



HAL
open science

Conception, synthèse et caractérisation de dérivés diaryl éthers comme nouveaux inhibiteurs directs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis*

Rasoul Tamhaev

► **To cite this version:**

Rasoul Tamhaev. Conception, synthèse et caractérisation de dérivés diaryl éthers comme nouveaux inhibiteurs directs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. Virologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES039 . tel-04675657

HAL Id: tel-04675657

<https://theses.hal.science/tel-04675657v1>

Submitted on 22 Aug 2024

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Conception, synthèse et caractérisation de dérivés diaryl éthers comme nouveaux inhibiteurs directs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Thèse présentée et soutenue, le 16 février 2024 par

Rasoul TAMHAEV

École doctorale

SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse

Spécialité

Chimie-Biologie-Santé

Unité de recherche

SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt Biologique

Thèse dirigée par

Christian LHERBET et Lionel MOUREY

Composition du jury

Mme Vania BERNARDES-GÉNISSON, Présidente, Université Toulouse III - Paul Sabatier

M. Laurent SOULÈRE, Rapporteur, INSA-Lyon

M. Ruben HARTKOORN, Rapporteur, Institut Pasteur Lille

Mme Stéphanie PETRELLA, Examinatrice, Université Paris Cité

M. Christian LHERBET, Directeur de thèse, CNRS Occitanie-Ouest

M. Lionel MOUREY, Co-directeur de thèse, CNRS Occitanie-Ouest

Membres invités

M. Laurent Maveyraud, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens tout particulièrement à remercier Christian Lherbet et Lionel Mourey de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Un grand merci à vous pour ces trois années durant lesquelles vous avez partagé vos connaissances et encadré ce projet. Merci pour votre soutien tant humain que professionnel.

Je remercie les membres du jury, Laurent Soulière et Ruben Hartkoorn, en tant que rapporteurs ainsi que Stéphanie Petrella et Vania Bernardes-Génisson d'avoir accepté de juger ces travaux de thèse.

Un grand merci à Laurent Maveyraud et Joëlle Azéma-Despeyroux pour leur implication dans les différents projets de cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de communiquer votre expertise, vos connaissances ainsi que vos conseils tout au long de ces travaux.

Merci à l'ensemble de l'équipe SySMiC et aux personnes du SPCMIB pour leur soutien et leur bonne humeur au quotidien. Des remerciements particuliers à Muriel, Nathalie et Isabelle pour l'organisation des goûters et repas.

Je tiens également à remercier les personnes du « SPCMIB Forever » : Mylan, Crystalle, Emma, Marc, Margaux, Emeline, Jon, Valentine, Maëlle et Stephen pour leur joie de vivre mais également le soutien dont ils m'ont fait part.

Merci à Adèle et Lorena, stagiaires formidables, pour leur implication et pour la bonne humeur partagée.

Je tiens à remercier toute l'équipe de Biophysique Structurale pour l'accueil, l'aide et le soutien indéfectible dont ils m'ont fait part durant ces trois années. Des remerciements particuliers à Valérie, Virginie, Suzana, Samuel, Jean-Denis et Fabienne pour avoir partagé leurs expertises et leurs conseils. Merci pour les moments de convivialité que l'on a pu partager que ce soit au laboratoire, mais également en dehors. Mes remerciements les plus sincères à Laura, Julie, Thomas, Clothilde, Aline, Georges, Martin, Pauline et Clément pour les très bons moments que l'on a pu partager, notamment pendant les soirées synchrotron. Je remercie également Ahmed, camarade de rédaction jusqu'à pas d'heure et pour son soutien moral.

Je tiens également à remercier Mila pour son support, sa curiosité mais également son sens de l'humour et de la répartie, et qui aura joué un rôle clé dans l'aboutissement de ce manuscrit.

Je remercie Méлина, colocataire de bureau avec qui cette aventure a été partagée durant les trois années. Merci pour toute l'aide qu'elle m'a apportée tout au long de cette thèse.

Un grand merci à Majed pour son soutien indéfectible du début à la fin de cette thèse. Merci pour ces discussions toujours plus intéressantes et intrigantes, qui parties de rien, pouvaient très souvent durer plusieurs heures.

Finalement, un grand merci à ma famille, mes parents, mes sœurs et mon frère pour leurs encouragements et leur soutien, source de motivation sans qui ces trois années de thèse auraient été totalement différentes.

Abréviations

ABC	ATP binding cassette
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ACP	Acyl Carrier Protein
ADA	Acide N-(2-acétamido)iminodiacétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
App	Apparent
ATP	Adénosine triphosphate
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependant kinase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DCC	Dynamic combinatorial chemistry
DCL	Dynamic combinatorial library
DCX	Dynamic combinatorial X-ray crystallography
DDCoA	Dodécényl-coenzyme A
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EMB	Ethambutol
ENR	Enoyl-[Acyl Carrier Protein] réductase
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
ETH	Ethionamide
EtOH	Ethanol
FAS	Fatty acid synthase
FBDD	Fragment-based drug design
HDAC	Histone désacétylase
HPLC	High performance liquid-chromatography
HRMS	High-resolution mass spectrometry
HTS	High-throughput screening
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
INH	Isoniazide
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ISO	Isoxyl
KTGS	Kinetic-target guided synthesis
LC-MS	Liquid-chromatography mass spectrometry
Mab	<i>Mycobacterium abscessus</i>
MDR-TB	Multi-drug resistant tuberculosis
MeOH	Méthanol
MmpL	Mycobacterial membrane protein large
MNT	Mycobactérie non tuberculeuse
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit
OMS	Organisation mondiale de la santé

ONU	Organisation des nations unies
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyéthylène glycol
PG	Peptidoglycane
PIPES	Acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthanesulfonique)
Pks13	Polyketide synthase 13
PZA	Pyrazinamide
Rf	Retention factor
RIF	Rifampicine
RMN / NMR	Résonance magnétique nucléaire / Nuclear magnetic resonance
RMSD	Root-mean-square deviation
SBL	Substrate binding loop
SDR	Short chaine deshydrogenase/reductase
TAC	Thiacétazone
TB	Tuberculose
TCL	Triclosan
TDR-TB	Totally drug-resistant tuberculosis
THT	Trans-2-hexadécénoyl-(N-acétylcystéamine)-thioester
TLC	Thin layer chromatography
TLIG	Test à libération d'interféron-gamma
TMM	Monomycolate de tréhalose
TST	Test de sensibilité cutané à la tuberculine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis

Table des matières

Introduction.....	8
I. La tuberculose	8
1. Histoire de la tuberculose	8
2. Etat actuel de la maladie.....	9
2.1. La tuberculose à travers le monde.....	9
2.2. La tuberculose en France	10
3. Tuberculose et VIH	11
4. Objectif : éradiquer la tuberculose.....	12
5. Impact de la COVID-19 sur la tuberculose.....	13
II. Les aspects biologiques de la maladie	14
1. Les agents pathogènes responsables de la tuberculose.....	14
2. Moyens de lutte contre la tuberculose.....	16
2.1. Dépistage et diagnostic	16
2.2. Prévention et vaccination.....	17
2.3. Traitement de la tuberculose	19
a. Anciens remèdes.....	19
b. Antibiotiques	20
c. Résistances et nouveaux médicaments.....	24
III. Les mécanismes de résistance aux médicaments	27
1. Limitation de l'entrée du médicament	28
2. Inactivation du médicament.....	28
3. Modification de la cible moléculaire	28
4. Efflux de médicaments	29
IV. L'enveloppe cellulaire mycobactérienne	30
1. Structure de l'enveloppe.....	30
2. Mycomembrane et acides mycoliques	32
3. Biosynthèse des acides mycoliques	34
3.1. Le système FAS-I	34
3.2. Le système FAS-II.....	34
V. InhA : l'énoyl ACP réductase du système FAS-II de Mtb.....	37
1. Généralités.....	37
2. Structure générale d'InhA et mécanisme d'action	38
2.1. Structure générale et site actif d'InhA	38
2.2. Mécanisme de réduction du substrat	41
2.3. Caractérisation structurale de la protéine InhA	42

3. Les inhibiteurs directs d’InhA et leur mode fixation.....	44
3.1. Les arylamides	47
3.2. Les pyrrolidines carboxamides	49
3.3. Les thiadiazoles	50
3.4. Les pyridones.....	52
3.5. Les sulfonamides	53
3.6. Les pyrazoles	55
3.7. Les diaryl éthers	56
a. Diaryl éthers alkylés	57
b. Triazole-diaryl éthers.....	60
3.8. Les inhibiteurs bimodaux.....	61
Objectifs des travaux de thèse	65
Résultats.....	66
Chapitre 1 : Criblage par cristallographie combinatoire dynamique.....	67
I. Introduction	68
II. Résultats	74
1. Conception et synthèse des fragments	74
1.1. Choix des fragments pour la formation des adduits	74
1.2. Synthèse des fragments aldéhydes	75
1.3. Fragments amines, hydrazines et hydrazides	78
a. Fragments commerciaux.....	78
b. Synthèse du fragment diaryl éther comportant une fonction amine	78
2. Criblage par DCX.....	80
2.1. Cristallisation de la protéine InhA	80
2.2. Formation d’imines.....	81
2.3. Formation d’hydrazones et d’acylhydrazones.....	82
a. Adduit formé avec l’aldéhyde 11	84
b. Adduits formés avec l’aldéhyde 17	86
c. Comparaison avec les structures des fragments aldéhydiques	88
d. Inhibition de l’activité enzymatique d’InhA	91
III. Conclusion.....	95
Chapitre 2 : Exploitation du portail mineur d’InhA par les <i>bis</i> -diaryl éthers	97
Chapitre 3 : Conception, synthèse et évaluation biologique d’inhibiteurs duaux.....	148
I. Introduction	149
II. Conception d’inhibiteurs duaux du système FAS-II de Mtb.....	151
III. Résultats	154

1.	Synthèse des inhibiteurs	154
1.1.	Synthèse des diaryl éthers aldéhydiques	154
1.2.	Condensation en inhibiteurs duaux	155
2.	Evaluation biologique des inhibiteurs	156
2.1.	Activités inhibitrices contre la protéine InhA	158
2.2.	Métabolisation des molécules duales par EthA	159
2.3.	Activités inhibitrices contre des souches mycobactériennes	159
2.4.	Etude de la cytotoxicité des composés	161
3.	Caractérisation structurale des complexes InhA-inhibiteurs duaux	163
IV.	Conclusion.....	165
Chapitre 4 : Production, purification et cristallisation d’InhA de <i>Mycobacterium abscessus</i>		167
I.	Introduction	168
1.	Mab, un modèle de bactérie multi-résistante	168
2.	Les inhibiteurs de Mab	169
II.	Résultats	171
III.	Conclusion.....	174
Conclusion générale et perspectives		175
Material and methods		178
Biology.....		179
I.	Production and purification of InhA	179
1.	Transformation and production of InhA in <i>E. coli</i>	180
1.1.	Transformation and preparation of stock bacteria	180
1.2.	Production and expression	180
2.	Purification of tagged and untagged InhA	181
2.1.	Affinity chromatography	181
2.2.	Cleavage of the histidine tag.....	182
2.3.	Affinity chromatography of untagged InhA.....	183
2.4.	Size-exclusion chromatography.....	184
2.5.	Electrophoresis gel	184
II.	Crystallization and structure determination	185
1.	Co-crystallization and soaking.....	186
1.1.	Co-crystallization.....	186
1.2.	Soaking.....	186
2.	Data processing and structure determination	187
2.1.	Data processing	187
2.2.	Structure resolution.....	188

a. Molecular replacement	188
b. Electron density map analysis and structure refinement	189
III. Evaluation of InhA inhibition	190
IV. Mycobacterial growth inhibition assays	192
V. Cell viability assays	192
Chemistry	193
Tables des illustrations	216
I. Table des figures	217
II. Table des schémas	220
III. Table des tableaux	221
Références bibliographiques	222

Introduction

I. La tuberculose

1. Histoire de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse très ancienne citée depuis l'antiquité. Aujourd'hui connue comme l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières, avec près de 1,5 million de décès par an sur les dernières années¹, elle a porté différentes appellations au cours de l'histoire. Elle fut mentionnée par de nombreux médecins, notamment par Hippocrate qui décrit précisément différentes formes de tuberculose dans ses textes sous les noms de phtisie² durant l'antiquité. En France et en Angleterre au Moyen Âge, une des formes de cette maladie, la tuberculose ganglionnaire, était vue comme « le mal royal » (« *King's evil* ») dont le toucher du roi pouvait guérir les personnes atteintes³. Plus connue sous le nom « écrouelles » en France, cette forme présentait des symptômes physiques marqués, notamment des fistules purulentes localisées au niveau des ganglions lymphatiques du cou, rendant les personnes ayant contracté cette maladie plus facilement distinguables. Pendant plusieurs siècles, notamment du XVII^e au XX^e siècle, 20 à 30 % des décès parmi les adultes dans les grandes villes, telles que Londres et Paris, étaient imputables à la tuberculose. Lors de cette période, les décès représenteraient, d'après certains experts, un chiffre pouvant atteindre le milliard⁴.

En raison de la grande variété de formes et de symptômes de la tuberculose, celle-ci a été perçue comme des maladies différentes pendant très longtemps. Avec la découverte de tubercules dans les poumons des phtisiques par Franciscus de le Boë, appelé aussi Franciscus Sylvius, un début d'explication a été apporté pour la forme pulmonaire. Plus d'un siècle plus tard, Laennec fera le rapprochement, à travers l'observation de tubercules dans divers organes de personnes atteintes de phtisie, d'écrouelles et autres pathologies, pour ainsi les regrouper sous le nom de tuberculose. Cette théorie, ainsi que la contagiosité de la maladie resteront sujettes à controverse malgré la démonstration de la transmission par Jean-Antoine Villemin entre 1865 et 1868. Quelques années plus tard, plus précisément en 1882, Robert Koch observe et isole l'agent responsable des tubercules, le bacille de Koch ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Cette découverte permettra progressivement de mettre fin aux éventuels débats sur les origines pathologiques et la contagiosité de la tuberculose. La découverte de ce pathogène permettra, en 1921, le développement du vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) par Albert Calmette et Camille Guérin. Ce vaccin restera obligatoire en France chez les nouveaux nés jusqu'en 2007.

Par la suite, les premiers antibiotiques efficaces contre *Mtb* seront identifiés à partir des années 1950, notamment l'isoniazide (INH) qui fera son apparition sur le marché pour le traitement de la tuberculose. Au fil des années, l'INH deviendra la molécule la plus utilisée pour traiter la tuberculose.

2. Etat actuel de la maladie

2.1. La tuberculose à travers le monde

De nos jours, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que plus de 20 % de la population mondiale serait porteuse de *Mtb*, sous forme dormante. Au cours de ces dernières années, environ 10 millions de nouveaux cas de tuberculose par an ont été rapportés, avec des chiffres allant jusqu'à 10.6 million en 2021¹.

L'incidence de la tuberculose est élevée dans les pays pauvres et en voie de développement, comme illustré sur la Figure 1. En effet, plus des deux tiers des cas de tuberculose répertoriés en 2021 étaient représentés par uniquement huit pays : l'Inde, l'Indonésie, la Chine, les Philippines, le Pakistan, le Nigeria, le Bangladesh ainsi que la République démocratique du Congo. L'Inde représentait, à elle seule, 28 % des cas de tuberculose, avoisinant ainsi près de 3 millions de cas pour une population de 1.4 milliard d'habitants. L'incidence de la tuberculose en Inde était, de ce fait, de 210 pour 100 000 habitants.

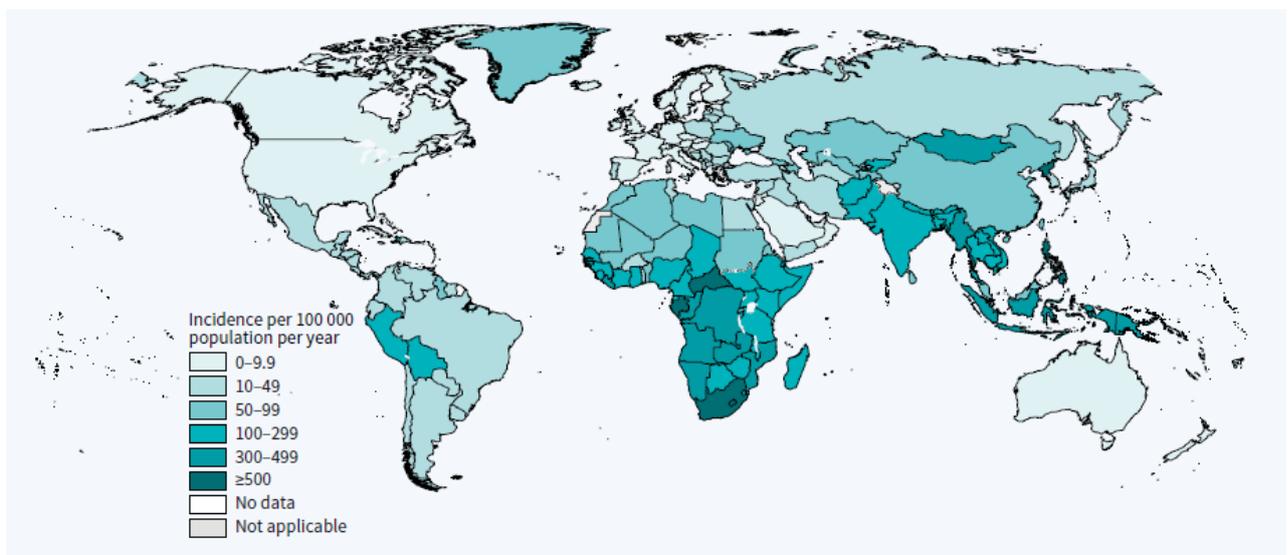


Figure 1 : Estimation de l'incidence de la tuberculose à travers le monde en 2021. Figure adaptée de *Global Tuberculosis Report 2022*, WHO, Geneva, 2022¹.

Parmi les 30 pays les plus touchés par la tuberculose, l'incidence est de 150 à 400 cas pour 100 000 habitants et est supérieure à 500 pour le Centrafrique, le Gabon, le Lesotho, les Philippines et l'Afrique du Sud.

La France ainsi que 46 autres pays enregistrent des incidences inférieures à 10 cas pour 100 000. Ces 46 autres pays sont principalement localisés dans les régions de l'Amérique du Nord, l'Europe, certains pays de la région de la Méditerranée orientale ainsi que la région du Pacifique Ouest.

La tuberculose peut se déclarer à tout âge chez l'être humain, avec une large prédominance à l'âge adulte. En 2021, 89 % des cas de tuberculose à travers le monde étaient retrouvés chez des adultes et 11 % chez des enfants. Parmi les adultes ayant contracté la tuberculose, la répartition était de 63.5 % d'hommes et 36.5 % de femmes (Figure 2).

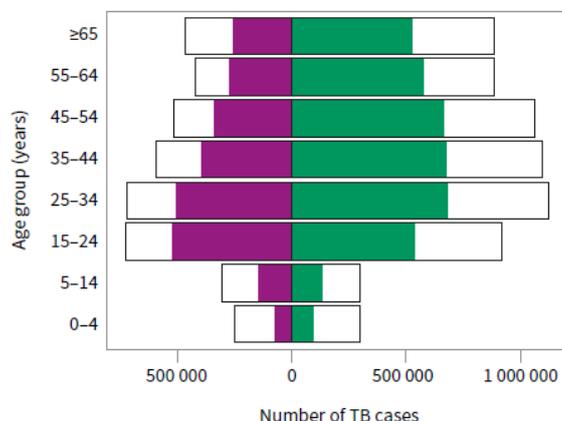


Figure 2 : Nombre de cas de tuberculose en fonction de l'âge et du genre en 2021. En violet : femmes ; en vert : hommes. Figure adaptée de Global Tuberculosis Report 2022, WHO, Geneva, 2022¹.

2.2. La tuberculose en France

En France, le nombre de cas de tuberculose est à la baisse depuis de nombreuses années (Figure 3). En 2021, 4 306 cas ont été déclarés sur le territoire français, soit une baisse de 6.5 % par rapport aux 4 606 cas déclarés en 2020. La différence est d'autant plus marquante en comparaison des 31 167 cas de tuberculose notifiés en 1972⁵, soit une baisse de 86.2 % illustrant les progrès de la France en ce qui concerne l'éradication de cette maladie. D'après les chiffres de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), l'incidence de la tuberculose en France a été divisée par dix en 50 ans, passant de 60 à 6.4 cas pour 100 000 habitants entre 1972 et 2021.

Malgré un taux d'incidence moyen de 6,4 sur le territoire français, des inégalités subsistent entre les différentes régions et départements. En effet, la Guyane, l'Île-de-France, ainsi que la région de Mayotte ont des taux d'incidence de 25.8, 13.2 et 12 respectivement là où des taux nuls ont été enregistrés pour la Lozère et la Drôme. La région de l'Île-de-France comprend à elle seule 38 % des cas de tuberculose répertoriés en 2021⁶.

L'incidence de la tuberculose est plus élevée chez les personnes en situation de précarité telles que les sans domicile fixe (68/100 000), celles en situation de détention carcérale (44/100 000) ainsi que chez les personnes nées à l'étranger (32/100 000).

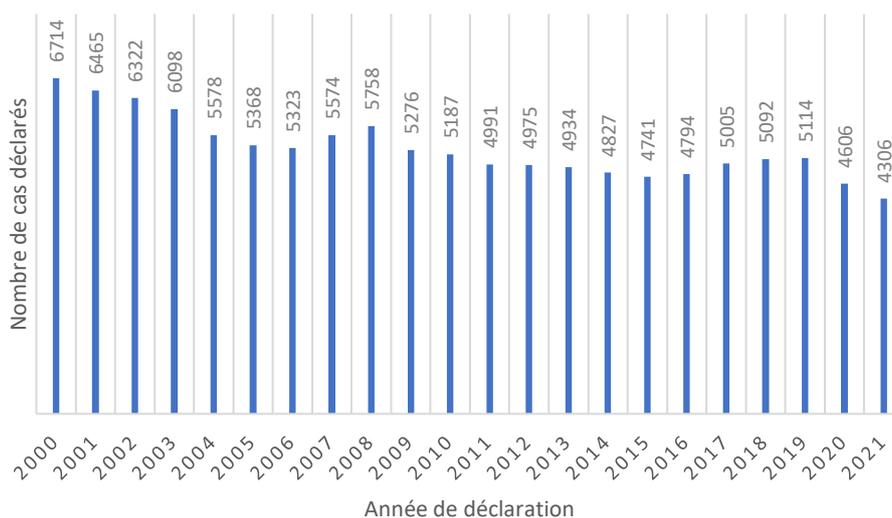


Figure 3 : Nombre de cas de tuberculose déclarés en France entre 2000 et 2021. Chiffres issus de Santé publique France.

3. Tuberculose et VIH

L'infection par Mtb chez les personnes touchées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) mène, bien souvent, au développement de la tuberculose. Dans cette situation de comorbidité, les risques de développer une forme active de la tuberculose sont jusqu'à 20 fois supérieurs par rapport à une personne non infectée par le VIH⁷. Les mécanismes favorisant l'infection par Mtb et la contraction de la tuberculose chez les personnes porteuses du VIH ne sont pas élucidés. Cependant, il est clair que la fragilisation du système immunitaire, avec la chute progressive de globules blancs, chez ces personnes augmente dramatiquement les risques de développer une tuberculose active⁸.

Cette co-infection mène, bien souvent, à la mort du patient s'il n'est pas pris en charge rapidement. En 2021, seulement 6.7 % des cas de tuberculose étaient des personnes positives au VIH, une proportion en baisse depuis de nombreuses années. Sur l'ensemble des décès dus au VIH, toujours durant l'année 2021, 23 % étaient imputables à la tuberculose, représentant environ 200 000 décès, principalement localisés en Afrique où la prévalence du VIH est extrêmement élevée.

4. Objectif : éradiquer la tuberculose

L'OMS, conjointement avec l'Organisation des Nations Unies (ONU), a mis en œuvre dès 2014, diverses stratégies afin d'éradiquer la tuberculose dans le monde d'ici 2035^{9,10}. Les baisses de 95 % du taux de mortalité et de 90 % du taux d'incidence par rapport aux chiffres de 2015 sont deux résultats importants liés à ces stratégies. Pour atteindre cela, la concentration a été portée sur plusieurs grands axes dont la prévention et le diagnostic de la maladie au plus tôt et la poursuite intensive de la recherche et du développement autour de la tuberculose.

Plusieurs étapes clé avaient été mises en place afin d'évaluer la progression de ce projet ambitieux et ainsi être en mesure de répondre en conséquence. Actuellement, les chiffres sont encore bien loin des attentes concernant la prochaine étape, 2025, comme le montre la Figure 4. En effet, seulement 20 % de l'objectif de réduction du taux d'incidence (10 % sur l'objectif 50 %) et 7.9 % pour celui de la réduction du nombre de décès (5.9 % sur l'objectif 75 %) ont été atteints d'après les derniers chiffres¹. Cela montre à quel point il est complexe de mettre en place un plan à l'échelle mondiale malgré les moyens mis en œuvre.

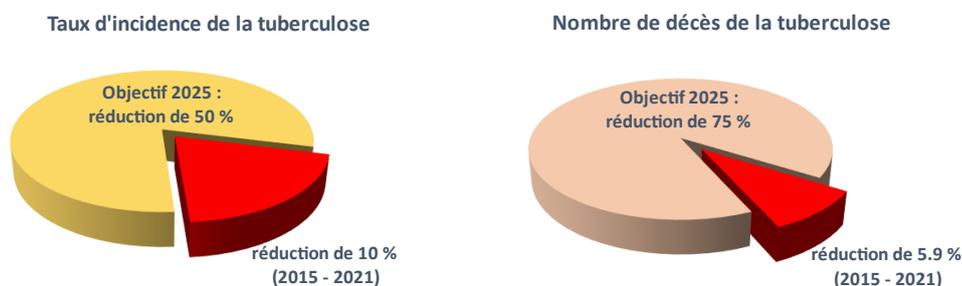


Figure 4 : Progression des stratégies de lutte contre la tuberculose pour l'étape 2025. Chiffres issus de Global Tuberculosis Report 2022, WHO, Geneva, 2022.

Outre l'explication socio-économique concernant certains pays et régions, qui est l'une des plus évidentes, des facteurs comme l'augmentation des cas de résistances aux médicaments viennent rendre la tâche plus ardue. En effet, la santé publique mondiale se heurte à près de 400 000 à

500 000 cas estimés de tuberculose multi-résistante par an¹. Ces résistances, acquises par des mutations spontanées sur le génome de Mtb, sont accrues par l'utilisation de doses trop faibles de médicament ou encore une période de traitement non menée à terme¹¹. Les personnes faisant une rechute de tuberculose ont, de ce fait, une probabilité supérieure de développer une tuberculose résistante. Ces différents points peuvent favoriser l'apparition et la sélection de souches résistantes, qui, par la suite, peuvent être transmises à d'autres personnes. Fréquenter une personne atteinte d'une tuberculose multi-résistante augmente, jusqu'à un facteur deux, la probabilité de développer à son tour une tuberculose multi-résistante¹².

5. Impact de la COVID-19 sur la tuberculose

La pandémie de COVID-19 a très fortement ralenti la progression du plan concernant l'éradication de la tuberculose, lancé par l'OMS. L'explosion fulgurante des cas de COVID-19 en 2020 à travers le monde a bouleversé les systèmes de santé des pays déjà en difficulté. Dans ces mêmes pays, le réaménagement des infrastructures destinées aux diagnostics de la tuberculose en lieux de dépistage de la COVID a drastiquement fait chuter les notifications de cas de tuberculose (Figure 5). De plus, la réattribution de financements pour la lutte contre la tuberculose en faveur de la lutte contre la COVID a porté un coup dans la progression visant à éradiquer la tuberculose. Ces différents points, couplés aux confinements dans le but d'endiguer la crise de la COVID, ont freiné et même inversé, dans certains pays, la tendance à la baisse pour les nombres de cas de tuberculose. Au sein d'un environnement clos, et sans accès aux systèmes de santé dans le but de diagnostiquer et traiter la tuberculose, la probabilité de contaminer un membre de la famille était fortement augmentée du fait du confinement à domicile.

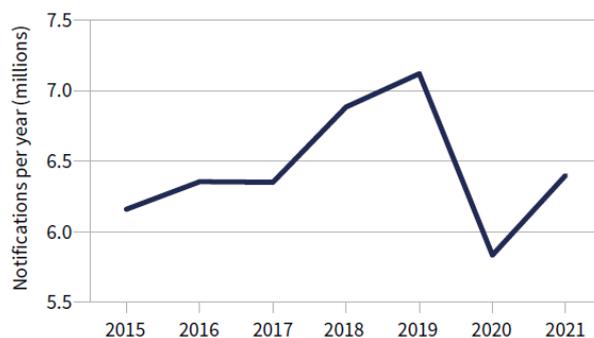


Figure 5 : Evolution du nombre de cas de tuberculose notifiés par an. Figure adaptée de Global Tuberculosis Report 2022, WHO, Geneva, 2022¹.

Le nombre de décès causé par la tuberculose a connu, après une constante baisse de 2015 à 2019, une hausse en 2020 et 2021 du fait de la crise de la COVID. Une augmentation de 3.1 % des cas de tuberculose résistante a également été observée sur la même période. En tenant compte de l'ensemble de ces points, l'OMS estime que, pour 2020-2025, plus de 6.3 millions de nouveaux cas et 1.4 million de décès supplémentaires seront à considérer. Eradiquer la tuberculose d'ici 2035 paraît ainsi difficilement réalisable, au vu de l'état actuel de la situation. Il est de ce fait essentiel de continuer les efforts collectifs pour mieux lutter contre cette épidémie qui dure depuis des millénaires.

II. Les aspects biologiques de la maladie

1. Les agents pathogènes responsables de la tuberculose

La tuberculose est majoritairement causée par *Mtb*, bien que d'autres mycobactéries du complexe dit *Mtb*, comme *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* peuvent aussi en être responsables¹³. Certains de ces pathogènes peuvent être transmis de l'animal à l'Homme. Le développement de tuberculose chez l'Homme après contact prolongé avec du bétail atteint de tuberculose bovine, provoquée par *M. bovis*, fut suggéré très tôt et s'est révélé exact. En effet, *M. bovis* est retrouvée chez plusieurs vertébrés¹⁴. *M. africanum*, décrite pour la première fois en 1968 chez un patient tuberculeux africain, est principalement localisée en Afrique où elle est responsable de jusqu'à 50 % des cas de tuberculose de cette région.

Mtb est une bactérie du genre *Mycobacterium*, appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae*, qui comporte plus de 190 membres connus actuellement¹⁵. Les mycobactéries pathogènes sont pour la plupart opportunistes, nécessitant une immunodépression ou bien une maladie préexistante (atteintes pulmonaires par exemple). Les mycobactéries sont souvent décrites en sous-groupes : les mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses. Certaines des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) provoquent des maladies bien connues, dont *M. ulcerans*, causant l'ulcère de Buruli. Parmi les MNT, d'autres mycobactéries comme *M. abscessus* émergent de plus en plus de nos jours. Ces dernières sont des agents pathogènes opportunistes responsables d'atteintes pulmonaires sévères, notamment chez les personnes ayant déjà une pathologie pulmonaire comme dans le cas de la mucoviscidose¹⁶.

Bien que *Mtb* soit une bactérie à Gram positif, la coloration est difficile notamment due à la mycomembrane, une paroi riche en lipides. *Mtb* est une bactérie aérobie à croissance lente formant des colonies de couleur beige. Cette bactérie est principalement disséminée par expectorations (toux, éternuement) de personnes atteintes de tuberculose infectieuse. Une gouttelette excrétée, dont la taille varie de 1 à 5 μm de diamètre, peut contenir une dizaine de bacilles. Ces fines gouttelettes peuvent persister dans l'air plusieurs heures, facilitant la contamination dans des espaces clos, comme les maisons. Une fois les gouttelettes inhalées, celles-ci cheminent jusqu'aux poumons par les voies respiratoires. Les bacilles tuberculeux contenus dans les gouttelettes seront phagocytés par, entre autres, des macrophages. Dans une majorité des cas, les bacilles restent dans un état quiescent dans ces cellules immunitaires qui se regroupent et forment un granulome. Dans ces circonstances, un état d'équilibre se met en place entre la lutte du système immunitaire ainsi que les bacilles et la maladie ne se déclenche pas, donnant ainsi lieu à une phase de tuberculose dite latente, dont un cinquième de la population mondiale est atteint de nos jours. Une personne souffrant de la forme latente est non contagieuse et le plus souvent asymptomatique.

Des mois, voire des années, plus tard, cette forme latente peut se transformer en tuberculose active. Bien souvent, ce changement d'état implique, comme déjà mentionné, une détérioration du système immunitaire liée ou non à une co-infection par le VIH. D'autres facteurs, comme la malnutrition, le diabète ainsi que l'usage d'immunosuppresseurs dans le cadre d'un traitement, entrent également en compte. Les mécanismes exacts lors de cette rupture de l'équilibre ne sont pour l'instant pas totalement élucidés, faute de sujets expérimentaux autre que l'humain pouvant être atteints de la forme latente. Cependant, certains travaux sur des sujets atteints de VIH (humains et macaques) montrent que la baisse des cellules T CD4^+ et CD8^+ , impliquées dans la production d'interféron γ , contribue fortement au basculement vers la forme active de la tuberculose^{17,18}.

Les bacilles tuberculeux se multiplient à l'intérieur des cellules immunitaires infectées, menant à la lyse de ces dernières et à la libération d'une grande quantité de bacilles. Par conséquent, cela provoque une inflammation localisée, attirant d'autres macrophages qui phagocytent les bacilles libérés. Ces bacilles pourront une nouvelle fois se démultiplier au sein des macrophages et, dans certains cas, atteindre d'autres tissus et organes en passant par la circulation sanguine, provoquant ainsi des tuberculoses extra-pulmonaires. Lors de cette phase, de la fièvre et de la toux se manifestent. D'autres symptômes apparaissent au cours de la progression de la maladie,

notamment des pertes d'appétit entraînant de l'amaigrissement, des sueurs nocturnes, un état de fatigue chronique, des douleurs thoraciques et une toux accompagnée de sang.

2. Moyens de lutte contre la tuberculose

2.1. Dépistage et diagnostic

Dans le but d'enrayer la progression et la propagation de la tuberculose, un dépistage et un diagnostic, très tôt, sont deux facteurs primordiaux. Pour cela, de nombreux tests existent, comme l'analyse microscopique des expectorations, le test de sensibilité cutané à la tuberculine (TST) appelé également le test Mantoux, ou encore l'examen de radiographie des poumons.

Les méthodes d'observation par microscopie sont généralement lentes et nécessitent un matériel précis. De plus, ce type de dépistage ne révèle pas spécifiquement la présence de Mtb, mais toutes les mycobactéries et par conséquent il n'est pas idéal pour des tests de dépistage en série. Ainsi, d'autres méthodes plus rapides et faciles à mettre en œuvre sont de préférence utilisées.

Parmi celles-ci, on trouve le test cutané tuberculinique, encore appelé test Mantoux, mis au point en 1907 par le médecin français Charles Mantoux. Ce test consiste en l'injection sous-cutanée, généralement dans le bras gauche, d'une dose de tuberculine, une solution de cultures de bacille tuberculeux bouillie, entraînant une réponse immunitaire et provoquant une induration¹⁹. L'observation et la mesure de la taille de cette dernière après 48 à 72 h permet d'en déduire ou non une infection sous-jacente. Néanmoins, des faux-positifs peuvent être observés lors de ces tests, en particulier à la suite d'une infection par des mycobactéries non-tuberculeuses ou une vaccination antérieure (inférieure à 10 ans) au BCG²⁰. Dans le but de valider le diagnostic, une recherche de nodules dans les poumons à l'aide d'une radiographie est généralement faite. En l'absence de nodules, il pourrait être question d'une tuberculose latente.

Récemment, deux nouvelles méthodes immunoenzymatiques, dont les modes de fonctionnement sont très similaires, ont vu le jour et sont commercialisées sous forme de kit : QuantiFERON-TB Gold Plus et T SPOT-TB. La première méthode fait intervenir la technique ELISA, là où TSPOT-TB utilise une méthode dérivée, l'ELISpot.

Le QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT, Qiagen) est un test de libération d'interféron γ (TLIG). Celui-ci dose, par la technique ELISA, l'interféron γ libéré par les cellules

immunitaires d'un échantillon de sang de patient. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ de cet échantillon mis en contact avec des antigènes particuliers (ESAT-6, CFP10 et TB 7.7) produisent une plus grande quantité d'interféron γ en réponse aux stimuli. Le choix de ces antigènes particuliers empêche une interférence de ce test avec le vaccin BCG pouvant fausser le résultat. Cette méthode est de plus en plus utilisée, en particulier en Europe. Elle peut être utilisée aussi en complément d'un test cutané douteux ou bien en cas d'administration récent du vaccin BCG. Cette méthode permet de détecter une tuberculose latente et ainsi de la traiter avant la phase de tuberculose active. Contrairement à la première version du test, le QuantiFERON-TB Gold Plus utilisé actuellement serait capable de discriminer les tuberculoses latentes et actives²¹.

Tout comme le test QuantiFERON, le T SPOT-TB (Oxford immunotec) repose également sur la libération d'interféron γ par les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ en présence des antigènes ESAT-6 et CPF10. L'interféron γ ainsi libéré va être fixé par des anticorps. Après l'ajout d'anticorps secondaires et de substrat, des spots bleu foncé apparaissent en cas de libération d'interféron γ . Le nombre de spots présents reflète un résultat positif ou négatif.

Ces tests sont recommandés pour les personnes à risque comme le personnel soignant, en cas de contacts avec une personne atteinte de tuberculose active, pour les personnes infectées par le VIH, les personnes ayant résidé dans un pays, ou étant d'origine d'un pays où la prévalence de la tuberculose est élevée. De récentes études statistiques montrent que les sensibilités et spécificités des méthodes de QuantiFERON-TB Gold Plus et T SPOT-TB sont comparables et sont légèrement supérieures à la méthode cutanée²².

2.2. Prévention et vaccination

Depuis le début de son utilisation dès les années 1920, en grande partie sur les nouveau-nés, le bacille de Calmette et Guérin (BCG) était le seul moyen de prévention vaccinale. Plus de cent ans après sa confection et mise sur le marché, le BCG est toujours inoculé et reste l'un des vaccins les plus utilisés au monde (vaccin anti-COVID-19 exclu), avec plus de 3 milliards de doses administrées. Le vaccin BCG se compose d'une souche vivante et atténuée de *M. bovis*, souche obtenue après 231 passages de culture. Cette atténuation est due à l'absence de la région de différence (RD1) sur le génome. Cette région code pour les protéines de virulence ESAT-6 et CFP-10²³. Depuis 2007, le vaccin BCG n'est plus obligatoire en France, mais demeure fortement recommandé chez les enfants dont les parents sont étrangers, et/ou venant

d'une région à risque. Cependant, le BCG reste très largement utilisé chez les enfants dans les pays dont la prévalence de la tuberculose est élevée, comme l'Inde ou encore la Russie. À travers le monde, c'est plus de 120 millions de vaccinations par an²⁴. Malgré cela, le vaccin BCG est très controversé²⁵, notamment quant à son efficacité. Dès la campagne de vaccination d'A. Calmette, avec plus de 114 000 enfants vaccinés entre 1921 et 1927²⁶, des retours sceptiques avaient été faits. De nos jours, l'efficacité de ce vaccin est remise en question, montrant une efficacité de 0 à 80 % selon les études²⁵.

Plusieurs variants de vaccin BCG sont actuellement disponibles sur le marché et divergent par leur composition, en particulier, la quantité de bacilles par dose²⁷. Actuellement, la majeure partie des vaccins BCG sont produits par l'UNICEF au Danemark, en Bulgarie, en Inde et au Japon. Ces pays produisent trois variants du BCG : BCG-Denmark, BCG-Russia et BCG-Japan. Le vaccin originel, le BCG-Pasteur n'est, quant à lui, utilisé que dans quelques pays. Ces différentes formulations et quantités de mycobactéries viables entraînent une réponse immunitaire (innée et adaptative) qui peut différer selon le type de BCG utilisé²⁸. Ainsi, certains vaccins peuvent se montrer légèrement plus protecteurs, notamment le BCG-Denmark qui est plus efficace que le BCG-Pasteur²⁹. Récemment, il a été montré que le vaccin BCG pourrait procurer une protection contre des pathogènes autres que ceux responsables de la tuberculose. Les personnes ayant reçu une ou plusieurs doses de BCG semblent plus protégés contre le diabète de type I^{30,31} et contre la COVID-19 chez les patients atteints de diabète de type I³².

Aujourd'hui, la nécessité de vaccins plus efficaces se fait ressentir pour contribuer à réaliser l'objectif d'éradication de la tuberculose de la surface de la terre. Plusieurs vaccins avec des approches différentes sont en phase d'essai clinique depuis cette dernière décennie³³. Parmi ces vaccins potentiels, on retrouve le vaccin M72/AS01 (GSK) qui vise à améliorer le vaccin BCG tant pour son efficacité que pour sa durée de protection. Ce vaccin est composé de la protéine M72 supplémentée avec un adjuvant, le AS01. M72, est une protéine recombinante venant de la fusion de deux antigènes de Mtb (Mtb32A et Mtb39A). Cette protéine stimule les lymphocytes T CD4⁺ et augmente de ce fait la production de l'interféron γ chez les personnes atteintes ou non de tuberculose³⁴. L'adjuvant AS01, un adjuvant à base de liposomes, est composé de deux immunostimulants : MPL et QS-21. Ceux-ci stimulent plusieurs cellules immunitaires, dont les cellules T CD4⁺ ainsi que les CD8⁺³⁵. La combinaison de M72 et AS01 forme un super immunostimulant permettant de mieux combattre Mtb. Après des résultats de phase II prometteuse en 2019, ce vaccin s'apprête aujourd'hui à entrer dans la phase III d'essais cliniques³⁶. Un autre vaccin en phase III, le VM 1002, est basé sur la souche BCG-Prague

modifiée génétiquement. Cette dernière comporte le gène codant pour la listériolysine, une protéine de *Listeria monocytogenes*, ainsi que la délétion du gène codant pour l'uréase C, ce qui, *in fine*, améliore l'immunogénicité du vaccin. Cette amélioration passe par une meilleure translocation d'antigènes mycobactériens du phagosome vers le cytoplasme et de ce fait, une meilleure présentation d'antigènes aux cellules T CD8⁺ ³⁷. Enfin, des vaccins utilisant d'autres mycobactéries que des souches atténuées de *M. bovis* sont en phase d'essais cliniques. Parmi les mycobactéries utilisées, des bacilles atténués de Mtb sont employés pour le vaccin RUTI ou encore MTBVAC. De plus, certains vaccins à base de mycobactéries non-tuberculeuses, notamment *Mycobacterium indicus pranii* et *Mycobacterium vaccae* sont également de potentiels candidats.

2.3. Traitement de la tuberculose

a. Anciens remèdes

Depuis les premières descriptions de la tuberculose durant l'antiquité, l'Homme a toujours cherché à traiter cette maladie. Durant la période romaine, Galien décrit la tuberculose comme étant liée à la malnutrition et recommande de l'air frais, une consommation de lait ainsi que des voyages sur mer comme traitement de la maladie. Une marche régulière dans des forêts boisées était fortement conseillée. L'air comme moyen de transmission, notamment avec les expectorations, était déjà mentionné comme vecteur de la maladie. Inspiré de la théorie des signatures, des remèdes à base de plantes ou bien de broyat de poumons d'animaux étaient préconisés, sans réel bénéfice biologique. Durant le moyen-âge, la pratique du toucher royal était perçue, pendant très longtemps, comme le remède à cette maladie. Jusque dans les années 1800, l'huile de foie de morue, les massages au vinaigre ou encore l'inhalation de ciguë étaient considérés comme des remèdes³⁸. Cette période a vu un grand nombre de potions et confections artisanales par des personnes malhonnêtes dans le but de s'enrichir.

Du fait de la contagiosité, les personnes atteintes par la tuberculose ne pouvaient être prises en charge par les hôpitaux publics. À partir du début du XVIII^e siècle, des sanatoria sont construits dans plusieurs pays, notamment en France, en Allemagne, en Suisse et aux États-Unis dans le but d'accueillir ces personnes à hauts risques pour la population. C'est ainsi que le premier sanatorium de France a été construit en 1861, et entre 1900 et 1950, pas moins de 250 sanatoria verront le jour. Ces sanatoria étaient construits dans des régions isolées, sur des montagnes ou bien en bord de mer afin de bénéficier d'air frais et de repos, deux conditions

citées à plusieurs reprises comme participant à la guérison. Initialement, les sanatoria étaient des lieux de guérison pour différentes maladies. Plusieurs sanatoria dédiés exclusivement à la tuberculose émergeront en France dès 1880. En ces lieux, des améliorations de l'état de santé de certaines personnes étaient observées, principalement dues à une meilleure condition de vie, d'alimentation et de repos, aboutissant à un renforcement du système immunitaire. Cependant, cela ne permettait généralement pas une guérison totale et durable dans le temps.

b. Antibiotiques

Depuis la découverte fortuite du premier antibiotique par Alexander Fleming en 1928³⁹, de nombreux antibiotiques ont été découverts ou mis au point⁴⁰. La découverte de la streptomycine par l'américain Selman Waksman au début des années 1940⁴¹ et la démonstration de son efficacité dans le traitement de la tuberculose chez les cochons d'Inde en 1944 apporta un espoir de lutte contre cette maladie, découverte pour laquelle il obtiendra le prix Nobel en 1952. Actuellement, tout un arsenal d'antibiotiques différents est disponible dans le but de traiter au mieux la tuberculose. Cet arsenal est subdivisé principalement en deux groupes, les antituberculeux de première et deuxième ligne. Cette division en deux grands groupes reste effective malgré plusieurs changements effectués par l'OMS sur la classification des antituberculeux, notamment en 2011 et 2016. Ces changements prennent systématiquement en compte l'efficacité ainsi que la toxicité des antituberculeux tout en incorporant les nouveaux antituberculeux développés.

○ Antituberculeux de première ligne

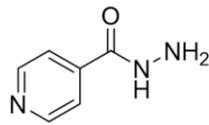
Dans la majorité des cas, le traitement d'une tuberculose (non-résistante) est initié avec la prise orale et quotidienne des antituberculeux de première ligne sur une période de plusieurs mois. Depuis 2010, les recommandations de l'OMS pour traiter une tuberculose et diminuer les risques de rechute impliquent l'usage des 4 antituberculeux de première ligne : l'isoniazide (INH), le pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB) ainsi que la rifampicine (RIF) sur 2 mois (Figure 6). Puis, l'isoniazide ainsi que la rifampicine sont conservés sur une période de 4 mois supplémentaire. Ces 4 antibiotiques ont des cibles et des mécanismes d'action différents, ce qui rend le traitement très efficace s'il est correctement suivi par les patients.

