417–425. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01041.x>.
- (230) Jong Tae Song. Induction of a Salicylic Acid Glucosyltransferase, AtSGT1, Is an Early Disease Response in *Arabidopsis Thaliana*. *Mol. Cells* **2006**, *22* (2), 233–238.
- (231) Mishra, A.; Baek, K.-H. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism: A Divergent Pathway for Plants and Bacteria. *Biomolecules* **2021**, *11* (5), 705. <https://doi.org/10.3390/biom11050705>.
- (232) Dean, J. V.; Shah, R. P.; Mohammed, L. A. Formation and Vacuolar Localization of Salicylic Acid Glucose Conjugates in Soybean Cell Suspension Cultures. *Physiol. Plant.* **2003**, *118* (3), 328–336. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00117.x>.
- (233) Dempsey, D. A.; Vlot, A. C.; Wildermuth, M. C.; Klessig, D. F. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arab. Book* **2011**, *9*, e0156. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>.
- (234) Steffan, H.; Ziegler, A. N-Salicyloyl-Aspartic Acid: A New Phenolic Compound in Grapevines. *Vitis* **1988**, *27*, 79–86.

- (235) Bourne, D. J.; Barrow, K. D.; Milborrow, B. V. Salicyloylaspartate as an Endogenous Component in the Leaves of *Phaseolus Vulgaris*. *Phytochemistry* **1991**, *30* (12), 4041–4044. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83462-T](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83462-T).
- (236) Zhang, Z.; Li, Q.; Li, Z.; Staswick, P. E.; Wang, M.; Zhu, Y.; He, Z. Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas Syringae* Interaction. *Plant Physiol.* **2007**, *145* (2), 450–464. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106021>.
- (237) Chen, Y.; Shen, H.; Wang, M.; Li, Q.; He, Z. Salicyloyl-Aspartate Synthesized by the Acetyl-Amido Synthetase GH3.5 Is a Potential Activator of Plant Immunity in *Arabidopsis*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2013**, *45* (10), 827–836. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt078>.
- (238) Chen, F.; D’Auria, J. C.; Tholl, D.; Ross, J. R.; Gershenzon, J.; Noel, J. P.; Pichersky, E. An *Arabidopsis Thaliana* Gene for Methylsalicylate Biosynthesis, Identified by a Biochemical Genomics Approach, Has a Role in Defense. *Plant J.* **2003**, *36* (5), 577–588. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01902.x>.
- (239) Effmert, U.; Saschenbrecker, S.; Ross, J.; Negre, F.; Fraser, C. M.; Noel, J. P.; Dudareva, N.; Piechulla, B. Floral Benzenoid Carboxyl Methyltransferases: From in Vitro to in Planta Function. *Phytochemistry* **2005**, *66* (11), 1211–1230. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.031>.
- (240) Koo, Y. J.; Kim, M. A.; Kim, E. H.; Song, J. T.; Jung, C.; Moon, J.-K.; Kim, J.-H.; Seo, H. S.; Song, S. I.; Kim, J.-K.; Lee, J. S.; Cheong, J.-J.; Choi, Y. D. Overexpression of Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Reduces Salicylic Acid-Mediated Pathogen Resistance in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **2007**, *64* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9123-x>.
- (241) Attaran, E.; Zeier, T. E.; Griebel, T.; Zeier, J. Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2009**, *21* (3), 954–971. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063164>.
- (242) Jong Tae Song; Yeon Jong Koo; Jong-Beum Park; Yean Joo Seo; Yeon-Jeong Cho; Hak Soo Seo; and Yang Do Choi. The Expression Patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 Encoding a Salicylic Acid (SA) Methyltransferase and a SA Glucosyltransferase, Respectively, in *Arabidopsis* Plants with Altered Defense Responses. *Mol. Cells* **2009**, *28* (2), 105–109. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0108-x>.
- (243) van Poecke, R. M. P.; Posthumus, M. A.; Dicke, M. Herbivore-Induced Volatile Production by *Arabidopsis Thaliana* Leads to Attraction of the Parasitoid *Cotesia Rubecula*: Chemical, Behavioral, and Gene-Expression Analysis. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27* (10), 1911–1928. <https://doi.org/10.1023/A:1012213116515>.
- (244) Klein, M.; Papenbrock, J. The Multi-Protein Family of *Arabidopsis* Sulphotransferases and Their Relatives in Other Plant Species. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55* (404), 1809–1820. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh183>.

- (245) Baek, D.; Pathange, P.; Chung, J.-S.; Jiang, J.; Gao, L.; Oikawa, A.; Hirai, M. Y.; Saito, K.; Pare, P. W.; Shi, H. A Stress-Inducible Sulphotransferase Sulphonates Salicylic Acid and Confers Pathogen Resistance in Arabidopsis: Sulphonation of Salicylic Acid. *Plant Cell Environ.* **2010**, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02156.x>.
- (246) Bektas, Y.; Eulgem, T. Synthetic Plant Defense Elicitors. *Front. Plant Sci.* **2015**, *5*, 804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>.
- (247) Metraux, J. P.; Ahlgoy, P.; Staub, Th.; Speich, J.; Steinemann, A.; Ryals, J.; Ward, E. Induced Systemic Resistance in Cucumber in Response to 2,6-Dichloro-Isonicotinic Acid and Pathogens. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1: Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Interlaken, Switzerland, September 9–14, 1990*; Hennecke, H., Verma, D. P. S., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1991; pp 432–439. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7934-6_66.
- (248) Kuć, J. Induced Immunity to Plant Disease. *BioScience* **1982**, *32* (11), 854–860. <https://doi.org/10.2307/1309008>.
- (249) Ward, E. R.; Uknes, S. J.; Williams, S. C.; Dincher, S. S.; Wiederhold, D. L.; Alexander, D. C.; Ahl-Goy, P.; Metraux, J. P.; Ryals, J. A. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **1991**, *3* (10), 1085–1094. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>.
- (250) Uknes, S.; Morris, S.; Vernooij, B.; Ryals, J. The Role of Benzoic Acid Derivatives in Systemic Acquired Resistance. In *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*; Romeo, J. T., Saunders, J. A., Barbosa, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1996; pp 253–263. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6_10.
- (251) Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. Induced Disease Resistance in Plants by Chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107* (1), 19–28. <https://doi.org/10.1023/A:1008760518772>.
- (252) Lawton, K. A.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T.; Ryals, J. Benzothiadiazole Induces Disease Resistance in Arabidopsis by Activation of the Systemic Acquired Resistance Signal Transduction Pathway. *Plant J.* **1996**, *10* (1), 71–82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010071.x>.
- (253) Vernooij, B.; Uknes, S.; Ward, E.; Ryals, J. Salicylic Acid as a Signal Molecule in Plant-Pathogen Interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6* (2), 275–279. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90147-3).
- (254) Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Rella, M. G.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J.-P.; Kessmann, H.; Ryals, J. A Benzothiadiazole Derivative Induces Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant J.* **1996**, *10* (1), 61–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010061.x>.