L'**INH** est l'antituberculeux le plus utilisé depuis sa découverte en 1952, et dont le mécanisme d'action ne fut élucidé que vers la fin des années 1990. L'INH est une petite prodrogue nécessitant une activation préalable par la protéine KatG de la mycobactérie. Lors de cette activation, un adduit est formé avec le NAD⁺⁴². Cet adduit cible la protéine InhA⁴³, une énoyl-acyl-carrier-protéine réductase impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques, constituants importants de l'enveloppe mycobactérienne. La grande majorité des résistances à l'INH est due à la non-activation de la prodrogue par la catalase KatG à la suite de mutations sur le gène codant pour celle-ci. Des mutations sur le gène *inhA* sont aussi responsables de résistances à INH.

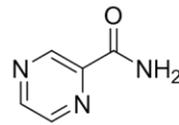
Le **PZA**, aussi développé dans les années 1950, est un analogue structural de l'isoniazide qui nécessite également une étape d'activation. L'acide pyrazinoïque est formé via l'action de la protéine PncA, une pyrazinamidase/nicotinamidase. En milieu acide, celui-ci s'accumule dans le cytoplasme des mycobactérie et cible un domaine C-terminal de la protéine ribosomale S1 (RpsA)⁴⁴. Par conséquent, la traduction au sein de ces mycobactéries est fortement perturbée, entraînant de ce fait, la mort cellulaire. Les mycobactéries résistantes au PZA présentent, principalement, des mutations sur le gène *pncA*, empêchant l'activation de la prodrogue.

Introduit en 1961, l'**EMB** est un antibiotique qui agit sur la production de composants de la paroi mycobactérienne. Il inhibe les arabinosyltransférases EmbA, B et C, enzymes impliquées dans la polymérisation de l'arabinose en arabinane puis en arabinogalactane. Les résistances à l'EMB sont peu nombreuses (inférieures à 1 %) et provoquées par des mutations sur les gènes *embA*, *B* et *C*.

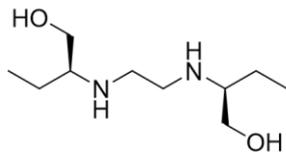
Enfin, la **RIF** est un antibiotique bloquant spécifiquement la transcription bactérienne. Cette molécule se fixe à la protéine RpoB, une protéine de la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. La RIF, comme l'INH, est un antibiotique essentiel dans le traitement de la tuberculose. Le gène *rpoB* est touché dans la plupart des résistances à la rifampicine. Les cas de résistance à la rifampicine sont parmi les plus fréquents.



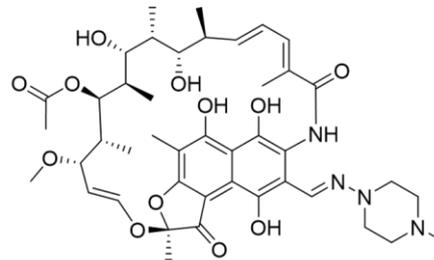
Isoniazide (INH)



Pyrazinamide (PZA)



Ethambutol (EMB)



Rifampicine (RIF)

Figure 6 : Les antituberculeux de 1^{ère} ligne et leurs structures.

○ Antituberculeux de deuxième ligne

L'emploi des antituberculeux de deuxième ligne est essentiellement réservé pour les tuberculoses résistantes aux antituberculeux de première ligne, notamment une résistance simultanée à la RIF et à l'INH, communément appelé tuberculoses multi-résistantes. Avec l'émergence de mycobactéries résistantes, ces antibiotiques plus toxiques que ceux de première ligne s'avèrent nécessaires pour lutter contre la tuberculose. Le traitement pour une tuberculose résistante est bien plus long, il passe de 6 mois jusqu'à une période de 2 ans. De plus, il nécessite une association de 4 à 6 médicaments en fonction du type de tuberculose résistante du patient. Dans ce groupe d'antituberculeux, on retrouve entre autres des **aminoglycosides**, comme la streptomycine anciennement utilisée comme antituberculeux de première ligne, des **fluoroquinolones**, des **oxazolidinones** (linézolide et cyclosérine) mais aussi des **thionamides** (Figure 7).

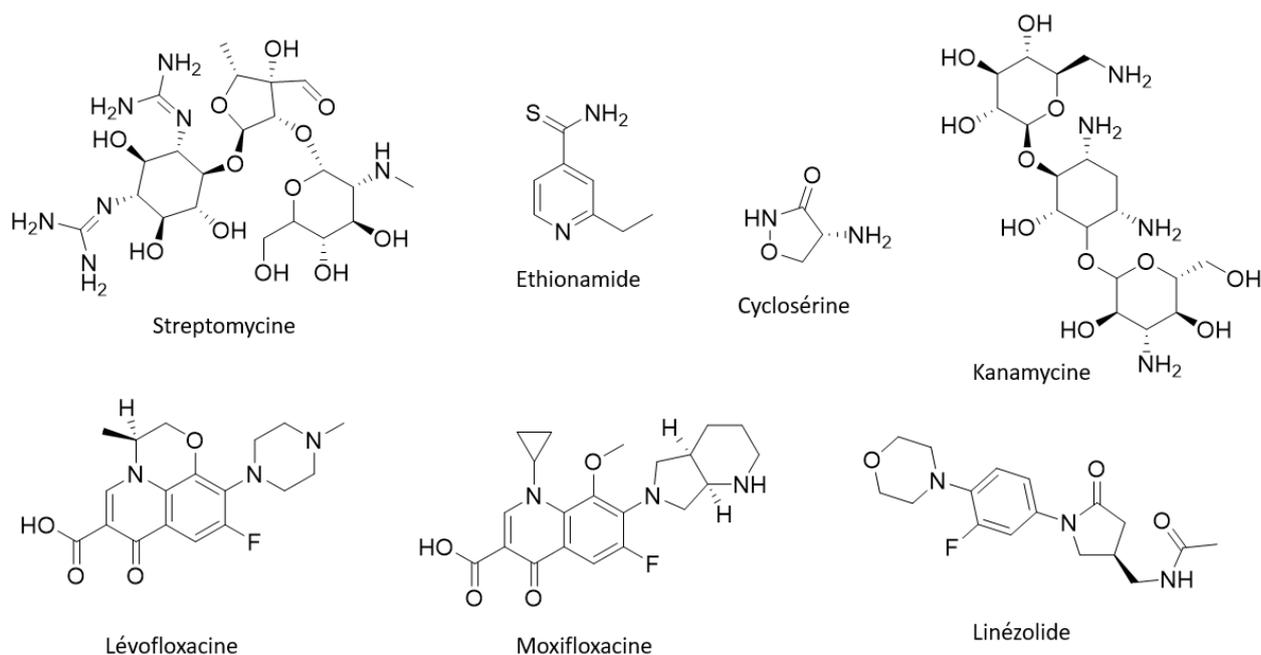


Figure 7 : Structures d'antituberculeux de 2^{ème} ligne.

Le spectre d'action de ces antituberculeux est très varié. Les **aminoglycosides**, constituent une famille d'antibiotiques composés d'unités de sucres, généralement de 2 à 5, substituées par des fonctions amines. Plusieurs antibiotiques tels que la streptomycine, la kanamycine, l'amikacine et la capréomycine sont retrouvés au sein de cette famille. Ces antibiotiques bloquent la synthèse protéique bactérienne en se fixant aux ribosomes bactériens. Contrairement aux antituberculeux de première ligne, des versions directement injectables existent. Ainsi, ces médicaments peuvent être très toxiques pour l'organisme, en particulier les reins.

Les **fluoroquinolones**, notamment la lévofloxacine et la moxifloxacine, respectivement développées en 1999 et 2000, sont deux antibiotiques à large spectre employés comme antituberculeux, mais aussi dans d'autres types d'infection, en particulier les infections urinaires. Les fluoroquinolones ciblent et bloquent les topoisomérases bactériennes (l'ADN gyrase et la topoisomérase IV), empêchant ainsi le déroulement de l'ADN, et de ce fait la réplication⁴⁵.

Les **thionamides**, notamment l'éthionamide (ETH), sont des analogues à la fois structuraux et fonctionnels de l'isoniazide. Une fois activé par la monooxygénase EthA⁴⁶, l'adduit formé avec le NAD⁺ se lie à InhA et bloque la synthèse d'acides mycoliques⁴⁷. Tout comme pour l'INH, des mutations sur le gène codant pour la protéine EthA peuvent provoquer des résistances à cet antibiotique.

Les deux **oxazolidinones**, à savoir le linézolide et la cyclosérine, sont des médicaments à très large spectre. Découverte en 1954 dans différentes espèces de *Streptomyces* (*lavendulae*, *garyphalus* et *roseochromogenus*), la cyclosérine a été introduite dès 1955 pour le traitement de la tuberculose. Son action antituberculeuse consisterait en l'inhibition de la formation de la paroi bactérienne en bloquant l'incorporation de la D-alanine. Cette action passerait par l'inhibition de l'alanine racémase et de la D-alanine ligase⁴⁸. Cependant, cette molécule est aussi connue pour jouer un rôle neurologique. Plus précisément, c'est un inhibiteur de l'acide *gamma*-aminobutyrique (GABA) transaminase, entraînant l'accumulation du neurotransmetteur GABA. Une forte dose de cyclosérine peut provoquer des vertiges, des maux de tête, de la paralysie, des convulsions, des crises d'épilepsie ainsi qu'une hépatotoxicité. Ces nombreux effets secondaires ont restreint la cyclosérine comme antituberculeux de 2nde ligne.

Contrairement à la cyclosérine, le linézolide est un antibiotique synthétique découvert dans les années 90. Cet antibiotique bloque la synthèse protéique en se fixant au centre peptidyltransférase de la sous-unité 50S ribosomale⁴⁹. Plusieurs mécanismes de résistance pour cet antibiotique ont été répertoriés⁵⁰.

c. Résistances et nouveaux médicaments

Ces dernières années, l'apparition de mycobactéries résistantes à un ou plusieurs antituberculeux de 1^{ère} ou 2^{ème} ligne appuie l'importance de développer des nouveaux médicaments. Malgré des estimations de nombre de cas par an constant (Figure 8), il est en effet primordial de traiter ces résistances et d'éviter leurs propagations. Par ailleurs, des souches de plus en plus résistantes ont vu le jour au fil du temps. Parmi celles-ci, des souches « *Extensively Drug-Resistant* » (XDR-TB) identifiées à partir du début des années 2000, notamment dans les pays d'Europe de l'Est, sont résistantes à l'INH, la RIF, aux fluoroquinolones ainsi qu'à un ou plusieurs antituberculeux injectables de deuxième ligne.

En 2009, le terme de TDR-TB, pour « *Totally Drug-Resistant Tuberculosis* » a vu le jour⁵¹. Les premiers cas, identifiés en Italie puis très rapidement en Inde ainsi qu'en Afrique du Sud, présentaient une résistance à tous les traitements disponibles à cette période.

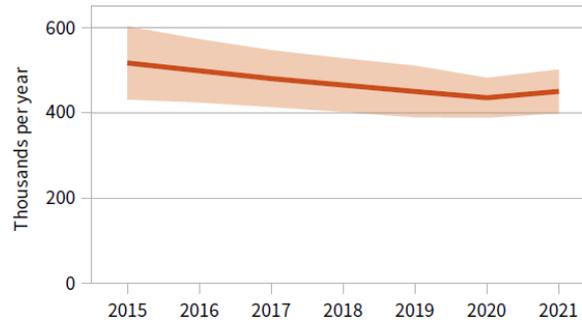


Figure 8 : Estimation des cas de tuberculoses résistantes à l'isoniazide et/ou la rifampicine. Orange : intervalle d'incertitude. Figure adaptée de Global Tuberculosis Report 2022, WHO, Geneva, 2022¹.

Ainsi, la recherche de nouveaux médicaments au cours de la dernière décennie a conduit à trois nouvelles molécules pour le traitement des tuberculoses multi-résistantes : la bédaquiline, le délamanide ainsi que le prétomanide (Figure 9).

La **bédaquiline** a été, en 2012, la première nouvelle molécule à être approuvée ces quarante dernières années aux États-Unis dans le traitement de la tuberculose. Cette diaryl quinoléine, possédant des groupements alcools et amines, agit directement sur la source d'énergie cellulaire, l'adénosine triphosphate (ATP). En bloquant l'ATP synthase, par la liaison à des sous-unités de l'ATP-synthase de type F, cette molécule provoque la mort cellulaire. Du fait d'une affinité 20 000 fois supérieure pour l'ATP synthase mycobactérienne par rapport à l'ATP synthase humaine, les effets secondaires sont minimes⁵².

La deuxième molécule, le **délamanide**, est un antituberculeux dérivé du nitro-dihydro-imidazooxazole. Une fois activé par le système F420 mycobactérien, son action antituberculeuse passe par l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques. Depuis ses premières utilisations en phase clinique en 2008, quelques résistances ont été décrites⁵³, cependant la prévalence de ces dernières reste faible.

Pour finir, le **prétomanide**, découvert au début des années 2000⁵⁴, est apparu sur le marché européen en 2020. L'utilisation de cet antibiotique est pour le moment restreinte à certaines conditions. Cet antibiotique est capable de tuer des bacilles quiescents ainsi que ceux en division, *via* des mécanismes pas encore entièrement élucidés⁵⁵.

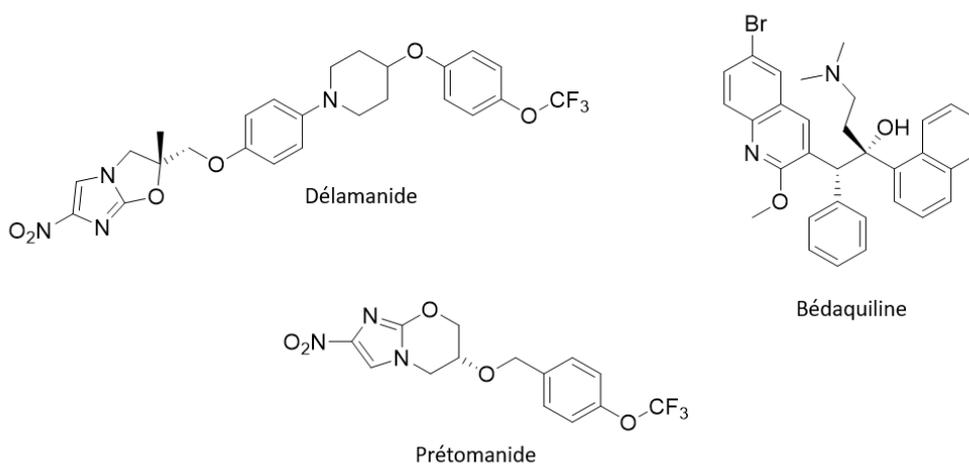


Figure 9 : Structures des nouveaux antituberculeux.

Avec l'arrivée de ces nouveaux antituberculeux, de nouvelles recommandations pour les traitements de la tuberculose, résistante ou non, ont été émises par l'OMS en 2022⁵⁶. L'association de 4 antituberculeux : l'INH, la rifampentine, qui comme la rifampicine appartient à la famille des rifamycines, la moxifloxacine et le PZA, permettrait de baisser la durée de traitement à un total de 4 mois chez les patients de plus de 12 ans. En parallèle, plusieurs autres molécules (Figure 10) ainsi que des associations de molécules sont en phase d'essais cliniques, dans l'optique d'aboutir à de nouvelles solutions pour le traitement de la tuberculose. Certaines de ces associations de médicaments sont en phase III d'essais cliniques. Parmi elles, un mélange de 4 antituberculeux (prétomanide, moxifloxacine, bédaquiline et PZA) est en phase de test pour le traitement de tuberculoses résistantes en 4 mois.

Le pipeline des médicaments et associations de médicaments en cours de développement est accessible *via internet*⁵⁷.

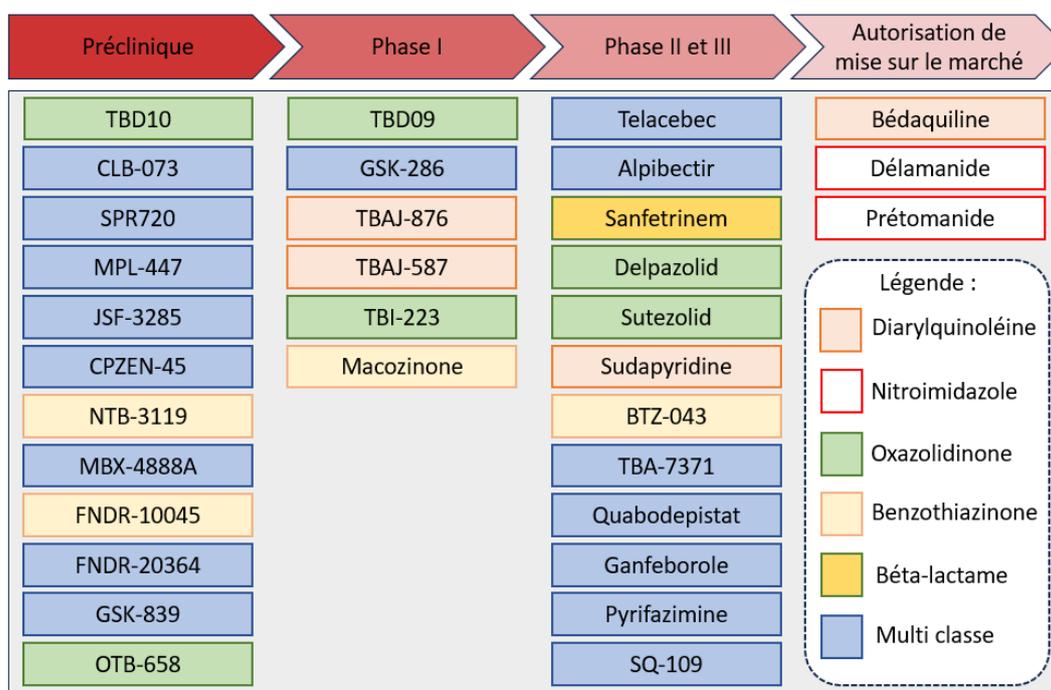


Figure 10 : Nouveaux médicaments en cours d'études. Figure réalisée à partir des informations disponibles sur le site newtdrugs.org.

III. Les mécanismes de résistance aux médicaments

Au début du XX^e siècle, les découvertes successives d'antibiotiques ont abouti à l'illusion d'un monde où toute maladie bactérienne pourrait être soignée. Malheureusement, ces illusions se sont heurtées très vite à la réalité et à la complexité du monde du vivant. À la suite de chaque découverte d'un nouvel antibiotique, des phénomènes de résistance ont été observés. Les mécanismes de résistance aux médicaments sont répartis en 4 principales catégories : limitation de l'entrée du médicament ; inactivation du médicament ; modification de la cible moléculaire du médicament et l'efflux du médicament⁵⁸. Ces résistances aux médicaments peuvent être des résistances dites naturelles ou bien acquises. Une résistance naturelle est une caractéristique propre à une espèce bactérienne. Une résistance acquise, quant à elle, peut être issue de phénomènes de mutations aléatoires ou bien liée à l'acquisition de matériel génétique étranger porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance en provenance d'une autre bactérie⁵⁹. Chez les bactéries, des mutations spontanées arrivent à une fréquence de 1 toutes les 10^5 à 10^8 réplifications. Si cette mutation n'est pas délétère et procure un avantage face à un antibiotique donné, la bactérie ayant acquis cette mutation survit et continue à se diviser. Cela induit un phénomène de sélection, qui permettra à la bactérie de se propager. L'ensemble des mécanismes de résistance aux antibiotiques est représenté sur la Figure 11 et est décrit dans ce qui suit.

1. Limitation de l'entrée du médicament

Cette stratégie est principalement observée chez les bactéries à Gram négatif. La présence de la seconde paroi composée de peptidoglycane confère à ces bactéries un caractère imperméable. Chez certaines espèces, la capacité à former des biofilms leur procure une résistance à divers antibiotiques par le même principe⁶⁰. Pour les molécules dont l'entrée nécessite l'intervention de porines, une réduction du nombre de ces porines, par des phénomènes de mutations ou non, peut entraîner une résistance⁶¹. Chez les mycobactéries, cette stratégie est aussi appliquée. En effet, bien que les mycobactéries soient des bactéries à Gram positif, la présence de la mycomembrane entraîne une résistance à certains types d'antibiotiques qui, en temps normal, sont efficaces contre les Grams positifs. Contrairement aux antibiotiques hydrophiles, les antibiotiques hydrophobes comme la rifampicine ou les fluoroquinolones entrent plus facilement dans cette mycomembrane.

2. Inactivation du médicament

Dans cette catégorie de résistances, les bactéries possèdent des enzymes capables de modifier ou de dégrader les antibiotiques. La grande majorité des résistances par modification de l'antibiotique font intervenir des transférases, qui greffent divers groupements chimiques⁶². L'acétylation est l'une des modifications les plus courantes, et est responsable de l'inactivation de multiples classes d'antibiotiques comme les aminoglycosides ou encore les fluoroquinolones. Cet ajout de groupements chimiques sur l'antibiotique peut alors l'empêcher, par gêne stérique, d'interagir avec la cible. Le second moyen de résistance est la dégradation de l'antibiotique, notamment par hydrolyse. Les résistances aux β -lactames (pénicilline, ampicilline), une famille d'antibiotiques qui bloquent la synthèse de peptidoglycane, sont principalement causées de cette manière⁶². Ces antibiotiques sont dégradés par des enzymes particulières, les β -lactamases. Mtb et d'autres mycobactéries produisent des β -lactamases, rendant inefficace cette famille d'antibiotique vis-à-vis de ces bactéries⁶³.

3. Modification de la cible moléculaire

La stratégie de résistance par modification de la cible peut être accomplie avec ou sans mutations. Cette modification des sites d'interaction empêche la fixation de l'antibiotique. Le plus souvent, cette modification résulte de mutations sur le gène codant pour la cible de

l'antibiotique. Cette stratégie est la principale cause de résistance à l'INH et aux thionamides (ETH, prothionamide), dont les mutations ont lieu sur les gènes codant pour les protéines responsables de l'activation de ces prodrogues^{64,65}. Lorsque cela touche une protéine essentielle, ces mutations provoquent une baisse conséquente de l'affinité de l'antibiotique pour la protéine, tout en gardant entièrement ou partiellement l'activité enzymatique de celle-ci. Des mécanismes de méthylation peuvent être à l'origine de résistance aux antibiotiques. De cette manière, certaines bactéries sont en mesure de résister aux aminoglycosides par la méthylation des ribosomes, cibles de cette classe d'antibiotiques⁶⁶. Récemment, des cas de résistances aux quinolones provoquées par la fixation de protéine particulière (PRPs) sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV ont été mis en évidence⁶⁷.

4. Efflux de médicaments

L'efflux de médicaments par des pompes à efflux est une stratégie de résistance majeure pouvant affecter l'ensemble des classes d'antibiotiques⁶⁸. La fonction primaire des pompes à efflux, protéines membranaires, est un maintien de l'homéostasie cellulaire et des échanges entre les milieux intracellulaire et extracellulaire⁶⁹. Plusieurs catégories de pompes sont impliquées dans ces mécanismes de résistance, avec des spécificités plus ou moins larges. Dans certains cas, cette résistance résulte d'une surexpression de ces pompes à efflux à la suite de dérèglements transcriptionnels, provoqués par des mutations ou non⁶⁹. Depuis 1990, plusieurs résistances de ce type ont été mises en évidence chez des isolats cliniques de bactéries⁷⁰. Chez *Mtb*, les pompes à efflux sont responsables de la résistance à certains antibiotiques. Les transporteurs de la famille des « *ATP Binding Cassette* » (ABC) RV1217c-RV1218c sont responsables de l'efflux de la rifampicine et de l'isoniazide⁷¹. Le niveau d'expression de ces transporteurs ABC a une répercussion directe sur l'efficacité de ces deux antibiotiques. Des résistances aux fluoroquinolones impliquant des pompes à efflux sont aussi observées chez *Mtb*^{72,73}.

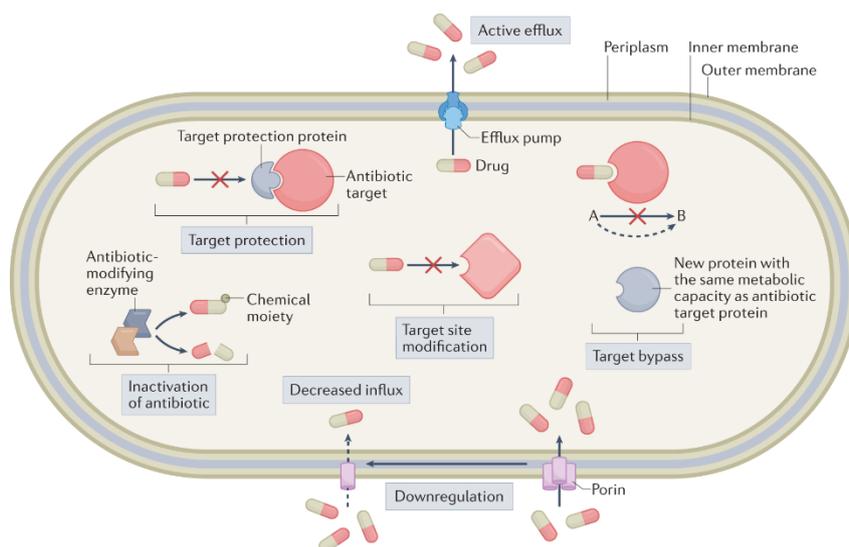


Figure 11 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Figure adaptée de Darby et al., Nat. Rev. Microbiol. 2023⁵⁸.

IV. L'enveloppe cellulaire mycobactérienne

Mtb a diverses armes à sa disposition dans le but d'échapper à l'action des antituberculeux. Comme déjà mentionné auparavant, l'un des atouts majeurs des mycobactéries est leur très forte imperméabilité. Vis-à-vis des composés hydrophiles, les mycobactéries sont 10 à 100 fois moins perméables que certaines bactéries Gram négatives, qui sont déjà connues pour leur caractère imperméable⁷⁴. Ainsi l'enveloppe des mycobactéries est très souvent considérée comme un rempart cellulaire qui protège les mycobactéries des éléments bactéricides contenus dans le milieu extracellulaire.

1. Structure de l'enveloppe

L'enveloppe cellulaire des mycobactéries, décrite en détails à partir des années 1990⁷⁵, est très spécifique. Cette enveloppe se structure en une bicouche lipidique complexe (Figure 12). Elle est séparée en trois parties : la membrane plasmique, le cœur de l'enveloppe (ou paroi) ainsi que la couche externe. Cette structure est très riche en lipides complexes, qui représentent jusqu'à 60 % du poids des mycobactéries.

La membrane plasmique, couche la plus interne de l'enveloppe, est une bicouche lipidique formée de phospholipides, similaire aux autres bactéries. Elle participe à l'intégrité structurale de la bactérie ainsi qu'aux échanges d'ions et de molécules avec l'extérieur. Cette

membrane est entourée de peptidoglycanes, formés de brins de glycanes composés de répétition de *N*-acétylglucosamines et d'acides *N*-acétylmuramiques ou d'acides *N*-acétylglycolymuramiques alternés et liés en $\beta(1-4)$. Les disaccharides peuvent varier en fonction de l'espèce mycobactérienne considérée. Ces brins sont réticulés entre eux à l'aide d'un tétrapeptide (L-Alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimelyl-D-alanine). Cette réticulation atteint 70 à 80 % chez *Mtb*, une valeur bien élevée comparée aux 40-50 % de réticulation retrouvée chez *Escherichia coli*.

Environ 10 % des acides *N*-acétylmuramiques du peptidoglycane servent, par une liaison phosphodiester, de point d'ancrage aux arabinogalactanes. L'arabinogalactane est un polysaccharide composé majoritairement de sous-unités d'arabinose et de galactose. A eux seuls, les arabinogalactanes correspondent à 35 % du poids total de l'enveloppe mycobactérienne. La structure des arabinogalactanes est elle-même divisée en 3 parties : l'espaceur, le galactane et l'arabinane. L'espaceur fait le lien entre le peptidoglycane et l'arabinogalactane.

Les acides mycoliques, quant à eux, viennent compléter l'enveloppe mycobactérienne. Ils sont retrouvés dans l'ensemble des espèces de la famille des *Mycobacteriaceae*. Ces acides mycoliques sont essentiels à la survie des mycobactéries et participent à la formation des deux feuillettes de la mycomembrane. Ils subsistent sous deux formes, appelés acides mycoliques liés et acides mycoliques libres. Les acides mycoliques liés sont greffés à l'extrémité galactose de l'arabinogalactane, lui-même attaché au peptidoglycane. Ces derniers représentent la plus grosse partie de l'enveloppe des mycobactéries. En opposition, les acides mycoliques libres, non attachés au peptidoglycane, sont retrouvés dans les lipides extractibles à l'aide de solvants organiques. Ils peuvent être attachés à des tréhaloses pour former des mono et dimycolates de tréhalose, des glycolipides contribuant à la forme en bâtonnet du bacille.

Une capsule riche en polysaccharides, principalement de type glucane, de protéines et de lipides recouvre la surface de *Mtb* et des autres mycobactéries. La proportion de ces constituants varie selon les mycobactéries et leur pathogénicité. Chez les mycobactéries pathogènes, cette capsule est principalement constituée de polysaccharides, tandis que cette même capsule sera plus riche en protéines pour les mycobactéries non pathogènes.

D'autres molécules associées à la membrane comme les lipomannanes, les lipoarabinomannanes, les glycolipides phénoliques ainsi que les dimycocérosates de phthiocérol, interviennent également dans la virulence. Ces molécules sont capables de moduler

la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant différentes cytokines mais également de promouvoir l'invasion de cellules immunitaires⁷⁶.

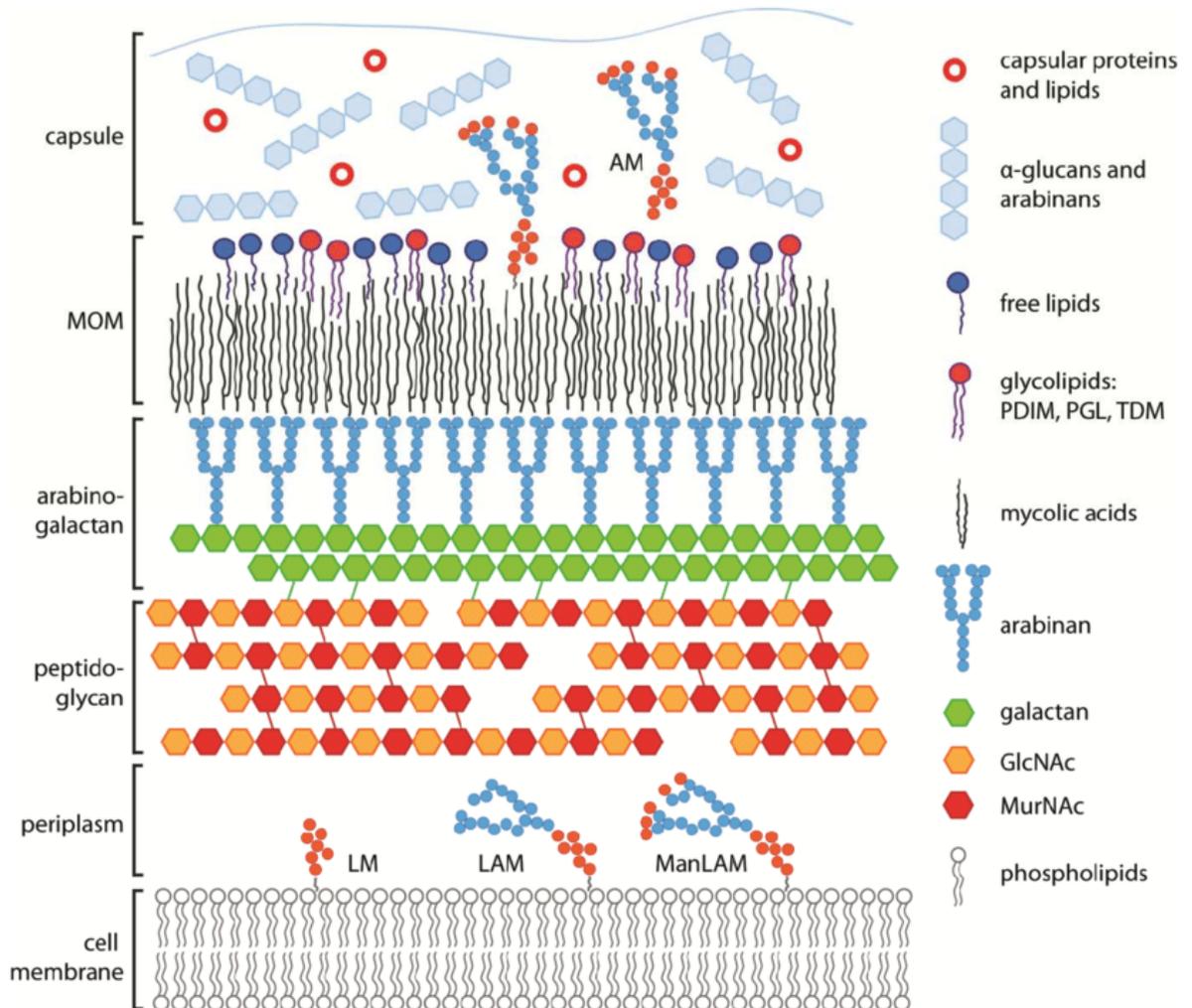


Figure 12 : Schéma de l'enveloppe de Mtb. AM : arabinomannane ; LM : lipomannane ; LAM : lipoarabinomannane ; ManLAM : mannose-capped LAM ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; MurNAc : acide N-acétylmuramique ; MOM : membrane externe mycobactérienne. Schéma issu de Raffetseder, Linköping University Electronic Press ; 2016⁷⁷.

2. Mycomembrane et acides mycoliques

Les acides mycoliques, retrouvés dans l'ensemble des espèces de la famille des *Mycobacteriaceae*, sont essentiels à la survie des mycobactéries et participent à la formation des deux feuillettes de la mycomembrane.

Largement décrits depuis 1950⁷⁸, les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes carbonées α -ramifiés et β -hydroxylés. La longueur des acides gras varie selon l'espèce mycobactérienne. La position β est substituée par la chaîne méromycolique, une longue chaîne

alkyle pouvant atteindre plus de 60 atomes de carbone chez Mtb, tandis que la chaîne en α est plus courte (de 22 à 26 atomes de carbone). Ainsi, la taille des acides mycoliques varie entre 60 et 90 unités de carbone chez Mtb.

Chez Mtb, on retrouve trois classes différentes d'acides mycoliques : les acides α -mycoliques, les acides méthoxy-mycoliques ainsi que les acides céto-mycoliques (Figure 13). Environ 70 % des acides mycoliques de Mtb sont des acides α -mycoliques, qui ont la particularité de porter, sur la chaîne méromycolique, deux cyclopropyles de configuration *cis*. Les 30 % restants sont principalement composés des acides méthoxy-mycoliques et des acides céto-mycoliques. Les acides méthoxy-mycoliques portent une fonction méthoxy en position distale ainsi qu'un cyclopropyle en position proximale, de configuration *cis* ou *trans*. Les acides céto-mycoliques, quant à eux, contiennent une fonction cétone en position distale ainsi qu'un cyclopropyle, *cis* ou *trans*, en position proximale⁷⁹.

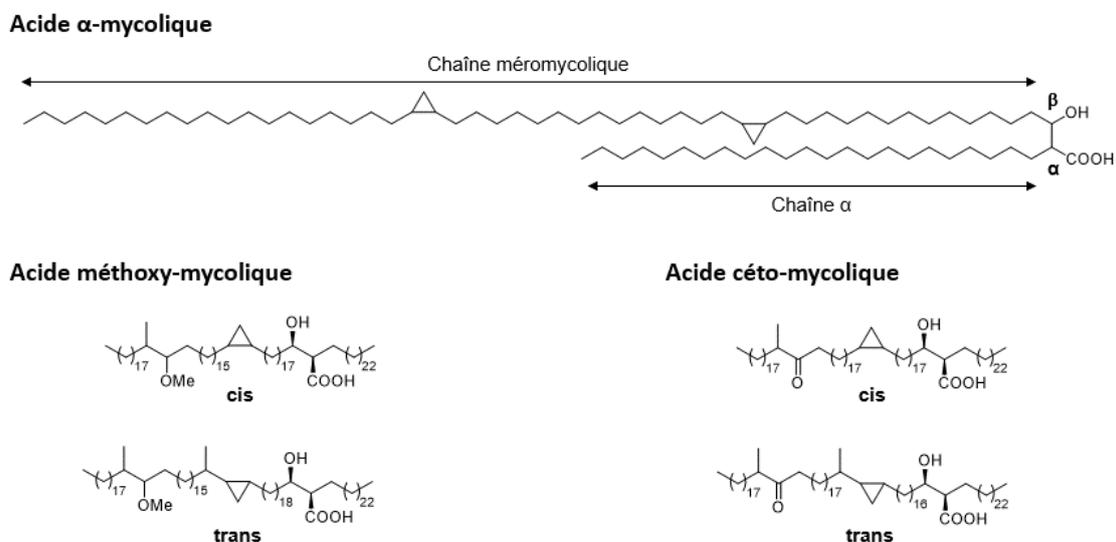


Figure 13 : Structures des 3 principales classes d'acides mycoliques de Mtb. Figure adaptée de Nataraj et al, Mol Microbiol 2015⁷⁹.

L'absence des enzymes responsables des modifications apportées en positions distale et proximale des acides mycoliques peut impacter fortement la croissance et la virulence du bacille⁸⁰. L'absence d'acides mycoliques oxygénés peut avoir des répercussions sur la croissance de Mtb, sur l'invasion des cellules immunitaires et de la réplication au sein de ces dernières⁸¹. L'intégrité de ces différents acides mycoliques est requise pour la virulence de Mtb. L'altération de la proportion des acides mycoliques modifie également la sensibilité à certains antibiotiques. En effet, des souches de Mtb dépourvues d'acides céto-mycoliques sont plus sensibles à la rifampicine et à l'ampicilline d'un facteur 4 et 8, respectivement⁸¹.

3. Biosynthèse des acides mycoliques

La biosynthèse des acides mycoliques fait intervenir des systèmes de synthèse d'acides gras : les systèmes acides gras synthases I et II (Figure 14). Ces systèmes sont retrouvés sous les abréviations FAS-I et FAS-II pour *Fatty Acid Synthase*-I et II. Ils sont essentiels à la survie des cellules végétales, animales, et bactériennes, mis à part certaines bactéries Gram positives qui peuvent contourner les systèmes FAS en incorporant des acides gras exogènes en cas d'inhibition des enzymes impliquées dans les systèmes FAS⁸².

3.1. Le système FAS-I

Le système FAS-I est ubiquitaire. Une seule enzyme multi-domaines est au centre de ce système et réitère plusieurs fois une séquence de réaction dans le but d'allonger les acides gras, précurseurs des acides mycoliques. L'enzyme FAS-I de Mtb est un homohexamère de 1.9 MDa codé par le gène *fasI*, dont la structure a été déterminée par cryo-microscopie électronique⁸³. Chacune de ces 6 chaînes polypeptidiques possède 7 domaines catalytiques. FAS-I possède des activités acétyltransférase, énoyl réductase, déshydratase, malonyl/palmitoyl-transférase, acyl carrier protein, cétoacyl réductase et cétoacyl synthase.

Le mécanisme de synthèse *de novo* consiste en une extension d'une chaîne alkyle en ajoutant 2 atomes de carbone par cycle *via* une réaction de condensation. Durant tout le processus d'élongation, le substrat reste à l'intérieur de la protéine FAS-I. Il est transloqué entre les différents sites catalytiques pour subir les modifications nécessaires. Cette enzyme synthétise deux types d'acides gras, de longueur C₁₆-C₁₈ et C₂₄-C₂₆ à partir d'acétyl-CoA. Les acides gras en C₂₄-C₂₆ sont utilisés pour former la chaîne α des acides mycoliques ou bien dans la synthèse de phospholipides membranaires. Les acides mycoliques en C₁₆-C₁₈ sont pris en charge par l'enzyme FabH, une β -cétoacyl ACP synthase III. Cette dernière ajoute une unité malonyl aux acyl-CoA synthétisés par la protéine FAS-I. Le produit de cette condensation (3-cétoacyl-ACP) est réduit en un acyl-ACP avant d'être pris en charge par le système FAS-II.

3.2. Le système FAS-II

Le système FAS-II est propre aux bactéries et aux végétaux. Ce système est également présent dans les mitochondries sous une forme différente pour la synthèse des acides gras jusqu'à 16 atomes de carbone. Chez les bactéries, le système FAS-II est composé de 4 activités

enzymatiques essentielles à la biosynthèse des acides mycoliques. Ce système prend en charge les β -cétacyl-ACP produits par FAS-I et FabH dans le but de les allonger. Ces β -cétacyl-ACP subissent une réduction par MabA, suivi d'une déshydratation par le complexe HadABC ainsi qu'une réduction médiée par l'énoyl ACP réductase. Enfin, le 4^{ème} groupe d'enzymes, composé de KasA et KasB, permet de condenser à nouveau un malonyl-ACP sur les acyl-CoA dans le but d'allonger la chaîne de 2 atomes de carbone lors de chaque tour de cycle.

La longueur maximale des acides gras synthétisés par ce système peut atteindre 62 atomes de carbone. Certaines protéines ou complexes sont spécialisés dans l'élongation des acides gras à très longue chaîne. En l'absence ou en cas de défaut de fonctionnement de KasB, il a été montré que la longueur des acides gras se retrouve diminuée, illustrant l'importance de KasB dans l'élongation des acides gras à très longue chaîne. Lorsqu'une telle mutation touche Mtb, la résistance de cette dernière face aux antibiotiques et aux mécanismes de défense de l'hôte se retrouve diminuée⁸⁴. De la même manière, la déshydratase HadBC serait impliquée dans l'élongation des acides gras les plus longs⁸⁵.

Ces acides gras sont fonctionnalisés par l'intermédiaire de 8 méthyltransférases. Ces dernières effectuent les ajouts des groupements cyclopropyles ainsi que de fonctions oxygénées (cétone et méthoxy) permettant l'obtention des différentes classes d'acides mycoliques. Ces modifications interviennent à la suite de l'introduction de deux doubles liaisons sur l'acide gras. Les protéines et les mécanismes intervenant lors de cette étape ne sont pas encore tout à fait identifiés et compris. L'introduction de ces doubles liaisons pourrait avoir lieu durant l'élongation des acides gras, par l'intermédiaire de l'acyl-ACP désaturase DesA1⁸⁶.

Enfin, lors des dernières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques, la chaîne α synthétisée par FAS-I et la chaîne méromycolique synthétisée par FAS-II sont condensées via l'intervention de trois enzymes essentielles. Les acides gras sont dans un premier temps activés : les complexes AccD4-AccA3 activent la chaîne α , tandis que FadD32 active la chaîne méromycolique. La condensation est réalisée *via* le domaine cétacyl synthase de la polycétide synthase 13 (*Polyketide synthase 13*, PKS13) qui réalise une condensation de Claisen. L'activité thioestérase de Pks13 suivie d'une étape de réduction catalysée par la protéine CmrA libère l'acide mycolique, qui sera par la suite transloqué vers l'enveloppe cellulaire afin d'être attaché aux arabinogalactanes.

Les acides mycoliques étant essentiels pour les mycobactéries, inhiber leur biosynthèse en ciblant les différentes protéines qui interviennent durant ce processus est une voie pertinente

pour lutter contre ces bactéries. Plusieurs antituberculeux déjà mentionnés dans ce manuscrit ciblent des protéines de cette voie métabolique, et sont représentés dans la Figure 14.

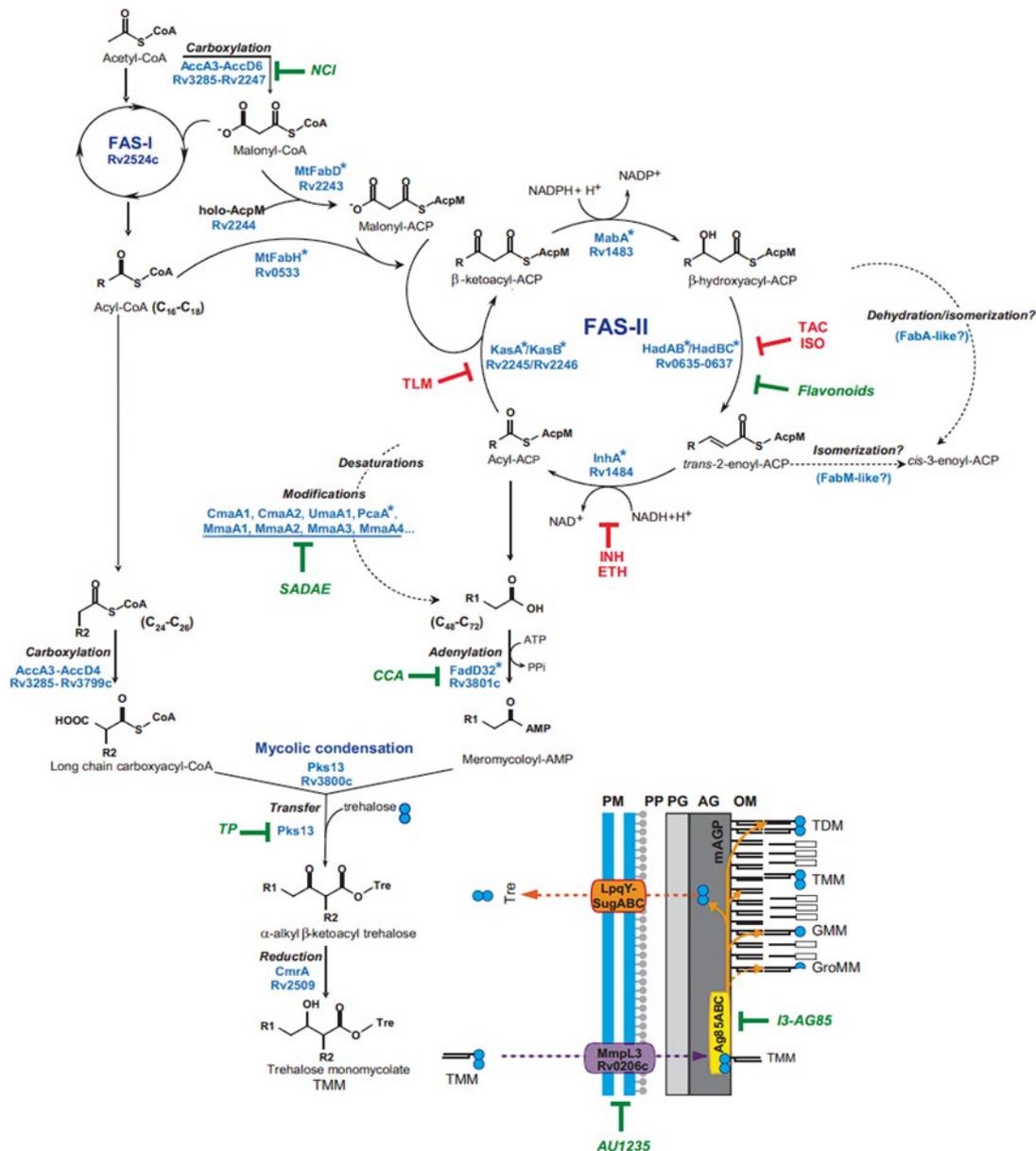


Figure 14 : Schéma de la biosynthèse, de l'inhibition et de la régulation des acides mycoliques. Antibiotiques en rouge : TAC = thiocétazone, ISO = isoxyle, INH = isoniazide, ETH = éthionamide, TLM = thiolactomycine ; les inhibiteurs en vert : NCI = NCI-172033, CCA = 4,6-diaryl-5,7-diméthyl coumarines, TP = thiophènes, AU1235 = 1-(2-adamantyl)-3-(2,3,4-trifluorophenyl)urée, I3-AG85 = 2-amino-6-propyl-4,5,6,7-tétrahydro-1-benzothiophène-3-carbonitrile. Les protéines régulées par une sérine-thréonine kinase sont marquées par un astérisque*. Tre = tréhalose, PM = membrane plasmique, PP = périplasme, PG = peptidoglycane, AG = arabinogalactane, OM = membrane externe, TDM = dimycolate de tréhalose, GMM = monomycolate de glucose, GroMM = monomycolate de glycérol. (schéma issu de Daffé et al., Springer, Cham 2017⁸⁷)

V. InhA : l'énoyl ACP réductase du système FAS-II de Mtb

1. Généralités

InhA, l'énoyl-[Acyl Carrier Protein] réductase (ENR) du système FAS-II de Mtb, est une protéine cytosolique essentielle pour la survie. Elle est codée par *inhA*, un gène hautement conservé au sein des différentes espèces de mycobactéries⁸⁸. Constituée de 269 acides aminés, pour un poids moléculaire de 28,5 kDa, InhA est retrouvée majoritairement sous forme homotétramérique en solution⁸⁹.