- (255) Kunz, W.; Schurter, R.; Maetzke, T. The Chemistry of Benzothiadiazole Plant Activators. *Pestic. Sci.* **1997**, *50* (4), 275–282. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199708\)50:4<275::AID-PS593>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199708)50:4<275::AID-PS593>3.0.CO;2-7).
- (256) Ruess, W.; Mueller, K.; Knauf-Beiter, G.; Kunz, W.; Staub, T. *Plant Activator CGA 245704: An Innovative Approach for Disease Control in Cereals and Tobacco*; British Crop Protection Council, 1996.
- (257) Trapani, G.; Reho, A.; Morlacchi, F.; Latrofa, A.; Marchini, P.; Venturi, F.; Cantalamessa, F. [Synthesis and antiinflammatory activity of various 1,4-benzothiazine derivatives]. *Farm. Sci* **1985**, *40* (5), 369–376.
- (258) Zani, F.; Mingiardi, M.; Maggiali, C.; Mazza, P. Biological Studies on 1,2-Benzisothiazole Derivatives. VI. Antimicrobial Activity of 1,2-Benzisothiazole and 1,2-Benzisothiazolin-3-One Derivatives and of Some Corresponding 1,2-Benzisoxazoles. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1989** **1996**, *51*, 707–713.
- (259) Vicini, P.; Zani, F.; Cozzini, P.; Doytchinova, I. Hydrazones of 1,2-Benzisothiazole Hydrazides: Synthesis, Antimicrobial Activity and QSAR Investigations. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37* (7), 553–564. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01378-8](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01378-8).
- (260) Gianella, M.; Gualtieri, F.; Melchiorre, C. Benzisoxazole and Benzisothiazole Analogs of Auxin.
- (261) Branca, C.; Plazzi, V.; Vitto, M.; Bordi, F.; Fracassini, D. S.; Bagni, N. Auxin-like Activity of 1,2-Benzisothiazole Derivatives. *Phytochemistry* **1975**, *14* (12), 2545–2550. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85221-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85221-6).
- (262) Watanabe, T.; Igarashi, H.; Matsumoto, K.; Seki, S.; Mase, S.; Sekizawa, Y. The Characteristics of Probenazole (Oryzemat) for the Control of Rice Blast. *J. Pestic. Sci.* **1977**, No. 2, 291–296.
- (263) Schreiber, K. J.; Nasmith, C. G.; Allard, G.; Singh, J.; Subramaniam, R.; Desveaux, D. Found in Translation: High-Throughput Chemical Screening in Arabidopsis Thaliana Identifies Small Molecules That Reduce Fusarium Head Blight Disease in Wheat. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® **2011**, *24* (6), 640–648. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0210>.
- (264) Conrath, U.; Chen, Z.; Ricigliano, J.; Klessig, D. Two Inducers of Plant Defense Responses, 2,6-Dichloroisonicotinic Acid and Salicylic Acid, Inhibit Catalase Activity in Tobacco. *Proc Natl Acad Sci U A* **1995**, *92* (16), 7143–7147. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7143>.
- (265) Lateur, M. Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d’une résistance systémique. *Biotechnol Agron Soc Env.* **2002**, *11*.
- (266) Ortega, F.; Steiner, U.; Dehne, H. W. Induced Resistance: A Tool for Fungicide Resistance Management. *Pestic. Sci.* **1998**, *53* (2), 193–196. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199806\)53:2<193::AID-PS754>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199806)53:2<193::AID-PS754>3.0.CO;2-1).

- (267) Knoth, C.; Salus, M. S.; Girke, T.; Eulgem, T. The Synthetic Elicitor 3,5-Dichloroanthranilic Acid Induces NPR1-Dependent and NPR1-Independent Mechanisms of Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2009**, *150* (1), 333–347. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133678>.
- (268) Durner, J.; Klessig, D. F. Inhibition of Ascorbate Peroxidase by Salicylic Acid and 2,6-Dichloroisonicotinic Acid, Two Inducers of Plant Defense Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (24), 11312. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11312>.
- (269) Conrath, U.; Pieterse, C. M. J.; Mauch-Mani, B. Priming in Plant–Pathogen Interactions. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7* (5), 210–216. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02244-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02244-6).
- (270) Chen, Z.; Klessig, D. F. Identification of a Soluble Salicylic Acid-Binding Protein That May Function in Signal Transduction in the Plant Disease-Resistance Response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (18), 8179. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8179>.
- (271) Wu, H.; Xu, H.; Marivingt-Mounir, C.; Bonnemain, J.-L.; Chollet, J.-F. Vectorizing Agrochemicals: Enhancing Bioavailability via Carrier-Mediated Transport. *Pest Manag. Sci.* **2019**, *75*, 1507–1516. <https://doi.org/10.1002/ps.5298>.
- (272) Hsu, F. C.; Kleier, D. A. Phloem Mobility of Xenobiotics VIII. A Short Review. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, 1265–1271.
- (273) Kleier, D. A.; Grayson, B.; Hsu, F. C. The Phloem Mobility of Pesticides. *Pestic. Outlook* **1998**, No. 9, 26–30.
- (274) Sicbaldi, F.; Sacchi, G. A.; Trevisan, M.; Del Re, A. A. M. Root Uptake and Xylem Translocation of Pesticides from Different Chemical Classes. *Pestic. Sci.* **1997**, *50* (2), 111–119. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199706\)50:2<111::AID-PS573>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199706)50:2<111::AID-PS573>3.0.CO;2-3).
- (275) Jensen, K. H.; Berg-Sørensen, K.; Bruus, H.; Holbrook, N. M.; Liesche, J.; Schulz, A.; Zwieniecki, M. A.; Bohr, T. Sap Flow and Sugar Transport in Plants. *Rev. Mod. Phys.* **2016**, *88* (3), 035007. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.88.035007>.
- (276) Dixon, H. H.; Joly, J. On the Ascent of Sap. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **1895**, *186*, 563–576.
- (277) Van Bel, A. J. E.; Ehlers, K.; Knoblauch, M. Sieve Elements Caught in the Act. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7* (3), 126–132. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02225-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02225-7).
- (278) Knoblauch, M.; van Bel, A. J. E. Sieve Tubes in Action. *Plant Cell* **1998**, *10* (1), 35–50. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.1.35>.
- (279) Czaninski, Y. Vessel-Associated Cells. *IAWA Bull* **1977**, *3*, 51–55.
- (280) Fromard, L.; Babin, V.; Fleurat-Lessard, P.; Fromont, J. C.; Serrano, R.; Bonnemain, J. L. Control of Vascular Sap PH by the Vessel-Associated Cells in Woody Species (Physiological and Immunological Studies). *Plant Physiol.* **1995**, *108* (3), 913–918.
- (281) Reszczyńska, E.; Hanaka, A. Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem. Biophys.* **2020**, *78* (4), 401–414. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00947-w>.

- (282) Shi, Y.; Cai, M.; Zhou, L.; Wang, H. The Structure and Function of Cell Membranes Studied by Atomic Force Microscopy. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *73*, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.012>.
- (283) Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology*, Third Edition. **2003**.
- (284) Cooper, G. M. Transport of Small Molecules. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* **2000**.
- (285) Bromilow, R. H.; Chamberlain, K. Pathways and Mechanisms of Transport of Herbicides in Plants. In *Target Sites for Herbicide Action*; Kirkwood, R. C., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1991; pp 245–284. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2433-9_9.
- (286) Neumann, S.; Grimm, E.; Jacob, F. Transport of Xenobiotics in Higher Plants I. Structural Prerequisites for Translocation in the Phloem. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **1985**, *180* (4), 257–268. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(85\)80001-9](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(85)80001-9).
- (287) Chollet, J.-F.; Rocher, F.; Jousse, C.; Delétage-Grandon, C.; Bashiardes I, G.; Bonnemain, J.-L. Acidic Derivatives of the Fungicide Fenpiclonil: Effect of Adding a Methyl Group to the N-Substituted Chain on Both Systemicity and Fungicidal Activity. *Pest Manag. Sci.* **2005**, *61* (4), 377–382. <https://doi.org/10.1002/ps.977>.
- (288) Chollet, J.-F.; Rocher, F.; Jousse, C.; Delétage-Grandon, C.; Bashiardes, G.; Bonnemain, J.-L. Synthesis and Phloem Mobility of Acidic Derivatives of the Fungicide Fenpiclonil. *Pest Manag. Sci.* **2004**, *60* (11), 1063–1072. <https://doi.org/10.1002/ps.906>.
- (289) Assmann, S. M.; Haubrick, L. L. Transport Proteins of the Plant Plasma Membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8* (4), 458–467. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80021-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80021-4).
- (290) Chrispeels, M. J.; Agre, P. Aquaporins: Water Channel Proteins of Plant and Animal Cells. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19* (10), 421–425. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90091-4).
- (291) Ortiz-Lopez, A.; Chang, H. C.; Bush, D. R. Amino Acid Transporters in Plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1465*(1-2), 275–280. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00144-9)
- (292) Stokes, M. E.; Chattopadhyay, A.; Wilkins, O.; Nambara, E.; Campbell, M. M. Interplay between Sucrose and Folate Modulates Auxin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2013**, *162* (3), 1552–1565. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215095>.
- (293) Wind, J.; Smeekens, S.; Hanson, J. Sucrose: Metabolite and Signaling Molecule. *Phytochemistry* **2010**, *71* (14–15), 1610–1614. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.07.007>.
- (294) Morkunas, I.; Narożna, D.; Nowak, W.; Samardakiewicz, S.; Remlein-Starosta, D. Cross-Talk Interactions of Sucrose and Fusarium Oxysporum in the Phenylpropanoid Pathway and the Accumulation and Localization of Flavonoids in Embryo Axes of Yellow Lupine. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168* (5), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.08.017>.
- (295) Doehlemann, G.; Wahl, R.; Horst, R. J.; Voll, L. M.; Usadel, B.; Poree, F.; Stitt, M.; Pons-Kühnemann, J.; Sonnewald, U.; Kahmann, R.; Kämper, J. Reprogramming a Maize Plant:

- Transcriptional and Metabolic Changes Induced by the Fungal Biotroph *Ustilago Maydis*. *Plant J.* **2008**, *56* (2), 181–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03590.x>.
- (296) Williams, L. E.; Lemoine, R.; Sauer, N. Sugar Transporters in Higher Plants – a Diversity of Roles and Complex Regulation. *Trends Plant Sci.* **2000**, *5* (7), 283–290. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01681-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01681-2).
- (297) Doidy, J.; Grace, E.; Kühn, C.; Simon-Plas, F.; Casieri, L.; Wipf, D. Sugar Transporters in Plants and in Their Interactions with Fungi. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17* (7), 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.009>.
- (298) Claus, J. S.; Behrens, R. Glyphosate Translocation and Quackgrass Rhizome Bud Kill. *Weed Sci.* **1976**, *24* (2), 149–152. <https://doi.org/10.1017/S0043174500065644>.
- (299) Gougler, J. A.; Geiger, D. R. Uptake and Distribution of *N*-Phosphonomethylglycine in Sugar Beet Plants. *Plant Physiol.* **1981**, *68* (3), 668–672. <https://doi.org/10.1104/pp.68.3.668>.
- (300) Denis, M.-H.; Delrot, S. Carrier-Mediated Uptake of Glyphosate in Broad Bean (*Vicia Faba*) via a Phosphate Transporter. *Physiol. Plant.* **1993**, *87* (4), 569–575. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb02508.x>.
- (301) Xu, J.; Li, G.; Wang, Z.; Si, L.; He, S.; Cai, J.; Huang, J.; Donovan, M. D. The Role of L-Type Amino Acid Transporters in the Uptake of Glyphosate across Mammalian Epithelial Tissues. *Chemosphere* **2016**, *145*, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.062>.
- (302) Kasai, F.; Bayer, D. E. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, Antiauxins, and Metabolic Perturbations on Cytoplasmic and Vacuolar PH of Corn Root Tips Measured by in Vivo ³¹P-NMR. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1995**, *51* (3), 161–169. <https://doi.org/10.1006/pest.1995.1016>.
- (303) Chen, L.; Ortiz-Lopez, A.; Jung, A.; Bush, D. R. ANT1, an Aromatic and Neutral Amino Acid Transporter in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2001**, *125* (4), 1813–1820. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1813>
- (304) Richard H. Bromilow; Chamberlain, K.; Avis A. Evans. Physicochemical Aspects of Phloem Translocation of Herbicides. *Weed Sci.* **1990**, *38* (3), 305–314. <https://doi.org/10.1017/S0043174500056575>
- (305) Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B.; Feeney, P. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- (306) 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. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- (307) Tice, C. M. Selecting the Right Compounds for Screening: Does Lipinski's Rule of 5 for Pharmaceuticals Apply to Agrochemicals? *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57* (1), 3–16. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200101\)57:1<3::AID-PS269>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200101)57:1<3::AID-PS269>3.0.CO;2-6).

- (308) Tice, C. M. Selecting the Right Compounds for Screening: Use of Surface-Area Parameters. *Pest Manag. Sci.* **2002**, *58* (3), 219–233. <https://doi.org/10.1002/ps.441>.
- (309) Avram, S.; Funar-Timofei, S.; Borota, A.; Chennamaneni, S. R.; Manchala, A. K.; Muresan, S. Quantitative Estimation of Pesticide-Likeness for Agrochemical Discovery. *J. Cheminformatics* **2014**, *6* (1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13321-014-0042-6>.
- (310) Rocher, F.; Roblin, G.; Chollet, J.-F. Modifications of the Chemical Structure of Phenolics Differentially Affect Physiological Activities in Pulvinar Cells of *Mimosa Pudica* L. II. Influence of Various Molecular Properties in Relation to Membrane Transport. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24* (8), 6910–6922. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6048-z>.
- (311) Hao, G.; Dong, Q.; Yang, G. A Comparative Study on the Constitutive Properties of Marketed Pesticides. *Mol Inf.* **2011**, *30* (6–7), 614–622. <https://doi.org/10.1002/minf.201100020>.
- (312) Albert, A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182* (4633), 421–423. <https://doi.org/10.1038/182421a0>.
- (313) Harper, N. J. Drug Latentiation. *J. Med. Pharm. Chem.* **1959**, *1* (5), 467–500. <https://doi.org/10.1021/jm50006a005>.
- (314) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70* (5), 1129–1143. <https://doi.org/10.1351/pac199870051129>.
- (315) Forde, E.; Devocelle, M. Pro-Moieties of Antimicrobial Peptide Prodrugs. *Molecules* **2015**, *20* (1), 1210–1227. <https://doi.org/10.3390/molecules20011210>.
- (316) N'Da, D. D. Prodrug Strategies for Enhancing the Percutaneous Absorption of Drugs. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20780–20807. <https://doi.org/10.3390/molecules191220780>.
- (317) Kleier, D. A.; Hsu, F. C. Phloem Mobility of Xenobiotics. VII. The Design of Phloem Systemic Pesticides. *Weed Sci.* **1996**, *44* (3), 749–756. <https://doi.org/10.1017/S0043174500094637>.
- (318) Gangwar, S.; Pauletti, G. M.; Wang, B.; Siahaan, T. J.; Stella, V. J.; Borchardt, R. T. Prodrug Strategies to Enhance the Intestinal Absorption of Peptides. *Drug Discov. Today* **1997**, *2* (4), 148–155. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01011-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01011-8).
- (319) Stella, V. J.; Borchardt, R. T.; Hageman, M. J.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. W. Prodrugs: Challenges and Rewards. *Springer Sci. Bus. Media* **2007**.
- (320) Zawilska, J.; Wojcieszak, J.; Olejniczak, A. Prodrugs: A Challenge for the Drug Development. *Pharmacol. Rep. PR* **2013**, *65*, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)70959-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)70959-9).
- (321) Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. Prodrug Approaches for CNS Delivery. *AAPS J.* **2008**, *10* (1), 92–102. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9009-8>.
- (322) Oz, H.; Ebersole, J. Application of Prodrugs to Inflammatory Diseases of the Gut. *Molecules* **2008**, *13* (2), 452–474. <https://doi.org/10.3390/molecules13020452>.
- (323) Sandros, M.; Sarraf, C.; Tabrizian, M. Prodrugs in Cardiovascular Therapy. *Molecules* **2008**, *13* (5), 1156–1178. <https://doi.org/10.3390/molecules13051156>.

- (324) Delahousse, J.; Skarbek, C.; Paci, A. Prodrugs as Drug Delivery System in Oncology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, *84*. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03906-2>.
- (325) Sugano, K.; Kansy, M.; Artursson, P.; Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Ecker, G.; Faller, B.; Fischer, H.; Gerebtzoff, G.; Lennernäs, H.; Senner, F. Coexistence of Passive and Carrier-Mediated Processes in Drug Transport. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 597–614. <https://doi.org/10.1038/nrd3187>.
- (326) DeGorter, M. K.; Xia, C. Q.; Yang, J. J.; Kim, R. B. Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52* (1), 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529>.
- (327) Giacomini, K. M.; Huang, S.-M.; Tweedie, D. J.; Benet, L. Z.; Brouwer, K. L. R.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K. M.; Hoffmaster, K. A.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R. B.; Lee, C. A.; Niemi, M.; Polli, J. W.; Sugiyama, Y.; Swaan, P. W.; Ware, J. A.; Wright, S. H.; Wah Yee, S.; Zamek-Gliszczyński, M. J.; Zhang, L.; The International Transporter Consortium. Membrane Transporters in Drug Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.
- (328) Pangeni, R.; Kang, S.; Jha, S.; Subedi, L.; Park, J. Intestinal Membrane Transporter-Mediated Approaches to Improve Oral Drug Delivery. *J. Pharm. Investig.* **2021**, *51*. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00515-1>.
- (329) Häfliger, P.; Charles, R.-P. The L-Type Amino Acid Transporter LAT1—An Emerging Target in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (10), 2428. <https://doi.org/10.3390/ijms20102428>.
- (330) Wang, Q.; Holst, J. L-Type Amino Acid Transport and Cancer: Targeting the MTORC1 Pathway to Inhibit Neoplasia. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5* (4), 1281–1294.
- (331) Kanai, Y.; Segawa, H.; Miyamoto, K.; Uchino, H.; Takeda, E.; Endou, H. Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98) *. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (37), 23629–23632. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23629>.
- (332) Geier, E.; Schlessinger, A.; Fan, H.; Gable, J.; Irwin, J.; Sali, A.; Giacomini, K. Structure-Based Ligand Discovery for the Large-Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218165110>.
- (333) del Amo, E. M.; Urtti, A.; Yliperttula, M. Pharmacokinetic Role of L-Type Amino Acid Transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* **2008**, *35* (3), 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.06.015>.
- (334) Prasad, P. D.; Wang, H.; Huang, W.; Kekuda, R.; Rajan, D. P.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255* (2), 283–288. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0206>.