La protéine InhA fait partie des « *Short chain dehydrogenase reductases* » (SDRs), une famille de ENR dont le poids moléculaire est environ de 30 kD. Les protéines de cette famille possèdent un site actif à motif Tyr-X-Lys. Généralement, la tyrosine et la lysine de ce motif sont séparées de 3 à 6 résidus. Les SDRs possèdent un site d'interaction avec le cofacteur, riche en glycine, en position *N*-terminale. Cette famille est elle-même subdivisée en plusieurs sous-familles, selon le nombre total de résidus, des motifs de fixation du cofacteur ainsi que des motifs du site actif⁹⁰. Certaines bactéries expriment plusieurs formes d'ENRs. Cette particularité leur procure une résistance plus large vis-à-vis de molécules pouvant inhiber les ENRs⁹¹.

À l'instar de beaucoup d'autres protéines ainsi que des autres membres du système FAS-II, l'activité de la protéine InhA peut être régulée *in vivo* par phosphorylation *via* une sérine/thréonine kinase. La phosphorylation de la thréonine 266 provoque l'arrêt de l'activité réductase de la protéine InhA⁹².

Depuis la mise en évidence d'InhA comme cible de plusieurs antituberculeux (INH et ses analogues thionamides) ainsi que l'importance de cette dernière dans la synthèse des acides mycoliques, les travaux visant à mieux comprendre les mécanismes de cette protéine se sont intensifiés afin de mieux lutter contre Mtb. En effet, de plus en plus de phénomènes de résistances sont observés, en particulier des résistances à l'INH ainsi qu'à son analogue, l'ETH, deux antituberculeux très largement utilisés pour le traitement de la tuberculose depuis leur introduction dans les années 1950. Ces deux antituberculeux sont respectivement activés par les enzymes KatG et EthA, générant des composés radicalaires qui forment des adduits avec le cofacteur NAD⁺. Ces adduits interagissent directement avec la protéine InhA en tant qu'inhibiteurs compétitifs⁹³. Ainsi, ils occupent la place du cofacteur NADH, empêchant la réduction de la double liaison de l'acide gras en cours d'élongation. Dans la grande majorité des cas de résistance à ces antituberculeux, les protéines responsables de l'étape d'activation

sont mutées. Ces mécanismes de résistance liés aux inhibiteurs indirects d'InhA ont provoqué une nécessité de développer des inhibiteurs directs.

Le développement d'inhibiteurs contre une cible protéique peut être grandement facilité par la compréhension des mécanismes d'une enzyme ainsi que par la connaissance de la structure tridimensionnelle de cette dernière.

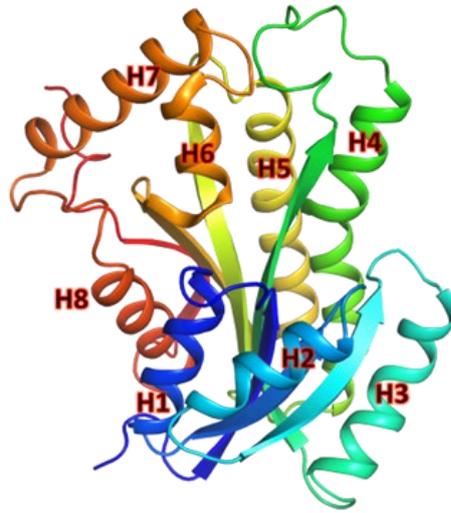
2. Structure générale d'InhA et mécanisme d'action

2.1. Structure générale et site actif d'InhA

L'ensemble des SDRs, dont InhA, possède un motif structural de type repliement de Rossmann, une organisation structurale présente chez les protéines capables de lier les nucléotides, comme le NADH ou le NADPH. Les motifs Rossmann, décrits pour la première fois en 1974 sont retrouvés dans plus de 20 % des protéines de la Protein Data Bank⁹⁴. Principalement, ces structures sont composées d'hélices et de brins formant un motif $\beta\alpha\beta$. L'arrangement de ces motifs en deux structures $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, séparées par une hélice α , comprend un feuillet β parallèle. Le cofacteur NAD se fixe sur la partie supérieure de ce feuillet.

La première structure de la protéine InhA résolue en présence du cofacteur NADH à 2.2 Å de résolution grâce à la diffraction aux rayons X montre l'organisation de la chaîne polypeptidique de cette protéine en motif Rossmann (Figure 15A)⁹⁵. Cette organisation fait intervenir 8 hélices α ainsi que des feuillets parallèles formés par 7 brins β . Dans les différentes structures disponibles de cette protéine, y compris dans la structure de la protéine sans ligand, une organisation en homotétramère est retrouvée avec ou sans intervention des symétries cristallographiques selon les groupes d'espaces (Figure 15B). En solution, la formation du tétramère semble se faire sans nécessité de liaison covalente. En effet, malgré la présence d'une cystéine dans la séquence primaire de chaque chaîne polypeptidique de cette protéine, celle-ci ne forme pas de pont disulfure.

A



B

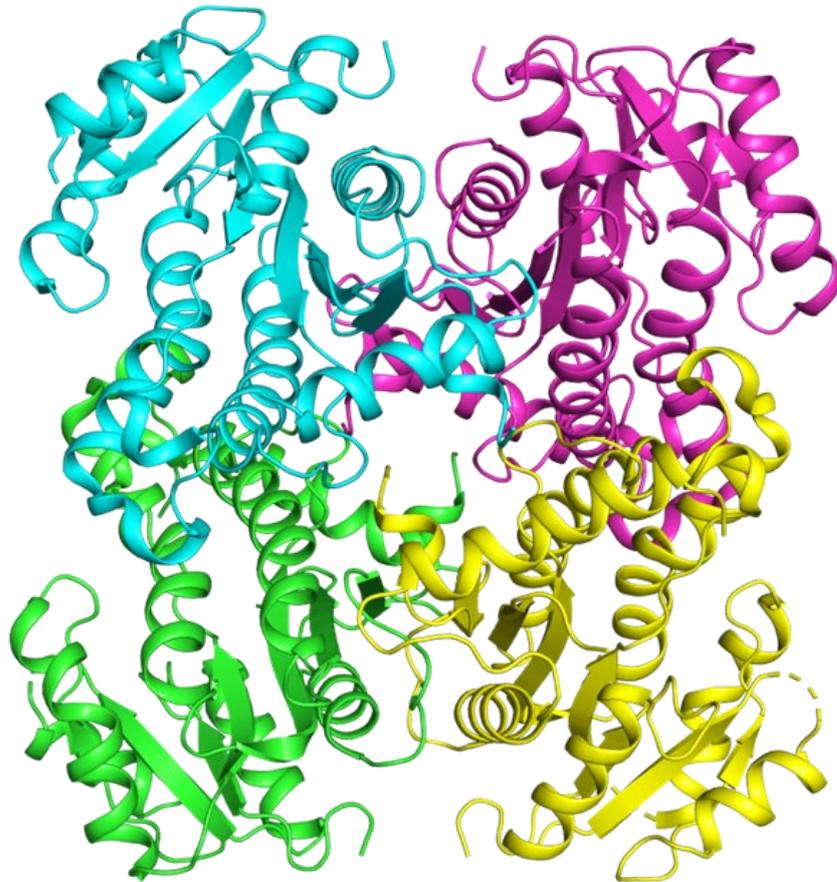


Figure 15 : Structure cristallographique d'InhA. A) Structure tertiaire (PDB : 1ENY). Les hélices α sont numérotées de H1 à H8 à partir de l'extrémité N-terminale. B) Structure quaternaire (PDB : 4TRM). Chaque protomère est représenté par une couleur distincte (cyan, magenta, jaune et vert).

InhA possède un large site actif permettant d'accueillir à la fois le cofacteur ainsi que ses substrats correspondant à la chaîne méromycolique en cours d'élongation. Les structures cristallographiques de la protéine en complexe avec le cofacteur NADH ainsi que celle en complexe avec le NAD⁺ et un analogue du substrat de 16 atomes de carbones (*trans*-2-hexadécénoyl-(*N*-acétylcysteamine)-thioester, THT) ont permis de mettre en évidence les poches de fixation du cofacteur ainsi que le site de fixation présumé du substrat naturel⁸⁹.

Le THT se place dans le site actif au-dessus du cofacteur (NAD⁺/NADH), une position stabilisée par l'intervention de plusieurs liaisons hydrogène dont deux faites avec le NAD⁺ et une avec la tyrosine 158 (Figure 16A). Cette tyrosine effectue une rotation de 60 degrés en présence du THT par rapport à la structure avec le cofacteur seul (Figure 16B). De ce fait, deux conformations de la tyrosine 158 sont observées à travers les différentes structures d'InhA⁹⁶. Une conformation dite « *out* », qui pointe vers le fond du site actif, ainsi qu'une conformation « *in* », en direction du cofacteur. Cette conformation « *in* » de la tyrosine 158 permet l'obtention de liaisons hydrogène avec le ribose du cofacteur ainsi que l'analogue du substrat.

Dans le site actif d'InhA, le THT se recroqueville au-dessus du cofacteur pour adopter une configuration en U et se fixer dans une région principalement hydrophobe formée par les résidus Phe149, Met155, Ala157, Tyr158, Pro193, Met199, Ile202, Ile215 et Leu218⁸⁹.

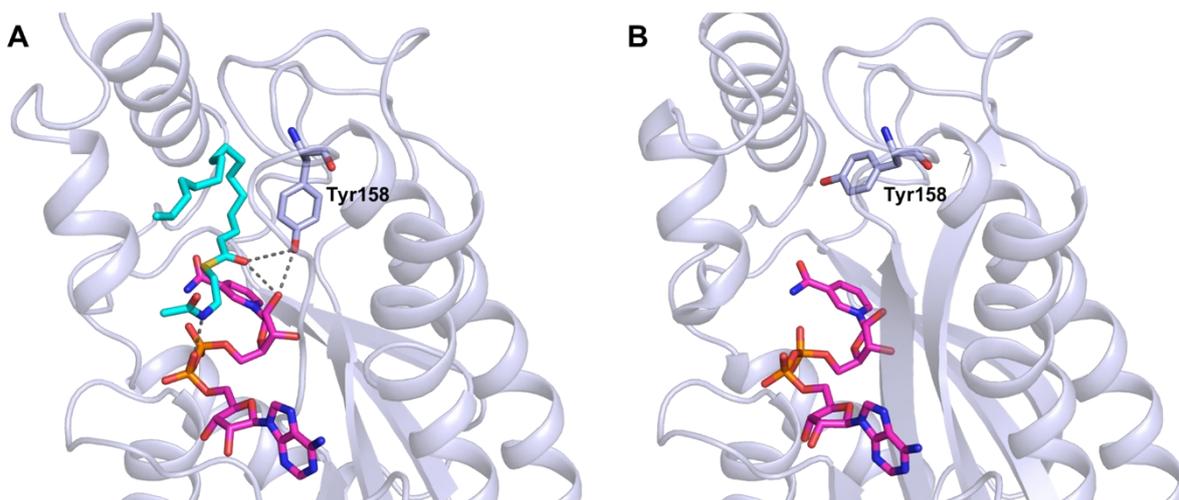


Figure 16 : Vue du site actif de la protéine InhA en présence du cofacteur et d'un analogue de substrat. A) Structure d'InhA en complexe avec le NAD⁺ en magenta et le THT en cyan (PDB : 1BVR). Les potentielles liaisons hydrogène sont représentées par des traits pointillés gris. B) Structure d'InhA en complexe avec le NADH seul, coloré en magenta (PDB : 1ENY).

2.2. Mécanisme de réduction du substrat

Le site actif d’InhA est caractérisé par la séquence consensus Tyr-X₂-Met-X₃-Lys, où deux acides aminés importants, la tyrosine ainsi que la lysine⁹⁶ sont séparés par 6 acides aminés, dont une méthionine, conservée à travers les différentes protéines InhA. Chez Mtb, et comme beaucoup d’autres mycobactéries, ce site consensus s’étend de la tyrosine 158 à la lysine 165. La tyrosine 158 joue un rôle dans la stabilisation de l’énolate, l’intermédiaire réactionnel⁸⁹. Sa mutation provoque une baisse de l’activité de la protéine⁹⁶. La lysine 165, quant à elle, est importante pour la fixation du cofacteur NADH dans le site actif. Lorsque cette lysine est mutée en alanine, le NADH n’est plus capable de se fixer⁹⁶. Plusieurs autres résidus ne faisant pas partie du site consensus entrent également en action pour le bon déroulement de la réaction, notamment la sérine 123, la phénylalanine 149 et la thréonine 196. La sérine 123 participe au mécanisme *via* la stabilisation d’une molécule d’eau dans le site actif, tandis que la phénylalanine 149 est impliquée dans la stabilisation de la conformation du cofacteur. Récemment, la thréonine 196 a été également montrée comme étant impliquée dans le processus de protonation et transfert d’un hydrure⁹⁷. Le mécanisme de réduction de la double liaison catalysée fait intervenir un transfert d’hydrure entre le cofacteur NADH et le substrat (Figure 17)^{89,98}. Lors de cette réaction, un hydrure du carbone 4 du cycle nicotinamide du NADH est transféré sur le carbone 3 du substrat énoyl. Ce transfert est facilité par les différentes interactions rapprochant le cofacteur ainsi que le substrat.

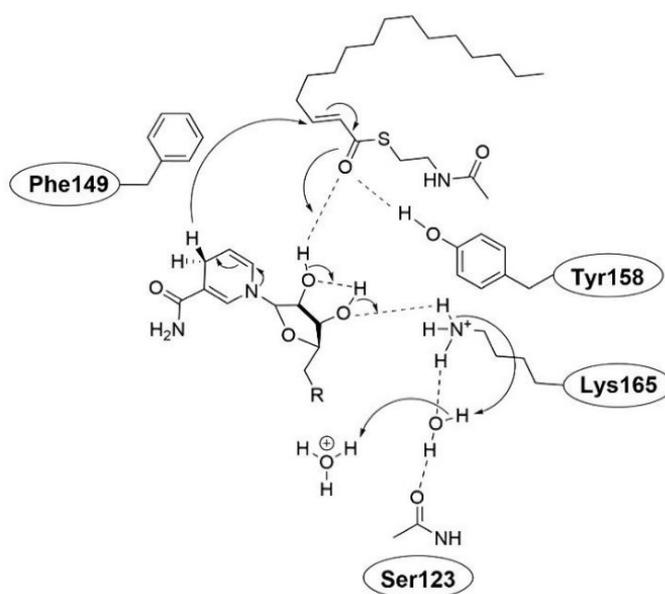


Figure 17 : Mécanisme de réduction de la double liaison du substrat énoyl par la protéine InhA. Figure adaptée de Chollet et al. Eur. J. Med. Chem. 2018⁹⁹.

2.3. Caractérisation structurale de la protéine InhA

A ce jour, le nombre de structures d'InhA déposées dans la Protein Data Bank s'élève à plus de 110, dont 98 concernent la protéine de Mtb. Au sein de l'ensemble de ces structures, la conformation de la protéine InhA est très conservée à l'exception d'une portion particulière qui présente une flexibilité importante. Cette région, appelée la boucle de fixation de substrat (« *Substrate binding loop* », SBL), s'étant des résidus 196 à 219 qui se trouvent sur les hélices H6 et H7 de la protéine et forme une structure en hélice-boucle-hélice très flexible^{89,100} (Figure 18). Grâce à la flexibilité de la SBL, InhA serait en mesure d'adapter le site actif en fonction des ligands⁸⁹.

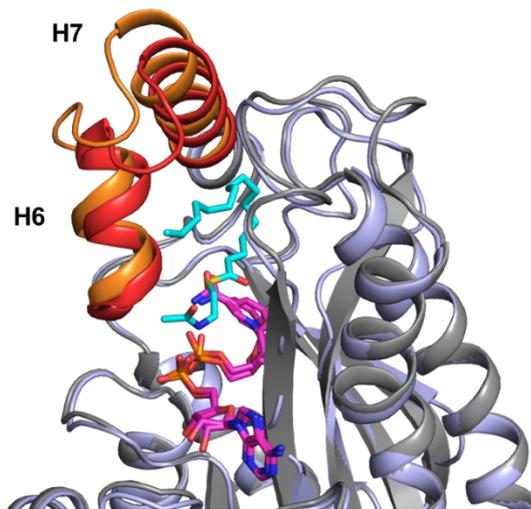


Figure 18 : SBL de la protéine InhA. Superposition de la structure d'InhA en complexe avec le NADH (PDB : 1ENY, en gris) et de la structure de la protéine en complexe avec le NAD⁺ et le THT (PDB : 1BVR, en bleu). Les SBL de ces deux structures sont respectivement représentées en rouge et en orange. Les cofacteurs NADH et NAD⁺ sont tous deux colorés en magenta, et le THT, en cyan.

L'hélice H6, qui comprend les résidus 196 à 206 de la SBL, participe à la formation de l'entrée du site actif de la protéine InhA, appelé portail majeur. Ce portail est formé par un ensemble de résidus situés sur différentes régions de la protéine. La partie supérieure du portail majeur, située au-dessus du cofacteur, est formée principalement par deux zones de la protéine qui correspondent aux résidus 96 à 106 formants principalement une boucle, et de l'autre côté, l'hélice H6 (Figure 19).

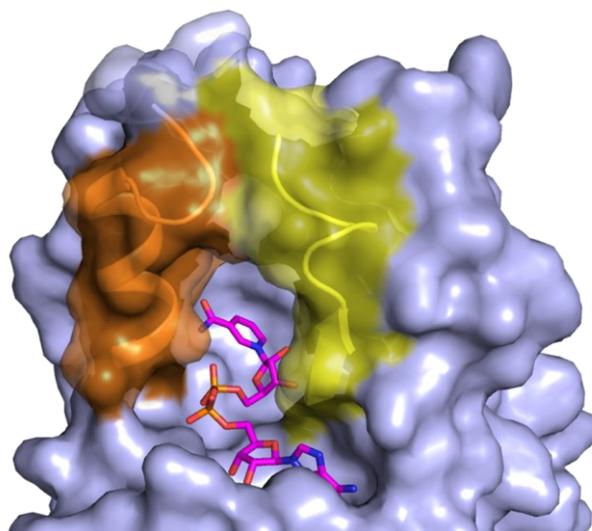


Figure 19 : Visualisation des résidus formant la partie supérieure du portail majeur. Vue de face du portail majeur d'InhA (1ENY). La surface de la protéine est représentée en bleu et le cofacteur en magenta. Les structures secondaires des résidus délimitant la partie supérieure du portail majeur sont représentées en jaune pour les résidus 96 à 106 et en orange pour les résidus 196 à 206 (hélice H6).

Du fait de la flexibilité de la SBL, principalement de l'hélice H6, l'état d'ouverture de ce portail peut varier d'une structure à l'autre. Le rapprochement de l'hélice H6 vers le centre de la structure entraîne une diminution de la taille de cette ouverture et inversement lorsque cette boucle est déplacée vers l'extérieure de la structure.

Dans de rares cas, une seconde ouverture au fond du site actif est observée. Cette dernière est nommée le portail mineur (Figure 20). Mentionné pour la première fois par *Rozwarski et al*⁸⁹, le portail mineur est une cavité formée par les résidus Met103, Gly104, Ala157 ainsi que les résidus Met199, Ile215 et Leu218 localisés sur la SBL.

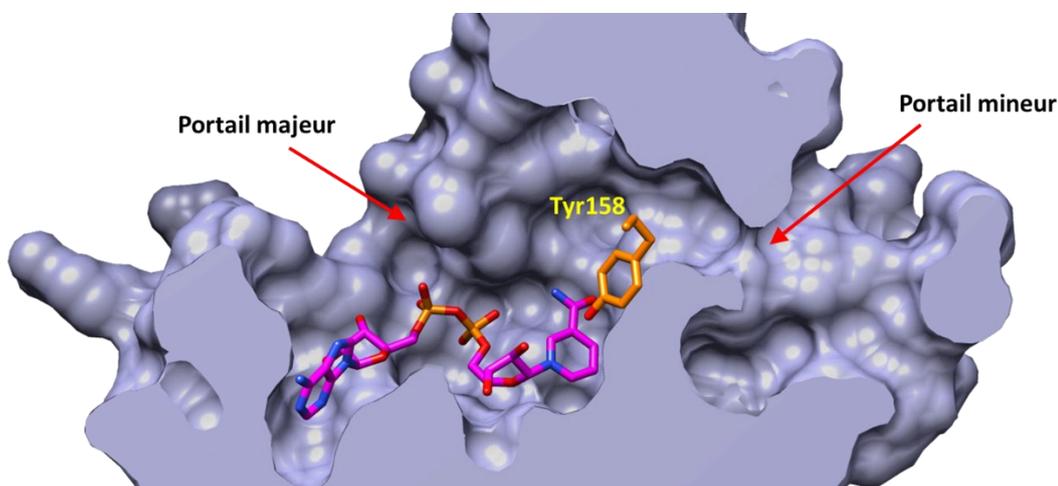


Figure 20 : Les portails majeur et mineur de la protéine InhA. Sur cette représentation de la surface de la protéine, le cofacteur est représenté en magenta.

La compréhension et l'exploitation des différentes interactions avec le site actif d'InhA sont primordiales dans l'optique de concevoir de nouveaux inhibiteurs contre cette protéine.

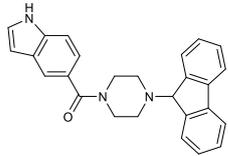
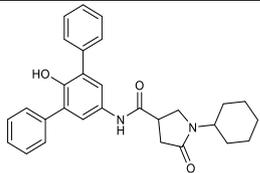
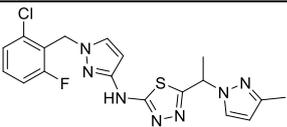
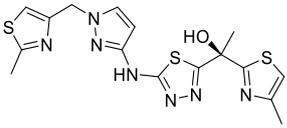
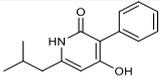
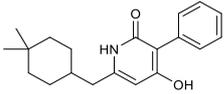
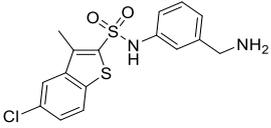
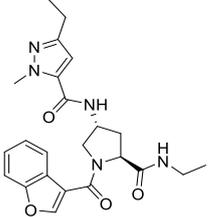
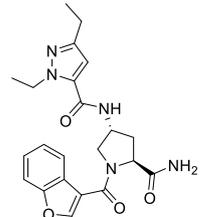
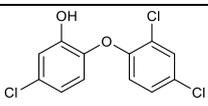
3. Les inhibiteurs directs d'InhA et leur mode fixation

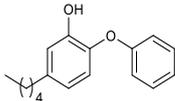
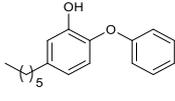
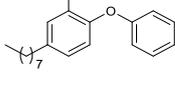
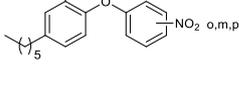
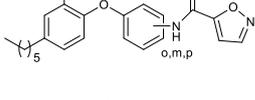
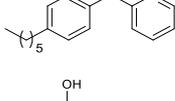
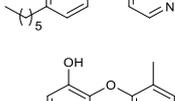
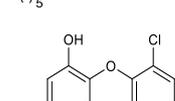
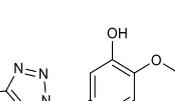
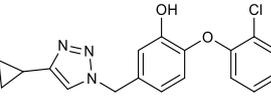
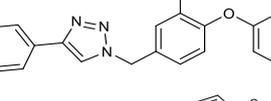
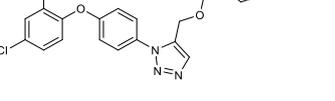
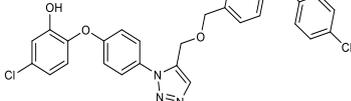
Bien souvent, les méthodes traditionnelles de développement de médicaments commencent par l'identification de molécules possédant une affinité pour une cible moléculaire donnée. On parle alors de touches ou « *hits* ». Dans le but d'accélérer et d'augmenter les chances d'identifier des inhibiteurs directs d'InhA, des méthodes de criblages à haut débit (« *High-Throughput Screening* », HTS) sont employées. Grâce à l'avancée des technologies et l'utilisation de systèmes automatisés tels que des robots, des banques de plusieurs milliers, voire de millions de composés, naturels ou synthétiques, peuvent être criblés. *In vitro*, ces criblages HTS sont couplés à différentes méthodes de détection de l'interaction protéine-ligand. Dans le pipeline de développement de médicaments, les composés mis en évidence lors des criblages font ensuite l'objet d'optimisation dans le but d'améliorer leur activité et de les orienter vers des molécules dites têtes de séries (« *leads* »).

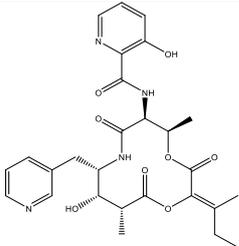
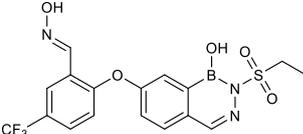
Au cours des vingt dernières années, différentes familles de molécules, telles que les **arylamides**, les **pyrrolidines carboxamides**, les **thiadiazoles**, les **pyridones**, les **sulfonamides**, les **pyrazoles** ainsi que les **diaryl éthers** ont été identifiées comme inhibiteurs directs d'InhA à la suite de criblages à haut débit.

Cette partie traitera de ces différentes familles d'inhibiteurs ainsi que leur mécanisme d'inhibition à InhA. Une partie des inhibiteurs mentionnés par la suite sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Structures des inhibiteurs directs d'InhA et données biologiques associées.

Classe	Composé	Structure	IC ₅₀ en nM	CMI µg/mL (µM)	Réf.
Arylamide	GENZ10850		160	(> 125)	101
Pyrrolidine carboxamide	P64		62	(> 125)	102
Thiadiazole	GSK625		2	0,42 (1)	103
	GSK693		7	0.08 (0.2)	103
Pyridone	NITD-529		9 600 ± 700	0.37 (1.54)	104
	NITD-916		570 ± 40	0.016 (0.05)	104
Sulfonamide	23		310	N.C	105
Pyrazole	7		34	3.5 (8)	106
	65		4	0.21 (0.5)	106
Diaryl éther	TCL		1 000	12.5 (43.1)	107

5PP		17 ± 5	1.0 (3.5)	107
6PP		11 ± 1	2.1 (7.8)	107
8PP		5.0 ± 0.3	1.9 (6.4)	107
14a, 14b, 14c		180 ± 20 48 ± 6 90 ± 10	12.5 (33) 12.5 (33) 30 (76)	108
12a, 12b, 12c		3220 ± 550 1220 ± 60 130 ± 34	> 200	108
3a		11500 ± 1160	50	108
3c		160 ± 16	3.13 (14.5)	108
PT70		50.7 ± 4	3.125 (11)	109
PT91		49.5 ± 2.2	1.56 (5.1)	110
PT501		N.C	0.78 (2.4)	111
PT504		N.C	0.156 (0.46)	111
PT503		N.C	6.25 (16.8)	111
2		5600 ± 800	6.17 (12.9)	112
11		> 50 000	> 40	112

Inhibiteur bimodaux	Pyridomicine		N.C	0.31 (0.57)	113
	AN12855		30	0.057 (0.13)	114

N.C : non communiqué

3.1. Les arylamides

La molécule GENZ10850, identifiée à partir d'une banque d'environ 500 000 composés, est l'une des molécules les plus efficaces parmi les **arylamides**¹⁰¹ (Figure 21A). Son interaction avec InhA a été mise en évidence lors d'un criblage basé sur la mesure de l'activité de la protéine. L'activité énoyl réductase de la protéine InhA est directement corrélée à la vitesse d'oxydation du NADH, détectable par mesure de l'absorbance à 340 nm. Pour accélérer la vitesse de criblage, la protéine InhA a été ajoutée à des solutions contenant jusqu'à 100 molécules différentes. Partant des mélanges qui ont révélé une inhibition acceptable, la capacité d'inhibition de chacun des composés de ces mélanges a été testée individuellement afin d'identifier la molécule active.

GENZ10850 présente une inhibition notable de la protéine InhA ($IC_{50} = 160$ nM), mais s'est révélée inefficace sur la mycobactérie, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à 125 μ M. Ce manque d'efficacité envers la croissance bactérienne est en partie imputable à l'un des mécanismes de résistance aux médicaments déjà cités, les pompes à efflux¹¹⁵. L'ajout d'inhibiteurs de pompes à efflux améliore, jusqu'à un facteur 4, la CMI de certains arylamides.

GENZ10850 occupe la poche de fixation du substrat, tel que défini par le THT (Figure 21B). Cet inhibiteur se place juste au-dessus du cofacteur, en formant une liaison hydrogène, par l'intermédiaire du groupement carbonyle, avec la tyrosine 158. Dans cette structure, la tyrosine se retrouve dans la conformation « *in* ». Une seconde liaison hydrogène, entre le groupement azote de l'indole et un oxygène porté par le phosphate du cofacteur, participe également à la stabilisation de l'inhibiteur dans le site actif. Le noyau fluorène, quant à lui, se retrouve dans la partie supérieure du fond du site actif.

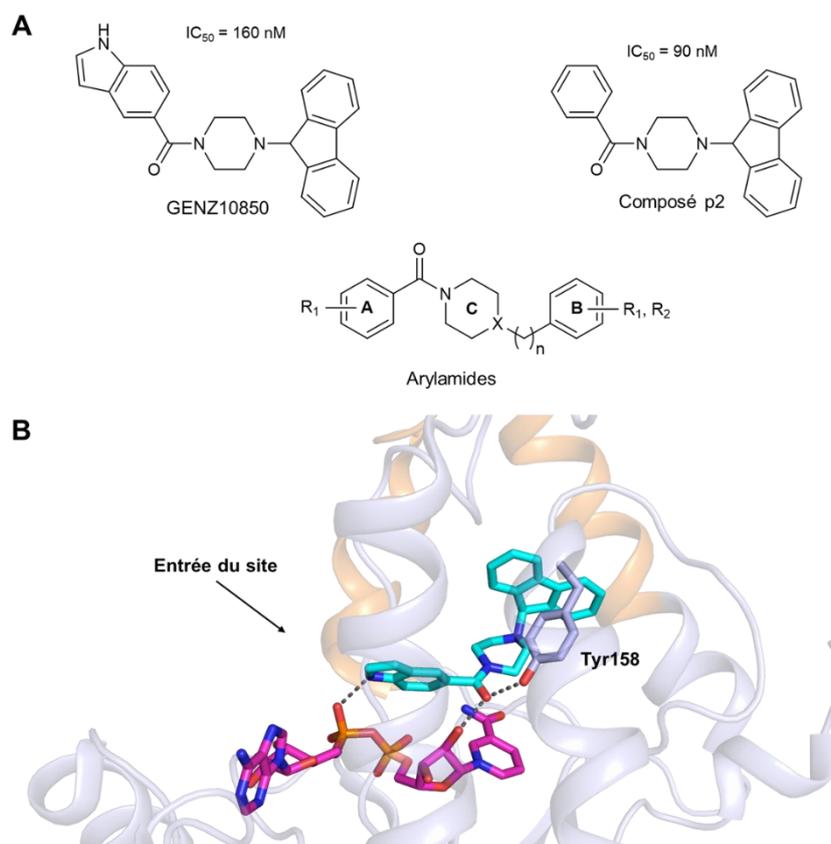


Figure 21 : Les arylamides et mode de fixation du composé GENZ10850. A) Structures des arylamides. B) Fixation du composé GENZ10850 dans le site actif d'InhA (PDB : 1P44). Le cofacteur NAD^+ est coloré en magenta et l'inhibiteur en cyan. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits pointillés gris.

Dans le but d'améliorer l'activité de ces composés sur Mtb, des dérivés ont été synthétisés par chimie combinatoire. Pendant l'étape d'optimisation d'un motif identifié, la chimie combinatoire peut rapidement permettre la synthèse d'une grande diversité de composés. En effet, l'emploi de fragments portant des fonctions réactives permet, dans des conditions propices, la condensation de ces fragments (Schéma 1). En fin de compte, cela aboutit à la création d'une librairie combinatoire dont le nombre de composés est proportionnel au nombre de fragments initiaux.

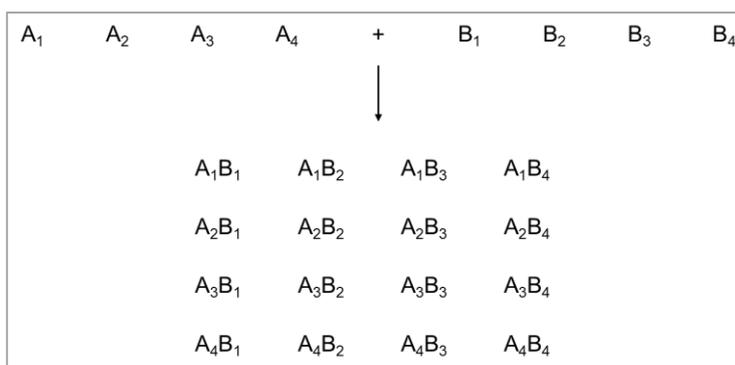


Schéma 1 : Illustration d'une chimie combinatoire. En solution, les fragments comportant des fonctions chimiques compatibles s'assemblent dans le but de former un produit final. Chaque composé A est en mesure de s'assembler à l'un des différents composés B.

De cette manière, à partir de 4 molécules acides et 15 pipérazines, 60 dérivés arylamides ont été obtenus¹⁰². Cependant, ces dérivés rencontrent le même problème que le composé GENZ10850, à savoir un manque d'inhibition de la croissance bactérienne malgré des IC₅₀ contre InhA qui peuvent descendre jusqu'à 90 nM.

3.2. Les pyrrolidines carboxamides

Parallèlement aux arylamides, un criblage d'une banque de 30 000 composés a mis en évidence les **pyrrolidines carboxamides** comme inhibiteurs potentiels d'InhA¹¹⁶. À l'instar des arylamides, l'identification de cette classe d'inhibiteurs a été faite *via* le dosage de l'activité enzymatique de la protéine InhA en présence des différentes molécules de la banque de composés. Toujours de manière identique aux arylamides, certains dérivés pyrrolidines carboxamides ont été synthétisés par chimie combinatoire dans le but de rapidement générer une grande variété de composés.

Cette classe d'inhibiteurs possède trois cycles dont un cétopyrrolidine (cycle B, Figure 22A) essentiel¹¹⁶. Le remplacement de ce cycle conduit à une perte de l'activité inhibitrice. Les substitutions des positions 3 et 5 du cycle A (Figure 22A) conduisent aux molécules les plus actives. Les substitutions sur ces deux positions par des atomes de chlore ou bien des groupements phényle et biphényle permettent d'obtenir une activité inhibitrice de la protéine jusqu'à 0,39 μM. Tout comme les arylamides, les pyrrolidines carboxamides montrent de bonnes activités contre InhA (IC₅₀ jusqu'à 62 nM) mais restent tout de même peu efficaces contre les mycobactéries (CMI > 62,5 μM).

La structure de la protéine InhA en complexe avec un des inhibiteurs de cette famille montre une zone de fixation similaire aux arylamides (Figure 22B). Dans cette structure, le ligand se fixe dans la poche du substrat. Le cycle cétopyrrolidine forme les liaisons hydrogène avec le

ribose ainsi que la tyrosine 158. Le cycle aromatique A, porté par la partie carboxamide fait face au fond du site actif et se retrouve dans la partie hydrophobe.

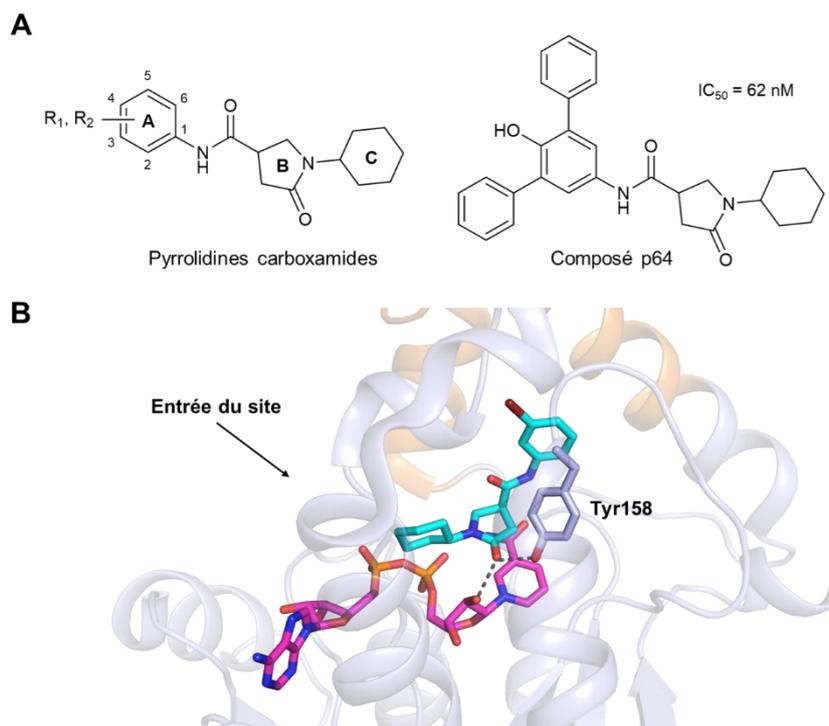


Figure 22 : Structures des pyrrolidines carboxamides et leur fixation dans le site actif. A) Structure générale des pyrrolidines carboxamides et celle du composé p64. B) Structure de la protéine InhA en complexe avec une pyrrolidine carboxamide (PDB : 4TRJ) colorée en cyan. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits pointillés gris foncé.

3.3. Les thiadiazoles

Un criblage à haut débit mené par l'entreprise pharmaceutique GlaxoSmithKline (GSK) sur un total de 1,9 million de composés, a mis en évidence l'intérêt des **thiadiazoles** portant un **pyrazole** (Figure 23A). Ce criblage reposait également sur l'inhibition de l'oxydation du NADH pour la détection de molécules actives envers InhA. Trois composés thiadiazole se sont avérés très efficaces, avec des IC_{50} compris entre 2 et 7 nM. Ces composés sont également capables d'inhiber la croissance des mycobactéries avec, pour le plus actif d'entre eux, une CMI de $0,2 \mu\text{M}^{103,117}$. Le mécanisme d'inhibition par ces molécules implique la formation d'un complexe avec l'enzyme ainsi que le cofacteur, préférentiellement avec le NADH¹¹⁷. Contrairement à la majorité des inhibiteurs, le mécanisme d'inhibition de ces thiadiazoles ne fait pas intervenir de liaison hydrogène avec la tyrosine 158 de l'enzyme^{103,117}. Cette dernière se retrouve dans la conformation « out » (Figure 23B). Cependant, elle est impliquée dans la fixation du ligand *via* des interactions de type van der Waals. Le cycle pyrazole de l'inhibiteur

se place au-dessus du nicotinamide en établissant des interactions d'empilement π . Une liaison hydrogène entre un azote de ce cycle ainsi que le ribose stabilise cette position. Deux liaisons hydrogène supplémentaires avec la chaîne principale de la méthionine 98 permettent le positionnement de cet inhibiteur dans le portail majeur.

Ces composés thiadiazoles se sont montrés également actifs sur des souches résistantes à l'isoniazide causées par la mutation de la protéine KatG. Récemment, des essais réalisés sur des modèles animaux (souris) ont montré une bonne biodisponibilité de ces composés après administration par voie orale. L'efficacité de ces molécules, et leur faible cytotoxicité, en particulier celles du composé GSK693 (Figure 23A), en font des candidats potentiels pour de futurs médicaments. Les recherches sur le composé GSK693 ont reçu des financements d'organismes importants tels que Global Alliance for TB dans l'espoir de continuer vers des essais cliniques de ce composé.

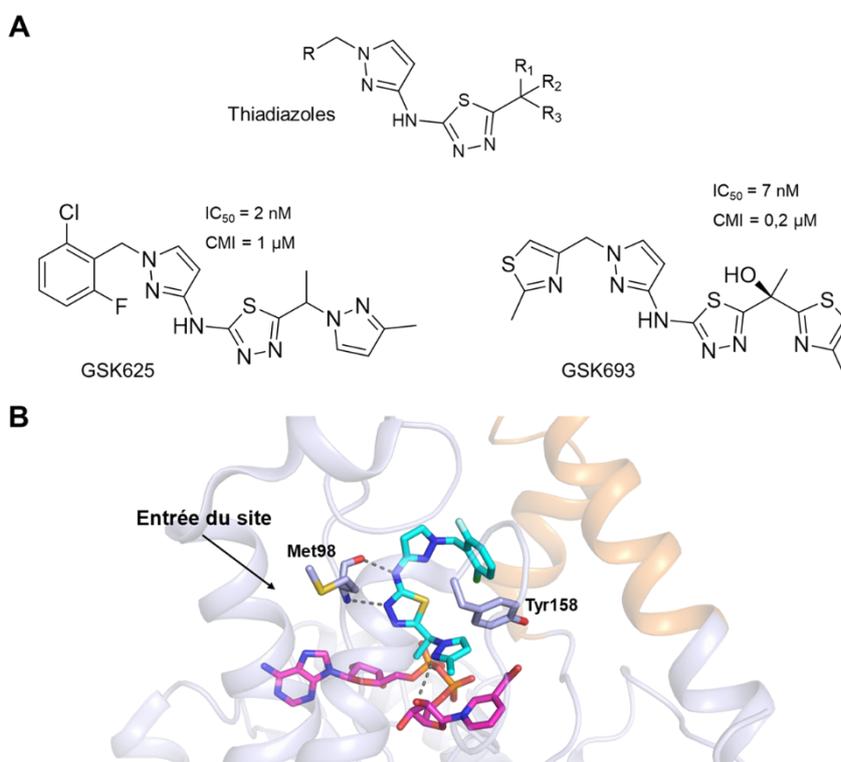


Figure 23 : Structures des thiadiazoles et leurs interactions avec InhA. A) Structure générale des thiadiazoles et celles des composés GSK625 et GSK693. B) Structure montrant la fixation d'une des thiadiazole (en cyan) dans le site actif (PDB : 5JFO). Le cofacteur NADH est coloré en magenta et les liaisons hydrogène en traits pointillés gris.

3.4. Les pyridones

Les **pyridones** ont été identifiées, dans un premier temps, par criblage phénotypique à haut débit d'une banque regroupant environ 2,3 million de composés¹⁰⁴. Lors de ce criblage, des mycobactéries entières atténuées (Mtb H37Ra) ont été utilisées comme cibles afin d'évaluer directement la capacité des composés à inhiber la croissance bactérienne. Plus de 20 000 composés ont montré une inhibition d'au moins 50 % de la croissance mycobactérienne à une concentration de 12,5 μM . Après application de plusieurs filtres (cytotoxicité, poids moléculaire, clog P), les pyridones ont été identifiées comme inhibiteurs efficaces contre Mtb. Au sein de cette famille de molécules, les analogues de type 4-hydroxy-2-pyridone (Figure 24) se sont montrés particulièrement intéressants. L'optimisation de ce motif a conduit au développement du NITD-916 (Figure 24). La protéine InhA a été identifiée comme cible de cette pyridone par séquençage génomique des mycobactéries résistantes au composé NITD-916. Le composé NITD-916 présente une activité correcte contre InhA ($\text{IC}_{50} = 0,57 \mu\text{M}$) mais se démarque dans son pouvoir inhibiteur de la croissance mycobactérienne, avec une CMI de 0,05 μM contre Mtb H37Rv et des CMI similaires contre des souches multi-résistantes de Mtb. Malgré une faible biodisponibilité dans les poumons après administration orale chez des souris, ce composé reste tout de même efficace dans la réduction de la charge bactérienne. Outre InhA de Mtb, cette pyridone se montre également efficace contre la protéine InhA de *M. abscessus*, une bactérie non-tuberculeuse dont la membrane est encore plus imperméable que celle de Mtb¹¹⁸.

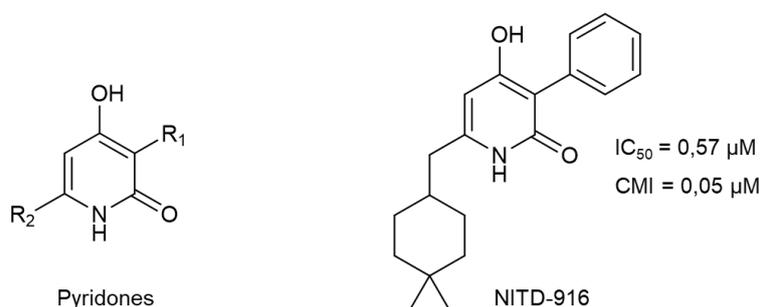


Figure 24 : Structure générale des pyridones et celle du composé NITD-916.

Plusieurs structures de la protéine en présence d'inhibiteurs de cette famille ont été résolues. Les différentes pyridones se fixent dans le site actif d'InhA d'une manière similaire aux inhibiteurs précédents. En effet, le groupement hydroxyle de la pyridone interagit avec la tyrosine 158 ainsi qu'avec le ribose du cofacteur. Une liaison hydrogène supplémentaire peut être formée entre le -NH de la pyridone et la méthionine 199 (Figure 24). Le groupement

cyclohexyle du NITD-916 est stabilisé par des interactions de type van der Waals avec plusieurs résidus de la poche hydrophobe du site actif, rendant ce composé plus efficace que ceux ne présentant pas de cyclohexyle (Tableau 1).

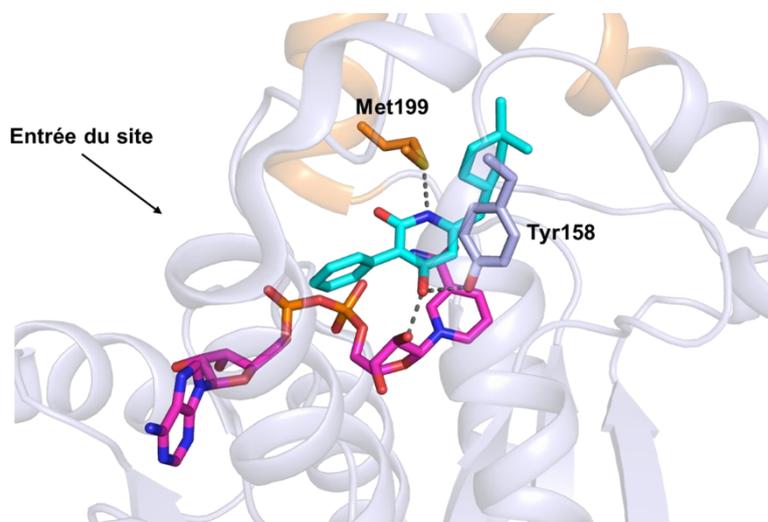


Figure 25 : Structure de la protéine *InhA* en complexe avec le NITD-916 (PDB : 4R9S). Le NADH et le NITD-916 sont respectivement colorés en magenta et en cyan. Les traits pointillés gris représentent les liaisons hydrogène.

3.5. Les sulfonamides

Des criblages basés sur des méthodes autres que le suivi de l'activité enzymatique dans la détection d'interactions ont également permis le développement d'inhibiteurs directs de la protéine *InhA*. *Sabbah et al*¹⁰⁵ ont mis à profit plusieurs méthodes, dont des techniques biophysiques, dont la résonance magnétique nucléaire (RMN), afin d'identifier des composés de bas poids moléculaire (appelés fragments) interagissant avec la protéine *InhA*. En raison des faibles affinités des fragments pour la protéine, le criblage d'une banque de 800 fragments a été réalisé par fluorimétrie différentielle à balayage (« *Differential Scanning Fluorimetry* », DSF). Cette méthode repose sur la variation de la température de dénaturation de la protéine provoquée par la fixation de ligands. Les interactions protéine-ligands ont ensuite été validées par RMN. L'optimisation de ces fragments, en incorporant les informations sur les zones de

fixation des fragments au niveau de la protéine InhA obtenus par cristallographie aux rayons X, a permis le développement d'inhibiteurs de type sulfonamide (Figure 26).

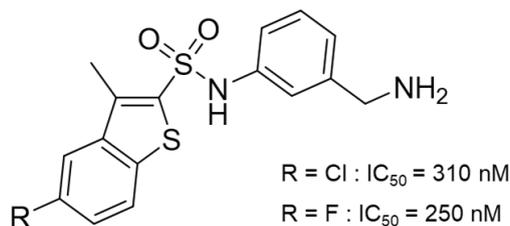


Figure 26 : Structures des sulfonamides actifs contre InhA.

Dans le site actif, le sulfonamide (R = Cl) se place dans la poche de fixation du substrat d'InhA (Figure 27). Cette position du ligand est stabilisée par une plusieurs liaisons hydrogène. L'atome d'azote du sulfonamide interagit avec la tyrosine 158, qui se trouve dans sa conformation « in ». Il interagit également avec le ribose du nicotinamide. Le motif benzylamine de ce ligand forme une liaison hydrogène avec les groupements phosphate. De ce fait, le benzothiazène se retrouve dans la zone hydrophobe du site actif. Néanmoins, l'efficacité de ces composés se limite à la protéine InhA (jusqu'à une IC₅₀ = 250 nM) et ils ne montrent pas d'activité contre la croissance mycobactérienne.

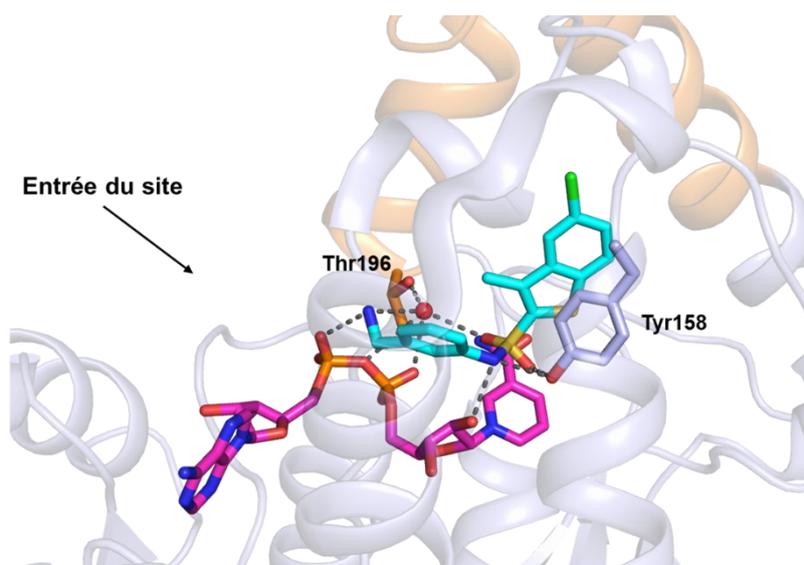


Figure 27 : Mode de fixation du sulfonamide dans le site actif d'InhA (PDB : 6SQL). Le cofacteur est représenté en magenta et le sulfonamide en cyan. La molécule d'eau est représentée par une sphère rouge. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits pointillés gris.

3.6. Les pyrazoles

Le développement de nouvelles technologies, notamment dans le domaine des oligonucléotides, a apporté des avancées majeures dans la conception de chimiothèques combinatoires. La chimie combinatoire mise en œuvre lors de la formation de bibliothèques chimiques codées par l'ADN (« *DNA-encoded chemical library* ») permet de cribler rapidement jusqu'à plusieurs dizaines, voire centaines de milliards, de combinaisons en fonction du nombre de fragments utilisés. Cette méthode est basée sur plusieurs cycles de couplages de fragments et de sélection par la cible^{119,120}. Plusieurs criblages de ce type ont été menés sur la protéine InhA¹⁰⁶. Pour ces criblages, la protéine InhA a été greffée sur un support solide à l'aide d'une étiquette (6 histidines ou biotine), puis mise en contact avec la chimiothèque avec ou sans le cofacteur sous forme NADH ou NAD⁺. L'identification de molécules interagissant avec la protéine nécessite alors le séquençage des fragments d'ADN après rupture de l'interaction composé-cible suivi de l'amplification de l'ADN.

De cette manière, le criblage de plus de 16 millions de combinaisons à partir de 1734 fragments a mis en évidence l'efficacité de certains composés, présentant un groupement **pyrazole**, contre la protéine InhA. Après optimisation du pyrazole *hit* (composé 7, IC₅₀ = 34 nM), le pyrazole tête de série (composé 65) issu de ce criblage (Figure 28) affiche de très bonnes activités à l'encontre d'InhA (IC₅₀ = 4 nM) et de Mtb (CMI = 0,50 μM). Toutefois, *in vivo*, sur modèle murin atteint de tuberculose, cette molécule s'avère inefficace.

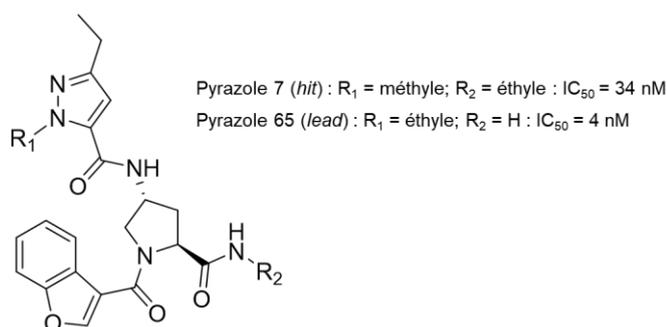


Figure 28 : Structures du pyrazole *hit* obtenu après criblage d'une banque de fragments couplés à l'ADN et molécule tête de série développée (*lead*).

La structure cristallographique de la protéine en complexe avec le pyrazole *hit* révèle une fixation de ce dernier dans le portail majeur (Figure 29). Cette conformation de l'inhibiteur est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogène avec les résidus composant l'hélice H6 de la SBL.

Toujours à l'entrée du site, la méthionine 98 est également impliquée dans la fixation du ligand. Le groupement pyrazole, quant à lui, effectue une liaison hydrogène avec le ribose du cofacteur. Dans cette structure, la tyrosine 158 n'est pas impliquée dans la stabilisation du ligand. Elle se trouve dans sa conformation « out », orientée vers le fond du site actif.

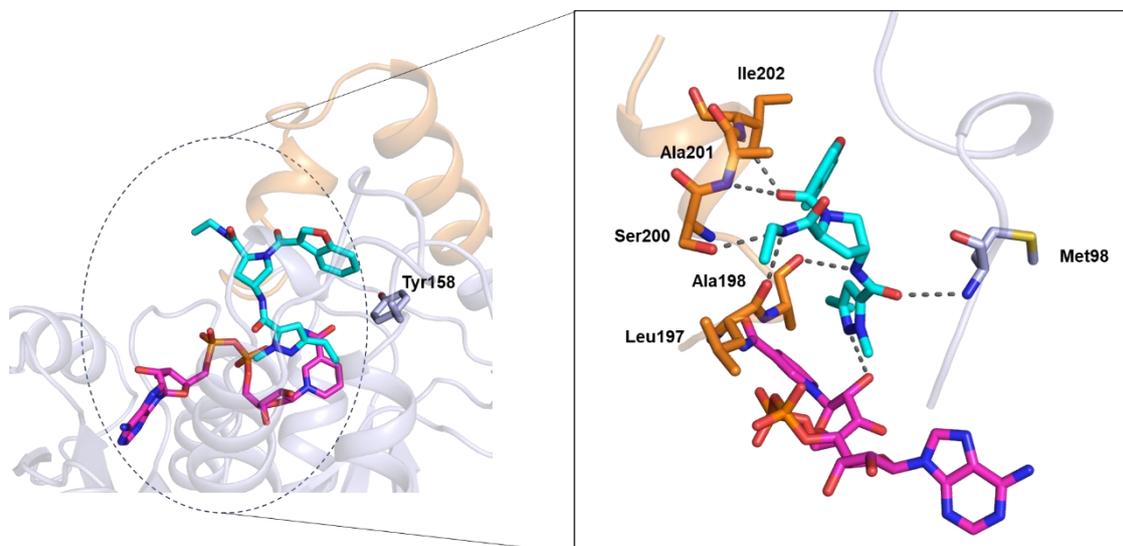


Figure 29 : Interactions avec le portail majeur d'InhA médiées par le pyrazole 7 (PDB : 4COD). Vue sur la partie supérieure du portail majeur. La SBL est colorée en orange. Le cofacteur et le ligand sont respectivement représentés en magenta et cyan. Les liaisons hydrogène sont représentées en traits pointillés gris.

3.7. Les diaryl éthers

Le triclosan (TCL, Figure 30A), un antibactérien et antifongique à large spectre, est un composé très utilisé comme agent désinfectant dans les produits de la vie quotidienne. Celui-ci est même retrouvé dans divers objets (jouets pour enfant) et produits hygiéniques. Certains produits de soins personnels contiennent 0,1 à 0,3 % de triclosan¹²¹. Cette molécule, très controversée, est à la fois considérée sans danger pour les mammifères par certains et de perturbateur endocrinien par d'autres. Cet antibactérien est capable d'interférer avec la synthèse des acides gras¹²² et d'inhiber la protéine InhA.

En 2003, la première structure de la protéine InhA en complexe avec le cofacteur ainsi que le TCL fut résolue¹⁰¹. À l'intérieur du site actif, le motif diaryl éther du TCL est stabilisé, comme la majorité des inhibiteurs directs d'InhA, au-dessus du cofacteur NAD⁺ par des liaisons hydrogène avec la tyrosine 158 ainsi que le 2'-OH du ribose du cofacteur (Figure 30B). Le TCL forme des interactions de type empilement π entre son cycle A, portant la fonction hydroxyle, et le cycle aromatique du nicotinamide. De ce fait, le TCL occupe également une partie de la poche de fixation du substrat, comme les inhibiteurs cités précédemment. Le complexe InhA-

NAD⁺-TCL ainsi formé empêche l'entrée du substrat et inhibe l'activité de la protéine InhA. Néanmoins, le TCL lui-même ne présente qu'une activité inhibitrice modeste contre InhA, avec une IC₅₀ de l'ordre de 1 μM. La structure de la protéine InhA en complexe avec le triclosan a inspiré de nombreux travaux, et de nombreuses molécules différentes sur la base du motif diaryl éther ont vu le jour.

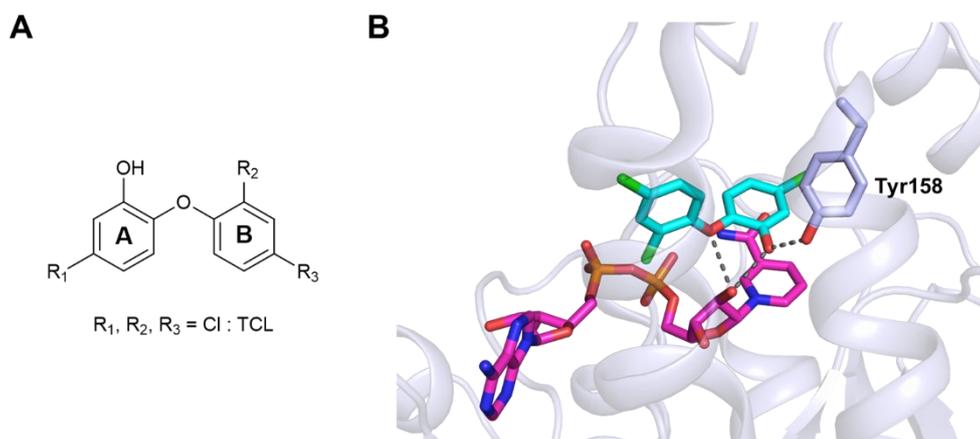


Figure 30 : Structure générale des diaryl éthers et mode d'inhibition du TCL. A) Structure des motif diaryl éthers. B) Structure d'InhA en complexe avec le TCL (PDB : 2B35), en cyan. Le NAD⁺ est représenté en magenta. Les interactions du TCL avec la tyrosine 158 et le NAD⁺ sont représentées par des traits pointillés gris.

a. Diaryl éthers alkylés

Sullivan et al. ont introduit, dès 2006, des composés diaryl éthers avec des chaînes alkyles greffées sur le 2-phénoxyphénol¹⁰⁷. L'incorporation de chaînes alkyles de 2 à 14 unités de carbone (Figure 31) améliore de façon drastique l'activité inhibitrice contre InhA. L'IC₅₀ du composé le plus efficace, comportant une chaîne octyle, atteint une valeur de 5 nM, soit une amélioration d'un facteur 200 en comparaison du TCL. De plus, l'activité antimycobactérienne contre H37Rv de ces molécules alkylées est également améliorée. Les composés substitués par des chaînes pentyle et octyle affichent des CMI respectives de 3,5 et 6,4 μM, des valeurs bien meilleures que les modestes 43 μM du TCL pour la même souche mycobactérienne (Tableau 1). Bien que les dérivés à chaîne hexyle et octyle soient très bien tolérés à forte dose (300 mg/kg) chez les souris par voie orale, ces derniers rencontrent des problèmes de biodisponibilité¹²³. La faible solubilité de ces composés est considérée comme l'une des raisons de ce manque d'activité *in vivo*. *In vitro*, ces deux dérivés sont toutefois capables de pénétrer dans des macrophages et de réduire la croissance des mycobactéries¹²³.

Dans le but de pallier le manque de solubilité induit par la présence des chaînes alkyles sur ces diaryl éthers, des modifications sur le cycle B (Figure 31) ont rapidement été étudiées¹⁰⁸. Diverses modifications ont été entreprises, parmi lesquelles l'ajout de groupements nitro, amino et pipérazine en *para*, *méta* ou *ortho* (Tableau 1, composés 12a-c et 14a-c). De plus, la modification du cycle aromatique en lui-même par ajout d'un ou plusieurs atomes d'azote a été explorée. Les substitutions sur le cycle B, que ce soit en *ortho*, *méta* ou *para* par des groupements volumineux, tout comme l'incorporation d'un ou plusieurs atomes d'azote, induisent toutes une baisse significative de l'activité inhibitrice des molécules correspondantes. La conservation des halogènes en position *ortho*, que ce soit le fluor, le chlore, le brome ou l'iode, entraîne également une légère détérioration de l'IC₅₀. Toutefois, des CMI proches de la molécule non substituée sont préservées pour le chlore et le brome. L'incorporation de petits groupements amino ou nitro en position *ortho* et *para* nuit sensiblement moins à l'activité des molécules. Malgré des IC₅₀ corrects, mais très souvent moins bonnes que celle du diaryl éther non substitué, la majorité de ces substitutions nuisent à la capacité des molécules à inhiber la croissance des mycobactéries.

Néanmoins, parmi ces molécules, le PT70, dérivé diaryl éther alkylé portant un groupement méthyle en position *ortho* du cycle B se distingue (Figure 31). Le temps de résidence de ce composé dans le site actif est drastiquement augmenté¹⁰⁹. Ce dernier passe de 0,1 seconde pour le composé non méthylé à 24 minutes après la méthylation. Le temps de résidence correspond à l'inverse de la vitesse de dissociation (k_{off}) de l'inhibiteur. Le PT70 ayant besoin du cofacteur NAD⁺ afin de se fixer dans le site actif, le k_{off} de l'inhibiteur a été approximé comme étant égal à celle du NAD⁺ ($K_d \text{ NAD}^+ > 2 \text{ mM}$). Ce dernier est déterminé par l'utilisation de cofacteur NAD⁺ radiomarqué au ³²P.

Selon les cibles, des inhibiteurs possédant des temps de résidence long peuvent être préférables. En effet, l'augmentation du temps de résidence des inhibiteurs dans le site actif peut entraîner une meilleure efficacité, en particulier à faible concentration d'inhibiteurs^{124,125}.

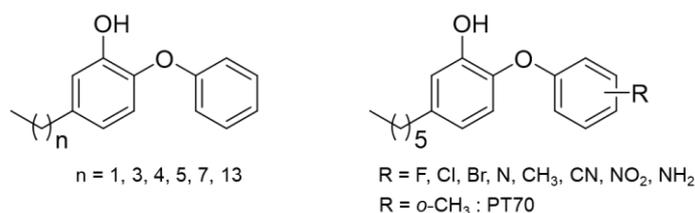


Figure 31 : Structures des diaryl éthers alkylés.

Cette augmentation du temps de résidence par l'ajout du groupement méthyle est expliquée par les structures d'InhA en présence de ces ligands. Ces ligands, tout comme le TCL, se placent au-dessus du cofacteur en établissant les mêmes liaisons hydrogène ainsi que les interactions d'empilement π avec le cycle aromatique du nicotinamide (Figure 32). Dans la structure en présence du ligand PT70, la SBL est plus ordonnée. Du fait des interactions hydrophobe possible entre le cycle B portant le méthyle et certains résidus hydrophobes de la SBL (Ala 198 et Ile 202), l'hélice H6 de la SBL se retrouve stabilisée dans une conformation plus proche du centre de la structure (Figure 32).

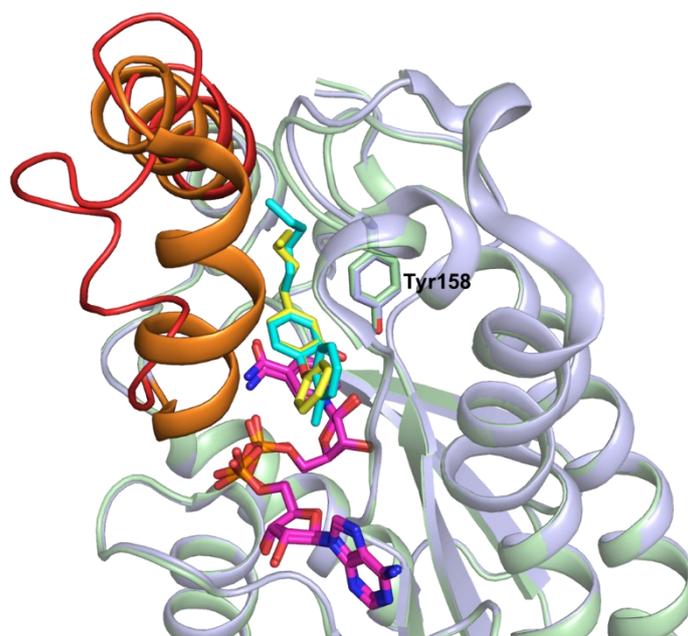


Figure 32 : Superposition des structures d'InhA en complexe avec les composés 5PP et PT70. La structure du complexe avec le 5PP (PDB : 2B36) est représentée en vert, SBL en rouge. La structure du complexe avec le PT70 (PDB : 2X23) est colorée en bleu, SBL en orange. Les ligands NAD^+ , 5PP et PT70 sont respectivement colorés en magenta, jaune et cyan.

En conséquence, le rapprochement de l'hélice H6 vers le centre de la protéine recouvre une grande partie du portail majeur, rendant la sortie de la molécule PT70 du site actif plus difficile (Figure 33A et B).

Dans ces structures, les chaînes alkyles de ces diaryl éthers se retrouvent dans le fond du site actif, en direction du portail mineur. Ce dernier est dans une conformation ouverte dans les structures en présence du 5PP et PT70 (Figure 33C et D).

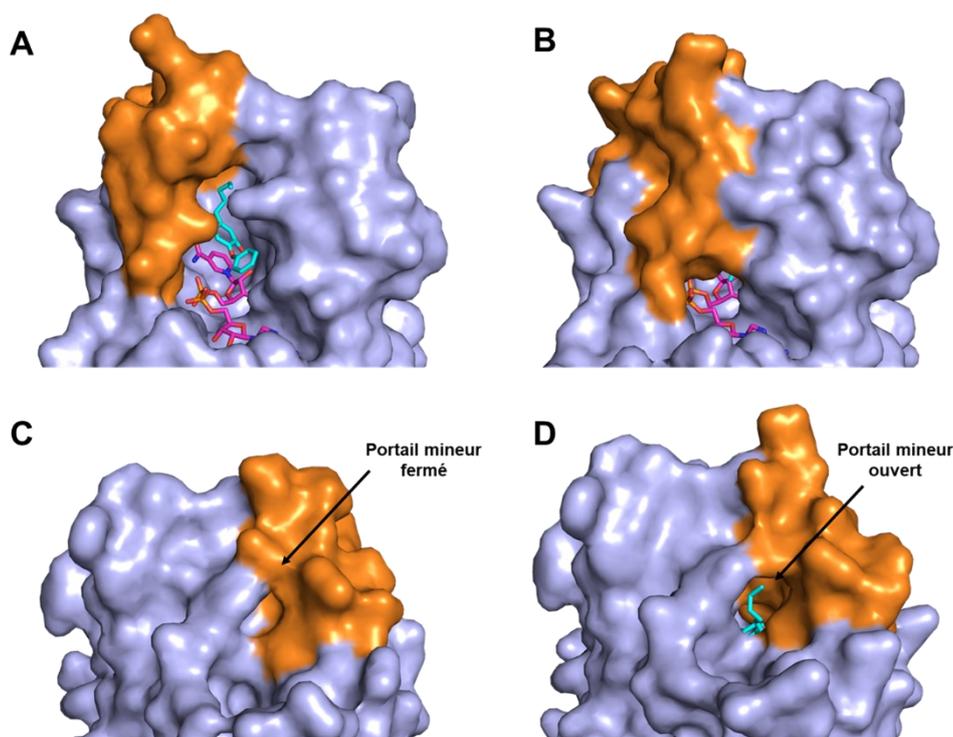


Figure 33 : Les états ouverts et fermés des portails majeur et mineur d’InhA. A) Structure de la protéine InhA en complexe avec le 5PP (PDB : 2B36). B) Structure d’InhA en complexe avec le PT70 (PDB : 2X23). C) Structure de la protéine InhA en complexe avec le NAD⁺ seul (PDB : 1ENY). D) Vue du portail mineur de la structure en complexe avec PT70 (PDB : 2X23). Les SBL de ces structures sont colorées en orange. Le cofacteur est coloré en magenta et les inhibiteurs en cyan.

b. Triazole-diaryl éthers

Par la suite, l’identification de dérivés diaryl éthers portant sur le cycle A un **triazole** substitué par différents groupements (Figure 34) a suscité l’intérêt pour les inhibiteurs à temps de résidence plus long. Le remplacement de la chaîne alkyle du composé PT70 par un triazole résulte en une augmentation du temps de résidence¹¹¹. En effet, certains de ces dérivés triazole-diaryl éthers, notamment lorsque le triazole porte un groupement cyclopropyle, présentent des temps de résidence allongés (jusqu’à 220 minutes) par rapport à PT70 (24 minutes) et de très bonnes CMI (jusqu’à 0,46 μ M). L’ajout du triazole contribue à améliorer la solubilité de ces molécules, dont le coefficient de partage log P baisse jusqu’à 4 unités par rapport à la molécule PT70. L’incorporation de groupements trop volumineux sur le triazole entraîne une baisse du temps de résidence des inhibiteurs concernés ainsi qu’une réduction de l’activité contre les mycobactéries. Le remplacement du cyclopropane par un cyclohexane entraîne une baisse du temps de résidence d’un facteur deux (94 minutes pour le cyclohexane) ainsi qu’une détérioration du CMI d’un facteur 10. Cette baisse de l’activité se confirme également lorsque le triazole se trouve sur le cycle B du motif diaryl éther^{112,126}. En effet, les inhibiteurs portant le triazole sur le cycle B présentent des IC₅₀ de l’ordre du micromolaire.

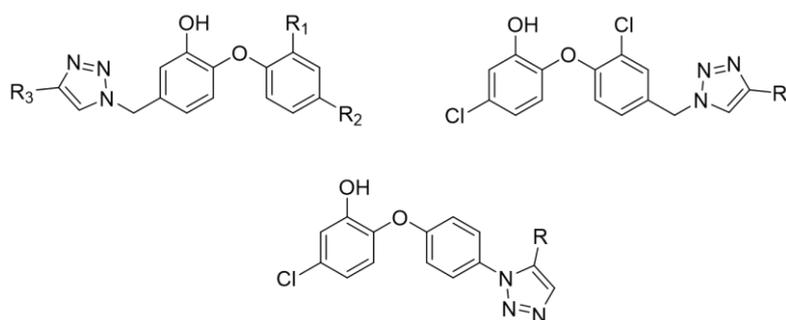


Figure 34 : Structures générales des diaryl éthers portant un groupement triazole.

Ces dérivés diaryl éthers portant un triazole se placent dans le site actif de la protéine InhA en respectant le mode d'inhibition du motif diaryl éther (Figure 35). Le groupement triazole se plaçant au fond du site actif est stabilisé par une liaison hydrogène entre l'azote en position 3 du triazole et la chaîne latérale de l'acide glutamique 219. Comme déjà observé pour la structure en complexe avec PT70, l'hélice H6 de la SBL est proche du centre de la structure et se superpose parfaitement avec celle de la structure en complexe avec le PT70. De ce fait, le portail majeur d'InhA avec ce dérivé triazole est également dans une conformation fermée.

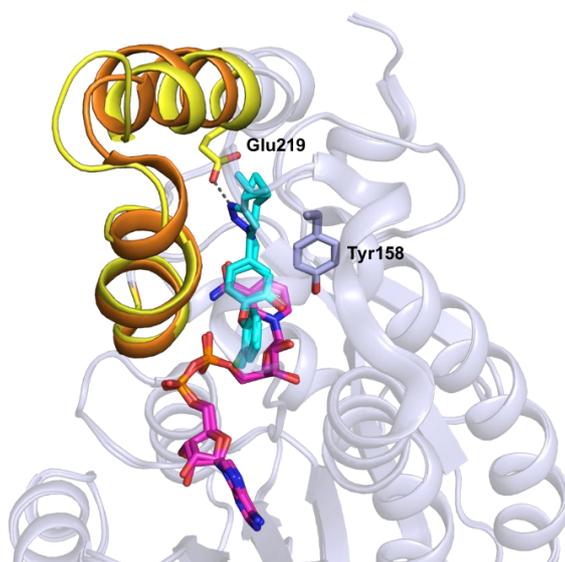


Figure 35 : Superposition des structures en complexes avec PT70 (PDB : 2X23) et PT504 (PDB : 5UGT). Le cofacteur NAD^+ est coloré en magenta et les inhibiteurs PT70 et PT504 en cyan. Les SBL sont colorées en orange pour la structure 2X23 et en jaune pour la structure 5UGT. La liaison hydrogène entre le triazole et le résidu Glu219 est indiquée par des traits pointillés gris.

3.8. Les inhibiteurs bimodaux

La **pyridomycine** (Figure 36A) est un antibiotique identifié en 1953 comme étant efficace contre la croissance de Mtb et de *M. smegmatis*. Bien que son efficacité ait été démontrée très tôt, le mécanisme d'action de cette molécule naturelle n'a été élucidé que très récemment. *Hartkoorn et al.*¹¹³ ont identifié InhA comme cible de la pyridomycine à la suite du

séquençage d'une souche résistante de Mtb à cet antibiotique. Cette souche résistante présente une mutation sur le gène *inhA*, impliquant la mutation de l'acide aspartique 148 en glycine, résidu proche de la poche de fixation du cofacteur. En conséquence de quoi, cette mutation entraîne une perte d'affinité du NADH pour la protéine. Les différentes données présentées par les auteurs dévoilent la pyridomycine comme étant un inhibiteur compétitif du cofacteur NADH pour InhA. La structure cristallographique de la protéine InhA en complexe avec la pyridomycine montre un mode de fixation inédit¹²⁷. En effet, celle-ci se fixe dans le site actif de la protéine en occupant simultanément la poche de fixation du cofacteur ainsi que la poche de fixation du substrat (Figure 36B).

Un autre inhibiteur direct d'InhA présente un comportement similaire à la pyridomycine. En effet, la molécule AN12855 (Figure 36A), une **diazaborine** optimisée, se fixe dans le site actif de la protéine en occupant également à la fois le site du cofacteur NADH et celui du substrat (Figure 36B). La structure cristallographique obtenue avec la protéine InhA, ainsi que des mesures biophysiques, montrent que cette diazaborine interagit avec InhA indépendamment du cofacteur¹¹⁴. Cette fixation est stabilisée par des interactions avec la tyrosine 158 et la lysine 165 du site catalytique. Le groupement oxime de la molécule forme également une liaison hydrogène avec l'acide glutamique 219, permettant le rapprochement entre les résidus 195 et 219. En cas de mutation d'un de ces deux résidus, l'activité de la diazaborine est fortement diminuée. Le composé AN12855 est à la fois très efficace contre la protéine InhA ($IC_{50} = 30$ nM) et dans l'inhibition des mycobactéries (CMI = 0,29 μ M). Plus encore, cette molécule se révèle active contre les isolats cliniques de Mtb multi-résistants. Administrée par voie orale chez des souris infectées par Mtb, elle se montre efficace dans le traitement de la tuberculose aiguë ainsi que la forme chronique.

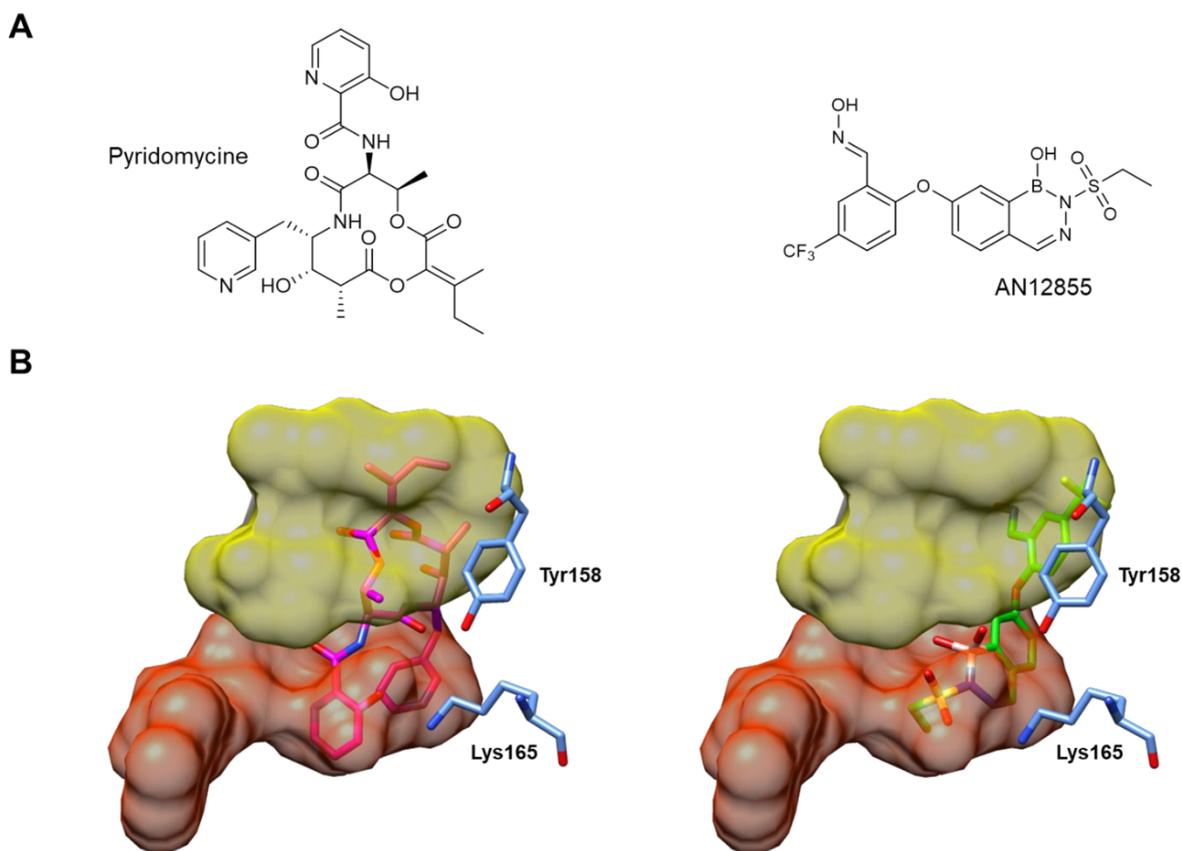


Figure 36 : Structure de la pyridomycine et du composé AN12855 (A), ainsi que leur positionnement dans le site actif (B). La pyridomycine est représentée en magenta (PDB : 4BGE) et le composé AN12855 en vert (PDB : 5VRL). Les surfaces des poches du cofacteur et du THT, analogue du substrat, sont respectivement représentées en rouge et en jaune.

L'ensemble des inhibiteurs cités précédemment, à l'exception des inhibiteurs bimodaux, se fixent à InhA au-dessus du cofacteur et occupent la poche du substrat. A partir de ces différentes structures de la protéine en complexe avec les inhibiteurs directs, le site actif d'InhA peut être subdivisé en 3 sites¹¹⁷ (Figure 37). Le site I correspond au site catalytique. La poche hydrophobe située dans le fond du site forme le site II. Le portail mineur se trouve derrière cette poche. Le site III, quant à lui, désigne la zone proche du portail majeur. De ce fait, cette zone est exposée au solvant.

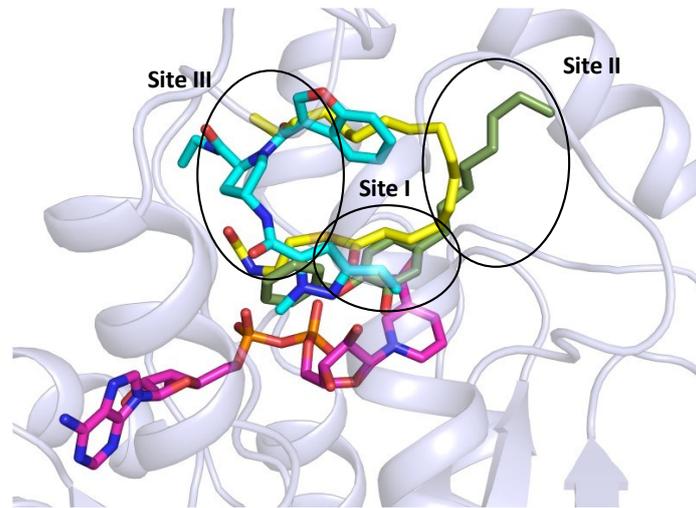


Figure 37 : Superposition des structures d'InhA en complexe avec des ligands interagissant dans les sites I, II et III. Le composé 8PP, le pyrazole KV1 et le THT sont représentés en vert (PDB : 2B37), en cyan (PDB : 4COD) en jaune (PDB : 1BVR), respectivement. Le cofacteur est représenté en magenta.

Parmi les inhibiteurs cristallisés avec la protéine InhA, très peu exploitent pleinement les portails majeur et mineur. L'identification de groupements pouvant interagir au niveau de ces deux portails, notamment avec les résidus de la SBL, pourrait mener vers la découverte de nouveaux inhibiteurs efficaces d'InhA.

Objectifs des travaux de thèse

Cette thèse, à l'interface de la chimie et de la biologie, a pour objectifs la conception et le développement d'inhibiteurs directs de la protéine InhA, essentielle à la survie des mycobactéries, mais également l'exploration du site actif de cette protéine. Ces inhibiteurs potentiels seront conçus de manière à cibler les portails majeur et mineur d'InhA, régions jusqu'ici peu explorées, comme observé à travers les différentes structures disponibles de la protéine InhA.

Pour parvenir à ces objectifs, différentes approches ont été employées. Dans une première approche, les efforts ont été concentrés sur la mise en place d'un criblage à base de fragments notamment par cristallographie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial X-ray Crystallography*). Cette dernière, dérivée de la chimie combinatoire dynamique, permet, *in situ*, de générer et de cribler de nombreuses molécules à partir de fragments. L'application de cette méthode en utilisant la protéine InhA comme cible a permis de mettre en lumière la formation de nouveaux dérivés diaryl éthers à partir de fragments.

Une deuxième approche a été développée autour d'une chimie médicinale plus conventionnelle dans la quête de molécules plus affines et efficaces envers InhA. Lors de cette approche, des molécules comportant plusieurs motifs reconnus par InhA, dont des motifs diaryl éthers ou encore des chaînes alkyles, ont été synthétisés. Cette approche permet d'explorer l'intégralité du site de liaison du substrat de la protéine InhA afin d'obtenir des inhibiteurs toujours plus affins et efficaces contre la croissance mycobactérienne. Les études structurales de la protéine InhA en complexe avec un des *bis*-diaryl éther synthétisé a révélé un état conformationnel inédit de cette protéine.

Enfin, des travaux par une approche multi-cibles ont également été menés lors de cette thèse. Lors de cette approche, des inhibiteurs duaux pouvant cibler deux activités enzymatiques du système FAS-II, notamment l'activité déshydratase catalysée par le complexe HadABC, ainsi que l'activité énoyl réductase, catalysée par InhA, ont été conçus. A travers cette approche, l'objectif est ainsi d'obtenir de nouveaux antibactériens toujours actifs en cas de mutation d'une des deux cibles.

Résultats

Chapitre 1 : Criblage par cristallographie combinatoire dynamique

I. Introduction

Comme nous l'avons vu auparavant dans l'introduction de ce mémoire, la protéine InhA, cible de la forme active de l'INH, tient un rôle important dans la synthèse des acides mycoliques, constituants essentiels de la paroi de Mtb¹²⁸. Malheureusement, l'émergence accrue des résistances à l'isoniazide rend cette molécule inefficace dans ces situations¹. Ces résistances à l'isoniazide sont très souvent imputables à des mutations sur le gène codant la catalase KatG, responsable de l'activation de la molécule⁶⁵. Le contournement des phénomènes de résistance liés à cette activation nécessaire à l'inhibition de la protéine InhA implique la nécessité de développer des inhibiteurs directs de l'enzyme. Plusieurs classes d'inhibiteurs directs de cette protéine identifiées par criblage à haut débit ont été répertoriées, en particulier les dérivés du triclosan (TCL)¹¹¹. Depuis la fin des années 90, de nouvelles approches basées sur des fragments (*Fragment-Based Drug Design*, FBDD) se montrent de plus en plus efficaces dans les processus d'identification de nouvelles molécules touchées (*hits*)¹²⁹. Ces méthodes tirent profit de la topologie du site actif, et donc des différentes zones d'interaction en son sein, afin de concevoir une ou des molécules possédant une bonne activité biologique à partir de fragments présentant des affinités modestes.

Au cours de ces 20 dernières années, plusieurs méthodes apparentées à la conception d'inhibiteurs à partir de fragments, comme la synthèse cinétique guidée par la cible (*Kinetic Target-Guided Synthesis*, **KTGS**) et la chimie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial Chemistry*, **DCC**) ont suscité un intérêt croissant. Ces deux approches utilisent le confinement dans le site actif de la protéine cible pour condenser des fragments *in situ*.

La KTGS, fait intervenir la formation de liaisons covalentes irréversibles reliant des fragments (Figure 38). Bien qu'il existe plusieurs réactions possibles pour condenser les fragments lors de la KTGS, une des plus utilisée est la cycloaddition de Huisgen. Une des adaptations de cette réaction est la chimie click entre un alcyne et un azoture catalysée avec du cuivre(I). Cette dernière a été développée par Sharpless, récompensé par le prix Nobel de Chimie en 2022. Lors de la KTGS, la proximité des fragments induite par le confinement dans le site actif de la protéine favorise une réaction de chimie click biocompatible, sans la nécessité de cuivre(I) comme catalyseur. Cette méthode a notamment porté ses fruits dans la conception d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase¹³⁰.

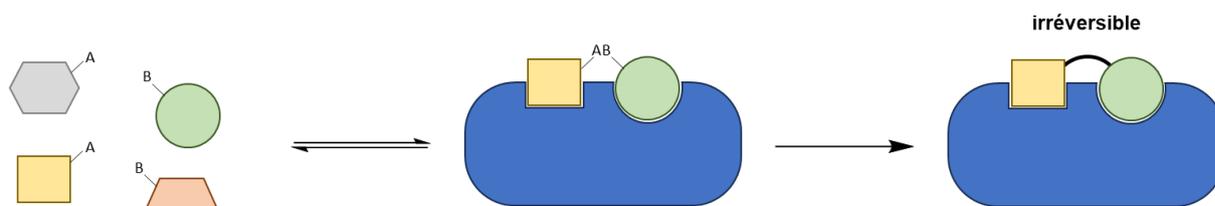


Figure 38 : Principe de fonctionnement de la KTGS.

Développée autour de la chimie supramoléculaire, la DCC fait quant à elle intervenir la formation de liaisons covalentes réversibles. La première utilisation de la DCC guidée par une cible protéique pour le développement d'inhibiteurs remonte à 1997¹³¹. Depuis lors, la DCC a été employée sur une multitude de cibles différentes dans le but de concevoir des inhibiteurs^{132,133}. Dans la DCC, des fragments en solution s'assemblent de manière spontanée et réversible dans le but de former une librairie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial Library*, DCL) (Figure 39). Ces réactions d'interconversion peuvent atteindre un état d'équilibre comportant autant d'associations que de dissociations de composés dans un intervalle de temps donné. Cependant, l'introduction d'une cible peut engendrer un déplacement de cet équilibre. Dans le cas des protéines comme cibles, la stabilisation peut être faite à l'intérieur du site actif. Cela aboutit, en fin de compte, à la sélection et l'amplification de certains assemblages au détriment d'autres. La mise en contact de la librairie avec la protéine cible peut avoir lieu avant que l'état d'équilibre ne soit atteint, ou bien après. Ces deux cas illustrent les deux formes de la chimie combinatoire dynamique : la DCC classique, lorsque la cible est introduite une fois l'équilibre atteint, ou bien la DCC adaptative, lorsque la cible est ajoutée dès le début de l'expérience (Figure 39).

Les résultats de DCC sont généralement analysés par différentes méthodes telles que la chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) ou bien la résonance magnétique nucléaire (RMN). À l'aide de ces techniques, l'apparition des adduits formés en solution ainsi que l'atteinte de l'état d'équilibre peuvent être visualisés.

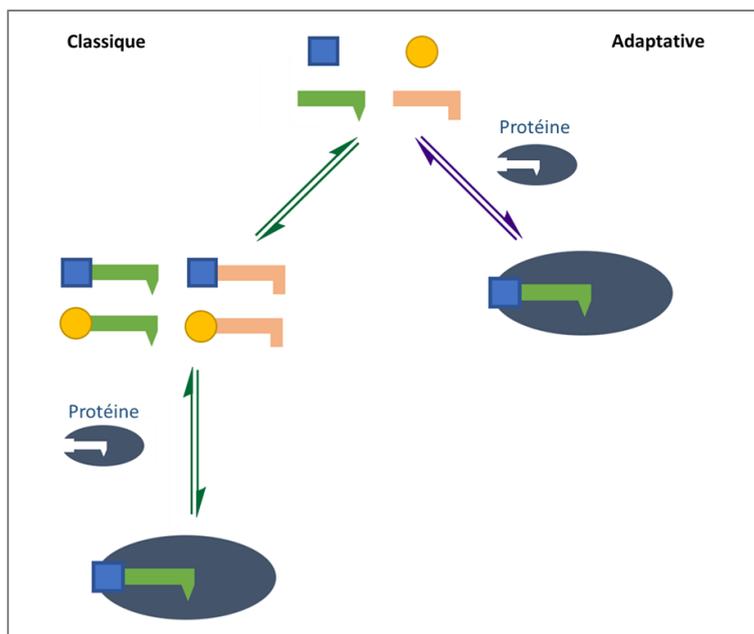


Figure 39 : Illustration des deux types de DCC. Sur la gauche, les flèches en vert montrent le cheminement de la DCC classique. Lors de celle-ci, la protéine cible est ajoutée après l'obtention de la librairie de composés. La flèche en violet, quant à elle, montre la DCC adaptative, avec l'incorporation de la cible protéique dès le début afin d'orienter la chimie combinatoire. Figure adaptée de Hirsch et al, *Eur. J. Org. Chem.*, 2019¹³².

Plusieurs réactions chimiques sont compatibles avec la DCC dont certaines sont représentées sur la Figure 40. Chacune de ces réactions nécessitent des conditions de fonctionnement particulières, notamment de pH.