- (335) Duelli, R.; Enerson, B. E.; Gerhart, D. Z.; Drewes, L. R. Expression of Large Amino Acid Transporter LAT1 in Rat Brain Endothelium. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20* (11), 1557–1562. <https://doi.org/10.1097/00004647-200011000-00005>.
- (336) Boado, R. J.; Li, J. Y.; Nagaya, M.; Zhang, C.; Pardridge, W. M. Selective Expression of the Large Neutral Amino Acid Transporter at the Blood-Brain Barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (21), 12079–12084. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12079>.
- (337) Uchino, H.; Kanai, Y.; Kim, D. K.; Wempe, M. F.; Chairoungdua, A.; Morimoto, E.; Anders, M. W.; Endou, H. Transport of Amino Acid-Related Compounds Mediated by L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1): Insights Into the Mechanisms of Substrate Recognition. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61* (4), 729. <https://doi.org/10.1124/mol.61.4.729>.
- (338) Wade, L. A.; Katzman, R. Synthetic Aminoacids and the Nature of L-DOPA Transport at the Blood-Brain Barrier. *J. Neurochem.* **1975**, *25* (6), 837–842. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb04415.x>.
- (339) Gynther, M.; Laine, K.; Ropponen, J.; Leppänen, J.; Mannila, A.; Nevalainen, T.; Savolainen, J.; Järvinen, T.; Rautio, J. Large Neutral Amino Acid Transporter Enables Brain Drug Delivery via Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (4), 932–936. <https://doi.org/10.1021/jm701175d>.
- (340) Gynther, M.; Jalkanen, A.; Lehtonen, M.; Forsberg, M.; Laine, K.; Ropponen, J.; Leppänen, J.; Knuuti, J.; Rautio, J. Brain Uptake of Ketoprofen–Lysine Prodrug in Rats. *Int. J. Pharm.* **2010**, *399* (1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.019>.
- (341) Cornford, E. M.; Young, D.; Paxton, J. W.; Finlay, G. J.; Wilson, W. R.; Pardridge, W. M. Melphalan Penetration of the Blood-Brain Barrier via the Neutral Amino Acid Transporter in Tumor-Bearing Brain. *Cancer Res.* **1992**, *52* (1), 138.
- (342) Gomes, P.; Soares-da-Silva, P. L-DOPA Transport Properties in an Immortalised Cell Line of Rat Capillary Cerebral Endothelial Cells, RBE 4. *Brain Res.* **1999**, *829* (1), 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01387-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01387-6).
- (343) Puris, E.; Gynther, M.; de Lange, E. C. M.; Auriola, S.; Hammarlund-Udenaes, M.; Huttunen, K. M.; Loryan, I. Mechanistic Study on the Use of the L -Type Amino Acid Transporter 1 for Brain Intracellular Delivery of Ketoprofen via Prodrug: A Novel Approach Supporting the Development of Prodrugs for Intracellular Targets. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (7), 3261–3274. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00502>.
- (344) Vig, B. S.; Huttunen, K. M.; Laine, K.; Rautio, J. Amino Acids as Promoieties in Prodrug Design and Development. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65* (10), 1370–1385. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.001>.
- (345) Dufaud, A.; Chollet, J.-F.; Rudelle, J.; Miginiac, L.; Bonnemain, J.-L. Derivatives of Pesticides with an α -Amino Acid Function: Synthesis and Effect on Threonine Uptake. *Pestic. Sci.* **1994**, *41* (4), 297–304. <https://doi.org/10.1002/ps.2780410403>.

- (346) Chollet, J.-F.; Delétage, C.; Faucher, M.; Miginiac, L.; Bonnemain, J.-L. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Some Pesticides with an α -Amino Acid Function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1997**, *1336* (2), 331–341. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(97\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00041-X).
- (347) Wu, H.; Marhadour, S.; Lei, Z.-W.; Yang, W.; Marivingt-Mounir, C.; Bonnemain, J.-L.; Chollet, J.-F. Vectorization of Agrochemicals: Amino Acid Carriers Are More Efficient than Sugar Carriers to Translocate Phenylpyrrole Conjugates in the Ricinus System. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *25* (15), 14336–14349. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8107-x>.
- (348) Marhadour, S.; Wu, H.; Yang, W.; Marivingt-Mounir, C.; Bonnemain, J.-L.; Chollet, J.-F. Vectorisation of Agrochemicals via Amino Acid Carriers: Influence of the Spacer Arm Structure on the Phloem Mobility of Phenylpyrrole Conjugates in the Ricinus System: *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73* (9), 1972–1982. <https://doi.org/10.1002/ps.4575>.
- (349) Xie, Y.; Zhao, J.-L.; Wang, C.-W.; Yu, A.-X.; Liu, N.; Chen, L.; Lin, F.; Xu, H.-H. Glycinergic-Fipronil Uptake Is Mediated by an Amino Acid Carrier System and Induces the Expression of Amino Acid Transporter Genes in *Ricinus Communis* Seedlings. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (19), 3810–3818. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06042>.
- (350) Li, T. X.; Chen, Y.; Liu, H. F.; Ma, C. Y.; Yang, W. Vectorizing Pro-Insecticide: Influence of Linker Length on Insecticidal Activity and Phloem Mobility of New Tralopyril Derivatives. *Molecules* **2021**, *26* (15), 4570. <https://doi.org/10.3390/molecules26154570>.
- (351) Sahu, A.; Sahu, P.; Agrawal, R. A Recent Review on Drug Modification Using 1,2,3-Triazole. *Curr. Chem. Biol.* **2020**, *14* (2), 71–87. <https://doi.org/10.2174/2212796814999200807214519>.
- (352) Lo, W. K. C.; Huff, G. S.; Cubanski, J. R.; Kennedy, A. D. W.; McAdam, C. J.; McMorran, D. A.; Gordon, K. C.; Crowley, J. D. Comparison of Inverse and Regular 2-Pyridyl-1,2,3-Triazole “Click” Complexes: Structures, Stability, Electrochemical, and Photophysical Properties. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (4), 1572–1587. <https://doi.org/10.1021/ic502557w>.
- (353) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical–Biology Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (7), 4905–4979. <https://doi.org/10.1021/cr200409f>.
- (354) Jiang, X.; Xie, Y.; Ren, Z.; Ganeteg, U.; Lin, F.; Zhao, C.; Xu, H. Design of a New Glutamine–Fipronil Conjugate with α -Amino Acid Function and Its Uptake by A. Thaliana Lysine Histidine Transporter 1 (AtLHT1). *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (29), 7597–7605. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02287>.
- (355) Mueckler, M.; Thorens, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *ABCs Membr. Transp. Health Dis. SLC Ser.* **2013**, *34* (2), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>.
- (356) Farrell, C. L.; Pardridge, W. M. Blood-Brain Barrier Glucose Transporter Is Asymmetrically Distributed on Brain Capillary Endothelial Luminal and Abluminal Membranes: An Electron

- Microscopic Immunogold Study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88 (13), 5779–5783. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5779>.
- (357) Pardridge, W. M.; Oldendorf, W. H. Kinetics of Blood-Brain Barrier Transport of Hexoses. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1975**, 382 (3), 377–392. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90279-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90279-5).
- (358) Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. Synthesis of Glycosyl Derivatives as Dopamine Prodrugs: Interaction with Glucose Carrier GLUT-1. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1 (5), 767–771. <https://doi.org/10.1039/b212066f>.
- (359) Kim, M.; Park, M. H.; Nam, G.; Lee, M.; Kang, J.; Song, I.-S.; Choi, M.-K.; Jin, H. K.; Bae, J.; Lim, M. H. A Glycosylated Prodrug to Attenuate Neuroinflammation and Improve Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Mol. Pharm.* **2021**, 18 (1), 101–112. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00677>.
- (360) Fan, W.; Wu, Y.; Li, X.-K.; Yao, N.; Li, X.; Yu, Y.-G.; Hai, L. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Brain-Specific Glucosyl Thiamine Disulfide Prodrugs of Naproxen. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (9), 3651–3661. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.029>.
- (361) Gynther, M.; Ropponen, J.; Laine, K.; Leppänen, J.; Haapakoski, P.; Peura, L.; Järvinen, T.; Rautio, J. Glucose Promoiety Enables Glucose Transporter Mediated Brain Uptake of Ketoprofen and Indomethacin Prodrugs in Rats. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (10), 3348–3353. <https://doi.org/10.1021/jm8015409>.
- (362) Yang, W.; Wu, H.-X.; Xu, H.-H.; Hu, A.-L.; Lu, M.-L. Synthesis of Glucose–Fipronil Conjugate and Its Phloem Mobility. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (23), 12534–12542. <https://doi.org/10.1021/jf2031154>.
- (363) Lei, Z.; Wang, J.; Mao, G.; Wen, Y.; Tian, Y.; Wu, H.; Li, Y.; Xu, H. Glucose Positions Affect the Phloem Mobility of Glucose–Fipronil Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (26), 6065–6071. <https://doi.org/10.1021/jf5010429>.
- (364) Wu, H.-X.; Yang, W.; Zhang, Z.-X.; Huang, T.; Yao, G.-K.; Xu, H.-H. Uptake and Phloem Transport of Glucose-Fipronil Conjugate in *Ricinus Communis* Involve a Carrier-Mediated Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (24), 6088–6094. <https://doi.org/10.1021/jf300546t>.
- (365) Wang, J.; Lei, Z.; Wen, Y.; Mao, G.; Wu, H.; Xu, H. A Novel Fluorescent Conjugate Applicable To Visualize the Translocation of Glucose–Fipronil. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (35), 8791–8798. <https://doi.org/10.1021/jf502838m>.
- (366) Yuan, J.-G.; Wu, H.-X.; Lu, M.-L.; Song, G.-P.; Xu, H.-H. Synthesis of a Series of Monosaccharide–Fipronil Conjugates and Their Phloem Mobility. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (18), 4236–4241. <https://doi.org/10.1021/jf400888c>.