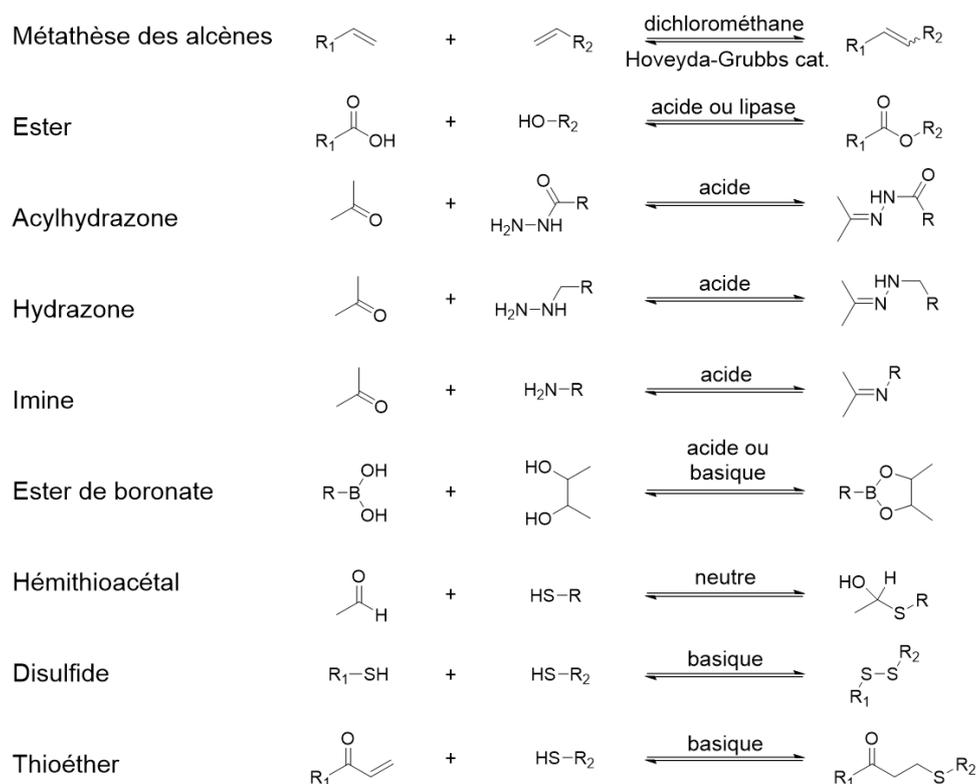


Figure 40 : Les principales réactions utilisées lors de la DCC guidée par une cible. Figure adaptée de Hirsch et al, Eur. J. Org. Chem., 2019¹³².

❖ Exemple de DCC

La chimie combinatoire dynamique a été appliquée avec succès pour le développement d'inhibiteurs de différentes protéines et notamment de l'endothiapepsine, une protéase aspartique¹³⁴⁻¹³⁷. Inspirée d'inhibiteurs précédemment identifiés par DCC contre cette protéine (Figure 41A), une banque de fragments a été confectionnée dans l'optique de concevoir un meilleur inhibiteur au cours d'une deuxième itération de DCC (Figure 41B)¹³⁸.

Différents mélanges de ces fragments ont été incubés en présence ou non de la cible protéique. La comparaison par chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) des quantités de composés formés a révélé une concentration trois fois plus importante d'un des adduits obtenus en présence de protéine, indiquant une sélection préférentielle de ce composé. Après identification et synthèse de la molécule concernée (Figure 41C), des tests d'inhibition de l'activité de la protéine ont révélé une IC_{50} de 54 nM, une valeur bien meilleure que la dizaine de micromolaire obtenue pour les inhibiteurs ayant inspiré ces travaux.

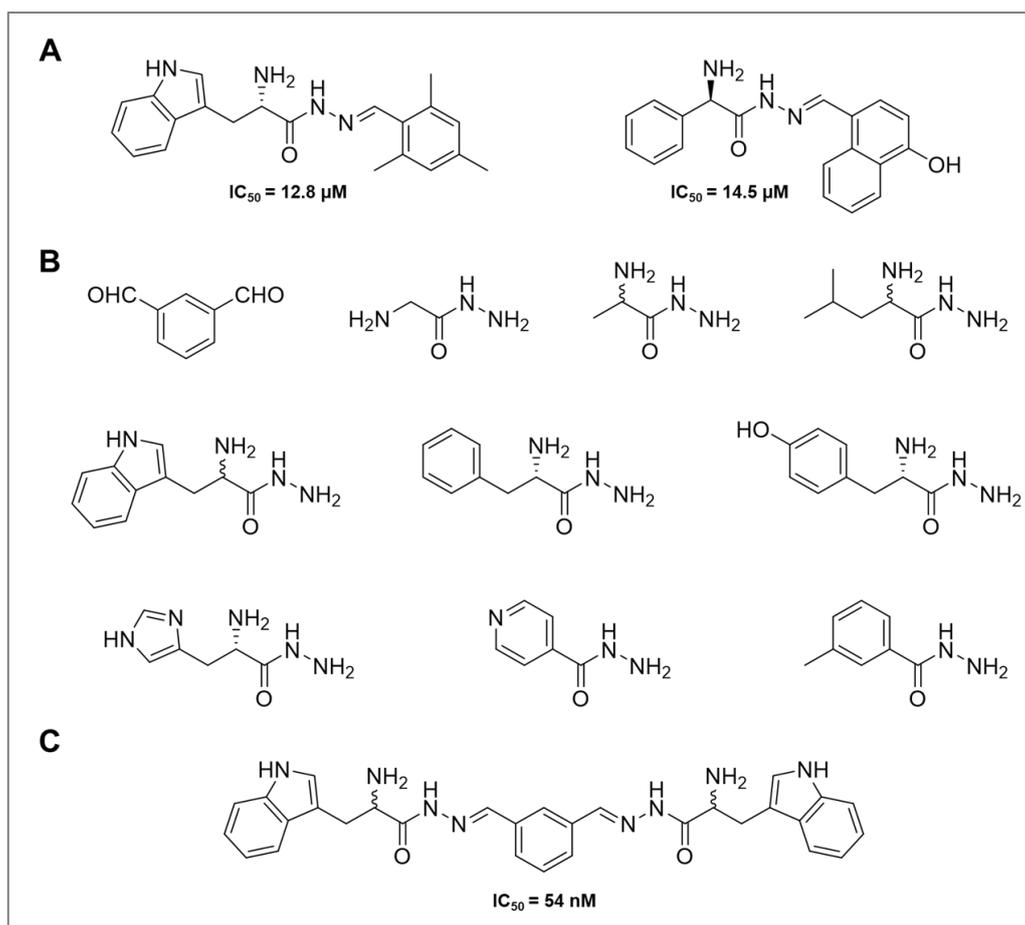


Figure 41 : Inhibiteurs et fragments contre l'endothiapepsine. A) Inhibiteurs de l'endothiapepsine précédemment identifiés par DCC¹³⁸. B) Fragments utilisés lors de la deuxième itération. C) Structure et activité du nouvel inhibiteur le plus efficace obtenu¹³⁴.

Dans le but de visualiser des interactions protéine-ligand, la cristallographie aux rayons X est l'une des méthodes apportant le plus d'informations. Cette dernière permet de visualiser à l'échelle quasi-atomique le composé dans le site actif et ainsi de déterminer les interactions mises en jeu avec la protéine. Cependant les criblages DCC et la visualisation des interactions par cristallographie aux rayons X sont généralement découplés. En effet, comme déjà mentionné plus haut, la LC-MS ainsi que la RMN sont très souvent utilisées comme méthodes analytiques afin de détecter les adduits formés. Dans l'exemple cité précédemment, la détermination de la structure du complexe protéine-ligand a été faite après l'identification (par HPLC) et la synthèse chimique du composé sélectionné par la protéine.

En 2003, une méthode couplant directement la DCC à la cristallographie aux rayons X a été introduite et nommée « *Dynamic Combinatorial X-ray crystallography* » (DCX)¹³⁹. La preuve de concept a été réalisée sur une protéine kinase (la cyclin-dépendant kinase2). Le trempage de cristaux de cette protéine en présence de différents fragments compatibles avec la DCC, suivi

de l'étude cristallographique de ces cristaux, a révélé la présence de ligands dans le site actif (Figure 42). Les cartes de densité électronique ont permis l'identification de molécules issues d'assemblages de fragments isatine et hydrazine (Figure 42C). Actuellement, cet exemple est le seul cas de DCX dans la littérature.

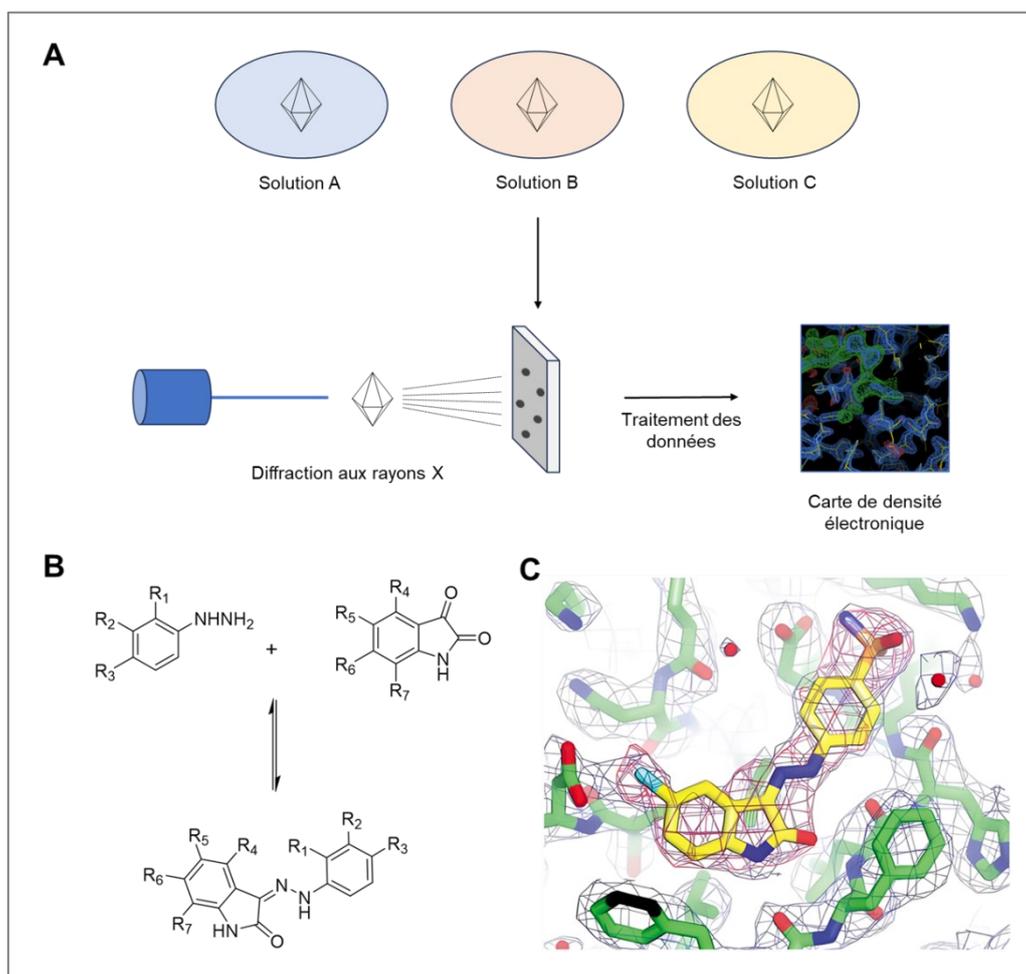


Figure 42 : Mise en place de la DCX et son analyse par cristallographie aux rayons X. A) Schéma de la DCX mise en place par Congreve et al¹³⁹. Les cristaux de protéine sont trempés dans différentes solutions dont la couleur indique la diversité des fragments mis en présence. Après diffraction aux rayons X et traitement des données, l'interprétation de la carte de densité électronique permet de visualiser et d'identifier les assemblages. B) Schéma des fragments et réaction mise en jeu lors de la DCX. C) Densité électronique obtenue et composé identifié. Figure adaptée de Congreve et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003¹³⁹.

Dans le cas de protéines présentant des facilités à cristalliser, cette méthode semble être idéale afin de cribler et d'identifier rapidement les composés interagissant avec la protéine. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est son application à la protéine InhA dans le but d'explorer de nouvelles interactions dans le site actif. Plus précisément, il sera question d'explorer les interactions au niveau des portails majeur et mineur d'InhA, peu exploités jusqu'à présent.

II. Résultats

1. Conception et synthèse des fragments

Lors de la DCC guidée par la cible, les fragments employés doivent à minima être en mesure d'entrer et d'être stabilisés dans le site actif de la protéine. Déjà mentionné précédemment, le motif diaryl éther (Figure 43) du triclosan (TCL), connu pour sa fixation dans le site actif d'InhA, est une option de choix comme fragment de départ. Ce motif diaryl éther doit être fonctionnalisé en considérant les différents types de réactions chimiques compatibles avec la DCC.

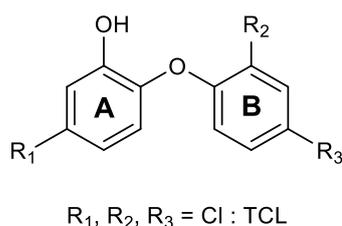


Figure 43 : Motif diaryl éther et structure du triclosan.

1.1. Choix des fragments pour la formation des adduits

Lors de la mise en place de la DCC, le choix du type de réaction est grandement influencé par sa biocompatibilité avec la protéine cible. En effet, la réaction doit être réalisable dans des conditions conservant l'intégrité structurale de la protéine, facteur primordial pour la sélection et la stabilisation des composés formés. La capacité à former des cristaux doit également être conservée pour InhA dans l'optique de mettre en application la DCX à cette protéine.

La protéine InhA de Mtb est active dans des conditions de pH autour de 6.8⁴³. Le choix de la fonctionnalisation du diaryl éther s'est ainsi porté sur les groupements aldéhydes, qui offrent une compatibilité pour la DCC autour de cette valeur de pH (Figure 40). Ces derniers peuvent être condensés avec plusieurs grandes familles de fragments tels que des amines, des hydrazines, des hydrazides ou bien des thiols pour former respectivement, des imines, hydrazones, acyl hydrazones et des hémithioacétals.

La fixation du motif diaryl éther dans le site de liaison du substrat de la protéine InhA est guidée par la fonction hydroxyle de la partie phénolique (Figure 43)^{101,111}. Cette dernière forme des liaisons hydrogène avec InhA, par l'intermédiaire de la Tyr158, mais également avec le cofacteur NAD⁺/NADH (Figure 44). De ce fait, la position de la fonction aldéhyde dicte la

localisation de l'assemblage. Lorsque la fonction aldéhyde se trouve sur le cycle A du diaryl éther, portant la fonction hydroxyle, l'assemblage pourrait avoir lieu à proximité du portail mineur au fond du site de la protéine. Dans le cas d'un aldéhyde rattachée au cycle B, l'assemblage devrait au contraire se réaliser à proximité du portail majeur (Figure 44).

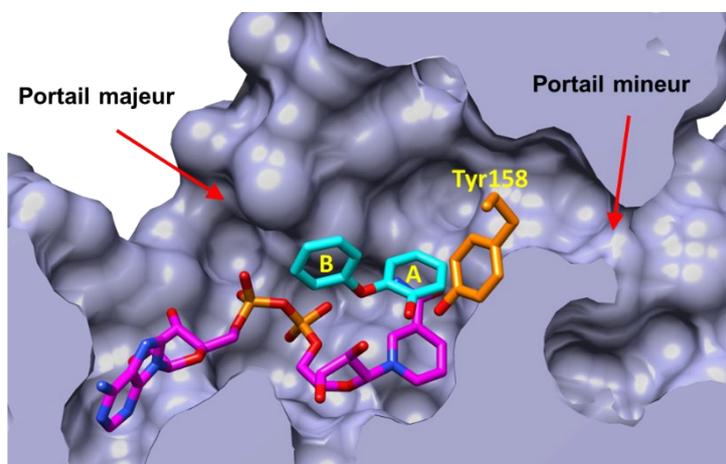


Figure 44 : Représentation de la fixation du motif diaryl éther dans le site actif d'InhA. Dans cette représentation, le motif diaryl éther est représenté en cyan et le cofacteur NAD⁺ en magenta.

1.2. Synthèse des fragments aldéhydes

Des diaryl éthers portant une fonction aldéhyde ont donc été synthétisés dans le but de les utiliser comme fragments lors de la DCX. Les voies de synthèse de ces diaryl éthers sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

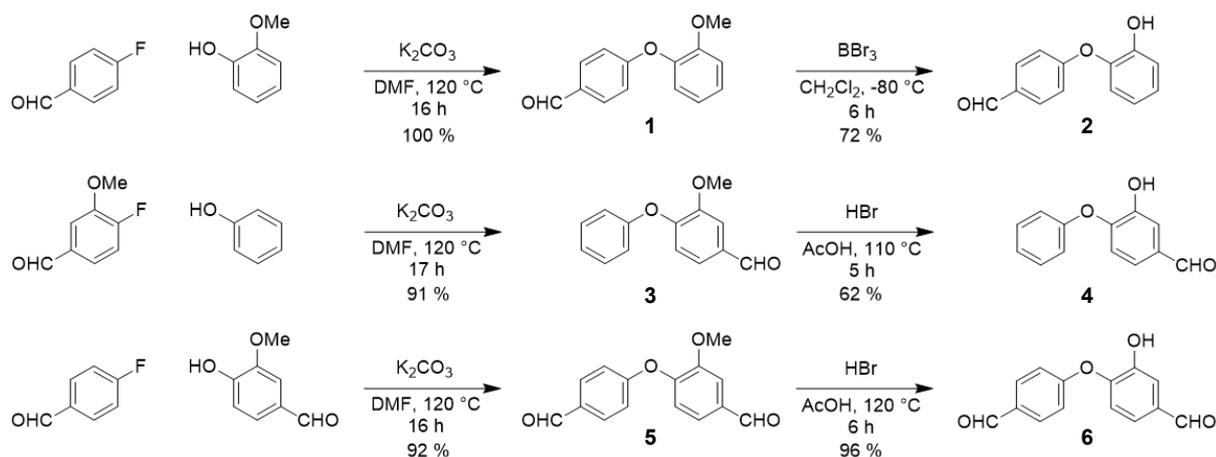


Schéma 2 : Synthèse des diaryl éthers 2, 4 et 6.

La synthèse des diaryl éthers **2**, **4** et **6** est réalisée en deux étapes (Schéma 2). Dans les trois cas, la première étape correspond à la condensation par une réaction de substitution aromatique nucléophile du 4-fluorobenzaldéhyde par un phénol, tous deux substitués ou non, dans de très bons rendements. La déprotection du *O*-méthyle aromatique des intermédiaires **1**, **3** et **5**, avec le tribromure de bore (BBr_3) ou l'acide acétique et l'acide bromhydrique, donne les diaryl éthers souhaités dans des rendements allant de 62 à 96 %.

L'ajout de groupements alkyles et de triazoles sur le diaryl éther stabilise davantage la molécule dans le site de liaison du substrat de InhA, en apportant des interactions hydrophobes supplémentaires^{107,111}. Ces diaryl éthers, qui seront utilisés comme fragments, ont également été synthétisés comme illustré dans les Schéma 3 (composé **11**) et Schéma 4 (composé **17**).

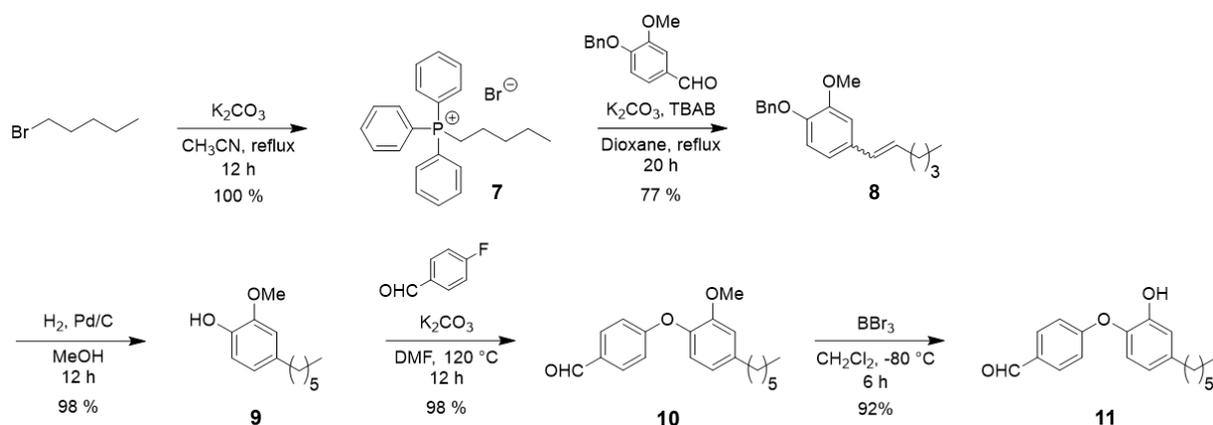


Schéma 3 : Synthèse du diaryl éther 11.

La synthèse du diaryl éther **11**, portant une chaîne alkyle, est réalisée en 5 étapes. Le bromure de (1-pentyl)triphénylphosphonium, une fois généré, est engagé dans une réaction de Wittig avec la vanilline *O*-benzylée. Cette condensation est suivie d'une hydrogénation catalytique afin de réduire la double liaison et retirer le groupement benzyle. L'intermédiaire **9** obtenu est ensuite engagé dans une substitution aromatique nucléophile du 4-fluorobenzaldéhyde pour donner le diaryl éther **10** dans un rendement excellent. La déprotection de ce dernier avec BBr_3 aboutit à l'obtention du composé désiré, avec un rendement global de 68 % à l'issue des 5 étapes.

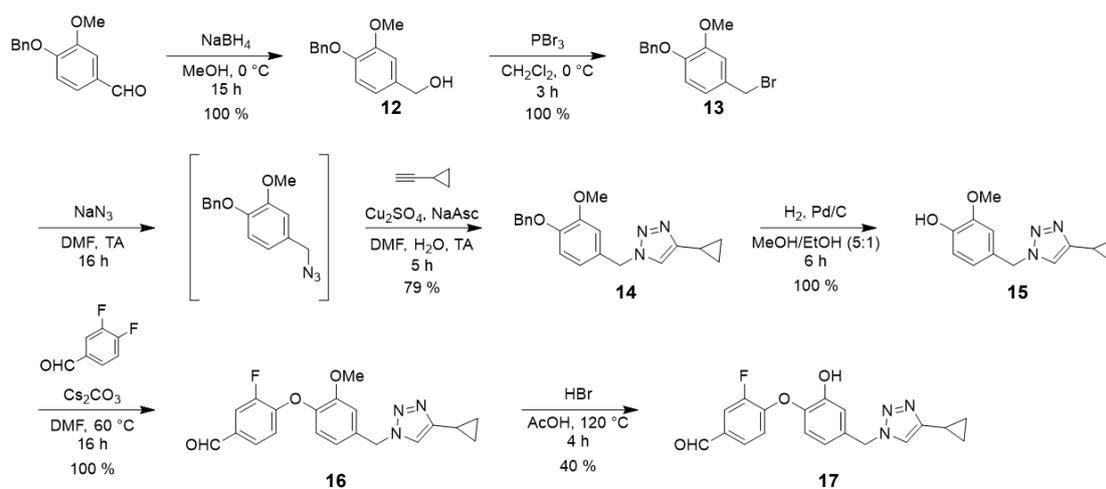


Schéma 4 : Synthèse du diaryl éther 17.

La synthèse du diaryl éther **17** comportant le triazole est réalisée en 6 étapes. Cette synthèse a pour point de départ la réduction de la vanilline *O*-benzylée au borohydrure de sodium (NaBH_4). Elle est suivie par la bromation de l'alcool au tribromure de phosphore (PBr_3) puis

de la formation de l'azoture par substitution nucléophile avec l'azoture de sodium (NaN_3). L'azoture ainsi formé est utilisé lors de la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre(I) généré *in situ* pour former sélectivement le triazole **14**. L'hydrogénation catalytique suivie de la substitution aromatique nucléophile par le 3,4-difluorobenzaldéhyde donne le diaryl éther **16**. Enfin, la déprotection du groupement *O*-méthyle avec l'acide acétique et l'acide bromhydrique aboutit au diaryl éther **17** souhaité.

Lors de la synthèse de ces fragments diaryl éthers, les étapes de déprotection des groupements *O*-méthyle, que ce soit par l'utilisation du BBr_3 ou bien d'acide acétique/acide bromhydrique ont été optimisées pour chaque composé. Malgré tout, des rendements très disparates peuvent être observés lors de la déprotection d'un même produit.

1.3. Fragments amines, hydrazines et hydrazides

a. Fragments commerciaux

Afin de cribler une grande diversité de fragments, des molécules commerciales comportant des fonctions complémentaires (amine, hydrazine et hydrazide) seront utilisées. Les assemblages étant en partie guidés par le positionnement du diaryl éther, cela permettra d'explorer les portails mineur et majeur d'InhA qui ont été peu exploités jusqu'alors. Les différents fragments utilisés lors de ce projet sont montrés sur la Figure 45.

b. Synthèse du fragment diaryl éther comportant une fonction amine

En parallèle des diaryl éthers portant une fonction aldéhyde, un diaryl éther présentant une fonction amine a été synthétisé dans le but d'utiliser ce dernier en tant que fragment lors des expériences de DCX (Schéma 5).

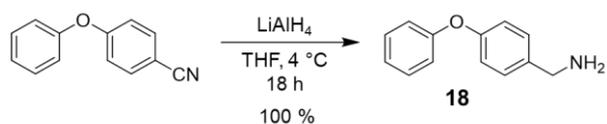


Schéma 5 : Synthèse du diaryl éther aminé **18**.

La synthèse de ce dernier est réalisée en une seule étape à partir du 4-phénoxybenzonnitrile *via* une réduction avec du tétrahydroaluminat de lithium (LiAlH_4) pour générer le diaryl éther **18** avec un rendement quantitatif.

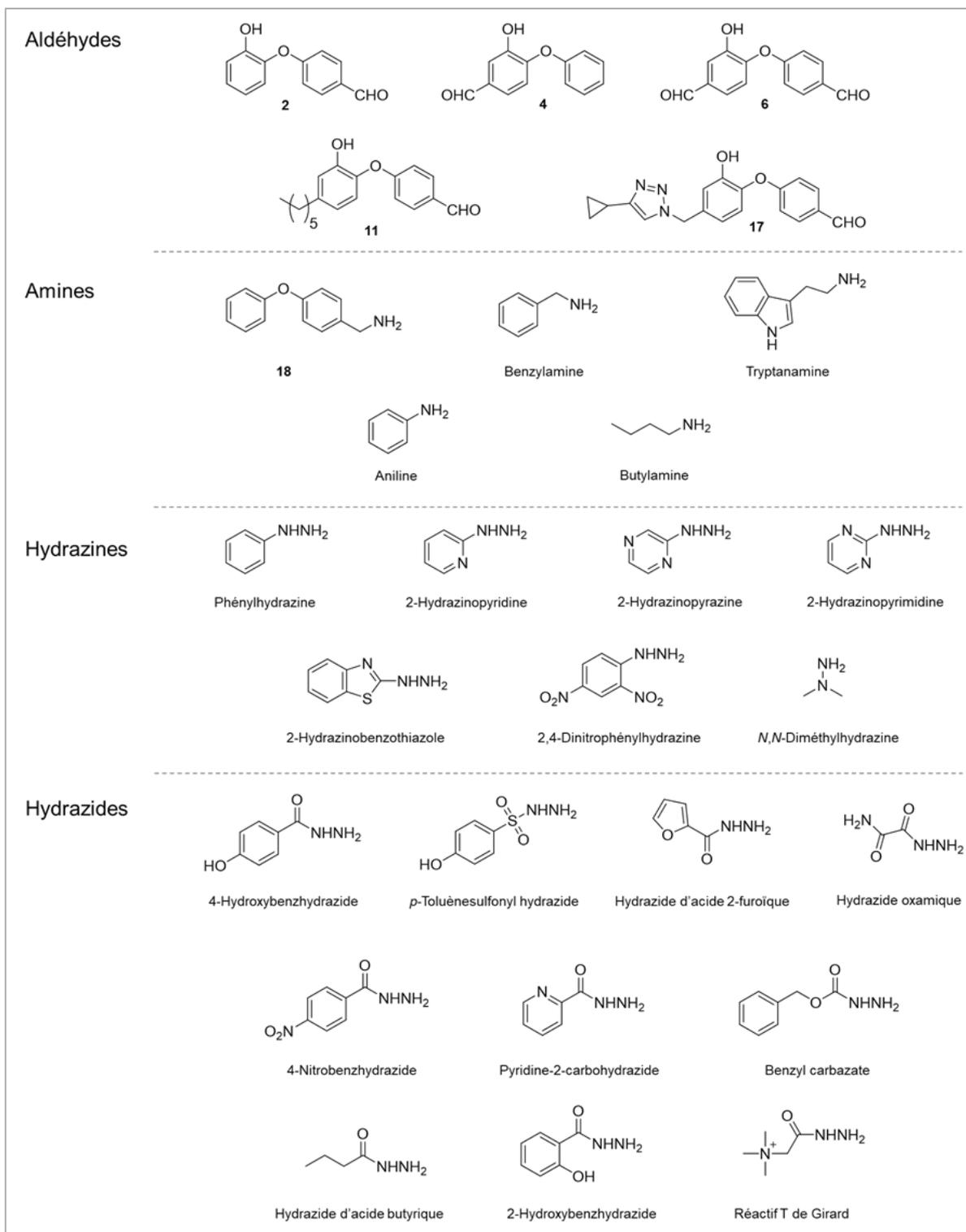


Figure 45 : Les différents fragments aldéhydes, amines, hydrazines et hydrazides utilisés lors du criblage DCX appliqué à InhA.

2. Criblage par DCX

L'application de la DCX nécessite la cristallisation de la protéine InhA. De ce fait, une vaste campagne de mise au point des conditions de cristallisation a été réalisée en présence ou non de ligands.

2.1. Cristallisation de la protéine InhA

Durant cette campagne, plus de 250 cristaux de la protéine InhA obtenus par co-cristallisation et/ou trempage ont été soumis à des expériences de diffraction des rayons X sur différents synchrotrons. Lors de celles-ci, il a été constaté, au travers de multiples ligands, que la méthode de trempage des cristaux de InhA ne semblait pas propice à la formation de complexes. Au vu de ces constatations, l'incubation d'InhA avec les différents fragments a été réalisée durant l'étape de cristallisation de la protéine dans le but d'optimiser les chances d'observer des adduits. De ce fait, les conditions de co-cristallisation de ligands avec la protéine InhA ont été optimisées. Lors de ces optimisations, plusieurs facteurs tels que la solution tampon de réservoir, l'agent précipitant, la température, la concentration en protéine, la nature et la concentration du cofacteur (NAD⁺ ou NADH) ont été étudiés.

La condition optimale, pour ce qui est de la taille des cristaux et la qualité de diffraction s'est avérée une solution contenant du polyéthylène glycol 4000 à 14 % (m/v final) comme agent de précipitation dans une solution tampon à 100 mM d'acétate d'ammonium, 100 mM d'acide *N*-(2-acétamido)iminodiacétique, 5 % (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO), pH 6.8. Sauf indication par ailleurs, cette condition de co-cristallisation a été utilisée pour l'ensemble des projets de cette thèse. Lors de cette étape, un volume de 200 nL de solution de cristallisation est ajouté à 200 nL de protéine InhA en solution tampon 30 mM acide pipérazine-*N,N'*-bis(2-éthanesulfonique) (PIPES), 150 mM NaCl, pH 6.8. La concentration en InhA est également importante lors de la cristallisation. Deux concentrations en protéine, 4 et 8 mg/mL donnent les meilleurs résultats.

Les diaryl éthers se fixent dans le site actif d'InhA en interagissant avec le cofacteur par des interactions de type empilement π . Cependant, cet empilement est limité avec le cofacteur réduit (NADH) du fait de la présence d'un carbone tétraédrique (sp³) sur le cycle nicotinamide, provoquant des gênes stériques. L'utilisation du cofacteur oxydé NAD⁺, ne présentant pas de carbone tétraédrique sur le cycle nicotinamide, favorise l'empilement π entre le cofacteur et les

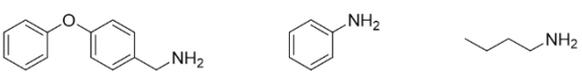
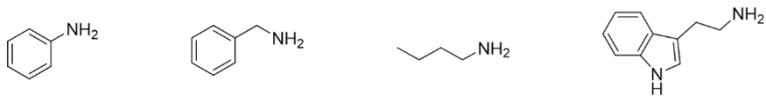
diaryl éthers ainsi que l'obtention de complexes. Durant les étapes de co-cristallisation, le NAD^+ est utilisé à une concentration 10 fois supérieure à celle de la protéine.

Dès lors que la méthode de co-cristallisation a été mise au point, des essais de DCX couplés à cette étape ont été entrepris en incubant diverses solutions contenant un diaryl éther aldéhydique en mélange avec des amines, des hydrazines et/ou des hydrazides. Les fragments diaryl éthers ainsi que les molécules possédant une fonction complémentaire (amine, hydrazine ou hydrazide) ont systématiquement été utilisés dans des concentrations supérieure à celle de la protéine InhA.

2.2. Formation d'imines

Dans un premier temps, le criblage par DCX s'est porté sur la formation d'imines. Dans le cadre de la DCC, les fonctions imines sont connues pour leur instabilité, en particulier lors de l'étape d'analyse¹⁴⁰. Pour pallier ces problèmes d'instabilité, les imines sont en général réduites en amines avant d'être analysées par HPLC, introduisant un biais supplémentaire dans l'interprétation des résultats. Néanmoins, la possibilité de visualiser les imines directement dans le site actif par cristallographie aux rayons X pourrait contourner ces problèmes. De ce fait, plusieurs essais de DCX ont été réalisés en présence des aldéhydes et plusieurs fragments amines, dont certains sont montrés sur le Tableau 2.

Tableau 2 : Criblage de fragments pour la formation d'imines.

Condition	Aldéhyde	Fragments amines
A4	4	
A11	11	
B4	4	
B11	11	

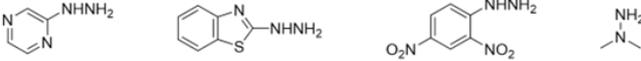
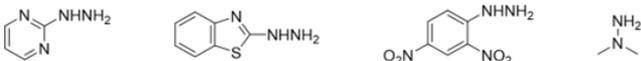
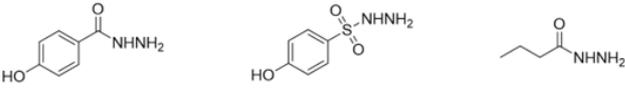
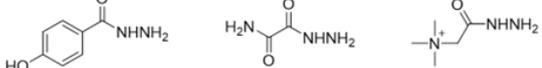
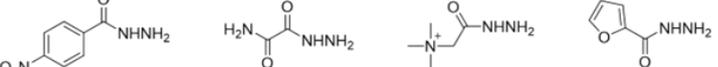
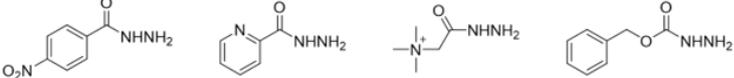
Les incubations ont été faites avec 0.14 mM d'InhA, 1.4 mM de NAD^+ et 1.25 mM de fragments avant ajout de la solution de cristallisation.

Cependant, aucune des conditions de DCX avec des fragments amines n'a donné lieu à l'obtention de cristaux de protéine. L'observation des gouttes de cristallisation a révélé la présence de précipités non cristallins, traduisant une possible agrégation de la protéine.

2.3. Formation d'hydrazones et d'acylhydrazones

Parallèlement, des criblages en présence d'hydrazines et d'hydrazides ont été menés dans l'optique de former des hydrazones et des acylhydrazones, qui présentent une bien meilleure stabilité que les imines^{141,142}. Dans le cadre de la DCC, les faibles vitesses de formation d'hydrazones et d'acylhydrazones à des pH proches du pH physiologique sont contrebalancées par l'utilisation d'activateurs¹⁴³. Ainsi, ces criblages ont été réalisés en présence et en absence d'acide 3,5-diaminobenzoïque comme activateur. Plusieurs conditions ont donné lieu à l'obtention de cristaux de protéine, principalement pour les conditions comportant les aldéhydes **11** et **17** (Tableau 3). Ces cristaux commencent à se former après une durée de 48 h à 20 °C. Dans le cas des aldéhydes **2**, **4** et **6**, aucune condition de DCX n'a conduit à l'obtention de cristaux.

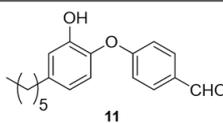
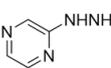
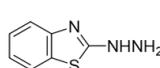
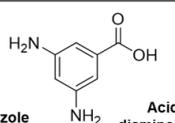
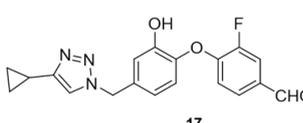
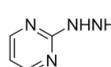
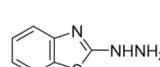
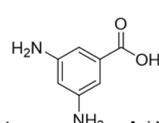
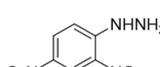
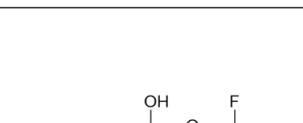
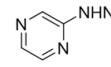
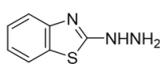
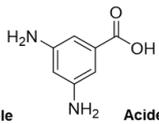
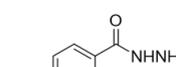
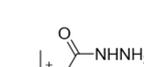
Tableau 3 : Criblages de fragments pour la formation d'hydrazones et d'acylhydrazones.

Condition	Aldéhyde	Fragments hydrazines et/ou hydrazides
C11	11	
C17	17	
D11	11	
D17	17	
E11	11	
E17	17	
F4	4	
F17	17	
G11	11	
G17	17	
H11	11	
H17	17	
I11	11	
I17	17	
J11	11	
J17	17	

Concentrations utilisées : InhA: 0.14 mM ; NAD⁺ : 1.4 mM ; aldéhydes : 1.4 mM ; hydrazines et hydrazides : 5 mM. Chaque condition a été réalisée avec et sans ajout d'activateur (10 mM final).

La diffraction aux rayons X des cristaux obtenus et la résolution des structures correspondantes ont mis en évidence la présence d'adduits formés à partir des fragments pour les conditions C11, E17 et J17 supplémentées en activateur (Tableau 4). Dans certains cas, des cristaux ont pu être obtenus en l'absence d'activateur. Cependant, aucune densité correspondant à la formation d'adduit n'a été observée, appuyant la nécessité de ce dernier dans le but de former les adduits.

Tableau 4 : Mélanges ayant donné des adduits en complexe avec la protéine InhA.

Condition	Fragments
C11	 11  2-Hydrazinopyrazine  2-Hydrazinobenzothiazole  Acide 3,5-diaminobenzoïque
E17	 17  2-Hydrazinopyrimidine  2-Hydrazinobenzothiazole  Acide 3,5-diaminobenzoïque  2,4-Dinitrophénylhydrazine  Diméthylhydrazine
J17	 17  2-Hydrazinopyrazine  2-Hydrazinobenzothiazole  Acide 3,5-diaminobenzoïque  4-Hydroxybenzhydrazide  Réactif T de Girard

Concentrations utilisées : InhA: 0.14 mM ; NAD⁺ : 1.4 mM ; aldéhydes : 1.4 mM ; hydrazines et hydrazides : 5 mM. Chaque condition a été réalisée avec et sans ajout de « catalyseur » (10 mM final).

a. Adduit formé avec l'aldéhyde 11

Dans le cadre du criblage avec le diaryl éther **11** présentant une chaîne alkyle, une structure cristallographique à 2.1 Å de résolution a été obtenue dans la condition C11 en présence d'activateur. Dans cette structure dont le groupe d'espace est *I4₁22* comportant un seul protomère d'InhA par unité asymétrique, une densité correspondant à la formation d'un adduit est observée. La modélisation des adduits possibles dans cette densité permet de les discriminer et d'identifier l'adduit formé avec la 2-hydrazinopyrazine (Figure 46A). La densité observée est trop petite et ne peut accueillir ni la benzothiazole (Figure 46B), ni l'acide 3,5-diaminobenzoïque.

Le produit d'assemblage se place dans le site d'InhA au-dessus du cofacteur NAD⁺ avec la chaîne alkyle orientée vers le fond du site actif, comme attendu (Figure 46C). Dans cette conformation, le groupement hydroxyle du motif diaryl éther forme des liaisons hydrogène avec la Tyr158 et le cofacteur NAD⁺. Le groupement pyrazine est stabilisé au niveau du portail

majeur par l'intervention de trois liaisons hydrogène ainsi que des interactions de van der Waals. Deux de ces liaisons hydrogène sont établies entre la fonction hydrazone et la chaîne principale du résidu Met98, résidu déjà décrit dans la littérature comme pouvant former des liaisons hydrogène dans le cas de diaryl éther portant un groupement pyridone¹⁴⁴. Une molécule d'eau vient stabiliser la position de la pyrazine en formant une troisième liaison hydrogène avec cette dernière et la chaîne principale du résidu Gly96. Ce résidu ainsi que le résidu Phe97 interagissent également avec la partie pyrazine de l'adduit par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Plusieurs autres interactions hydrophobes sont également impliquées dans la stabilisation de l'adduit dans le site actif, impliquant les résidus Met103, Ala198, Met199 et Ile198 dans la zone du portail majeur ainsi que les résidus Phe149, Tyr158, Met161 et Leu218 dans le fond du site actif. Ces différents résidus et les interactions associées sont déjà cités dans la littérature, notamment pour les dérivés de diaryl éther^{107,109,144}.

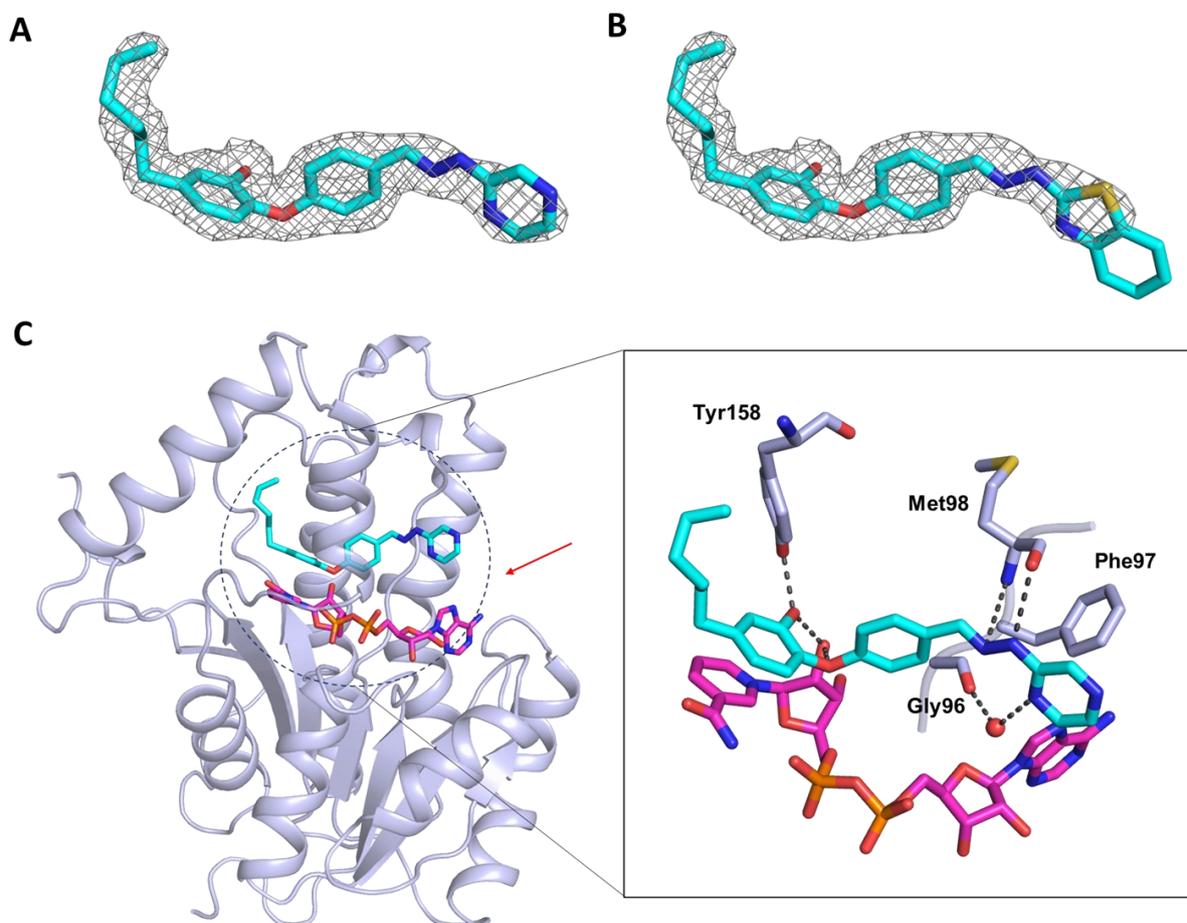


Figure 46 : Structure d'InhA obtenue par DCX à partir de l'aldéhyde 11. A) Modélisation de l'adduit formé avec l'aldéhyde 11 et le 2-hydrazinopyrazine dans la carte 2Fo-Fc, affichée à un contourage de 1 σ . B) Modélisation de l'adduit formé avec le 2-hydrazinobenzothiazole dans cette même densité. C) Structure d'InhA obtenue avec le complexe NAD⁺-adduit. Le cofacteur NAD⁺ est représenté en magenta et la molécule issue de l'assemblage de l'aldéhyde 11 avec la 2-hydrazinopyrazine en cyan. La flèche rouge indique le portail majeur. La molécule d'eau est représentée par une sphère rouge et les liaisons hydrogène par des traits pointillés noirs.

b. Adduits formés avec l'aldéhyde 17

L'emploi de l'aldéhyde 17 comme fragment lors des essais de DCX a également permis de visualiser des adduits formés dans les conditions E17 et J17 en présence d'activateur (Tableau 4). La modélisation des adduits possibles dans les densités électroniques observées pour les jeux de données correspondants montre que dans le cas de la condition E17, l'adduit est formé avec la 2-hydrizinopyrimidine et dans la condition J17, avec la 2-hydrizinopyrazine (Figure 47).

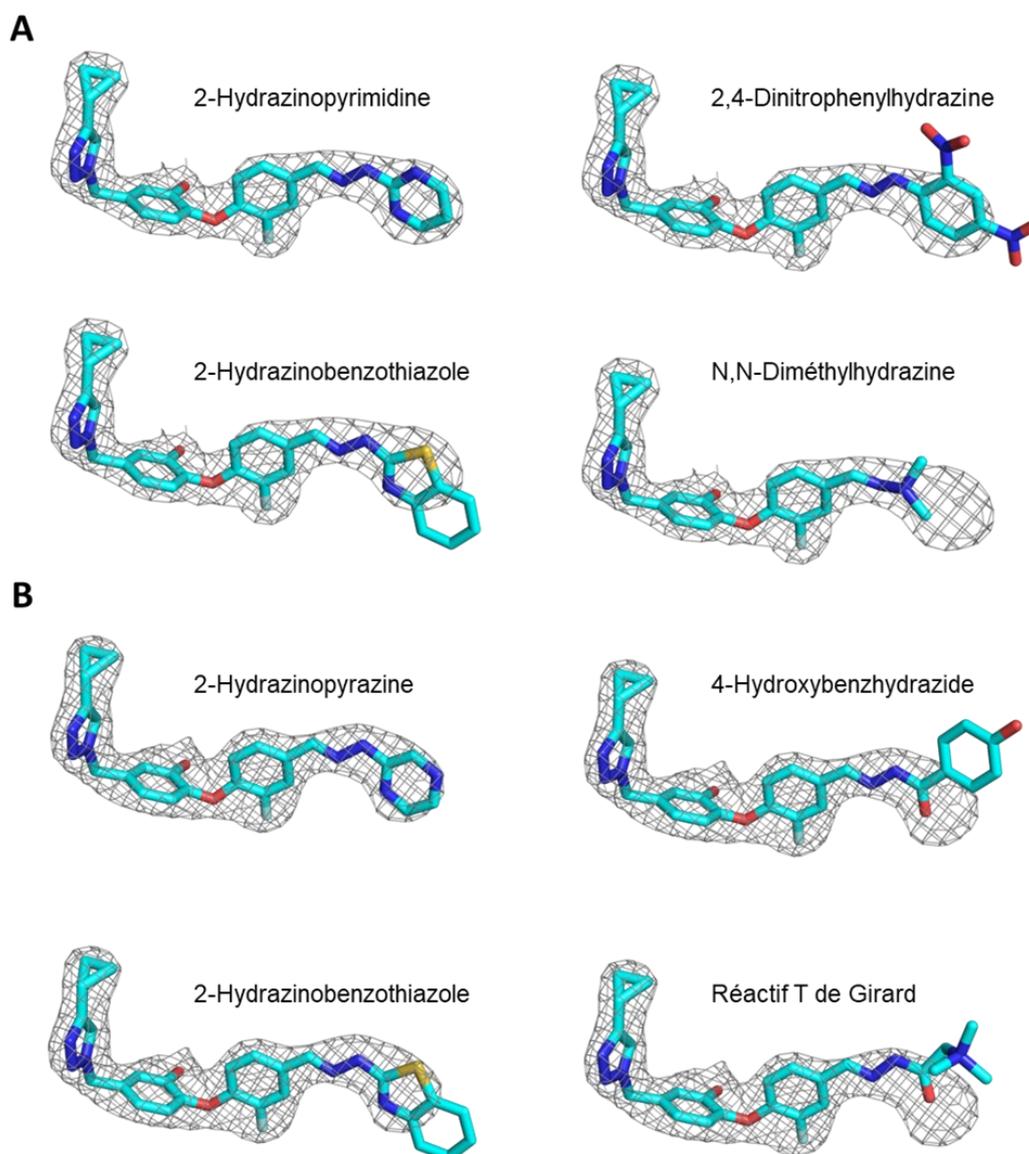


Figure 47 : Modélisation des différents adduits dans les cartes de densité électronique. A) Modélisation des adduits possibles avec la 2-hydrizinopyrimidine, la 2,4-dinitrophénylhydrazine, la 2-hydrizinobenzothiazole et la diméthylhydrazine dans la carte de densité électronique correspondant au ligand dans la condition E17 en présence de catalyseur. B) Modélisation des adduits possibles avec la 2-hydrizinopyrazine, la 4-hydroxybenzhydrazide, la 2-hydrizinobenzothiazole et le réactif de Girard dans la condition J17. Les cartes 2Fo-Fc sont colorées en gris avec un niveau de contourage de 1σ .

Ainsi, deux structures dans le groupe d'espace $I4_122$ ont été obtenues à 2.3 Å de résolution pour ces conditions dans lesquelles les adduits se fixent dans le site actif de la même manière que tous les diaryl éthers (Figure 48). De cette façon, la partie triazole de ces molécules se retrouve dans le fond du site actif. L'azote en position 3 de ces triazoles forme une liaison hydrogène avec le résidu Glu219 présent sur l'hélice H7, une interaction déjà observée auparavant dans la littérature pour les triazole-diaryl éthers¹¹¹. Comme observé avec l'adduit formé dans la condition C11, la fonction hydrazone de ces deux nouveaux adduits intervient également dans la formation de liaisons hydrogène avec le résidu Met98. Enfin, plusieurs interactions de van der Waals entre le diaryl éther ont également lieu par l'intermédiaire des mêmes résidus observés pour l'adduit formé dans la condition C11, y compris dans la région du portail majeur avec les résidus Gly96 et Phe97.

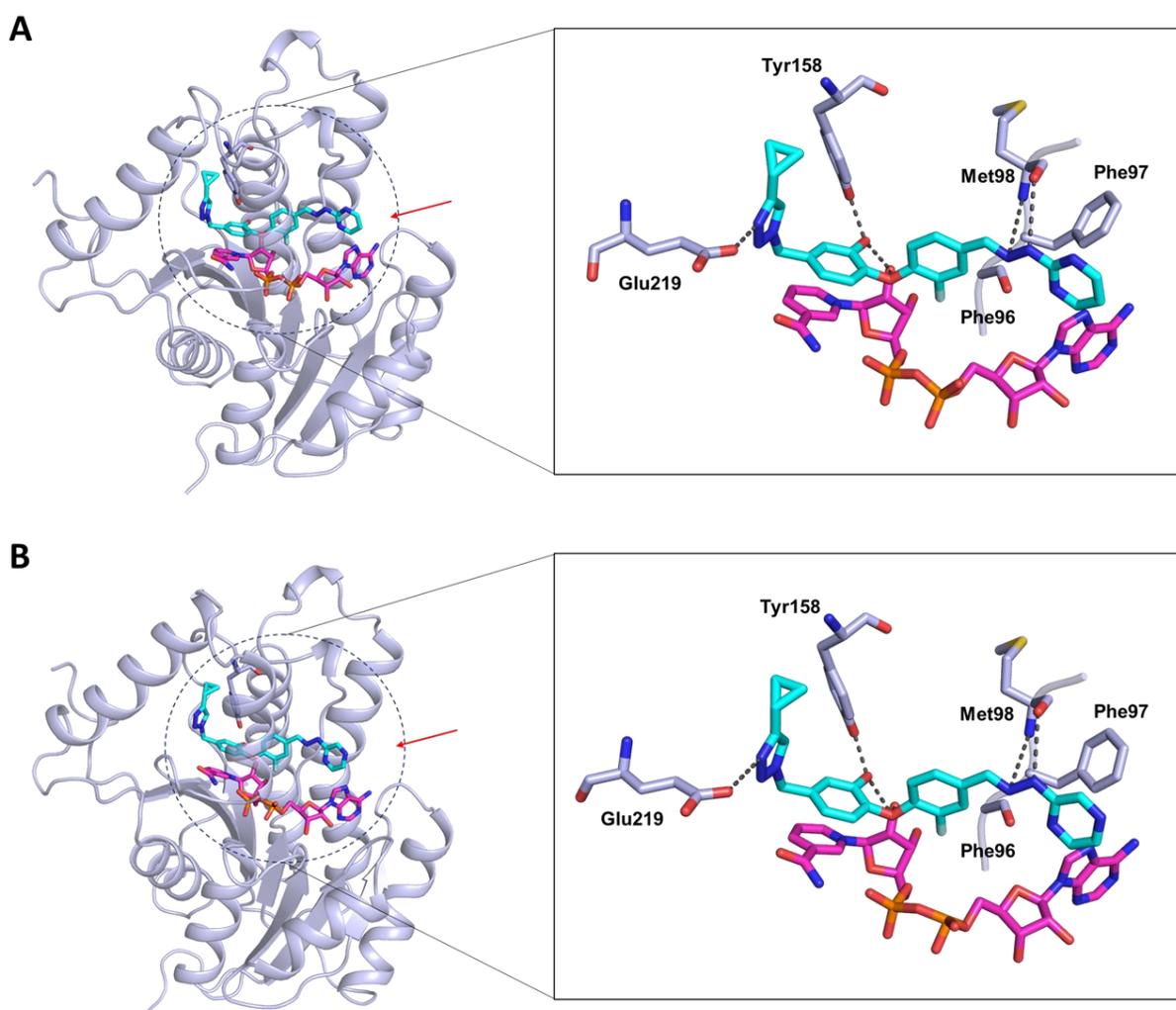


Figure 48 : Structures cristallographiques des complexes d'InhA obtenues par DCX avec l'aldéhyde 17. A) Structure obtenue dans la condition E17. B) Structure obtenue dans la condition J17. Dans ces deux structures, le cofacteur NAD⁺ est représenté en magenta et les adduits en cyan. La flèche rouge indique le portail majeur. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits pointillés noirs.

Les trois structures obtenues à la suite des expériences de DCX se superposent parfaitement, avec un rmsd (*root-mean-square deviation*) moyen compris entre 0.15 à 0.30 Å pour les atomes de carbone $C\alpha$, et révèlent une position identique pour les adduits (Figure 49). En effet, ces derniers se fixent dans le site actif d’InhA par l’intermédiaire des mêmes interactions. La chaîne alkyle de l’adduit formé avec l’aldéhyde **11** ainsi que les parties triazole-alkyles des deux adduits formés à partir de l’aldéhyde **17** occupent la même zone, proche du portail mineur. Une légère différence est observée dans le cas du résidu Glu219, résidu impliqué dans une liaison hydrogène avec un atome d’azote du triazole. Cet acide glutamique se retrouve légèrement plus proche des adduits dans le cas des structures issues de DCX en présence de l’aldéhyde **17**.

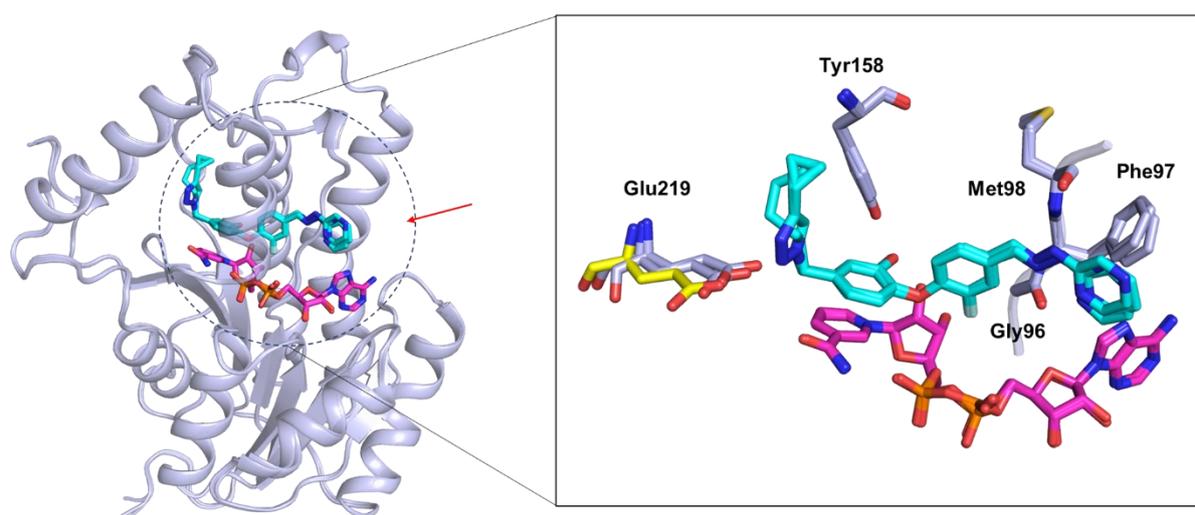


Figure 49 : Superposition des trois structures obtenues par DCX. Les adduits sont représentés en cyan, le NAD^+ en magenta. Le résidu Glu219 de la structure cristallographique obtenue dans la condition C11, est représenté en jaune. La flèche rouge indique le portail majeur.

Pour ces trois conditions, plusieurs expériences de DCX ont conduit à la formation de cristaux de protéine. La diffraction aux rayons X de ces cristaux a conduit systématiquement à l’observation de densités correspondant aux adduits observés pour chacune des trois conditions de DCX, illustrant ainsi la reproductibilité de la DCX.

c. Comparaison avec les structures des fragments aldéhydiques

Des expériences de co-cristallisation d’InhA en présence du cofacteur NAD^+ et des différents aldéhydes ont également été menées. Ainsi, des structures à 1.6 et 1.9 Å de résolution ont respectivement été résolues dans le groupe d’espace $C2$ pour InhA en complexe avec le

NAD⁺ et les aldéhydes **11** et **17**. Dans l'unité asymétrique de ces structures, quatre protomères contenant chacun le cofacteur NAD⁺ ainsi que l'aldéhyde correspondant s'organisent en tétramère. La superposition des différents protomères pour chaque structure révèle des différences dans la région de la boucle de fixation de substrat (*Substrate binding loop*, SBL) formée par les hélices H6 et H7 d'InhA (Figure 50).

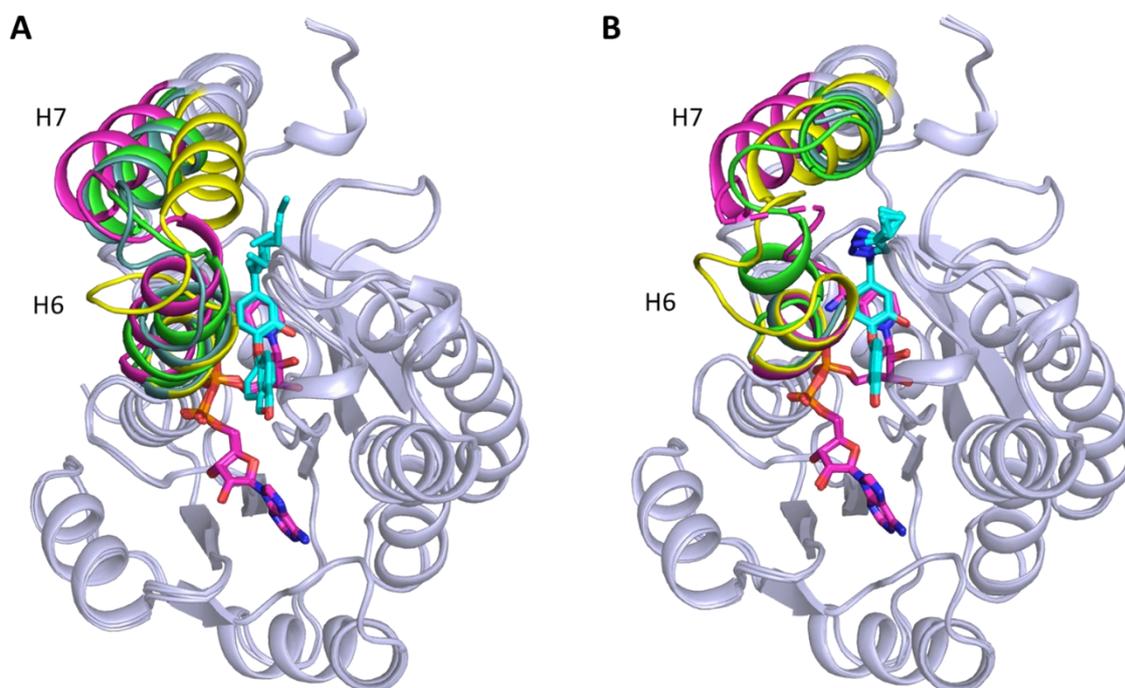


Figure 50 : Superposition des protomères des complexes InhA-NAD⁺-aldéhyde. A) Superposition des protomères issus de la structure en complexe avec l'aldéhyde **11**. B) Superposition des protomères de la structure en complexe avec l'aldéhyde **17**. Les cofacteurs NAD⁺ sont représentés en magenta et les aldéhydes **11** et **17** en cyan. Pour chaque structure, les SBL de chaque protomère sont colorées différemment (jaune, vert, turquoise et violet).

En effet, ces deux hélices présentent une variabilité considérable à travers les différents protomères. La conformation des hélices H6 et H7 d'InhA influence l'état d'ouverture des portails majeur et mineur. Un rapprochement de ces hélices vers le centre de la protéine est souvent indicatif d'un état fermé des portails majeurs et mineurs. Malgré une disparité conformationnelle des hélices H6, les portails majeurs de ces structures sont similaires (Figure 51A et B). Une différence notable est observée concernant le portail mineur (Figure 51C et D). Des variations aussi bien entre les deux structures qu'entre protomères au sein d'une même structure concernant le portail mineur sont observées. L'origine de ces variations, observées dans de nombreuses structures d'InhA déposées dans la PDB, et qui témoigne de la dynamique de la SBL, n'a pas encore été élucidée. Ainsi, en présence de l'aldéhyde **11**, le portail mineur est dans un état légèrement plus ouvert par rapport à la structure en complexe avec l'aldéhyde **17**.

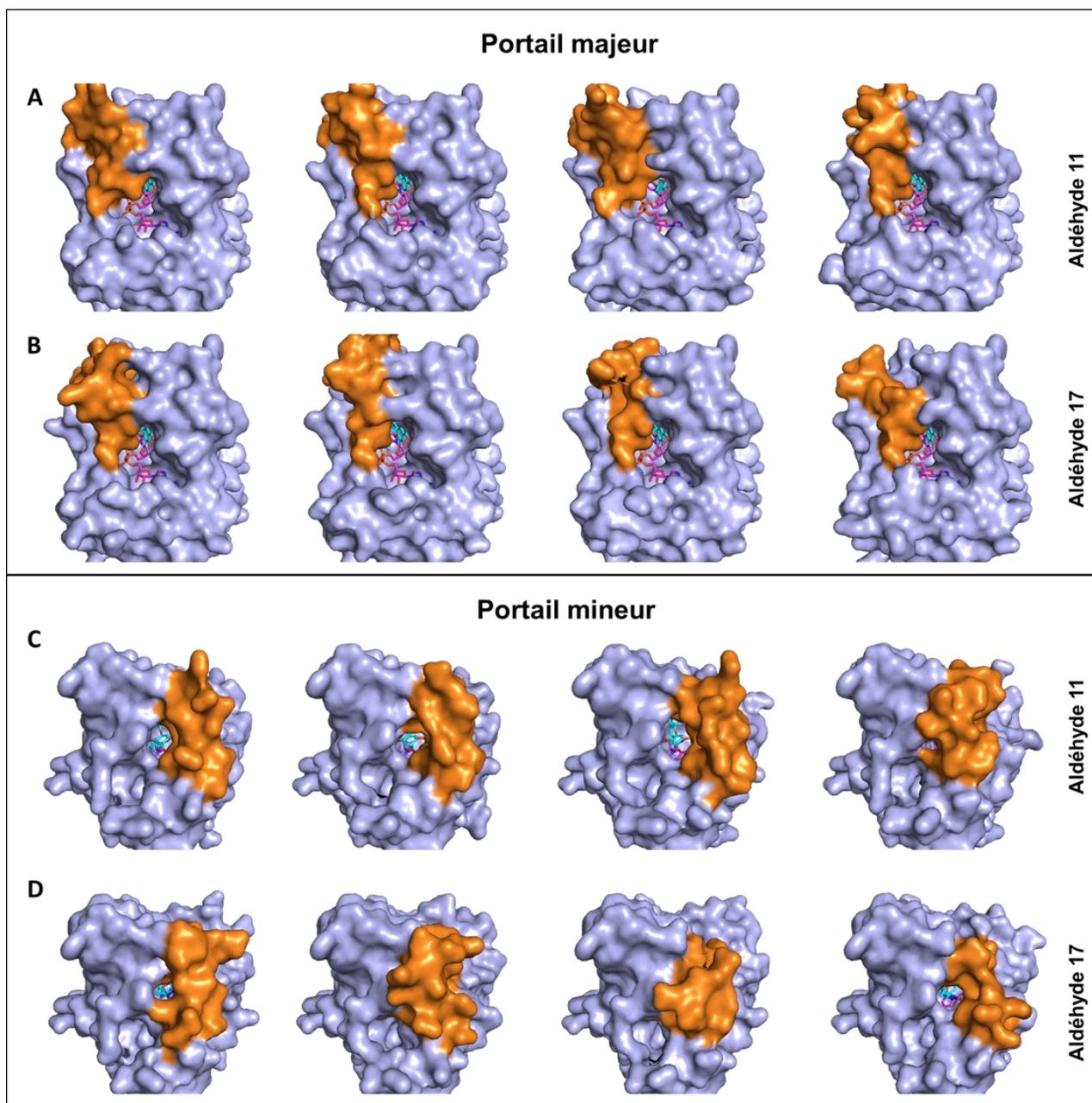


Figure 51 : Etat d'ouverture des portails majeur et mineur. En A et B, vue les portails majeurs de chacun des 4 protomères des structures en complexe avec les aldéhydes **11** (A) et **17** (B). En C et D, vues sur les portails mineurs de chacun des protomères des structures en complexe avec les composés **11** (C) et **117** (D). Dans ces structures, dont la surface moléculaire est représentée, la SBL est colorée en orange. Le NAD^+ et les aldéhydes sont respectivement colorés en magenta et en cyan.

Dans la structure d'InhA en complexe avec l'aldéhyde **11**, le ligand lui-même montre plusieurs conformations. En effet, malgré une position localisée dans la poche de fixation du substrat, des différences sont observées pour la partie alkyle ainsi que pour le cycle B portant la fonction aldéhyde. La chaîne alkyle n'étant stabilisée que par des interactions hydrophobes impliquant les résidus Phe149, Pro156, Tyr158, Ile202, Val203, Ile215 et Leu218 dans la zone du portail mineur, celle-ci présente un degré de flexibilité conséquent (Figure 52A). Le cycle B du diaryl

éther **11** présente deux conformations : une première qui présente un angle d'environ 90° par rapport au cycle A, avec la fonction aldéhyde pointant en direction du cofacteur et qui est retrouvée dans 3 des 4 protomères ainsi qu'une deuxième conformation, retrouvée dans un seul des protomères, affichant un angle d'environ 65°. La position des atomes d'oxygène des fonctions aldéhydes est toutefois conservée dans ces deux conformations, laissant la possibilité de former une liaison hydrogène avec le résidu Met98 (Figure 52A). La comparaison des structures avant et après DCX avec ces deux aldéhydes révèle une position très conservée du motif diaryl éther (Figure 52B).

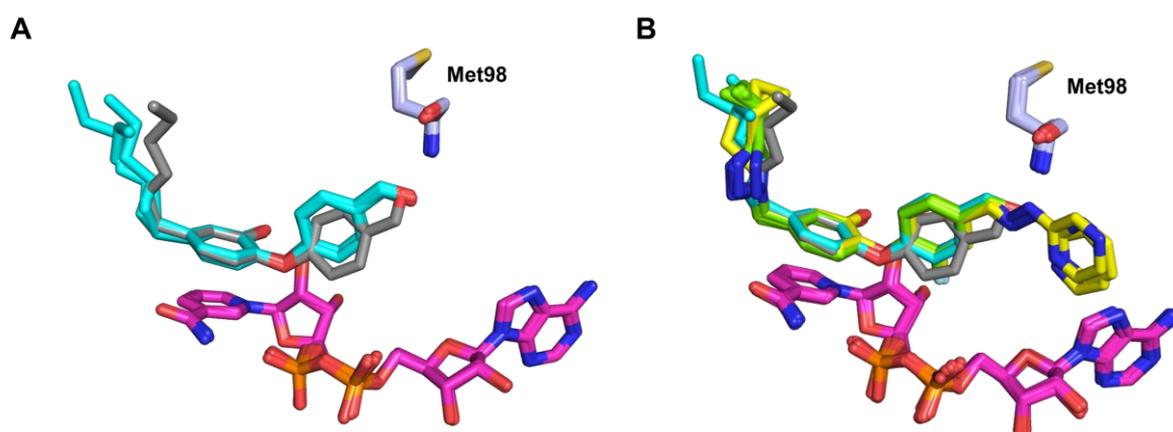


Figure 52 : Superposition des conformations du diaryl éther 11 de chaque monomère (A) et des différents diaryl éthers avant et après DCX (B). Les molécules de NAD⁺ sont colorées en magenta. Les diaryl éthers 11 et 17 sont représentés en cyan et en vert. Le diaryl éther 11 dont la fonction aldéhyde pointe à l'opposé du NAD⁺ est coloré en gris. Les adduits obtenus par DCX sont représentés en jaunes.

d. Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA

Dans l'objectif de déterminer les effets de l'incorporation du groupement hydrazone, les activités inhibitrices des diaryl éthers avant et après DCX ont été déterminées. Pour cela, les adduits formés dans les conditions C11, E17 et J17 ont été synthétisés par condensation de l'aldéhyde et de l'hydrazine correspondant (Schéma 6). Cette étape est réalisée à température ambiante et dans un milieu légèrement acide.

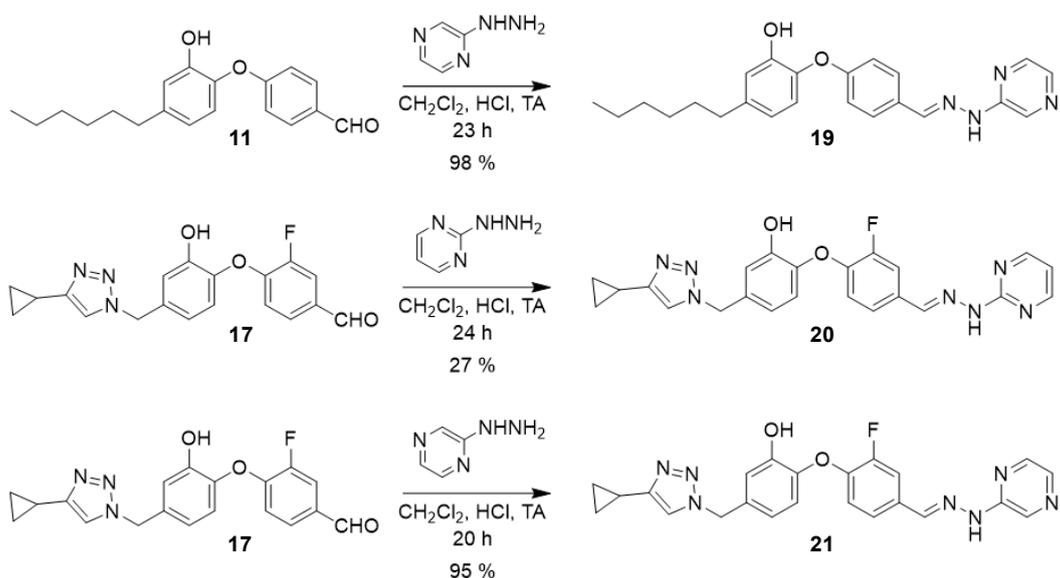
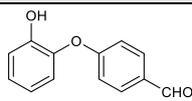
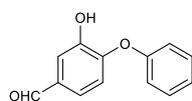
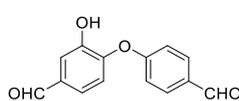
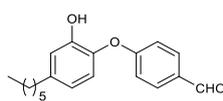
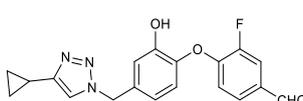
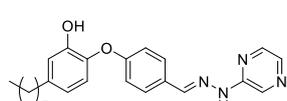
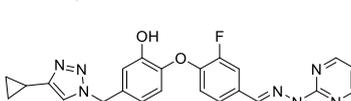
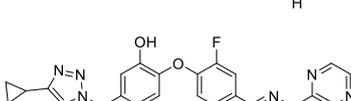


Schéma 6 : Synthèse des adduits 19 (C11), 20 (E17) et 21 (J17).

Des tests d'activité enzymatique sur protéine ont été menés en présence des différents aldéhydes et adduits synthétisés, du substrat dodécényl-CoA (DDCoA) et du cofacteur NADH. La cinétique d'oxydation du NADH est suivie à 340 nm par spectroscopie UV. Les activités inhibitrices des différents composés sont indiquées dans le Tableau 5. Parmi les aldéhydes, les composés **11** et **17** présentent une bonne IC_{50} , en particulier l'aldéhyde **11**. Ce dernier affiche une valeur d' IC_{50} de 26 nM, en accord avec ce qui est reporté dans la littérature dans le cas des diaryl éthers alkylés¹⁰⁷. L'aldéhyde **17**, possédant un triazole, présente une IC_{50} moins bonne (2,30 μ M). Les aldéhydes **2**, **4** et **6**, quant à eux, se montrent très peu actifs contre InhA, avec respectivement seulement 39, 21, et 40 % d'inhibition de l'activité d'InhA à 50 μ M de ligand.

La formation de l'adduit **19**, dans la condition C11 à partir de l'aldéhyde **11**, conduit à une détérioration considérable de l' IC_{50} (1,26 μ M), soit un facteur 50 d'écart avec la valeur obtenue pour l'aldéhyde **11** (26 nM). Dans le cas des adduits formés avec l'aldéhyde **17**, les IC_{50} adduits ainsi que de l'aldéhyde sont du même ordre de grandeur.

Tableau 5 : Activités inhibitrices des diaryl éthers synthétisés contre la protéine InhA.

Composé	Structure	IC ₅₀ (μM)
2		39 % ^a
4		21 % ^a
6		40 % ^a
11		0,026 ± 0,001
17		2,30 ± 0,12
19		1,26 ± 0,16
20		46 % ^b
21		2,69 ± 0,28

^a % d'inhibition à 50 μM en composé. ^b % d'inhibition à 2 μM en composé

Ainsi, au travers de ces tests d'activité, il apparaît que malgré plusieurs interactions supplémentaires par rapport aux fragments aldéhydes **11** et **17**, notamment une liaison hydrogène avec le résidu Met98 ainsi que des interactions de van der Waals avec les résidus Gly96 et Phe97, les adduits issus de la DCX ne conduisent pas à une amélioration de l'activité inhibitrice.

Lors de la chimie combinatoire dynamique guidée par une cible protéique les adduits peuvent se former en solution ou bien au sein même de la protéine. Dans le but d'investiguer ces deux éventualités, des essais de DCX ont été réalisés en pré-incubant ou non la protéine InhA avec les fragments aldéhydes. De cette manière, les fragments aldéhyde se fixent dans un premier temps dans le site actif de la protéine, puis les différents fragments hydrazines/hydrazides pourraient attaquer le carbonyle dans le but de former l'hydrazone/acylhydrazone. Cette approche a été employée avec la condition C11, en pré-incubant ou non la protéine InhA avec l'aldéhyde pendant 1 h avant l'ajout des hydrazines. Ceci

a donné lieu à la résolution d'une structure dans le groupe d'espace $I4_122$ à 2.1 Å, possédant un seul protomère dans l'unité asymétrique. La comparaison des structures obtenues avec et sans pré-incubation a révélé, dans les deux cas, la formation de l'adduit **19** (Figure 53). Ces deux structures d'InhA en complexe avec l'adduit avec ou sans pré-incubation sont identiques.

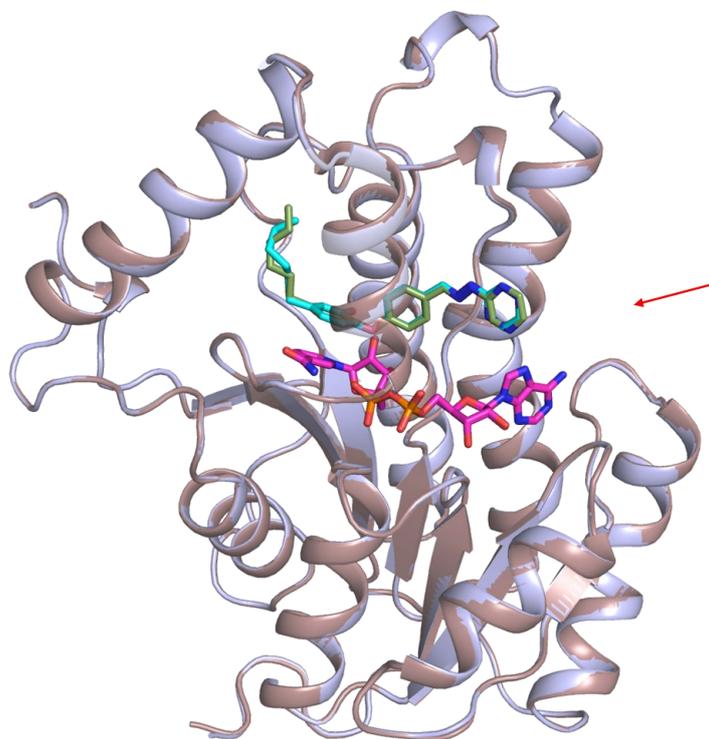


Figure 53 : Superposition des structures issues de DCX avec (en marron) et sans (en bleu) pré-incubation. Les cofacteurs NAD^+ sont représentés en magenta et les adduits sont respectivement représentés en vert et en cyan. Le portail majeur est indiqué par une flèche rouge.

Or l'aldéhyde **11** et les adduits partagent un même site de fixation (Figure 52B) et l'aldéhyde **11** présente une meilleure activité inhibitrice que l'adduit **19** d'un facteur 48 (Tableau 5). Ainsi, en partant de la considération que l' IC_{50} est liée au K_d , l'adduit **19** formé en solution pourra difficilement remplacer l'aldéhyde **11** dans ce site, l'aldéhyde présentant un meilleur IC_{50} que l'adduit. De ce fait, l'observation de l'adduit **19** en DCX après une étape de pré-incubation avec l'aldéhyde **11** suggère la possibilité de former l'adduit à l'intérieur de la protéine. Cette hypothèse est également appuyée par la localisation de l'aldéhyde à l'entrée du site actif. Le groupement carbonyle à l'entrée du site étant plus accessible, cela favorise la condensation *in situ*.

III. Conclusion

Les différents résultats obtenus montrent la possibilité d'appliquer la DCX dans le but de cartographier le site actif d'InhA. Des structures de 3 adduits formés directement au contact de la protéine à partir de fragments ont pu être obtenues, représentant ainsi la seconde application de la DCX et le premier exemple de DCX en co-cristallisation. Par comparaison avec des structures de InhA en complexe avec des fragments aldéhydiques, les adduits apportent la possibilité de former une liaison hydrogène et plusieurs interactions de van der Waals supplémentaires. Malgré ces interactions supplémentaires, les adduits formés sont de moins bons inhibiteurs d'InhA que les fragments aldéhydiques (jusqu'à un facteur 48). L'utilisation d'une plus grande bibliothèque de fragments afin d'occuper d'avantage le portail majeur de cette protéine et d'exploiter des interactions avec l'hélice H6 de la SBL pourrait aboutir, tout comme les pyrazoles mentionnés dans l'introduction, à la formation d'adduits plus efficaces contre InhA. De telles interactions pourraient être favorisées par l'utilisation de diaryl éther portant la fonction aldéhyde en position *ortho* ou *meta*, permettant la formation d'adduits pouvant interagir de l'hélice H6.

De plus, aucune condition de DCX visant à former des adduits dans le portail mineur n'a conduit à l'obtention de cristaux. Le ciblage de cette zone, légèrement moins accessible au solvant que le portail majeur, pourrait aboutir à l'obtention d'inhibiteurs plus efficaces. La substitution du groupement cyclopropyle par une fonction aldéhyde sur le diaryl éther **17**, couplé à l'utilisation de fragments hydrophobes avec une fonction complémentaire (amine/hydrazine/hydrazide) pourrait être propice à la formation d'adduits dans le portail mineur.

Chapitre 2 : Exploitation du portail mineur d'InhA par les *bis*-diaryl éthers

Introduction

Comme déjà évoqué précédemment, le site actif d'InhA peut être décomposé en trois sites : le site de fixation du substrat (I), la région hydrophobe dans le fond du site actif (II), ainsi que la région à l'entrée du site (III), exposée au solvant. La résolution d'une structure cristallographique d'InhA dans laquelle deux molécules de TCL occupent les sites I et II a suscité notre intérêt pour la conception d'inhibiteurs portant plusieurs motifs diaryl éthers. Précédemment, des études menées au sein du laboratoire pour la conception d'inhibiteurs cycliques contenant deux motifs diaryl éthers ont conduit à l'obtention de la molécule M01. Cependant, cette dernière affiche une activité modeste contre InhA ($IC_{50} = 4.6 \mu M$). Lors de ce projet, des inhibiteurs acycliques comportant trois pharmacophores, dont deux diaryl éthers, ont été synthétisés dans le but de cibler le portail mineur. Ces derniers, moins rigides que des macrocycles, offrent une plus grande adaptabilité au site actif.

Résultats

L'article correspondant à ces travaux a été publié dans la revue *Bioorganic Chemistry* et est donné dans les pages qui suivent¹⁴⁵.

Conclusion et perspectives

Après synthèse de 11 *bis*-diaryl éthers et détermination des activités biologiques associées, nous avons montré que le composé **EG1-57** présentait une IC_{50} de $0.7 \mu M$ contre InhA. La structure cristallographique du complexe formé entre la protéine, le cofacteur NAD^+ et **EG1-57** a également été résolue dans le cadre de ce projet. Cette structure révèle un portail mineur très largement ouvert, accueillant le deuxième motif diaryl éther ainsi que la chaîne alkyle de l'inhibiteur. Malgré la présence de plusieurs interactions supplémentaires (liaisons hydrogène et interactions de van der Waals), le composé **EG1-57** se montre moins efficace que les diaryl éthers alkylés, pour lesquels les structures montrent que le portail mineur est généralement moins ouvert. Cette structure, en plus des structures de complexes avec de dérivés diaryl éthers coumarines récemment résolues par nos équipes, montrent l'adaptabilité importante de la protéine InhA aux différents inhibiteurs, notamment dans le portail mineur. La grande ouverture observée pour le portail mineur peut laisser suggérer une fonction de point d'entrée/sortie de molécules, inhibiteurs et/ou substrats.

Exploring the plasticity of the InhA substrate-binding site using new diaryl ether inhibitors

Rasoul Tamhaev,^{a,b} Emeline Grosjean,^a Hikmat Ahamed,^a Mélina Chebaiki,^{a,b} Frédéric Rodriguez,^a Deborah Recchia,^c Giulia Degiacomi,^c Maria Rosalia Pasca,^c Laurent Maveyraud,^{b,*} Lionel Mourey,^{b,**} Christian Lherbet^{a,***}

^a Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (LSPCMIB), UMR 5068, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France

^b Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France.

^c Department of Biology and Biotechnology “Lazzaro Spallanzani”, University of Pavia, 27100 Pavia, Italy.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

*** Corresponding author.

Email addresses laurent.maveyraud@ipbs.fr (L. Maveyraud), lionel.mourey@ipbs.fr (L. Mourey), christian.lherbet@univ-tlse3.fr (C. Lherbet).

Keywords: tuberculosis, InhA, minor portal, inhibitors, diaryl ethers, X-ray crystallography

Abstract

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), remains a worldwide scourge with more than 10 million people affected yearly. Among the proteins essential for the survival of Mtb, InhA has been and is still clinically validated as a therapeutic target. A new family of direct diaryl ether inhibitors, not requiring prior activation by the catalase peroxidase enzyme KatG, has been designed with the ambition of fully occupying the InhA substrate-binding site. Thus, eleven compounds, featuring three pharmacophores within the same molecule, were synthesized. One of them, 5-(((4-(2-Hydroxyphenoxy)benzyl)(octyl)amino)methyl)-2-phenoxyphenol (compound **21**), showed good inhibitory activity against InhA with IC₅₀ of 0.70 μM. The crystal structure of compound **21** in complex with InhA/NAD⁺ showed how the molecule fills the substrate-binding site as well as the minor portal of InhA. This study represents a further step towards the design of new inhibitors of InhA.

1. Introduction

According to the recent World Health Organization (WHO) report, Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) affects nearly 10 million people each year worldwide and remains one of the leading causes of death due to a single infectious agent [1]. Emergence of multidrug-resistant (MDR) and of extensively drug-resistant (XDR) TB augurs for a growing incidence, leading to an increasing number of victims. In the last 60 years, no new anti-TB drugs have been approved by the US-FDA for MDR-TB treatment with the exception of bedaquiline, delamanid and pretomanid, for which resistance are already emerging [2]. Therefore, there is a real need for new drugs capable of eradicating TB.

Mycobacteria present a unique cell wall that acts as a barrier to antibiotics. Biosynthetic pathways of cell wall components, such as mycolic acids, are very attractive targets for the development of antitubercular drugs. In this respect, enzymes belonging to the type II Fatty Acid Synthesis (FAS-II) system required for the mycolic acid biosynthesis are essential for mycobacterial survival [3]. As such, they represent privileged targets for the discovery of new anti-TB drugs [4]. Among them, InhA catalyzes the reduction by the cofactor NADH of the alkene bond at position 2 of growing *trans*-2-enoyl-ACP substrates. InhA is the primary target of isoniazid (INH), a first-line anti-TB drug and one of the most effective compounds to treat TB. INH acts as a prodrug requiring activation by KatG, a catalase-peroxidase, to generate the adduct INH-NAD that inhibits InhA [5, 6]. Since the beginning of the clinical use of INH, resistance to this antibiotic have been observed, mainly through mutations in the activating enzyme KatG [7] and less commonly in InhA. Consequently, the discovery of direct inhibitors of InhA that do not require pre-activation by KatG is crucial. Only a limited set of potent direct inhibitors with activity against INH-resistant and wild-type strains of Mtb have been identified [8]. These include triclosan (TCL), a highly effective broad-spectrum diaryl ether antibacterial agent, and its analogues, some of which have shown promising activities against InhA [9-14]. The substrate-binding site of InhA can be divided in three distinct sites as illustrated in **Figure 1** [15, 16]. Site I corresponds to the catalytic site. Site II corresponds to a hydrophobic pocket where sits the aliphatic chain of the substrate, as exemplified by the structure of InhA/NAD⁺ with a C16 fatty acyl substrate analogue (ligand ID THT in PDB 1BVR, chain A) [6]. Site III is solvent-exposed and narrows the size of the entrance of the protein at the so-called major portal. It is noteworthy that in the X-ray structure reported for the InhA/NAD⁺/TCL complex (ligand ID TCL in PDB 1P45, chain A), two molecules of TCL were found to bind within the substrate-binding site of InhA [17] (**Figure 1**). One TCL molecule (TCL1) occupies site I and part of site III and shows close contacts with the cofactor and with Tyr158, which belongs

together with Phe149 and Lys165 to the catalytic triad of InhA. The second TCL molecule (TCL2) binds to the hydrophobic pocket defined by site II. The presence of these two TCL molecules was recently exploited to develop macrocyclic or dimeric, TCL-based, *bis*-diaryl ether inhibitors of InhA (**Figure 2**). For instance, we reported the synthesis of macrocyclic diaryl ether analogues such as compound M01 that showed an IC₅₀ inhibitory activity of 4.6 μM [18]. On the other hand, Chetty *et al.* designed and synthesized a series of flexible di-triclosan analogues, which displayed InhA inhibition also in the micromolar range (Cpd2 and Cpd38, **Figure 2**) [19, 20]. A more rigid acyclic *bis*-diaryl ether derivative (Cpd61, **Figure 2**) showed a similar inhibitory activity against InhA [21]. It is worth mentioning that another part of the protein, the minor portal located behind site II, has been little exploited until now. This site was recently targeted through the design of coumarin diaryl ethers that are highly effective against both InhA and mycobacterial growth (e.g. Cpd7b, ligand ID VZR in PDB 8OTN, chain D; **Figures 1 and 2**) [22]. This site may also be targeted, although in a lesser extent, by alkyl chains grafted onto TCL (e.g. compound 8PP, ligand ID 8PS in PDB 2B37, chain D; **Figures 1 and 2**) [12-14, 23]. Thus, several choices of pharmacophore groups can be used to occupy the different sites defining the substrate-binding site of InhA. Following this line, we report here on the design, synthesis and characterization of new InhA inhibitors incorporating within the same molecule two diaryl ether moieties and an alkyl chain grafted on a nitrogen atom (**Figure 2**). The high-resolution structure of the most potent compound revealed a previously unseen occupation of the active site with maximum opening of the minor portal.

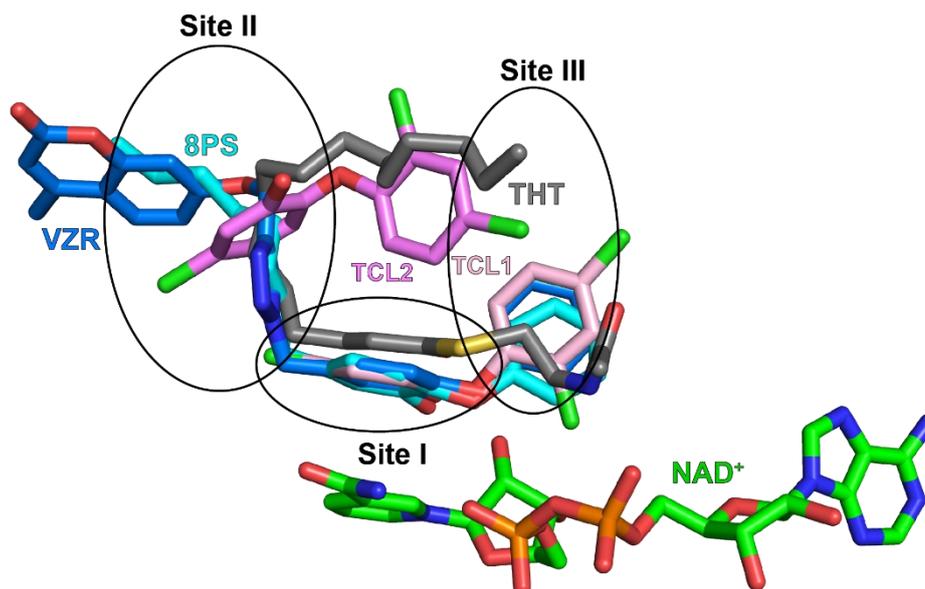


Figure 1. Overlaid X-ray structures of TCL1 and TCL2 (respectively pink and magenta, PDB 1P45:A), 8PS (cyan, PDB 2B37:A), VZR (blue, 8OTN:D), and THT (grey, 1BVR:A) binding to InhA in the presence of NAD⁺ (green). The substrate binding site is divided in three sites i.e site I, site II and site III (after [15, 16]).