- (367) Chen, Y.; Lei, Z.; Zhang, Y.; Yang, W.; Liu, H.; Zhou, Y.; Yang, M. Influence of Pyranose and Spacer Arm Structures on Phloem Mobility and Insecticidal Activity of New Tralopyril Derivatives. *Molecules* **2017**, *22*, 1058. <https://doi.org/10.3390/molecules22071058>.
- (368) Wu, H.; Marhadour, S.; Lei, Z.-W.; Dugaro, É.; Gaillard, C.; Porcheron, B.; Marivingt-Mounir, C.; Lemoine, R.; Chollet, J.-F.; Bonnemain, J.-L. Use of D-Glucose–Fenpiclonil Conjugate as a Potent and Specific Inhibitor of Sucrose Carriers. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68* (20), 5599–5613. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx354>.
- (369) Shukla, A. K.; Shrivash, M. K.; Pandey, A.; Pandey, J. Synthesis, in Vitro and Computational Studies of Novel Glycosyl-1, 2, 3-1H-Triazolyl Methyl Benzamide Derivatives as Potential α -Glucosidase Inhibitory Activity. *Bioorganic Chem.* **2021**, *109*, 104687. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104687>.
- (370) Dong, L.; Shen, S.; Chen, W.; Lu, H.; Xu, D.; Jin, S.; Yang, Q.; Zhang, J. Glycosyl Triazoles as Novel Insect β -N-Acetylhexosaminidase OfHex1 Inhibitors: Design, Synthesis, Molecular Docking and MD Simulations. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (12), 2315–2322. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.032>.
- (371) Bonnemain, J.-L.; Chollet, J.-F.; Rocher, F. Transport of Salicylic Acid and Related Compounds. In *SALICYLIC ACID*; Hayat, S., Ahmad, A., Alyemeni, M. N., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, **2013**; pp 43–59. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6_4.
- (372) Amborabé, B.-E.; Fleurat-Lessard, P.; Chollet, J.-F.; Roblin, G. Antifungal Effects of Salicylic Acid and Other Benzoic Acid Derivatives towards *Eutypa Lata*: Structure–Activity Relationship. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40* (12), 1051–1060. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01470-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01470-5).
- (373) Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-Triazole Ring as a Bioisostere in Medicinal Chemistry. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572–1581. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>.
- (374) Lauria, A.; Delisi, R.; Mingoia, F.; Terenzi, A.; Martorana, A.; Barone, G.; Almerico, A. M. 1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed with Biological Activity, through 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (16), 3289–3306. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301695>.
- (375) Song, N.; Ding, M.; Pan, Z.; Li, J.; Zhou, L.; Tan, H.; Fu, Q. Construction of Targeting-Clickable and Tumor-Cleavable Polyurethane Nanomicelles for Multifunctional Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (12), 4407–4419. <https://doi.org/10.1021/bm401342t>.
- (376) Mayer, T.; Maier, M. E. Design and Synthesis of a Tag-Free Chemical Probe for Photoaffinity Labeling. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (28), 4711–4720. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700188>.

- (377) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (4), 1067–1068. <https://doi.org/10.1021/ja01609a099>.
- (378) Mojtahedi, M. M.; Samadian, S. Efficient and Rapid Solvent-Free Acetylation of Alcohols, Phenols, and Thiols Using Catalytic Amounts of Sodium Acetate Trihydrate. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/642479>.
- (379) Chandrasekhar, S.; Kumar, H. V. The Reaction of Aspirin with Base. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (28), 3561–3564. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.04.096>.
- (380) Huisgen, R.; Knorr, R.; Möbius, L.; Szeimies, G. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXIII. Einige Beobachtungen Zur Addition Organischer Azide an CC-Dreifachbindungen. *Chem. Ber.* **1965**, *98* (12), 4014–4021. <https://doi.org/10.1002/cber.19650981228>.
- (381) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (382) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (383) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.
- (384) Wang, Y.; Han, L.; Yuan, N.; Wang, H.; Li, H.; Liu, J.; Chen, H.; Zhang, Q.; Dong, S. Traceless β -Mercaptan-Assisted Activation of Valinyl Benzimidazolinones in Peptide Ligations. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (7), 1940–1946. <https://doi.org/10.1039/C7SC04148A>.
- (385) Ikubo, M.; Inoue, A.; Nakamura, S.; Jung, S.; Sayama, M.; Otani, Y.; Uwamizu, A.; Suzuki, K.; Kishi, T.; Shuto, A.; Ishiguro, J.; Okudaira, M.; Kano, K.; Makide, K.; Aoki, J.; Ohwada, T. Structure–Activity Relationships of Lysophosphatidylserine Analogs as Agonists of G-Protein-Coupled Receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (10), 4204–4219. <https://doi.org/10.1021/jm5020082>.
- (386) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17* (7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.
- (387) Zhang, Y.; Tortorella, M. D.; Liao, J.; Qin, X.; Chen, T.; Luo, J.; Guan, J.; Talley, J. J.; Tu, Z. Synthesis and Evaluation of Novel Erlotinib–NSAID Conjugates as More Comprehensive Anticancer Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (10), 1086–1090. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00286>.
- (388) Yu, W.-Y.; Zhang, Y.-H.; Yisheng, L.; Jie, Z.-W.; Zhang, Y.-B.; Peng, S.-X. Synthesis and Hypoglycemic Activities of Nitric Oxide-Donating Salsalate Derivatives. *J. China Pharm. Univ.* **2008**, *39*, 301–305.

- (389) Fischer, E.; Speier, A. Darstellung Der Ester. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, 28 (3), 3252–3258. <https://doi.org/10.1002/cber.189502803176>.
- (390) Egorova, K. S.; Seitkalieva, M. M.; Posvyatenko, A. V.; Khrustalev, V. N.; Ananikov, V. P. Cytotoxic Activity of Salicylic Acid-Containing Drug Models with Ionic and Covalent Binding. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (11), 1099–1104. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00258>.
- (391) Babazadeh, M.; Edjlali, L.; Rashidian, L. Application of 2-Hydroxyethyl Methacrylate Polymers in Controlled Release of 5-Aminosalicylic Acid as a Colon-Specific Drug. *J Polym Res* **2007**, 14, 207–213. <https://doi.org/10.1007/s10965-007-9099-5>.
- (392) White, D. A. Alkylations with Potassium Carbonate in Dimethylformamide. *Synth. Commun.* **1977**, 7 (8), 559–568. <https://doi.org/10.1080/00397917709409277>.
- (393) Bolton, S. A.; Sutton, J. C.; Anumula, R.; Bisacchi, G. S.; Jacobson, B.; Slusarchyk, W. A.; Treuner, U. D.; Wu, S. C.; Zhao, G.; Pi, Z.; Sheriff, S.; Smirk, R. A.; Bisaha, S.; Cheney, D. L.; Wei, A.; Schumacher, W. A.; Hartl, K. S.; Liu, E.; Zahler, R.; Seiler, S. M. Discovery of Nonbenzamidine Factor VIIa Inhibitors Using a Biaryl Acid Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (18), 5239–5243. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.028>.
- (394) Chuprakov, S.; Ogunkoya, A. O.; Barfield, R. M.; Bauzon, M.; Hickie, C.; Kim, Y. C.; Yeo, D.; Zhang, F.; Rabuka, D.; Drake, P. M. Tandem-Cleavage Linkers Improve the In Vivo Stability and Tolerability of Antibody–Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2021**, 32 (4), 746–754. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00029>.
- (395) Kotian, P. L.; Krishnan, R.; Rowland, S.; El-Kattan, Y.; Saini, S. K.; Upshaw, R.; Bantia, S.; Arnold, S.; Sudhakar Babu, Y.; Chand, P. Design, Parallel Synthesis, and Crystal Structures of Biphenyl Antithrombotics as Selective Inhibitors of Tissue Factor FVIIa Complex. Part 1: Exploration of S2 Pocket Pharmacophores. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (11), 3934–3958. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.013>.
- (396) Thomas, K.; Moody, T. W.; Jensen, R. T.; Tong, J.; Rayner, C. L.; Barnett, N. L.; Fairfull-Smith, K. E.; Ridnour, L. A.; Wink, D. A.; Bottle, S. E. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Hybrid Nitroxide-Based Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 147, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.077>.
- (397) Zhao, Y. Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants. *Mol. Plant* **2012**, 5 (2), 334–338. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr104>.
- (398) Naveed, M.; Qureshi, M. A.; Zahir, Z. A.; Hussain, M. B.; Sessitsch, A.; Mitter, B. L-Tryptophan-Dependent Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Improves Plant Growth and Colonization of Maize by Burkholderia Phytofirmans PsJN. *Ann. Microbiol.* **2015**, 65 (3), 1381–1389. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0976-y>.
- (399) Nappi, M.; He, C.; Whitehurst, W. G.; Chappell, B. G. N.; Gaunt, M. J. Selective Reductive Elimination at Alkyl Palladium(IV) by Dissociative Ligand Ionization: Catalytic C(Sp³)–H