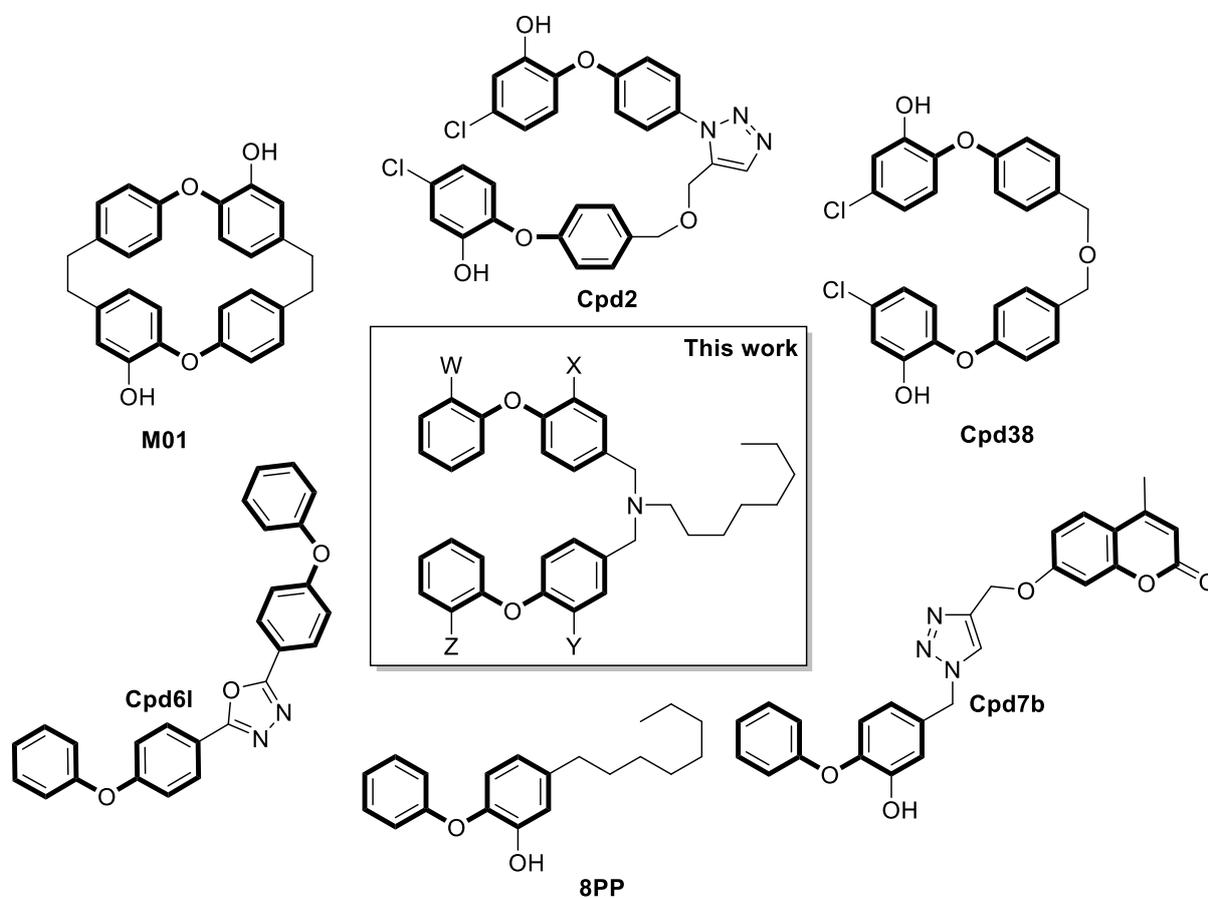
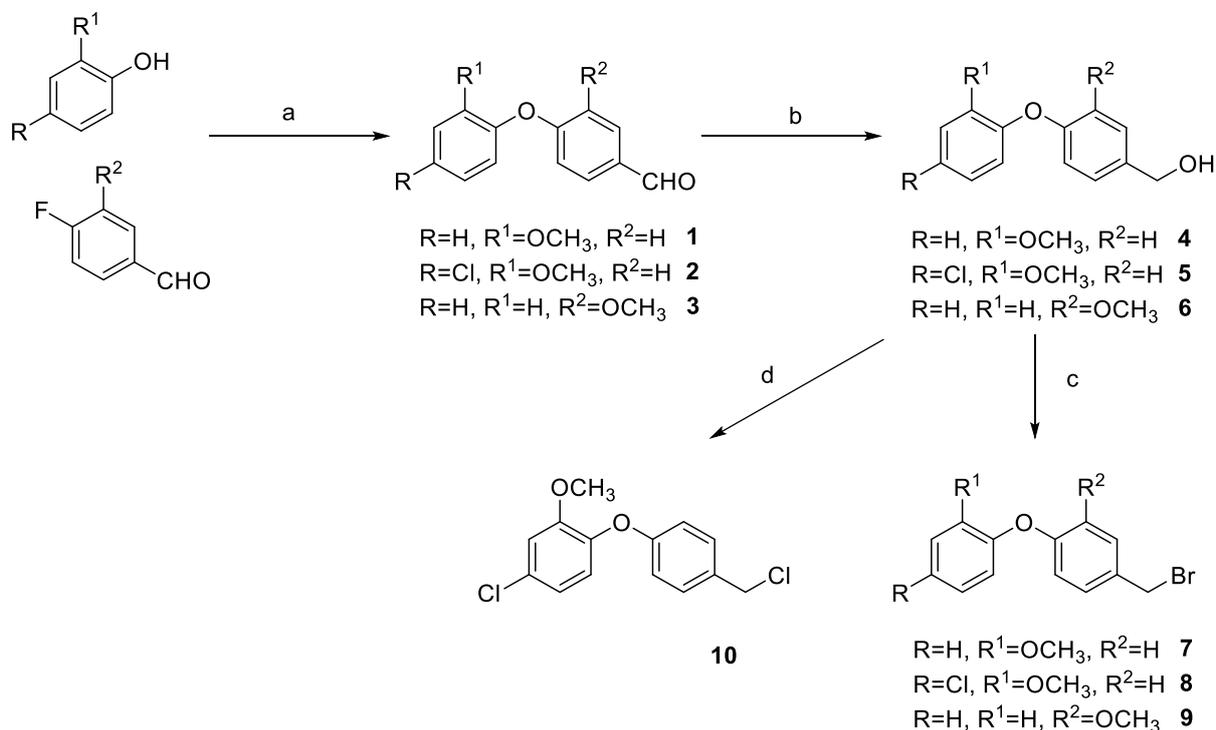


Figure 2. Bis-diaryl ether inhibitors of InhA.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of the molecules

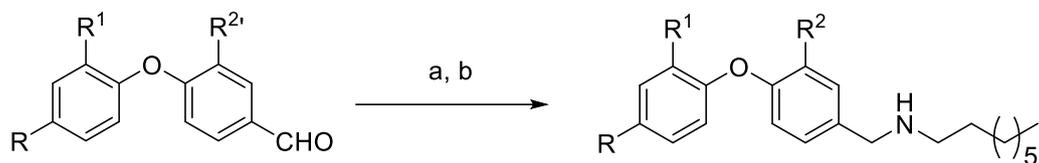
The synthetic routes of *bis*-diaryl ether compounds and their analogues are depicted in **Schemes 1-6**.



(a) K₂CO₃, DMF, 120 °C, 66-91%; (b) NaBH₄, MeOH, 89-92%; (c) CBr₄/PPh₃, CH₂Cl₂, 70-88%; (d) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 67% (from **5**).

Scheme 1. Synthesis of the precursors **1-10**.

The initial steps start with the synthesis of the various precursors, i.e. aldehydes **1**, **2** and **3** and halides **7-9** and **10** (**Scheme 1**). Condensation of differently substituted phenols with 4-fluorobenzaldehyde affords diaryl ethers **1**, **2** and **3** in good yields, which were subsequently reduced using NaBH₄. The resulting alcohols were treated with triphenylphosphine/carbon tetrabromide or mesyl chloride to afford the bromide or chloride derivatives **7**, **8**, **9** and **10**.



R=H, R¹=OCH₃, R²=H **1**

R=Cl, R¹=OCH₃, R²=H **2**

R=H, R¹=H, R²=OCH₃ **3**

R=R¹=R²=H (4-phenoxybenzaldehyde)

R=H, R¹=OCH₃, R²=H **11**

R=Cl, R¹=OCH₃, R²=H **12**

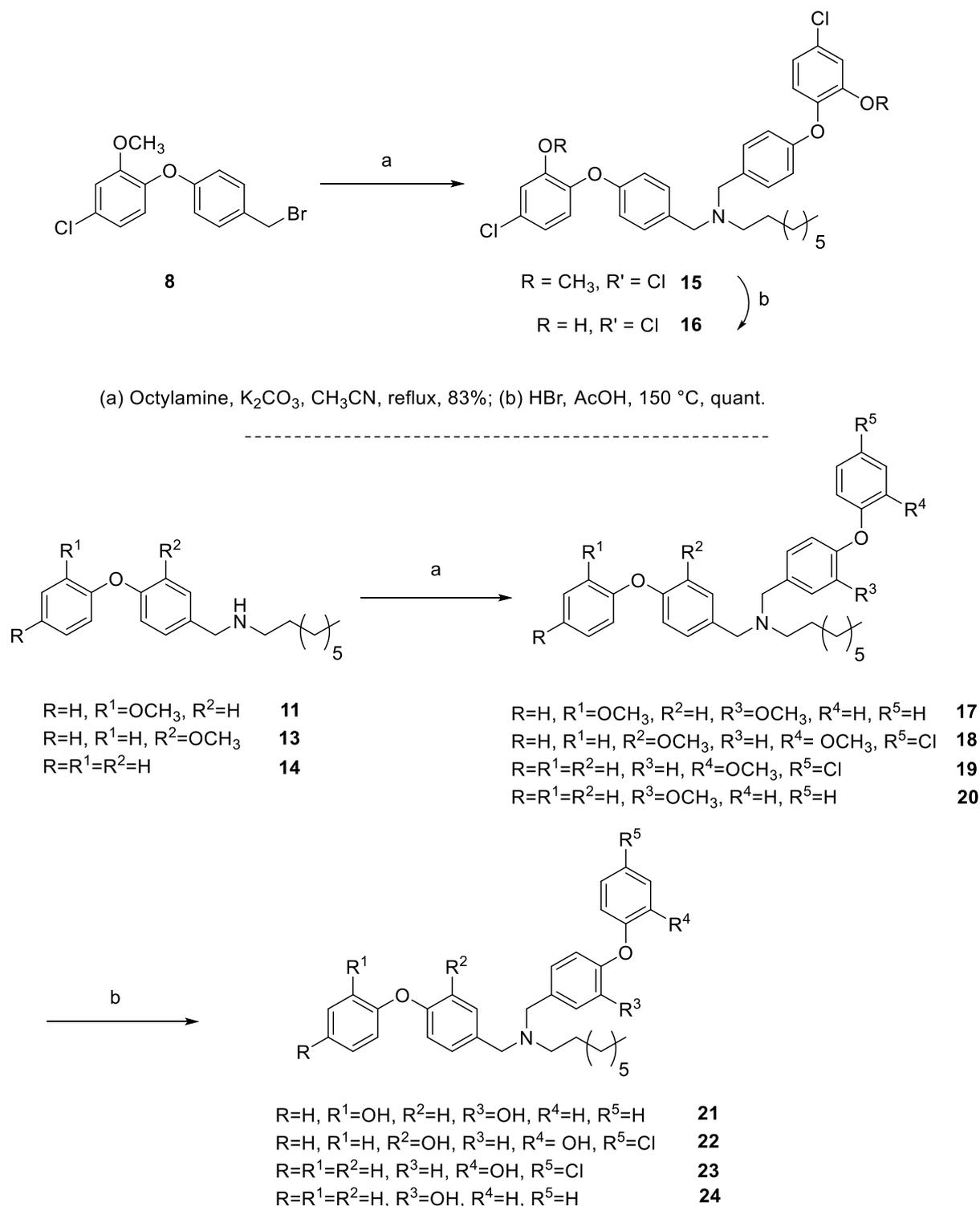
R=H, R¹=H, R²=OCH₃ **13**

R=R¹=R²=H **14**

(a) Octylamine, CH₂Cl₂; (b) NaBH₄, MeOH/EtOH

Scheme 2. Synthesis of the precursors **11-14**.

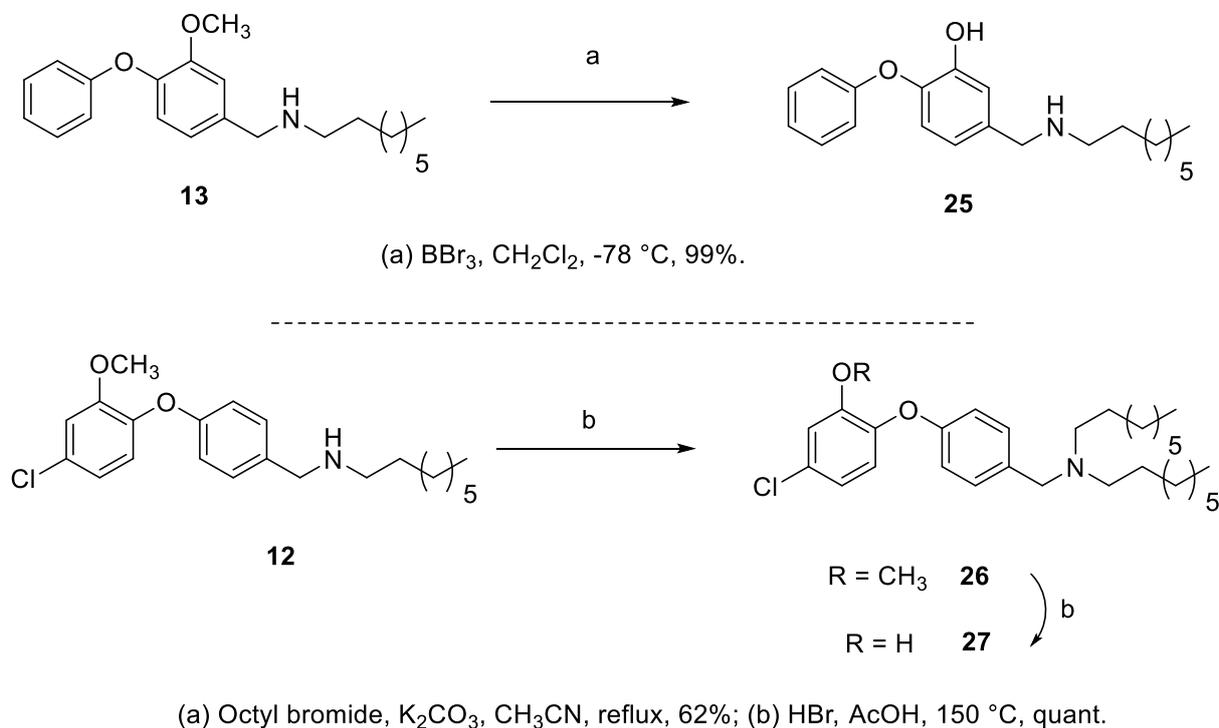
Reductive aminations of substituted aldehydes with octylamine were achieved with NaBH₄ to provide the desired secondary amines **11-14** without contamination of by-products (**Scheme 2**).



Scheme 3. Synthesis of diaryl ether derivatives **16** and **21-24**.

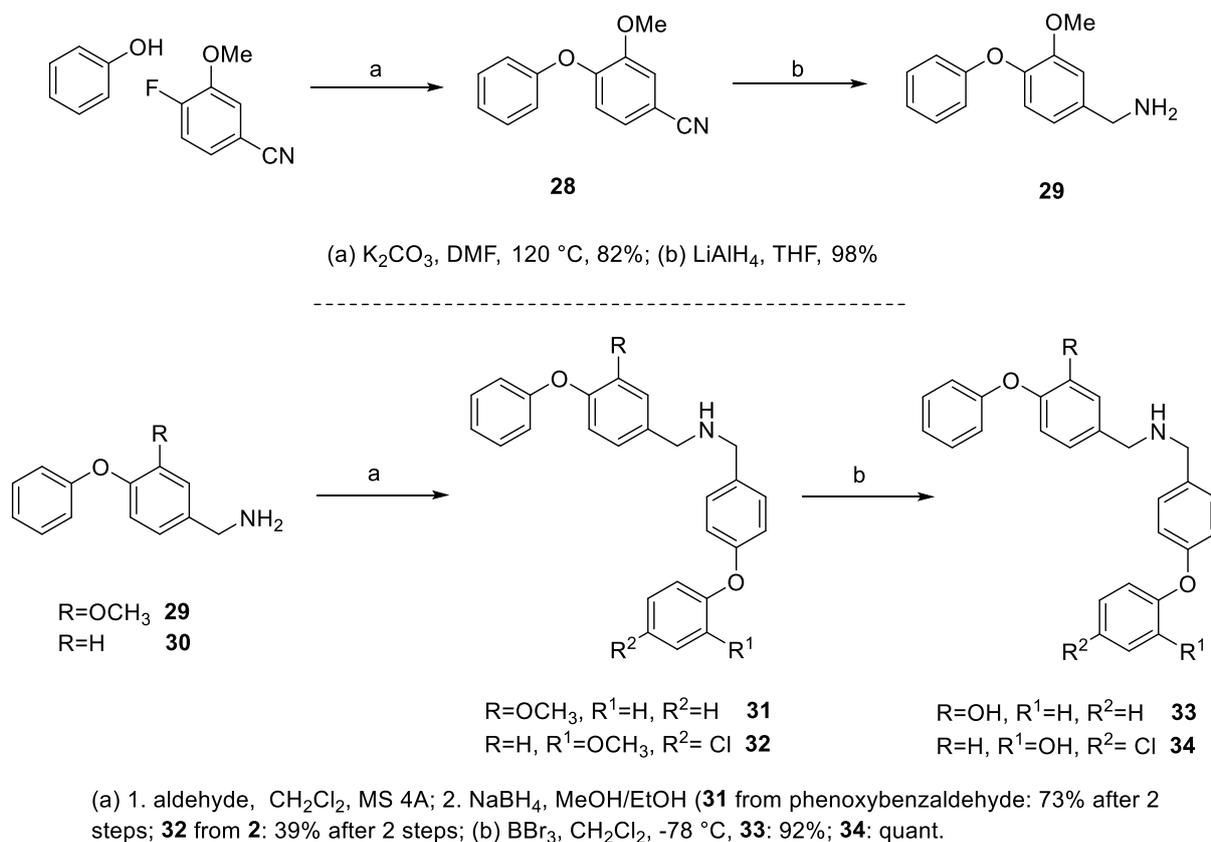
In order to synthesize diaryl ether **15**, octylamine was treated with bromide derivative **8** using potassium carbonate as base (**Scheme 3**). Various substituted diaryl ether derivatives **17-20** were synthesized by condensing compounds **8** or **9** with secondary amines **11**, **13** and **14** using

the same reaction conditions. Each *bis*-diaryl ether molecule was demethylated using hydrogen bromide in acetic acid under reflux (**Scheme 3**). For these molecules, the reaction with HBr/AcOH by comparison with BBr₃ has the merit of being much cleaner and above all reproducible. Nevertheless, secondary amine derivative **25** was synthesized in one-step from **13** using BBr₃ at low temperature.



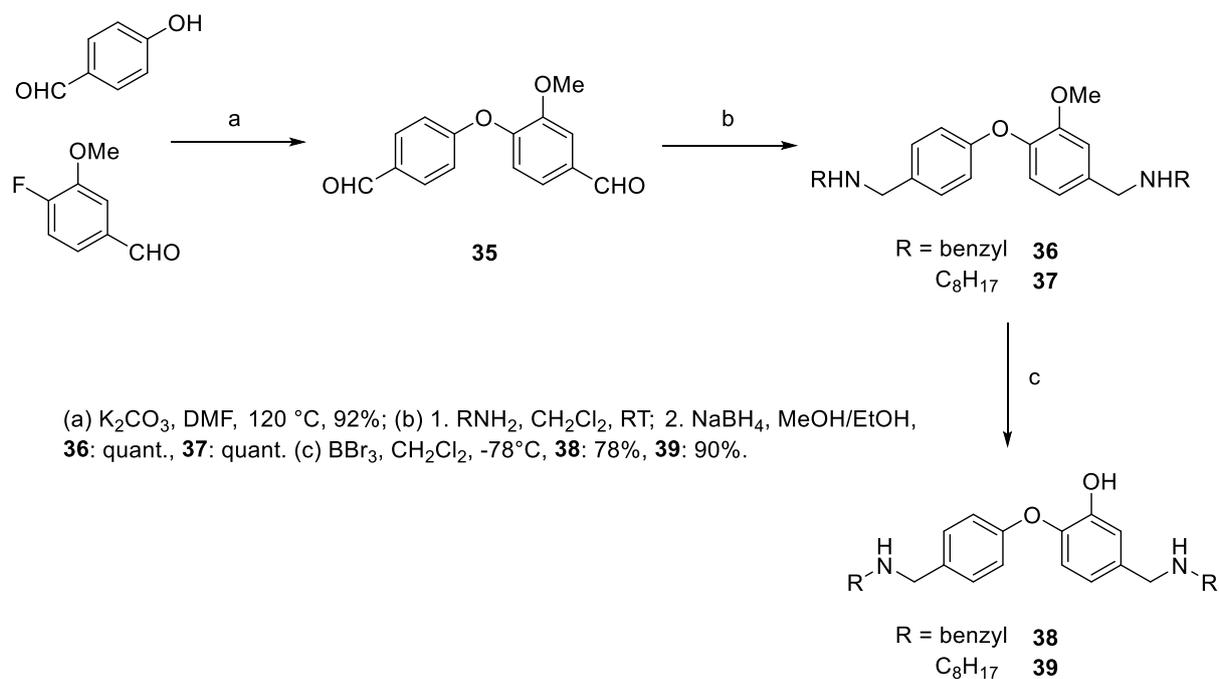
Scheme 4. Synthesis of derivatives **25** and **27**.

In addition to mono-alkylated *bis*-diaryl ether derivatives listed above, miscellaneous analogs or truncated compounds such as **27**, **33** and **34** have been synthesized to verify their ability to inhibit the InhA protein. *Bis*-C₈-alkylated amine **27** was synthesized from compound **12** and octyl bromide after demethylation in good yield (**Scheme 4**). Compounds **33** and **34**, deprived of alkyl chain, have also been synthesized to determine the impact of this chain on recognition by InhA. To this end, compounds **31** and **32** were synthesized by reductive amination of amines **29** and **30** in the presence of 4-phenoxybenzaldehyde and aldehyde **2**, respectively, in good yields (**Scheme 5**). Final compounds **33** and **34** were obtained after demethylation using BBr₃ in excellent yields.



Scheme 5. Synthesis of diaryl ether compounds **33** and **34**.

Two bifunctionalized diaryl ethers **38** and **39** were synthesized in two steps from aldehyde **35** (**Scheme 6**). Unlike the other molecules shown above, these molecules have two secondary amines containing either a benzyl or an octyl group.

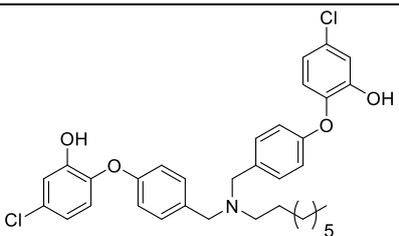
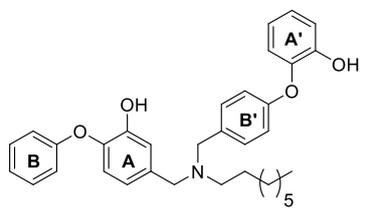
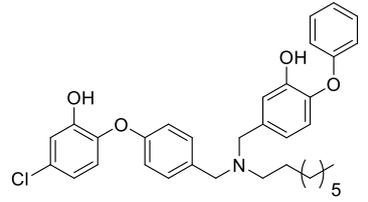


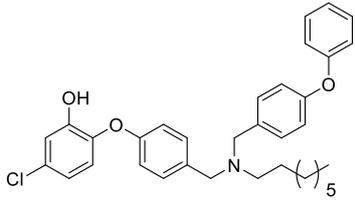
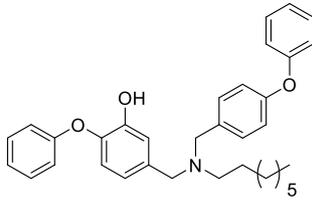
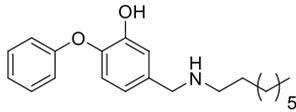
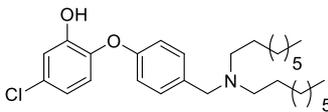
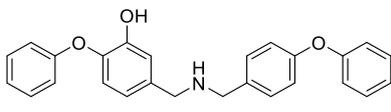
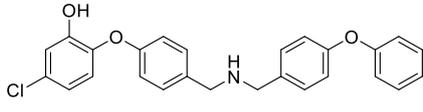
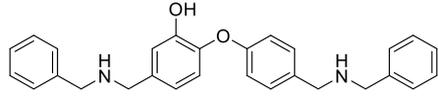
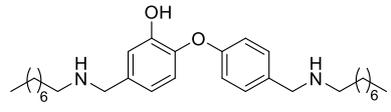
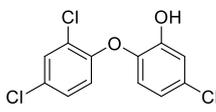
Scheme 6. Synthesis of compounds **38** and **39**.

2.2. *InhA* inhibition assay

The inhibition activity of synthesized compounds was investigated via a well-known procedure [24]. Initial velocities were measured at fixed concentrations of NADH (250 μM), dodecenoyl Coenzyme A (DDCoA, 50 μM) and inhibitors as a first screening (50 μM) at 25 $^{\circ}\text{C}$ in 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8. The reactions were initiated by the addition of *InhA* enzyme. Triclosan was used as a control. As shown in **Table 1**, compound **21** showed the best inhibitory activity with IC_{50} of 0.70 μM , making it one of the most efficient derivatives bearing two diaryl ethers as compared to previous studies [19, 20]. Surprisingly, comparing compounds **22** and **21**, the presence of a chlorine atom on the aromatic leads to a significant decrease in inhibitory activity. If a hydroxyl group is absent as found in compound **24**, compared to compound **21**, a decrease in affinity was observed with an IC_{50} of 1.82 μM . This may be due to the loss of a hydrogen bond with a residue of *InhA*. *Bis*-diaryl ether derivative **33** bearing no alkyl chain showed an IC_{50} of 1.38 μM while the same compound with a different hydroxyl positioning and bearing a chloride atom displays no capacity to inhibit *InhA*.

Table 1. Structure and inhibitory activity of diaryl ether derivatives toward *InhA* enzyme and *Mtb* H37Rv strain.

ID molecules	Molecules	% inhibition at 50 μM	IC_{50} (μM)	MIC_{90} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
16		28	ND ^a	10
21 (EG1-57)		100 (91% at 5 μM)	0.70 \pm 0.07	20
22		28 (at 5 μM) ^b	ND ^a	20

23		43	ND ^a	>40
24		100 (80% at 5 μM)	1.82 ± 0.21	ND ^a
25		30 (at 5 μM) ^b	ND ^a	5
27		41	ND ^a	10
33		91 (at 15 μM) ^b	1.38 ± 0.07	ND
34		NI ^c	ND ^a	5
38		<5	ND ^a	10
39		62	ND ^a	2.5
Triclosan (TCL)		98	ND ^a	ND ^a

^aND, not determined; ^bNot soluble at 50 μM; ^cNI, no inhibition.

2.3. Inhibition of mycolic acid biosynthesis in *Mtb* H37Rv

Compounds were screened against *Mtb* strain H37Rv by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC). Results are reported in **Table 1**. As a general trend, most of the compounds showed poor antimycobacterial activities with MIC values in the range of 10 to > 40 μg/mL. Among diaryl ether derivatives, **34** and **39** showed the best inhibitory activity with MIC of 5 and 2.5 μg/mL, respectively. The best inhibitor **21** of the enzyme InhA was poorly active against *Mtb* with a MIC of 20 μg/mL.

2.4. X-ray structure of the *InhA*/NAD⁺/**21** complex

To gain further insight into protein-ligand interactions, we succeeded in obtaining the X-ray structure of the complex of compound **21**, the best diaryl ether derivatives (in terms of IC₅₀) in our series, with *InhA* and NAD⁺ (PDB code 8OTL). Crystals were obtained in the presence of PEG 4000 after successive incubation of the protein with the cofactor then with compound **21**. They belong to space group *C222*₁ with 6 molecules in the asymmetric unit and diffracted X-rays to a maximum resolution of 2.1 Å. Clear electron density was visible in the substrate-binding site of *InhA* that allows for unambiguous positioning of the cofactor and the ligand. The latter was observed in only one of the six molecules of the asymmetric unit (**Figure 3**), a quite common feature when considering structures of *InhA*/NAD(H)/ligand complexes obtained in *C2*₁ and *C222*₁ space groups available in the PDB. In all 6 chains of the asymmetric unit, the NAD⁺ molecules adopt strictly the same position and canonical conformation observed in other deposited *InhA* structures. Differences are observed for the so-called “substrate-binding loop” (SBL, residues 192-226 encompassing helices H6 and H7) where H6 adopts an open conformation in the unpopulated chains (**Figure 3A**) and a closed conformation in the only one chain bearing the ligand (**Figure 3B**). Furthermore, the Phe149 and Tyr158 side chains are in the so-called *out* and *in* conformation, respectively, in the populated molecule but adopt various, and even alternate, *in/out* orientations in the molecules that only contains the cofactor (**Figure 3**).

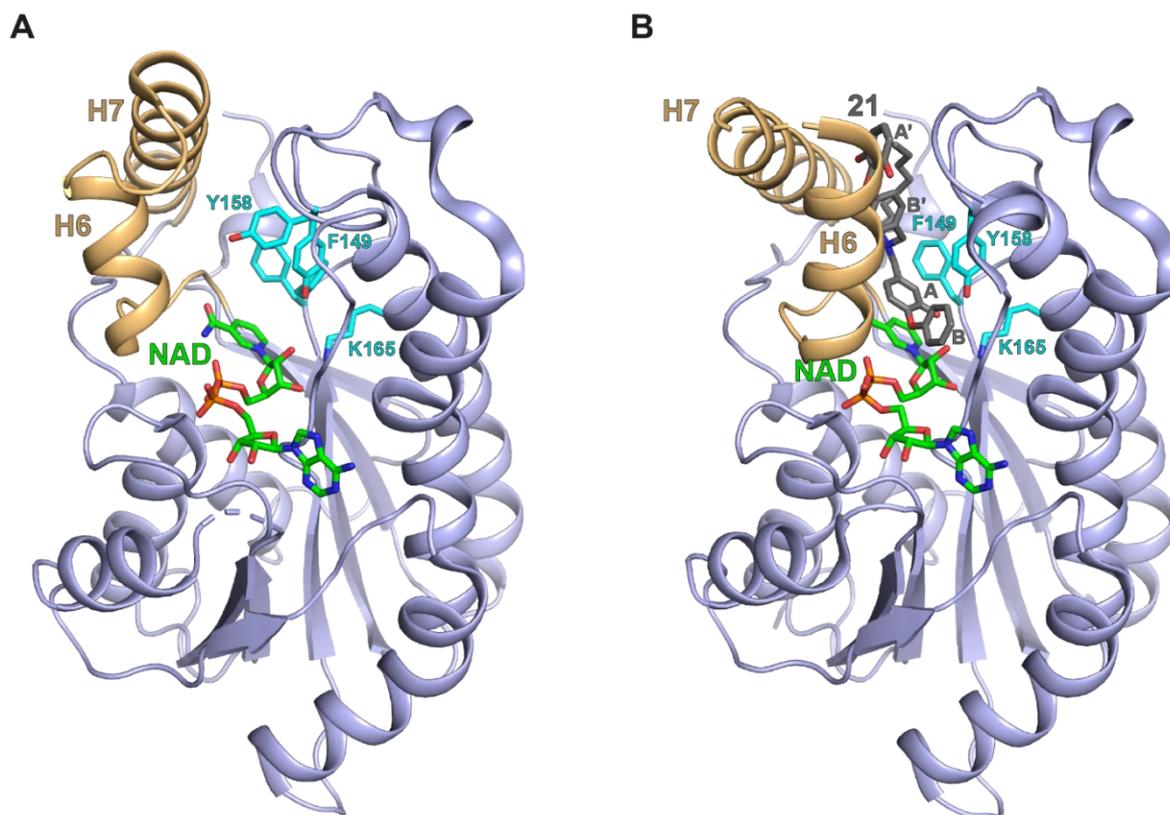


Figure 3. X-ray structure of the InhA/NAD⁺/21 complex. **A.** Five of the six molecules making up the crystal have no bound ligand (only 8OTL:A is shown). **B.** Bound ligand in the sixth molecule (8OTL:F). Cartoon representation showing the difference in the conformation of the SBL loop (residues 192-226, orange), with helix H6 from open to closed. The NAD⁺ (green), the ligand (gray) and the side chains of the catalytic triad Phe149-Tyr158-Lys165 (cyan) are shown as sticks. In the non-populated molecules, the side chains of Phe149 and Tyr158 adopt alternative *in/out* conformations whereas in the ligand complex, Phe149 and Tyr158 side chains are *out* and *in*, respectively.

As found in other InhA-diaryl ether structures, the hydroxyl-substituted ring A of **21** is stacked with the NAD⁺ nicotinamide and its hydroxyl moiety makes hydrogen bonds with the hydroxyl group of Tyr158 and the 2'-hydroxyl group of NAD⁺ (**Figure 4A**). Two additional hydrogen bonds are formed between the hydroxyl group of the other hydroxyl-substituted ring of **21** (i.e. A'), which adopts two alternate conformations rotated by 180°, and either the main-chain oxygen atom of Ile202 or the side-chain nitrogen atom of Gln214 (**Figure 4B**). Another polar contact might be formed between the protein and the ligand through a cation- π interaction involving the Phe149 side chain and the nitrogen atom of **21**, which would require protonation of the amine (**Figure 4C**). In addition to polar contacts, binding of **21** occurs through numerous, i.e. 80 in total, non-bonded contacts involving the cofactor and protein residues. Among top contributors, number of contacts in parentheses, are found NAD⁺ (28), Tyr158 (8), Ile202 (7), and Gln214 (5). Other contacts involved Gly96 (3), Phe97 (3), Gly104 (1), Phe149 (3), Met155 (1), Pro156 (2), Ala157 (3), Met161 (4), Lys165 (1), Pro193 (1), Ala198 (3), Met199 (1), Val203 (2), Val206 (2), Leu218 (1), and Trp222 (1). From the ligand perspective, 64% (51) of

these contacts involve the AB diphenyl ether (**Figure 4A**), 23% (19) the A'B' diphenyl ether (**Figure 4B**), 4% (3) the benzylic CH₂ groups, and 9% (7) the alkyl chain (**Figure 4C**).

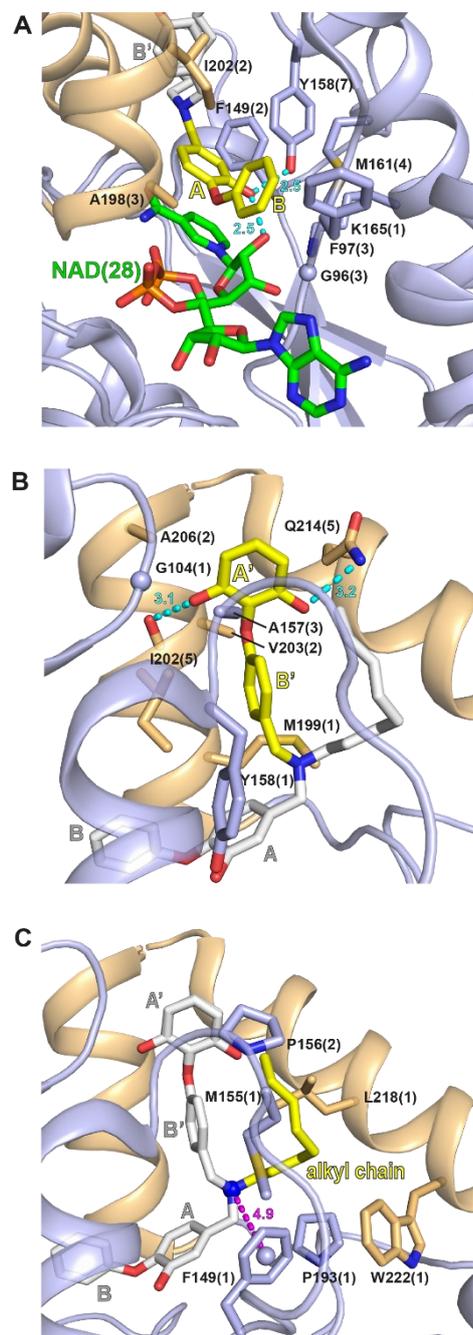


Figure 4. Detailed interactions of compound **21** with InhA/NAD⁺. Three different zooms are shown that correspond to **A**. The AB diaryl ether. **B**. The A'B' diaryl ether. Both observed orientations of cycle A' are shown. **C**. The alkyl chain. The protein is shown as cartoon using the same color scheme as in Figure 3. In each panel, the considered part of the ligand is in yellow while the remaining part is in light gray. The cofactor is in green. Protein residues involved in defining the inhibitor-binding pocket are shown as sticks and labeled with their number of non-bonded contacts with the ligand given in parentheses. Hydrogen bonds are displayed as cyan dotted lines. The putative cation- π interaction is shown as magenta dotted lines. Distances are indicated.

It should be noted that while we were trying to solve the crystal structure of the InhA/NAD⁺/**21** complex, we also performed molecular docking simulations (see Supplementary Material). Comparison of docking and crystallographic binding poses shows similar conformations for the AB diaryl ether and the nitrogen (**Figure 5**). Beyond nitrogen, in the direction of the minor

portal, significant differences are observed with the alkyl chain and the A'B' diaryl ether mainly due to a very different opening of the minor portal in the 2X22:A vs. 8OTL:F structures.

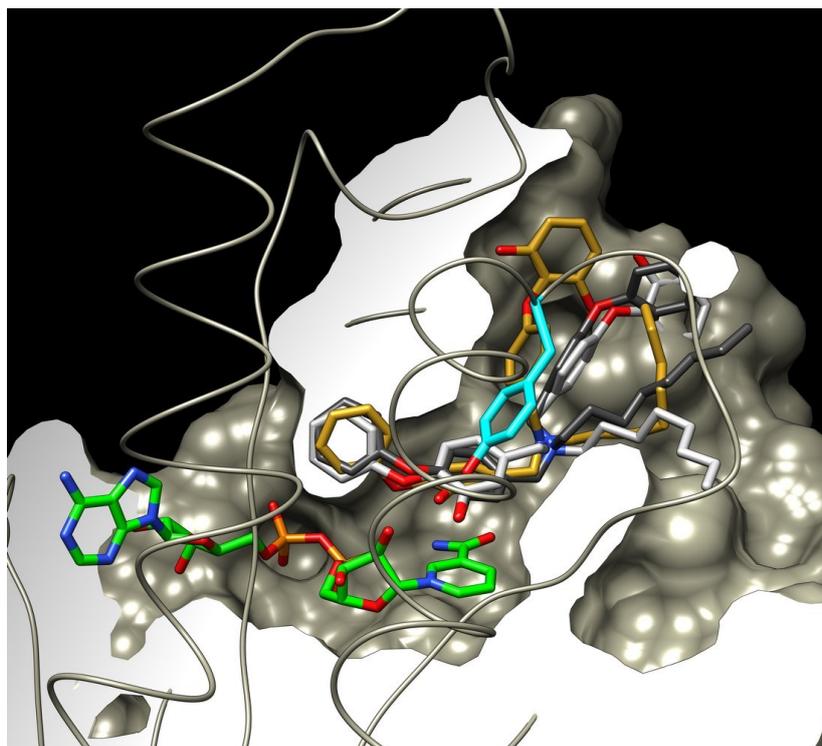


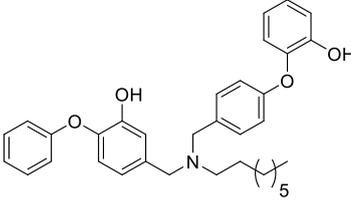
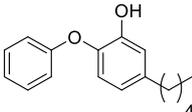
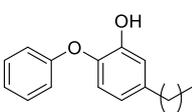
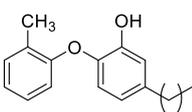
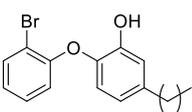
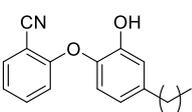
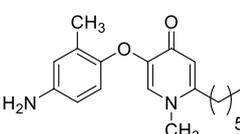
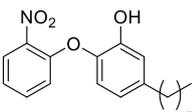
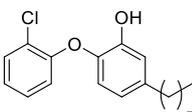
Figure 5. Comparison of the two best docking poses (black, grey) with the crystallographic conformation (orange) of compound **21** in 8OTL:F (grey surface). The side chain of Tyr158 and NAD⁺ are shown in cyan and green, respectively.

2.5. Compared analysis of the functional and structural effect of *InhA* complexation to alkyl diaryl ethers

Compound **21** has 6.6 fold improved IC₅₀ compared to macrocyclic diaryl ether analogues such as compound M01 (0.7 μM vs. 4.6 μM) [18]. This might be explained by the fact that the latter are rigid molecules although more flexible *bis*-diaryl ether analogues have also been shown to display *InhA* inhibition in the micromolar range [20, 21]. However, the differences in inhibition of both protein activity and *Mtb* growth between the alkyl *bis*-diaryl ether compound **21** and smaller alkyl diaryl ethers, i.e. compounds PT70, PT119, PT10 and PT91, which display IC₅₀ values up to 10 times lower (at close *InhA* concentrations, i.e. 50 and 100 nM, **Table 2**), are quite striking. These differences cannot be explained by the number of hydrogen bonds/non-bonded contacts involved in protein-ligand interactions (**Table 2** and **Figure 6**). Indeed, compound **21** makes more hydrogen bonds and non-bonded contacts with the protein. In contrast, these differences might be explained by the wider opening of the minor portal in the structure of the complex with **21** compared to alkyl diaryl ethers (**Figure 6**). Indeed, the alkyl part of compound **21** extends towards the minor portal in a manner reminiscent of what has

been observed for coumarin diaryl ethers [22], and opening is further accentuated by the presence of the A'B' diaryl ether.

Table 2. Structure and properties of diaryl ether analogues bearing an alkylated chain.

PDB:chain	Compound name (PDB ligand ID)	Structure	IC ₅₀ (nM)	MIC (µg/ mL)	N° H-bonds	N° non-bonded contacts ^a	Ref.
8OTL:F	21 (VZE)		700 ^b	20	4	80:28-52	This work
2B36:A	5PP (5PP)		17 ^c	1	2	47:28-19	[14]
2B37:D	8PP (8PS)		5 ^c	1.9	2	83:38-45	[14]
2X23:G	PT70 (TCU)		50.3 ^d	3.1	2	70:34-36	[12]
4OHU:A	PT92 (2TK)		10 ^e	3.1	2	61:28-33	[13, 23]
4OIM:A	PT119 (JUS)		235.6 ^d	2.5	2	72:31-41	[13]
4OXN:B	PT155 (1S5)		ND ^f	ND	3	63:30-33	[23]
4OXY:B	PT10 (1TN)		182 ^d	12.5	2	67:32-35	[23]
4OYR:C	PT91 (1US)		49.5 ^d	1.6	2	59:31-28	[23]

^a Total number: with cofactor-with protein, determined using the LigPlot+ program [25]. InhA concentration: ^b50 nM, ^c1 nM, ^d100 nM and ^e20nM. ^fND, not determined.

3. Conclusions

Over the past decade, InhA has been demonstrated as a promising target and various types of inhibitors have been identified that bind to the substrate site. In the present study, the substrate-binding site was exploited by designing *bis*-diaryl ether molecules bearing a chain reminiscent of the substrate. A series of eleven alkyl *bis*-diaryl ether derivatives were synthesized and one of them displayed nanomolar inhibitory activity against the enzyme. The X-ray structure of the corresponding complex with InhA and NAD⁺ was obtained. This structure revealed the protein adaptability to a relatively large inhibitor and the observed opening of the minor portal underlines its plasticity. Such an opening of the minor portal raises the question of whether it could act as an entry/exit gate for compounds (substrates and/or inhibitors).

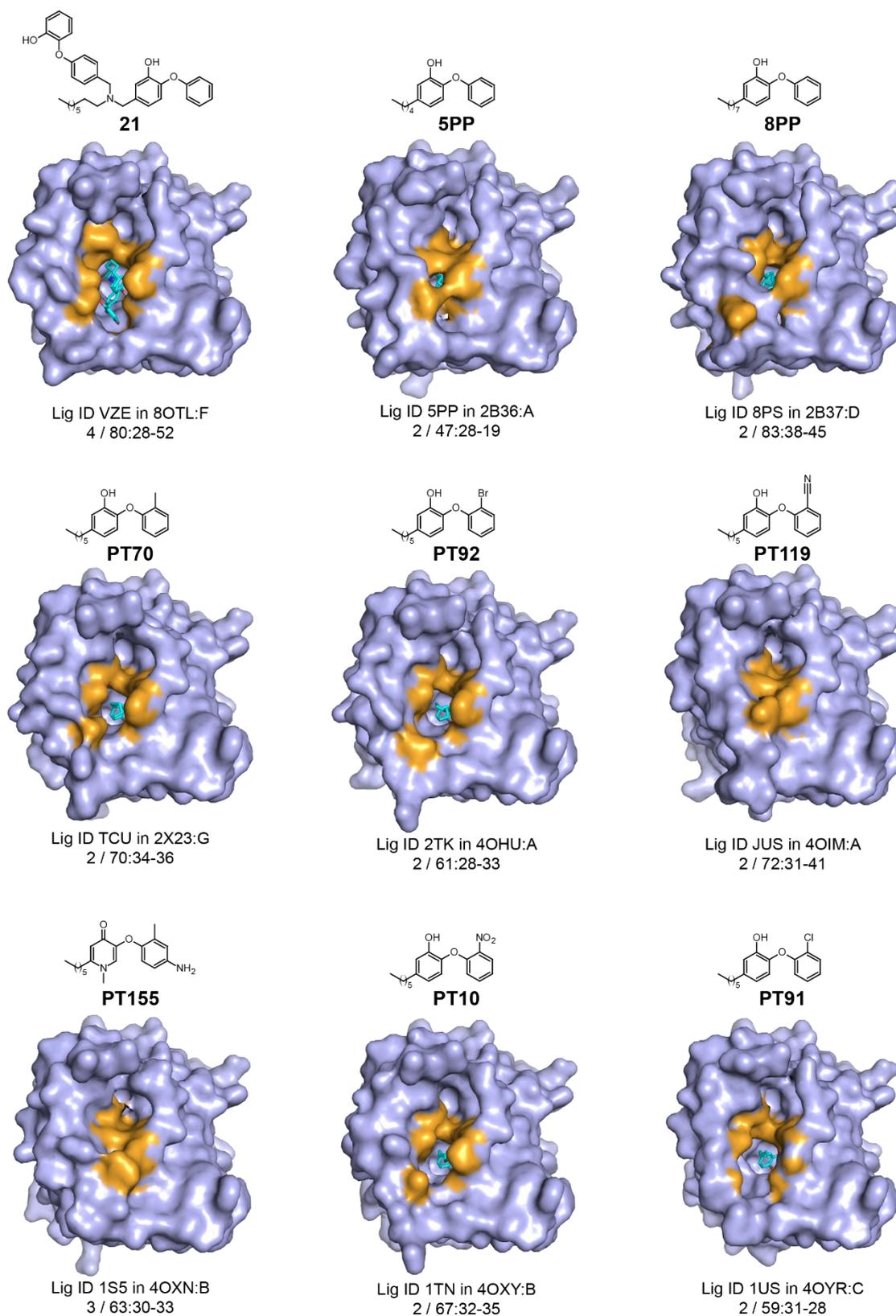


Figure 6. Effect of alkyl diaryl ether binding on minor portal opening. In each panel, the chemical structure and compound name (upper lines) and PDB identifiers as well as the number of hydrogen bonds and the number of (total:with cofactor/with protein) non-bonded contacts (lower lines) are given. The protein molecular surface is represented in lightblue. Residues interacting with compound **21** are displayed in orange on all structures, which are represented in the same orientation.