- Amination to Azetidines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (12), 3178–3182. <https://doi.org/10.1002/anie.201800519>.
- (400) Ruiz-Sanchis, P.; Savina, S. A.; Acosta, G. A.; Albericio, F.; Álvarez, M. Orthogonal Protecting Groups in the Synthesis of Tryptophanyl-Hexahydropyrroloindoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (1), 67–73. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101057>.
- (401) Roush, W. R.; Choi, J. Y.; PODUST, L. Novel Agents Targeting Cyp51. WO2015048306A1, **2015**.
- (402) Yu, K.; Gao, B.; Liu, Z.; Ding, H. Enantioselective Total Synthesis and Structural Reassignment of (+)-Alsmaphorazine E via a Traceless Chirality Transfer Strategy. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (24), 4485–4488. <https://doi.org/10.1039/C6CC00930A>.
- (403) Yu, K.; Gao, B.; Ding, H. Asymmetric Total Synthesis and Absolute Configuration Reassignment of Indole Alkaloid (+)-Alsmaphorazine D. *Acta Chim. Sin.* **2016**, *74*, 410. <https://doi.org/10.6023/A16020102>.
- (404) Henrottin, J.; Zervosen, A.; Lemaire, C.; Sapunarcic, F.; Laurent, S.; Van den Eynde, B.; Goldman, S.; Plenevaux, A.; Luxen, A. N1-Fluoroalkyltryptophan Analogues: Synthesis and in Vitro Study as Potential Substrates for Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (3), 260–265. <https://doi.org/10.1021/ml500385d>.
- (405) Schultz, A. W.; Lewis, C. A.; Luzung, M. R.; Baran, P. S.; Moore, B. S. Functional Characterization of the Cyclomarin/Cyclomarazine Prenyltransferase CymD Directs the Biosynthesis of Unnatural Cyclic Peptides. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (3), 373–377. <https://doi.org/10.1021/np9006876>.
- (406) Junk, L.; Papadopoulos, E.; Kazmaier, U. Tryptophan N 1-Alkylation: Quick and Simple Access to Diversely Substituted Tryptophans. *Synthesis* **2021**, *53* (14), 2503–2511. <https://doi.org/10.1055/a-1404-5079>.
- (407) Ghaly, P. E.; Churchill, C. D. M.; Abou El-Magd, R. M.; Hájková, Z.; Dráber, P.; West, F. G.; Tuszynski, J. A. Synthesis and Biological Evaluation of Structurally Simplified Noscapine Analogues as Microtubule Binding Agents. *Can. J. Chem.* **2017**, *95* (6), 649–655. <https://doi.org/10.1139/cjc-2016-0649>.
- (408) Srinivas, S.; Neeraja, P.; Banothu, V.; Kumar Dubey, P.; Mukkanti, K.; Pal, S. Synthesis, Biological Evaluation and *In Silico* Studies of Compounds Based on Tryptophan-Naproxen-Triazole Hybrids. *ChemistrySelect* **2020**, *5* (46), 14741–14746. <https://doi.org/10.1002/slct.202003786>.
- (409) Dai, J.; Dan, W.; Zhang, Y.; He, M.; Wang, J. Design and Synthesis of C Modified and Ring-Truncated Canthin-6-One Analogues as Effective Membrane-Active Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (18), 3123–3128. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.001>.

- (410) Saget, T.; König, B. Photocatalytic Synthesis of Polycyclic Indolones. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (31), 7004–7007. <https://doi.org/10.1002/chem.202001324>.
- (411) Zhong, X.; Qi, S.; Li, Y.; Zhang, J.; Han, F.-S. A Study in Indol-2-Yl Carbinol Chemistry and the Application for the Total Synthesis of Mersicarpine. *Tetrahedron* **2015**, *71* (22), 3734–3740. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.07.095>.
- (412) Rentzea, C.; Misslitz, U.; Witschel, M.; Zagar, C.; Landes, A. 2-W-Diaminocarboxylic Acid Compounds. US20050085516A1, **2005**.
- (413) Wang, T.; Yin, Z.; Zhang, Z.; Pendri, A.; Li, G.; Gerritz, S.; Zhai, W.; Scola, P. M.; Sun, L.-Q.; Mull, E. Compounds for the Treatment of Hepatitis C. EP2566872B1, **2014**.
- (414) He, X.-K.; Lu, J.; Zhang, A.-J.; Zhang, Q.-Q.; Xu, G.-Y.; Xuan, J. BI-OAc-Accelerated C3–H Alkylation of Quinoxalin-2(1H)-Ones under Visible-Light Irradiation. *Org. Lett.* **2020**, *22* (15), 5984–5989. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02080>.
- (415) Lu, S.; Obianom, O. N.; Ai, Y. Novel Cinnamaldehyde-Based Aspirin Derivatives for the Treatment of Colorectal Cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (17), 2869–2874. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.032>.
- (416) DeBerardinis, A. M.; Madden, D. J.; Banerjee, U.; Sail, V.; Raccuia, D. S.; De Carlo, D.; Lemieux, S. M.; Meares, A.; Hadden, M. K. Structure–Activity Relationships for Vitamin D3-Based Aromatic A-Ring Analogues as Hedgehog Pathway Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3724–3736. <https://doi.org/10.1021/jm401812d>.
- (417) Kikkeri, R.; Traboulsi, H.; Humbert, N.; Gumienna-Kontecka, E.; Arad-Yellin, R.; Melman, G.; Elhabiri, M.; Albrecht-Gary, A.-M.; Shanzer, A. Toward Iron Sensors: Bioinspired Tripods Based on Fluorescent Phenol-Oxazoline Coordination Sites. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (7), 2485–2497. <https://doi.org/10.1021/ic061952u>.
- (418) Shen, Z.; Dong, V. M. Benzofurans Prepared by C-H Bond Functionalization with Acylsilanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (4), 784–786. <https://doi.org/10.1002/anie.200804854>.
- (419) Shanzer, A.; Melman, G.; Barda, Y.; Kikkeri, R.; Kraiz, B.; Ginat, L. Lanthanide Clusters and Methods of Use Thereof. US20160002269A1, **2016**.
- (420) Bremner, J. B.; Samosorn, S.; Ambrus, J. I. N-Acylation of 5-Substituted Indoles with Carboxylic Acids via DCC Coupling. *Synthesis* **2004**, *2004* (16), 2653–2658. <https://doi.org/10.1055/s-2004-831228>.
- (421) Anžiček, N.; Williams, S.; Housden, M. P.; Paterson, I. Toward Aplyronine Payloads for Antibody–Drug Conjugates: Total Synthesis of Aplyronines A and D. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (8), 1343–1350. <https://doi.org/10.1039/C7OB03204H>.
- (422) Yamamoto, T.; Iwasaki, T.; Morita, T.; Yoshimi, Y. Strategy for O -Alkylation of Serine and Threonine from Serinyl and Threoninyl Acetic Acids by Photoinduced Decarboxylative Radical Reactions: Connection between Serine/Threonine and Carbohydrates/Amino Acids at the Side Chain. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (7), 3702–3709. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00061>.

- (423) Ramesh, R.; De, K.; Chandrasekaran, S. An Efficient Synthesis of Dehydroamino Acids and Dehydropeptides from O-Cbz and O-Eoc Derivatives of Serine and Threonine. *Tetrahedron* **2007**, *63* (42), 10534–10542. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.07.094>.
- (424) Max, J. B.; Mons, P. J.; Tom, J. C.; Schacher, F. H. Double Hydrophilic Poly(Ethylene Oxide)-Block -Poly(Dehydroalanine) Block Copolymers: Comparison of Two Different Synthetic Routes. *Macromol. Chem. Phys.* **2020**, *221* (1), 1900383. <https://doi.org/10.1002/macp.201900383>.
- (425) Yang, Y.-Q.; Ji, M.-C.; Lu, Z.; Jiang, M.; Huang, W.-W.; He, X.-Z. Facile Access to α,β -Dehydroalanine and α,β -Dehydroamino Butyric Acid Derivatives from DL-Serines and Threonines. *Synth. Commun.* **2016**, *46* (11), 977–982. <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1149194>.
- (426) Suzen, S. Investigations on the Effect of Base and Solvents on the Elimination of P-Toluene Sulphonyl Group in the Synthesis of Dehydroalanine. *J. Fac. Pharm. Ankara.* **2001**, *30* (1), 17–25.
- (427) Ikubo, M.; Inoue, A.; Nakamura, S.; Jung, S.; Sayama, M.; Otani, Y.; Uwamizu, A.; Suzuki, K.; Kishi, T.; Shuto, A.; Ishiguro, J.; Okudaira, M.; Kano, K.; Makide, K.; Aoki, J.; Ohwada, T. Structure–Activity Relationships of Lysophosphatidylserine Analogs as Agonists of G-Protein-Coupled Receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (10), 4204–4219. <https://doi.org/10.1021/jm5020082>.
- (428) Koch, S.; Schollmeyer, D.; Löwe, H.; Kunz, H. C-Glycosyl Amino Acids through Hydroboration–Cross-Coupling of Exo-Glycals and Their Application in Automated Solid-Phase Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (22), 7020–7041. <https://doi.org/10.1002/chem.201300150>.
- (429) Pícha, J.; Buděšínský, M.; Macháček, K.; Collinsová, M.; Jiráček, J. Optimized Syntheses of Fmoc Azido Amino Acids for the Preparation of Azidopeptides. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (3), 202–214. <https://doi.org/10.1002/psc.2968>.
- (430) Silva, G.; Guimarães, B.; Assis, S.; Lima, V.; De Oliveira, R. Ultrasound-Assisted Synthesis of 1-N-Beta-D-Glucopyranosyl-1H-1,2,3-Triazole Benzoheterocycles and Their Anti-Inflammatory Activities. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 914–921. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130117>.
- (431) Jarrahpour, A. A.; Alvand, P.; Arab, R.; Beheshti, A. Synthesis of N-(2-Hydroxy-3-Methoxybenzylidene) - 2, 3, 4, 6-Tetra-O-Acetyl - β -D Galactopyranosylamine as a New Chiral Schiff Base for Asymmetric [2+2] Cycloadditions. *Molbank* **2005**, *2005* (4). <https://doi.org/10.3390/M436>.
- (432) Ibatullin, F. M.; Shabalin, K. A. A Simple and Convenient Synthesis of Glycosyl Azides. *Synth. Commun.* **2000**, *30* (15), 2819–2823. <https://doi.org/10.1080/00397910008086908>.

- (433) Thanh, N. D.; Hai, D. S.; Ngoc Bich, V. T.; Thu Hien, P. T.; Ky Duyen, N. T.; Mai, N. T.; Dung, T. T.; Toan, V. N.; Kim Van, H. T.; Dang, L. H.; Toan, D. N.; Thanh Van, T. T. Efficient Click Chemistry towards Novel 1H-1,2,3-Triazole-Tethered 4H-Chromene-d-Glucose Conjugates: Design, Synthesis and Evaluation of in Vitro Antibacterial, MRSA and Antifungal Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *167*, 454–471. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.060>.
- (434) Ren, B.; Wang, M.; Liu, J.; Ge, J.; Zhang, X.; Dong, H. Zemplén Transesterification: A Name Reaction That Has Misled Us for 90 Years. *Green Chem.* **2015**, *17* (3), 1390–1394. <https://doi.org/10.1039/C4GC02006E>.
- (435) Zemplén, G.; Kunz, A. Studien über Amygdalin, IV: Synthese des natürlichen *l*-Amygdalins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1924**, *57* (8), 1357–1359. <https://doi.org/10.1002/cber.19240570825>.
- (436) Zemplén Deacetylation. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; John Wiley & Sons, Ltd, **2010**, 3123–3128. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr691>.
- (437) Goyard, D.; Docsa, T.; Gergely, P.; Praly, J.-P.; Vidal, S. Synthesis of 4-Amidomethyl-1-Glucosyl-1,2,3-Triazoles and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Carbohydr. Res.* **2015**, *402*, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.009>.
- (438) Yu, F.; Wang, Q.; Zhang, Z.; Peng, Y.; Qiu, Y.; Shi, Y.; Zheng, Y.; Xiao, S.; Wang, H.; Huang, X.; Zhu, L.; Chen, K.; Zhao, C.; Zhang, C.; Yu, M.; Sun, D.; Zhang, L.; Zhou, D. Development of Oleanane-Type Triterpenes as a New Class of HCV Entry Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (11), 4300–4319. <https://doi.org/10.1021/jm301910a>.
- (439) Rocher, F.; Chollet, J.-F.; Jousse, C.; Bonnemain, J.-L. Salicylic Acid, an Ambimobile Molecule Exhibiting a High Ability to Accumulate in the Phloem. *Plant Physiol* **2006**, *141* (4), 1684–1693. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082537>.
- (440) He, M.; Su, J.; Xu, Y.; Chen, J.; Chern, M.; Lei, M.; Qi, T.; Wang, Z.; Ryder, L. S.; Tang, B.; Osés-Ruiz, M.; Zhu, K.; Cao, Y.; Yan, X.; Eisermann, I.; Luo, Y.; Li, W.; Wang, J.; Yin, J.; Lam, S. M.; Peng, G.; Sun, X.; Zhu, X.; Ma, B.; Wang, J.; Liu, J.; Qing, H.; Song, L.; Wang, L.; Hou, Q.; Qin, P.; Li, Y.; Fan, J.; Li, D.; Wang, Y.; Wang, X.; Jiang, L.; Shui, G.; Xia, Y.; Gong, G.; Huang, F.; Wang, W.; Wu, X.; Li, P.; Zhu, L.; Li, S.; Talbot, N. J.; Chen, X. Discovery of Broad-Spectrum Fungicides That Block Septin-Dependent Infection Processes of Pathogenic Fungi. *Nature Microbiology* **2020**, *5* (12), 1565–1575. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00790-y>.
- (441) Sun, Y.; Ruan, X.; Ma, L.; Wang, F.; Gao, X. Rapid Screening and Evaluation of Maize Seedling Resistance to Stalk Rot Caused by *Fusarium* Spp. *Bio Protoc* **2018**, *8* (10), e2859. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2859>.

- (442) Pereira, R.; Benedetti, R.; Pérez-Rodríguez, S.; Nebbioso, A.; García-Rodríguez, J.; Carafa, V.; Stuhldreier, M.; Conte, M.; Rodríguez-Barrios, F.; Stunnenberg, H. G.; Gronemeyer, H.; Altucci, L.; de Lera, Á. R. Indole-Derived Psammaphin A Analogues as Epigenetic Modulators with Multiple Inhibitory Activities. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9467–9491. <https://doi.org/10.1021/jm300618u>.
- (443) Reid, R. C.; Clark, C. I.; Hansford, K.; Stoermer, M. J.; Mcgeary, R. P.; Fairlie, D. P.; SCHAFFER, K. E. Compounds and Inhibitors of Phospholipases. WO2002008189A1, **2002**.
- (444) Dalton, N.; Gordon, C. P.; Boyle, T. P.; Vandegraaf, N.; Deadman, J.; Rhodes, D. I.; Coates, J. A.; Pyne, S. G.; Keller, P. A.; Bremner, J. B. The Discovery of Allyltyrosine Based Tripeptides as Selective Inhibitors of the HIV-1 Integrase Strand-Transfer Reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (25), 6010–6023. <https://doi.org/10.1039/C6OB00950F>.
- (445) Sazonova, N. M.; Tarasyuk, A. V.; Shumskii, A. N.; Povarnina, P. Yu.; Kruglov, S. V.; Antipova, T. A.; Gudasheva, T. A.; Seredenin, S. B. Synthesis and Biological Properties of a New Dipeptide Mimetic of Brain-Derived Neurotrophic Factor Loop 2. *Pharm. Chem. J.* **2018**, *52* (9), 763–770. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1896-0>.
- (446) Guanti, G.; Banfi, L.; Basso, A.; Bondanza, L.; Guglieri, G.; Powles, K.; Riva, R. Optimized Synthesis of Phosphatidylserine. *Amino Acids* **2010**, *39* (2), 367–373. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0447-0>.
- (447) Thanh, N. D.; Hai, D. S.; Ngoc Bich, V. T.; Thu Hien, P. T.; Ky Duyen, N. T.; Mai, N. T.; Dung, T. T.; Toan, V. N.; Kim Van, H. T.; Dang, L. H.; Toan, D. N.; Thanh Van, T. T. Efficient Click Chemistry towards Novel 1H-1,2,3-Triazole-Tethered 4H-Chromene–D-Glucose Conjugates: Design, Synthesis and Evaluation of in Vitro Antibacterial, MRSA and Antifungal Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *167*, 454–471. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.060>.
- (448) M. Takacs, J.; C. Thacker, N.; Molnár-Tóth, J.; L. Miska, J.; G. Barletta, R. Preparation of D-Cycloserine and ¹³C-Labeled D-Cycloserine. *Heterocycles* **2012**, *86* (2), 1575. <https://doi.org/10.3987/COM-12-12553>.
- (449) Percec, V.; Wilson D.; Leowanawat, P.; Wilson, C.; Hughes, A.; Kaucher, M.; Hammer, D.; Levine, D.; Kim, A.; Bates, F.; Davis, K.; Lodge, T.; Klein, M.; DeVane, R.; Aqad, E.; Rosen, B.; Argintaru, A.; Sienkowska, M.; Rissanen, K.; Nummelin, S.; Ropponen, J. Self-Assembly of Janus Dendrimers into Uniform Dendrimersomes and Other Complex Architectures. *Science* **2010**, *328* (5981), 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1185547>.
- (450) Gu, K.; Bi, L.; Zhao, M.; Wang, C.; Ju, J.; Peng, S. Toward the Development of Chemoprevention Agents. Part II: Chemo-Enzymatic Synthesis and Anti-Inflammatory Activities of a New Class of 5-Amino-2-Substitutedphenyl-1,3-Dioxacycloalkanes. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (18), 6273–6290. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.018>.

- (451) Tsuji, H.; Yamamoto, H. Hydroxy-Directed Amidation of Carboxylic Acid Esters Using a Tantalum Alkoxide Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (43), 14218–14221. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b09482>.
- (452) Zhang, Y.-M.; Fan, X.; Yang, S.-M.; Scannevin, R. H.; Burke, S. L.; Rhodes, K. J.; Jackson, P. F. Syntheses and in Vitro Evaluation of Arylsulfone-Based MMP Inhibitors with Heterocycle-Derived Zinc-Binding Groups (ZBGs). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 405–408. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.049>.

Résumé

L'acide salicylique est un composé impliqué dans de nombreux processus biologiques et physiologiques des plantes. L'usage d'acide salicylique pour la protection des cultures a montré son intérêt, mais avec toutefois une limitation majeure. En effet, lorsqu'il est apporté de façon exogène à la plante, ce dernier est rapidement métabolisé et compartimenté, et n'aura donc une activité biologique que sur une courte période. Il s'avère donc nécessaire de trouver une stratégie permettant à l'acide salicylique d'être disponible sur un plus long terme *in planta*. Pour parvenir à cet objectif, nous avons utilisé une stratégie de prodrogue validée antérieurement au laboratoire avec un fongicide associé à un nutriment tel qu'un α -aminoacide ou un sucre. Dans le cadre de ces travaux, l'acide salicylique a été sélectionné en tant que substance active ainsi que deux analogues chlorés, les acides 5-chloro et 3,5-dichlorosalicylique.

Au cours de la première partie de ce travail, des conjugués d'acide salicylique ou de ses deux analogues chlorés ont été synthétisés en réalisant diverses variations structurales au niveau du nutriment (α -aminoacide ou sucre) ou de l'espaceur (1,2,3-triazole, éthylène glycol, 1,4 ou 1,5-dicarbonyle) qui relie les deux entités. Ces synthèses multi-étapes ont permis l'obtention de seize conjugués d'acide salicylique ou analogues liés à différents aminoacides de série L (acide glutamique, tryptophane, acides diamino propionique et butyrique, lysine et sérine) ou à un sucre (glucose) avec des rendements globaux satisfaisants. Ces bioprécurseurs et leurs intermédiaires ont été caractérisés par des techniques usuelles d'analyse de molécules organiques telles que la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse.

La seconde partie de ce travail a consisté à réaliser des études biologiques préliminaires avec six de ces conjugués. Ces derniers associent l'acide salicylique et ses deux analogues chlorés à du β -D-glucose ou de l'acide L-glutamique *via* un espaceur 1,2,3-triazole. La mobilité phloémienne a été évaluée chez le ricin en comparaison des trois molécules parentes. Les résultats obtenus ont mis en évidence une meilleure mobilité en présence d'un α -aminoacide. Ces six conjugués ont ensuite été évalués sur un modèle de laboratoire quant à leurs activités biologiques sur l'helminthosporiose du maïs provoquée par le champignon parasite *Bipolaris maydis*. Tous les composés ont montré une action préventive en réduisant la taille des nécroses induites par *B. maydis* sur les feuilles de maïs. Toutefois, les deux conjugués associant l'acide salicylique ou son analogue monochloré en position 5 à l'acide glutamique sont ceux qui présentent la plus forte efficacité préventive alors qu'ils n'ont aucune action fongicide directe *in vitro*. On peut donc alors supposer que ces deux produits ont stimulé les défenses naturelles chez le maïs. Cette hypothèse a ensuite été confirmée car ces molécules induisent, de façon similaire aux composés parents, une régulation positive de l'expression de deux gènes liés à la défense, *ZmNPR1* et *ZmPRI*.

Mots clés : Acide salicylique, Bioprécurseur, Prodrogue, Conjugué, Synthèse multi-étapes, Défenses naturelles des plantes, Éliciteur, Systémie.

Abstract

Salicylic acid is an elicitor compound involved in many biological and physiological processes in plants. The use of salicylic acid for natural protection of crops has shown its interest, but with a major limitation. When it is brought exogenously to the plant, it is rapidly metabolized and compartmentalized, and will therefore have a biological activity only over a short period. Consequently, it is necessary to find a strategy that allows salicylic acid to be available over a longer period *in planta*. To achieve this objective, we used a prodrug strategy previously developed in the laboratory with a fungicide associated to a nutrient such as an α -amino acid or a sugar. Salicylic acid was selected as the active substance along with two chlorinated analogues, 5-chloro and 3,5-dichlorosalicylic acids.

In the first part of this work, prodrugs (also called conjugates) of salicylic acid or its two chlorinated analogues were synthesized by making various structural variations concerning the nutrient (α -amino acid or sugar) or the spacer arm (1,2,3-triazole, ethylene glycol, 1,4 or 1,5-dicarbonyl) that links the two units. These multi-step syntheses allowed to obtain sixteen conjugates of salicylic acid or analogues linked to different L-series amino acids (glutamic acid, tryptophan, diamino propionic and butyric acids, lysine and serine) or to a sugar (glucose) with satisfactory yields. These bioprecursors and their intermediates were characterized by usual techniques of organic compounds analysis such as nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

The second part of this work involved preliminary biological studies with six of these conjugates. These conjugates combine salicylic acid and its two chlorinated analogues with β -D-glucose or L-glutamic acid *via* a 1,2,3-triazole spacer. Phloem mobility was evaluated in the *Ricinus* model in comparison to the three parent molecules. The results showed a better mobility in the presence of an α -amino acid. These six conjugates were then evaluated in a laboratory model for their biological activities on southern corn leaf blight due to the parasitic fungus *Bipolaris maydis*. All compounds showed preventive action by reducing the size of *B. maydis*-induced necroses on maize leaves. Thus, the two conjugates combining salicylic acid or its monochlorinated analog in position 5 with glutamic acid showed the highest preventive efficiency while they had no direct *in vitro* fungicidal activity. It can be hypothesized that these two prodrugs stimulated natural defenses in maize. This assumption was then confirmed because these compounds induced, in a similar way to the parent compounds, an up-regulation of the expression of two defense-related genes, *ZmNPR1* and *ZmPRI*.

Keywords: Salicylic acid, Bioprecursor, Prodrug, Conjugate, Multi-step synthesis, Plant defense responses, Elicitor, Systemicity.