4. Experimental section

4.4. Chemistry

All commercial reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Alfa Aesar and were used without further purification. CH₂Cl₂ and *N,N*-dimethylformamide were purified over a solvent purification system. Proton and carbon nuclear magnetic resonance (¹H NMR and ¹³C NMR) spectra were recorded on Bruker advance (300 MHz/75 MHz or 500 MHz/125 MHz) spectrometers. Chemical shifts were recorded in parts per million (ppm, δ) relative to the corresponding deuterated solvent (7.26 ppm and 77.0 ppm for CDCl₃). ¹H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t) and multiplet (m) or broad (b). Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed on a Thermo-Finnigan MAT 95 XL instrument. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck 60 F254 pre-coated silica gel plates (0.2 mm thickness). Visualization was accomplished by UV irradiation at 254 nm. Flash column chromatography was performed on a Puriflash from Interchim or Combiflash from Serlabo.

General procedure for the aromatic substitution (compounds 1-3).

Phenol (1 eq) and 4-fluorobenzaldehyde (1.1-1.2 eq) were dissolved in *N,N*-dimethylformamide (20 mL). To this mixture, add K₂CO₃ (2.5 eq) and heat to 120 °C. After 18 h of stirring, the mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was diluted with ethyl acetate and washed with water. The combined organic layers are washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography to afford the desired diaryl ether derivative.

General procedure for the reduction of aldehydes (compounds 4-6).

Sodium borohydride (2-4 eq) was added to a stirred solution of aldehyde derivative (1 eq) in methanol (10 mL) at 4 °C. The mixture was stirred 30 minutes at this temperature and then overnight at room temperature. Once the reaction was complete, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to afford the desired compound. No further purification step was necessary.

General procedure for the bromation of alcohol derivatives (compounds 7-9).

To a solution of alcohol derivative (1 eq) solubilized in dichloromethane (10 mL), were added carbon tetrabromide (1.25-1.5 eq) and triphenylphosphine (1.4-2 eq) at 4 °C. Then, the reaction

mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate was added. The reaction mixture was washed with water (3×). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by flash chromatography.

General procedure for the reductive amination (compounds 11-14).

Octylamine (1 eq) was added to a solution of aldehyde (1 eq) in 50 mL anhydrous dichloromethane with molecular sieves. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Molecular sieves were removed by filtration and the solution was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with methanol/ethanol (1/1, 50 mL) and sodium borohydride (3 eq) was slowly added to the ice-cooled solution. Once the reaction was complete as seen by TLC, saturated solution of NH₄Cl was added and the resulting solution was concentrated *in vacuo*. Ethyl acetate was added and the organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the desired compound. No further purification was needed.

General procedure of demethylation (compounds 16, 21-24).

CH₃COOH (1 mL) and HBr 48% (1 mL) were added to the methoxybenzene derivative (0.162-0.322 mmol). The mixture was stirred at 150 °C for 5 h. Then a NaHCO₃ sat aqueous solution was added slowly and was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to give the desired compound.

4-(2-Methoxyphenoxy)benzaldehyde (1) [26].

The product **1** was synthesized as described in the general procedure for aromatic substitution with guaiacol (500 mg, 4 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (600 mg, 4.8 mmol). Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 95/5 to 90/10) gave compound **1** as a lightly yellow oil (75%, 0.801 g). *R_f* = 0.27 (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.90 (s, 1H, CHO); 7.85 – 7.78 (m, 2H, ArH); 7.28 – 7.19 (m, 1H, ArH); 7.10 (dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H, ArH); 7.06 – 6.95 (m, 4H, ArH); 3.79 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.8; 163.5; 151.6; 142.8; 131.8; 130.8; 126.4; 122.5; 121.3; 116.2; 113.0; 55.8.

4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (2) [19].

The product **2** was synthesized as described previously in the general procedure for aromatic substitution with 4-chloro-2-methoxyphenol (0.700 g, 4.4 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (0.657 g, 5.3 mmol) and K_2CO_3 (1.22 g, 8.8 mmol). Purification by flash chromatography (petroleum ether and ethyl acetate: 9/1) gave compound **2** as a white powder. Yield: 91% (1.050 g). $R_f = 0.65$ (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.91 (s, 1H, ArCHO); 7.90 – 7.77 (m, 2H, ArH); 7.10 – 6.92 (m, 5H, ArH); 3.78 (s, 3H, OCH_3); NMR ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9; 163.3; 152.4; 141.7; 132.0; 131.5; 131.3; 123.4; 121.3; 116.3; 113.8; 56.3.

3-Methoxy-4-phenoxybenzaldehyde (3).

The product **3** was synthesized as described previously in the general procedure for aromatic substitution with phenol (1 g, 10.6 mmol) and 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (1.8 g, 11.7 mmol) and K_2CO_3 (3.68 g, 26.3 mmol). Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 95/5 to 80/20) gave compound **3** as a light beige oil (66%, 0.212 g). $R_f = 0.26$ (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.88 (s, 1H, CHO), 7.52 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH), 7.40 – 7.32 (m, 3H, ArH), 7.20 – 7.13 (m, 1H, ArH), 7.07 – 7.01 (m, 2H, ArH), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 3.94 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 190.8; 155.7; 152.1; 150.9; 132.1; 129.9; 125.7; 124.3; 119.9; 117.7; 110.5; 56.0.

(4-(2-Methoxyphenoxy)phenyl)methanol (4).

The product **4** was synthesized as described in the general procedure for aldehyde reduction with compound **1** (330 mg, 1.45 mmol) and sodium borohydride (219 mg, 5.8 mmol) to give compound **4** as a lightly yellow oil (89%, 0.229 g). $R_f = 0.47$ (petroleum ether/ethyl acetate: 7/3). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.31 – 7.26 (m, 2H, ArH), 7.14 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.05 – 6.95 (m, 2H, ArH), 6.95 – 6.90 (m, 3H, ArH), 4.62 (s, 2H, $ArCH_2OH$), 3.83 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 157.5; 151.3; 144.9; 134.9; 128.5; 124.9; 121.0; 121.0; 117.1; 112.8; 64.9; 55.9; HRMS (DCI/ CH_4 , $[M]^+$) Calculated for $C_{14}H_{14}O_3$: 230.0943. Found: 230.0944.

(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)phenyl)methanol (5) [20].

The product **5** was synthesized as described in the general procedure for aldehyde reduction with compound **2** (600 mg, 2.29 mmol), sodium borohydride (183 mg, 4.83 mmol) to give

compound **5** as a white solid (99%, 0.632 g). $R_f = 0.16$ (petroleum ether/ethyl acetate: 8/2). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.24 – 7.18 (m, 2H, ArH); 6.97 (m, 1H, ArH); 6.91 – 6.79 (m, 4H, ArH); 4.51 (s, 2H, CH_2OH); 3.75 (s, 3H, OCH_3); 3.40 (b, 1H, OH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.9; 151.7; 143.5; 135.2; 129.5; 128.4; 121.6; 120.7; 118.9; 113.3 (C2); 64.2 (C13); 55.9 (C14); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}]^+$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Cl}$: 264.0553. Found: 264.0557.

(3-Methoxy-4-phenoxyphenyl)methanol (6).

The product **6** was synthesized as described in the general procedure for aldehyde reduction with compound **3** (500 mg, 2.191 mmol) and sodium borohydride (249 mg, 6.57 mmol) to give **6** as a white solid (92%, 464 mg). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36 – 7.25 (m, 2H, ArH), 7.10 – 7.01 (m, 2H, ArH), 6.99 – 6.86 (m, 4H, ArH), 4.68 (s, 2H, Ar- CH_2), 3.84 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.8; 151.5; 144.4; 137.6; 129.5; 122.5; 120.9; 119.5; 117.1; 111.5; 65.1; 55.9; HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}]^+$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$: 230.0943. Found: 230.0948.

1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (7).

The compound **7** was synthesized as described in the general procedure for bromination with compound **4** (299 mg, 1.3 mmol), carbon tetrabromide (539 mg, 1.625 mmol) and triphenylphosphine (477 mg, 1.82 mmol). Purification on silica with petroleum ether and ethyl acetate (9:1) gave compound **7** as a yellow oil (76%, 0.293 g). $R_f = 0.65$ (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36 – 7.27 (m, 2H, ArH); 7.17 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.9$ Hz, 1H, ArH); 7.01 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 2H, ArH); 6.97 – 6.93 (m, 1H, ArH); 6.91 – 6.85 (m, 2H, ArH); 4.50 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.82 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158.2; 151.6; 144.3; 131.5; 130.4; 125.3; 121.6; 121.1; 116.9; 112.8; 55.9; 33.6; HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}]^+$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{Br}$: 292.0099. Found: 292.0110.

1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-4-chloro-2-methoxybenzene (8) [27].

The compound **8** was synthesized as described in the general procedure for bromination with compound **5** (0.632 g, 2.41 mmol), carbon tetrabromide (1.199 g, 3.615 mmol) and triphenyl phosphine (0.948 g, 3.615 mmol). Purification on silica with petroleum ether and ethyl acetate (9:1) gave the desired compound **8** as a white solid (70%, 0.547 g). $R_f = 0.79$ (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.34 – 7.29 (m, 2H, ArH); 6.99 (m, 1H, ArH); 6.92 (m, 2H, ArH); 6.87 (m, 2H, ArH); 4.40 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.70 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.9; 152.1; 142.9; 131.9; 130.5; 130.1; 122.4; 120.9; 116.9;

113.5; 56.1; 33.5; HRMS (DCI-CH₄, [M]⁺) Calculated for C₁₄H₁₂O₂ClBr: 325.9709. Found: 325.9706.

4-(Bromomethyl)-2-methoxy-1-phenoxybenzene (9).

The compound **9** was synthesized as described in the general procedure for bromination with compound **6** (230 mg, 1 mmol), carbon tetrabromide (497 mg, 1.5 mmol) and triphenylphosphine (525 mg, 2 mmol). Purification on silica with petroleum ether and ethyl acetate (9:1) gave compound **9** as a lightly pink oil (88%, 0.257 g). *R_f* = 0.67 (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.28 (m, 2H, ArH), 7.12 – 7.03 (m, 2H, ArH), 7.01 – 6.88 (m, 4H, ArH), 4.51 (s, 2H, Ar-CH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.3; 151.1; 145.4; 133.9; 129.5; 122.8; 121.6; 120.3; 117.5; 113.3; 55.9; 33.6; HRMS (DCI/CH₄, [M]⁺) Calculated for C₁₄H₁₃O₂Br: 292.0099. Found: 292.0102.

4-Chloro-1-(4-chloromethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (10).

The product **10** was synthesized as described previously [20]. Briefly, to a ice-cooled solution of **5** (498 mg, 1.88 mmol) solubilized dichloromethane (15 mL) under argon, was added triethylamine (0.626 mL, 4.51 mmol). After 5 min of stirring, methanesulfonyl chloride (0.175 mL, 2.26 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 23 h. Then the organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 to 30/70) gave compound **10** as a white solid (67%, 0.356 g). *R_f* = 0.78 (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.28 (m, 2H, ArH), 7.02 – 6.99 (m, 1H, ArH), 6.93 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, ArH), 6.92 – 6.86 (m, 2H, ArH), 4.56 (s, 2H, ArCH₂); 3.79 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.8; 152.0; 143.0; 131.5; 130.0; 122.2; 120.8; 116.7; 113.3; 56.0; 45.8; HRMS (DCI/CH₄, [M]⁺) Calculated for C₁₄H₁₂O₂Cl₂: 282.0214. Found: 282.0216.

***N*-(4-(2-Methoxyphenoxy)benzyl)octan-1-amine (11).**

The product **11** was synthesized as described in the general procedure for reductive amination with compound **1** (158 mg, 0.692 mmol), octylamine (0.115 mL, 0.692 mmol) and sodium borohydride (78.5 mg, 2.076 mmol) to give **11** as a beige solid (quant., 0.250 g). *R_f* = 0.13 (100 % ethyl acetate). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48 – 7.39 (m, 2H, ArH), 7.13 (ddd, *J* = 8.8, 6.2, 2.9 Hz, 1H, ArH), 7.01 – 6.94 (m, 1H, ArH), 6.93 – 6.84 (m, 4H, ArH), 3.92 (s, 2H, ArCH₂), 3.76 (s, 3H), 2.80 – 2.55 (m, 2H, NHCH₂), 1.83 – 1.66 (m, 2H, NHCH₂-CH₂), 1.34 – 1.15 (m,

10H, CH₂ alkyl), 0.89 – 0.76 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.7; 151.5; 143.9; 131.; 125.4; 125.37; 121.6; 121.1; 116.9; 112.8; 55.8; 50.3; 46.2; 31.6; 29.0; 28.97; 26.80; 26.5; 22.4; 14.0; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₂H₃₂NO₂: 342.2433. Found: 342.2436.

***N*-(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)octan-1-amine (12).**

The product **12** was synthesized as described in the general procedure for reductive amination with compound **2** (0.240 g, 0.914 mmol), octylamine (0.118 g, 9.136 mmol) and sodium borohydride (0.104 g, 2.749 mmol) to afford **12** (quant., 343 mg). *R_f* = 0.15 (petroleum ether/ethyl acetate: 6/4). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.29 – 7.20 (m, 2H, ArH); 6.95 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, ArH); 6.89 – 6.83 (m, 4H, ArH); 3.79 (s, 3H, OCH₃); 3.74 (s, 2H, Ar-CH₂); 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, NCH₂); 1.58 – 1.43 (m, 2H, NCH₂-CH₂); 1.35 – 1.18 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.91 – 0.82 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.5; 151.8; 143.9; 134.3; 129.5; 129.4; 121.4; 120.7; 117.1; 113.2; 56.0; 53.1; 49.2; 31.7; 29.7; 29.4; 29.2; 27.2; 22.6; 14.0; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₂H₃₁ClNO₂: 376.2043. Found: 376.2045.

***N*-(3-Methoxy-4-phenoxybenzyl)octan-1-amine (13).**

The product was synthesized as described in the general procedure for reductive amination with 3-methoxy-4-phenoxybenzaldehyde **3** (507 mg, 2.2 mmol), octylamine (287 mg, 2.2 mmol) and sodium borohydride (6.67 mmol) to give **13** as a white solid (quant., 0.756 g). *R_f* = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate: 7/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.69 (s, 1H, CH₂-NH-CH₂); 7.49 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH); 7.31 – 7.23 (m, 2H, ArH); 7.10 – 7.01 (m, 1H, ArH); 6.96 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H, ArH); 6.93 – 6.83 (m, 3H, ArH); 4.02 (s, 2H, Ar-CH₂); 3.91 (s, 3H, OCH₃); 2.83 – 2.68 (m, 2H, NH-CH₂ alkyl); 1.91 – 1.74 (m, 2H, NHCH₂-CH₂ alkyl); 1.40 – 1.12 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.92 – 0.76 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.7; 151.3; 146.2; 129.4; 126.4; 122.9; 122.6; 119.7; 117.7; 114.3; 56.2; 50.3; 45.8; 31.5; 28.9; 28.8; 26.6; 25.9; 22.4; 13.8; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₂H₃₂NO₂: 342.2433. Found: 342.2434.

***N*-(4-Phenoxybenzyl)octan-1-amine (14).**

The product **14** was synthesized as described in the general procedure for reductive amination with commercially available 4-phenoxybenzaldehyde (0.400 g, 2.02 mmol), octylamine (0.261 g, 2.02 mmol) and sodium borohydride (0.229 g, 6.06 mmol) to afford **14** as a lightly yellow oil (quant., 0.628 g). *R_f* = 0.13 (100 % ethyl acetate). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (br, 2H); 7.56 – 7.47 (m, 2H, ArH); 7.35 – 7.27 (m, 2H, ArH); 7.15 – 7.08 (m, 1H, ArH); 7.00 –

6.92 (m, 4H, ArH); 3.97 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-); 2.79 – 2.66 (m, 2H, NH-CH₂); 1.88 – 1.69 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂); 1.38 – 1.13 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.89 – 0.78 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.4; 156.2; 134.7; 129.7; 123.1; 118.9; 118.7; 53.2; 49.2; 31.8; 29.7; 29.5; 29.2; 27.3; 22.6; 14.1; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₁H₃₀NO: 312.2327. Found: 312.2329.

***N,N*-Bis(4-(4-chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)octan-1-amine (15).**

To a solution of compound **8** (150 mg, 0.46 mmol, 2.1 eq) in acetonitrile (10 mL), were added octylamine (30 mg, 0.22 mmol, 1 eq) and K₂CO₃ (95 mg, 0.69 mmol, 3.1 eq). The mixture was stirred overnight at reflux under inert gas (argon). The reaction mixture was concentrated and ethyl acetate was added. The organic solution was washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 80/20) gave compound **15** as a yellow oil (76%, 0.108 g), *R_f* = 0.9 (dichloromethane/methanol: 97/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (m, 4H, ArH); 6.98 (m, 2H, ArH); 6.91 – 6.85 (m, 8H, ArH); 3.83 (s, 6H, 2 OCH₃); 3.50 (s, 4H, 2 ArCH₂); 2.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, NCH₂); 1.25 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.88 (m, 3H CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ 156.5; 152.0; 144.2; 134.5; 130.1; 129.4; 121.5; 120.9; 117.1; 113.4; 57.6; 56.2; 53.4; 31.9; 29.5; 29.4; 27.4; 26.9; 22.8; 14.2; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₃₆H₄₂Cl₂NO₄: 622.2491. Found: 622.2502.

***N,N*-Bis(4-(4-chloro-2-hydroxyphenoxy)benzyl)octan-1-amine (16).**

The product **16** was synthesized as described in the general procedure of demethylation with compound **15** (100 mg, 0.162 mmol) to give **16** as a white powder (95%, 0.090 g). *R_f* = 0.69 (dichloromethane/methanol: 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (m, 4H, ArH); 7.05 (dd, *J* = 1.9 Hz ; 0.8 Hz, 2H, ArH); 6.93 (m, 4H, ArH); 6.79 (m, 4H, ArH); 4.39 (br, 2H, 2 OH); 3.56 (s, 4H, 2 ArHCH₂); 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz , 2H, NCH₂); 1.29 – 1.17 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.87 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.6; 148.3; 142.5; 130.6; 129.5; 120.6; 119.8; 117.8; 116.8; 57.5; 53.4; 32.0; 29.9; 29.5; 29.4; 27.4; 22.8; 14.3; C_q missing. HRMS (DCI-CH₄, [M]⁺) Calculated for C₃₄H₃₇NO₄Cl₂: 593.2100. Found: 593.2098.

***N*-(3-Methoxy-4-phenoxybenzyl)-*N*-(4-(2-methoxyphenoxy)benzyl)octan-1-amine (17).**

Compounds **9** (144 mg, 0.49 mmol) and **11** (167 mg, 0.49 mmol) were dissolved in acetonitrile (10 mL). K₂CO₃ (169 mg, 1.225 mmol) was slowly added and the reaction mixture was stirred at reflux under argon overnight. The solvent was removed *in vacuo* and ethyl acetate was added.

The organic solution was washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 100/0 to 90/10) gave **22** as a colorless oil (40%, 0.109 g). *R_f* = 0.53 (petroleum ether/ethyl acetate with few drops of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31 – 7.24 (m, 4H, ArH); 7.12 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 2.0 Hz, 1H, ArH); 7.07 – 7.00 (m, 2H, ArH); 7.00 – 6.96 (m, 1H, ArH); 6.96 – 6.93 (m, 2H, ArH); 6.93 – 6.86 (m, 6H, ArH); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 3.53 (s, 4H, Ar-CH₂N); 2.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, NCH₂-alkyl); 1.55 – 1.47 (m, 2H, NCH₂CH₂); 1.30 – 1.19 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.91 – 0.81 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.1; 156.7; 151.4; 151.2; 145.3; 143.5; 137.1; 134.0; 129.8; 129.4; 124.6; 122.2; 121.1; 121.0; 120.8; 120.6; 117.0; 113.0; 112.8; 58.0; 57.7; 56.0; 55.9; 53.5; 31.8; 29.4; 29.3; 27.3; 27.0; 22.6; 14.1; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₃₆H₄₄NO₄: 554.3270. Found: 554.3280.

***N*-(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)-*N*-(3-methoxy-4-phenoxybenzyl)octan-1-amine (18).**

Compounds **10** (155 mg, 0.55 mmol) and **13** (187 mg, 0.55 mmol) were solubilized in acetonitrile (10 mL) under argon. K₂CO₃ (1.37 mmol) was slowly added and the reaction mixture was stirred at reflux overnight under argon. The solvent was removed *in vacuo* and ethyl acetate was added. The organic solution was washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification with flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 95/5 to 90/10) gave **19** as a lightly yellow oil (33%, 0.107 g). *R_f* = 0.35 (petroleum ether/ethyl acetate; 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.32 – 7.25 (m, 4H, ArH); 7.07 – 7.04 (m, 1H, ArH); 7.04 – 7.00 (m, 1H, ArH); 6.98 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, ArH); 6.97 – 6.92 (m, 2H, ArH); 6.91 – 6.87 (m, 6H, ArH); 3.83 (s, 3H, OCH₃); 3.83 (s, 3H, OCH₃); 3.53 (s, 4H, Ar-CH₂); 2.50 – 2.37 (m, 2H, NCH₂ alkyl); 1.60 – 1.45 (m, 2H, NCH₂-CH₂ alkyl); 1.33 – 1.23 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.92 – 0.84 (m, 4H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.1; 156.3; 151.8; 151.2; 144.1; 143.5; 137.1; 134.4; 129.9; 129.4; 129.3; 122.2; 121.4; 120.9; 120.8; 120.6; 117.0; 116.9; 113.3; 112.9; 58.0; 57.6; 56.1; 55.9; 53.5; 31.8; 29.4; 29.3; 27.3; 27.0; 22.6; 14.1; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₃₆H₄₃ClNO₄: 588.2881. Found: 558.2882.

***N*-(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)-*N*-(4-phenoxybenzyl)octan-1-amine (19).**

Compounds **8** (142.6 mg, 0.46 mmol) and **14** (150 mg; 0.46 mmol) were dissolved in acetonitrile (10 mL) and K₂CO₃ (158.2 mg, 1.14 mmol) was added. The reaction mixture was

stirred at reflux for 24 h. The solvent was removed *in vacuo* and ethyl acetate was added. The organic solution was washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient (dichloromethane/methanol: 100/0 to 97/3)) gave **19** as a yellow oil (74%, 0.191 g). *R_f* = 0.8 (dichloromethane/methanol: 97/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.32 (m, 6H, ArH); 7.12 (m, 1H, ArH); 7.07 – 6.98 (m, 5H, ArH); 6.96 – 6.92 (m, 4H, ArH); 3.85 (s, 3H, OCH₃); 3.57 (s, 4H, ArCH₂); 2.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, NCH₂ alkyl); 1.64 – 1.27 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.94 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.5; 156.5; 156.0; 151.9; 144.2; 135.0; 134.5; 130.1; 130.0; 129.7; 129.4; 123.1; 121.5; 120.9; 118.7; 117.0; 113.4; 57.7; 56.2; 53.4; 32.0; 29.5; 29.4; 27.4; 27.0; 22.8; 14.2; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₃₅H₄₁ClNO₃: 558.2775. Found: 558.2770.

***N*-(3-Methoxy-4-phenoxybenzyl)-*N*-(4-phenoxybenzyl)octan-1-amine (20).**

To a solution of compound **14** (95.6 mg, 0.3 mmol) dissolved in acetonitrile (10 mL), compound **9** (90.2 mg, 0.3 mmol) and K₂CO₃ (106 mg, 0.76 mmol) were added. The mixture was refluxed for 21 h under argon. The solvent was removed *in vacuo*, ethyl acetate was added, and the organic mixture was washed with water (3X) and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether with 0.5 % ammonia solution/ethyl acetate: 100/0 to 80/20) gave **20** as a yellow oil (97%, 154.6 mg). *R_f* = 0.37 (petroleum ether/ethyl acetate with few drops of ammonia solution; 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.27 (m, 6H, ArH); 7.17 – 7.09 (m, 2H, ArH); 7.08 – 7.01 (m, 4H, ArH); 7.01 – 6.98 (m, 2H, ArH); 6.98 – 6.93 (m, 3H, ArH); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 3.60 (s, 4H, Ar-CH₂-N); 2.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂ alkyl); 1.67 – 1.52 (m, 2H, NHCH₂-CH₂); 1.42 – 1.23 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.99 – 0.87 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.1; 157.4; 155.9; 151.2; 143.5; 137.0; 134.8; 130.0; 129.6; 129.4; 123.0; 122.2; 120.9; 120.6; 118.64; 118.59; 117.0; 112.9; 58.0; 57.7; 55.8; 53.5; 31.8; 29.4; 29.3; 27.3; 27.0; 22.6; 14.1; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₃₅H₄₂NO₃: 524.3165. Found: 524.3158.

5-(((4-(2-Hydroxyphenoxy)benzyl)(octyl)amino)methyl)-2-phenoxyphenol (21).

To a solution of compound **17** (100 mg, 0.18 mmol) in dry dichloromethane, boron tribromide (0.54 mL, 0.54 mmol) was slowly added at -80 °C under argon. The reaction mixture was stirred at -80 °C for 1 h then for 4 h at room temperature. The reaction was quenched with cold water at 4 °C followed by a saturated NaHCO₃ (aq) solution. The aqueous solution was extracted with dichloromethane (3 ×). Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient

dichloromethane/methanol/ammonia solution: 99.5/0/0.5 to 95/5) gave **21** as a lightly yellow oil (71%, 0.068 g). $R_f = 0.22$ (dichloromethane/methanol: 97/3 with few drops of ammonia solution). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.38 – 7.29 (m, 4H, ArH), 7.14 – 7.07 (m, 2H, ArH), 7.05 – 7.01 (m, 3H, ArH), 7.01 – 6.94 (m, 3H, ArH), 6.90 – 6.79 (m, 4H, ArH), 3.53 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.49 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.49 – 2.36 (m, 2H, NCH_2), 1.60 – 1.43 (m, 2H, CH_2 alkyl), 1.35 – 1.13 (m, 10H, CH_2 alkyl), 0.93 – 0.82 (m, 3H, CH_3 alkyl); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.0; 155.5; 147.4; 147.2; 143.7; 142.0; 137.0; 135.3; 130.1; 129.8; 124.5; 123.4; 120.7; 120.5; 118.7; 118.6; 117.7; 116.3; 116.1; 57.7; 57.6; 53.4; 31.9; 29.4; 29.3; 27.3; 26.9; 22.6; 14.1; HRMS (ESI, $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{NO}_4$: 526.2957. Found: 526.2957.

5-Chloro-2-(4-(((3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)(octyl)amino)methyl)phenoxy)phenol (22).

The product **22** was synthesized as described in the procedure of demethylation with compound **18** (100 mg, 0.17 mmol). Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 95/5 to 90/10) gave compound **22** as a brown oil (92%, 0.090 g). $R_f = 0.69$ (petroleum ether/ethyl acetate: 7/3). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.27 (m, 4H, ArH); 7.14 – 7.03 (m, 3H, ArH); 7.02 – 6.96 (m, 2H, ArH); 6.93 – 6.88 (m, 2H, ArH); 6.83 – 6.77 (m, 4H, ArH); 3.64 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.61 (s, 2H, Ar- CH_2); 2.62 – 2.41 (m, 2H, NCH_2); 1.65 – 1.45 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{-CH}_2$ alkyl); 1.29 – 1.16 (m, 10H, CH_2 alkyl); 0.93 – 0.81 (m, 3H, CH_3 alkyl); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 156.8; 156.1; 148.6; 147.5; 142.9; 142.2; 133.9; 132.4; 130.8; 129.8; 129.5; 123.5; 121.2; 120.3; 120.1; 118.8; 117.9; 117.4; 117.0; 116.8; 57.1; 57.0; 52.1; 31.8; 29.3; 29.2; 27.1; 25.9; 22.6; 14.1; HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{ClNO}_4$: 560.2568. Found: 560.2574.

5-Chloro-2-(4-((octyl(4-phenoxybenzyl)amino)methyl)phenoxy)phenol (23).

The product **23** was synthesized as described in the general procedure of demethylation with compound **19** (180 mg, 0.322 mmol) solubilized in $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{HBr}$ 48% (1.5/1.5 mL). Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5) gave compound **23** as a viscous brown oil (quant., 0.210 g). $R_f = 0.66$ (dichloromethane/methanol: 9/1). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (br, 1H, OH); 7.44 – 7.38 (m, 2H, ArH); 7.37 – 7.30 (m, 4H, ArH); 7.15 – 7.08 (m, 2H, ArH); 7.04 – 6.98 (m, 2H, ArH); 6.98 – 6.92 (m, 2H, ArH); 6.89 – 6.84 (m, 2H, ArH); 6.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH); 6.76 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H, ArH); 3.84 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.81 (s, 2H, Ar- CH_2); 2.72 – 2.54 (m, 2H, NCH_2 alkyl); 1.74 – 1.57 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{-CH}_2$ alkyl); 1.25 – 1.14 (m, 10H, CH_2 alkyl); 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 alkyl); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.5; 157.1; 156.7; 149.0; 141.9;

131.5; 129.9; 129.8; 123.7; 120.9; 120.4; 119.3; 118.6; 117.4; 117.2; 56.8; 52.2; 31.8; 29.8; 29.2; 27.1; 25.3; 22.7; 14.2; C_q missing; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₃₄H₃₉ClNO₃: 544.2618. Found: 544.2600.

5-((Octyl(4-phenoxybenzyl)amino)methyl)-2-phenoxyphenol (24).

The product **24** was synthesized as described in the general procedure of demethylation with compound **20** (91.4 mg, 0.175 mmol) solubilized in CH₃COOH/HBr 48% (1/1 mL). Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 96/4) gave compound **24** as a yellow oil (43%, 44.7 mg). *R_f* = 0.26 (dichloromethane/methanol; 97/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.37 – 7.27 (m, 6H, ArH); 7.15 – 7.05 (m, 3H, ArH); 7.04 – 6.91 (m, 6H, ArH); 6.87 – 6.78 (m, 2H, ArH); 3.53 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 3.50 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 2.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, NHCH₂); 1.58 – 1.44 (m, 2H, NHCH₂-CH₂); 1.36 – 1.16 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.94 – 0.80 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.5; 157.0; 155.9; 147.2; 142.0; 137.1; 134.9; 130.0; 129.8; 129.6; 123.4; 123.0; 120.8; 118.66; 118.65; 118.60; 117.8; 116.3; 57.75; 57.66; 53.34; 31.9; 29.5; 29.3; 27.3; 26.9; 22.6; 14.1; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₃₄H₄₀NO₃: 510.3008. Found: 510.3008.

5-((Octylamino)methyl)-2-phenoxyphenol (25).

To a solution of compound **13** (104 mg, 0.29 mmol) dissolved in dichloromethane (25 mL), boron tribromide (0.87 mL, 0.87 mmol) was added drop wise at -80 °C under argon. The reaction mixture was stirred at this temperature for 1 h and then was gradually warmed to room temperature and stirred for 4 h. Cold water (10 mL) was added at 4 °C followed by addition of a saturated water solution of NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (2×) and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give compound **25** as a beige powder (99%, 0.099 g). *R_f* = 0.37 (dichloromethane/methanol: 9/1 with a drop of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.33 – 7.25 (m, 2H, ArH); 7.10 – 7.01 (m, 1H, ArH); 6.97 – 6.89 (m, 3H, ArH); 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH); 6.69 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, ArH); 5.14 (br, 1H); 3.67 (br, 1H); 2.66 – 2.55 (m, 2H, Ar-CH₂-NH); 1.54 – 1.41 (m, 2H, -NH-CH₂-alkyl); 1.32 – 1.17 (m, 10H, CH₂ alkyl); 0.94 – 0.80 (m, 3H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.3; 148.3; 142.8; 136.2; 129.7; 123.0; 120.1; 119.5; 117.5; 117.2; 53.2; 49.1; 31.8; 29.5; 29.4; 29.2; 27.3; 22.6; 14.1; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₁H₃₀NO₂: 328.2271. Found: 328.228545.

***N*-(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)-*N*-octyloctan-1-amine (26).**

Compound **12** (100 mg, 0.27 mmol) and 1-bromooctane (51 mg, 0.27 mmol) were dissolved in acetonitrile (10 mL). Then K₂CO₃ (93 mg, 0.66 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred at reflux for 22 h. The solvent was removed *in vacuo* and ethyl acetate was added. The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5) gave **26** as a yellow oil (44%, 0.057 g). *R_f* = 0.29 (dichloromethane/methanol: 97/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28 – 7.22 (m, 2H, ArH); 7.00 – 6.96 (m, 1H, ArH); 6.91 – 6.84 (m, 4H, ArH); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 3.51 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 2.44 – 2.31 (m, 4H, N-CH₂-alkyl); 1.52 – 1.38 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 1.30 – 1.19 (m, 20H, CH₂); 0.95 – 0.81 (m, 6H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.1; 151.7; 144.3; 130.0; 129.2; 121.2; 120.8; 117.0; 113.3; 57.9; 56.1; 53.6; 31.8; 29.5; 29.3; 27.4; 26.9; 22.6; 14.1; C_q missing; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₃₀H₄₇ClNO₂: 488.3295. Found: 488.3283.

5-Chloro-2-(4-((dioctylamino)methyl)phenoxy)phenol (27).

The product **27** was synthesized as described in the general procedure of demethylation with compound **26** (57 mg, 0.116 mmol). Filtration on silica (dichloromethane/methanol: 9/1) gave **27** as a brown oil (95%, 0.062 g). *R_f* = 0.5 (dichloromethane/methanol: 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.08 (br, 1H, OH); 7.22 – 7.15 (m, 2H, ArH); 7.09 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH); 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH); 6.83 – 6.78 (m, 2H, ArH); 6.76 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H); 3.95 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 2.86 – 2.66 (m, 4H, N-CH₂-alkyl); 1.71 – 1.50 (m, 4H N-CH₂-CH₂-alkyl); 1.32 – 1.13 (m, 20H, CH₂ alkyl); 0.96 – 0.78 (m, 6H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.3; 149.2; 142.4; 130.9; 129.6; 120.3; 119.9; 117.3; 117.2; 57.1; 52.9; 31.8; 29.3; 29.2; 27.2; 22.6; 14.1; C_q missing; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₂₉H₄₅ClNO₂: 474.3139. Found: 474.3126.

3-Methoxy-4-phenoxybenzotrile (28).

A solution of phenol (0.564 g, 6 mmol), 4-fluoro-3-methoxybenzotrile (0.756 g, 5 mmol) and K₂CO₃ (0.829 g, 6 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide was heated at 120 °C and stirred overnight. The reaction mixture was concentrated and the resulting residue was diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 9/1) gave **28** as a white solid (1.121g, 82%). *R_f* = 0.44 (petroleum ether/ ethyl

acetate: 9/1). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.33 (m, 2H, ArH); 7.23 – 7.14 (m, 3H, ArH); 7.05 – 6.98 (m, 2H, ArH); 6.88 – 6.83 (m, 1H, ArH); 3.91 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.6; 150.65; 150.61; 130.0; 125.9; 124.4; 119.1; 118.8; 118.6; 106.7; 115.5; 56.2; HRMS (DCI-CH_4 , $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_2$: 226.0868. Found: 226.0873.

(3-Methoxy-4-phenoxyphenyl)methanamine (29).

To a solution of compound **28** (207 mg, 0.92 mmol) solubilized in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) under inert gas (argon), LiAlH_4 (2 mL, 4.8 mmol) was added dropwise at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. The mixture was stirred 1 h at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ then overnight at room temperature. The reaction was neutralized with addition of water, in ice bath. The solvent was then removed *in vacuo* and ethyl acetate was added. The organic phase was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give **29** as a yellowish oil (98 %, 0.206 mg). R_f = 0.55 (dichloromethane/methanol: 9/1 with few drops of ammonia solution). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.30 – 7.21 (m, 2H, ArH); 7.04 – 6.97 (m, 2H, ArH); 6.94 – 6.89 (m, 3H, ArH); 6.86 – 6.79 (m, 1H, ArH); 3.84 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 1.97 (b, 2H, NH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.9; 151.4; 143.6; 139.6; 129.3; 122.2; 121.0; 119.4; 116.8; 111.7; 55.8; 46.0; HRMS (DCI-CH_4 , $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2$: 230.1181. Found: 230.1178.

(4-Phenoxyphenyl)methanamine (30).

The product **30** was synthesized as described for compound **29** [28]. Briefly, to a solution of LiAlH_4 (187 mg, 5.2 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL), was added 4-phenoxybenzotrile (500 mg, 2.6 mmol) at $4\text{ }^\circ\text{C}$. After 18 h of stirring, water (10 mL) was added and the mixture was stirred for another 45 minutes. The mixture was filtered, concentrated under vacuum, and then ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give compound **32** as a yellowish powder (100%, 0,513 g). (R_f = 0.17 dichloromethane/methanol: 90/10 with few drops of ammonia solution). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.28 (m, 3H); 7.28 – 7.25 (m, 1H, ArH); 7.13 – 7.05 (m, 1H, ArH); 7.04 – 6.96 (m, 4H, ArH); 3.84 (s, 2H, Ar- CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.3; 155.8; 138.2; 129.5; 128.3; 122.9; 118.9; 118.5; 45.7. NMR data are in agreement with those already reported in the literature [28].

***N*-(3-Methoxy-4-phenoxybenzyl)-1-(4-phenoxyphenyl)methanamine (31).**

To a solution of compound **29** (150 mg, 0.654 mmol) solubilized in anhydrous dichloromethane (10 mL) with molecular sieves (4 Å) under inert gas (argon), 4-phenoxybenzaldehyde (115 µL, 0.654 mmol) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature, filtered, and evaporated under reduced pressure. The resulting dried imine compound was dissolved in methanol/ethanol (1:1, 10 mL) and reduced with sodium borohydride (120 mg, 3.17 mmol) for 5 h. Saturated aqueous solution of NH₄Cl was added to neutralize residual sodium borohydride. The mixture was extracted with ethyl acetate and combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 100/0 to 70-30) gave **31** as a yellowish oil (73 %, 0.197 g). *R_f* = 0.08 (petroleum ether/ethyl acetate: 7/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.28 (m, 6H, ArH); 7.16 – 7.09 (m, 1H, ArH); 7.09 – 7.01 (m, 6H, ArH); 7.01 – 6.96 (m, 3H, ArH), 6.92 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, ArH); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 3.85 (s, 4H, Ar-CH₂); 2.07 (br, 1H, NH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.0; 157.3; 156.0; 151.3; 143.7; 137.0; 135.0; 129.6; 129.4; 129.3; 123.0; 122.2; 120.8; 120.5; 118.8; 118.6; 116.9; 112.5; 55.8; 52.8; 52.5; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₂₇H₂₆NO₃: 412.1913. Found: 412.1903.

***N*-(4-(4-Chloro-2-methoxyphenoxy)benzyl)-1-(4-phenoxyphenyl)methanamine (32).**

Compounds **2** (131 mg, 0.5 mmol) and **30** (100 mg, 0.5 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (20 mL) in the presence of molecular sieves (4 Å). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. Molecular sieves were filtered and the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in methanol/ethanol (1:1, 20 mL) and NaBH₄ (57 mg, 1.5 mmol) was added. After 2 h, NH₄Cl_{sat} was added and the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (3×) and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane (0.5 % of ammonia solution)/methanol: 100/0 to 92:8) gave compound **32** as a lightly yellow oil (39%, 0.086 g). *R_f* = 0.76 (dichloromethane with few drops of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.26 (m, 6H, ArH); 7.13 – 7.06 (m, 1H, ArH); 7.03 – 6.95 (m, 5H, ArH); 6.93 – 6.85 (m, 4H, ArH); 3.83 (s, 3H, OCH₃); 3.79 (s, 2H, CH₂); 3.78 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.4; 156.5; 156.1; 151.8; 144.0; 135.2; 134.7; 129.7; 129.5; 129.4; 123.0; 121.4; 120.8; 118.9; 118.6; 117.2; 113.3; 26.1; 52.6; 52.5; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₇H₂₅ClNO₃: 446.1523. Found: 446.1522.

2-Phenoxy-5-(((4-phenoxybenzyl)amino)methyl)phenol (33).

To a solution of **31** (157 mg, 0.382 mmol) solubilized in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL), boron tribromide (1.5 mL, 1.5 mmol) was added drop wise at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ under inert gas (argon). The mixture was stirred for 5 h followed by the addition of cold methanol (5 mL) to neutralize the reaction. The solvent was removed *in vacuo*, followed by 3 extractions with ethyl acetate and saturated solution of NaHCO_3 . Combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated at reduced pressure. Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 90/10) gave **33** as a brown solid (92 %, 0.140 g). $R_f = 0.41$ (dichloromethane/methanol: 9/1). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.26 (m, 6H, ArH); 7.14 – 7.04 (m, 2H, ArH); 7.03 – 7.00 (m, 2H, ArH); 7.00 – 6.96 (m, 3H, ArH); 6.96 – 6.93 (m, 2H, ArH); 6.83 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH); 6.77 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, ArH); 4.65 (br, 2H); 3.79 (s, 2H, Ar- CH_2); 3.74 (s, 2H, Ar- CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.2; 157.1; 156.3; 148.0; 142.7; 135.9; 133.8; 129.8; 129.7; 129.67; 123.1; 120.2; 119.4; 118.8; 118.75; 117.6; 116.8; 52.1; 52.0; HRMS (DCI- CH_4) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{NO}_3$: 398.1756. Found: 398.1769.

5-Chloro-2-(4-(((4-phenoxybenzyl)amino)methyl)phenoxy)phenol (34).

The product **34** was synthesized as described previously with compound **30** (80 mg, 0.171 mmol) to give **34** as a lightly brown oil (quant., 0.075 g). $R_f = 0.4$ (dichloromethane/methanol with a drop of ammonia solution). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.38 – 7.29 (m, 2H, ArH); 7.29 – 7.23 (m, 2H, ArH); 7.23 – 7.15 (m, 2H, ArH); 7.14 – 7.07 (m, 1H, ArH); 7.02 (m, 1H, ArH); 7.00 – 6.93 (m, 4H, ArH); 6.82 – 6.73 (m, 4H, ArH); 4.65 (s, 1H, NH); 3.79 (s, 2H, CH_2); 3.73 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.2; 156.4; 156.2; 149.3; 142.3; 134.0; 133.9; 129.9; 129.8; 127.7; 129.6; 123.2; 120.6; 120.0; 118.9; 118.8; 117.5; 117.2; 52.5; 52.2; HRMS (ESI, $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{ClNO}_3$: 432.1366. Found: 442.1369.

4-(4-Formylphenoxy)-3-methoxybenzaldehyde (35).

The product **35** was synthesized as described previously. Briefly, to a solution of vanilline (5.93 g, 39 mmol) dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (70 mL), were added K_2CO_3 (10.78 g, 78 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (6.28 mL, 58.5 mmol). The solution was heated to $120\text{ }^\circ\text{C}$ overnight and then the solvent was removed *in vacuo*. The mixture was dissolved with EtOAc and washed with H_2O and brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated at reduced pressure to give **35** as a beige solid compound (92%, 9.27 g). $R_f = 0.48$ (petroleum

ether/EtOAc; 7/3). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.96 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.57 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.11 – 7.00 (m, 2H), 3.89 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.7; 190.6; 162.0; 151.9; 148.9; 134.1; 131.9; 131.8; 125.3; 121.4; 117.3; 111.2; 56.0; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₁₅H₁₃O₄: 257.0814. Found: 257.0821.

***N*-Benzyl-1-(4-(4-((benzylamino)methyl)-2-methoxyphenoxy)phenyl)methanamine (36).**

The product **36** was synthesized as described previously. Briefly, to a solution of compound **35** (100 mg, 0.39 mmol) dissolved in dichloromethane (30 mL), benzylamine (85 μL, 0.78 mmol) was added. This mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated and ethanol/methanol (1:1, 20 mL) was added followed by sodium borohydride (44.3 mg, 1.17 mmol) at 4 °C. The reaction was stirred 24 h at room temperature. The solvent was then removed *in vacuo* and the mixture was dissolved with dichloromethane. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ solution and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 91/10) gave **36** as a yellow oil (46%, 78.6 mg). *R_f* = 0.39 (Petroleum ether/ethyl acetate: 6/4 with few drops of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.35 (m, 8H, ArH); 7.32 – 7.27 (m, 4H, ArH); 7.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH); 6.99 – 6.94 (m, 3H, ArH); 6.91 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, ArH); 3.87 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 3.84 (s, 4H, NH-CH₂); 3.79 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.9; 151.2; 143.8; 140.08; 140.02; 136.9; 134.1; 129.2; 128.3; 128.2; 128.01; 127.98; 126.85; 126.77; 120.6; 120.4; 116.9; 112.5; 55.8; 53.1; 52.9; 52.8; 52.4; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₂₉H₃₁N₂O₂: 439.2386. Found: 439.2357

***N*-(4-(2-Methoxy-4-((octylamino)methyl)phenoxy)octan-1-amine (37)**

Compound **35** (100 mg, 0.39 mmol), octylamine (130 μL, 0.78 mmol) and sodium borohydride (44.3 mg, 1.17 mmol) were used to give **37** as an orange oil (100%, 188.2 mg). *R_f* = 0.45 (petroleum ether/ethyl acetate: 6/4 with few drops of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.23 – 7.16 (m, 2H, ArH); 6.98 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH); 6.89 – 6.83 (m, 3H, ArH); 6.80 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, ArH); 3.79 (s, 3H, OCH₃); 3.74 (s, 2H, ArCH₂); 3.69 (s, 2H, ArCH₂); 2.60 (dt, *J* = 10.6, 7.2 Hz, 4H, NCH₂); 1.54 – 1.40 (m, 4H, NCH₂-CH₂); 1.34 – 1.19 (m, 20H, CH₂ alkyl); 0.90 – 0.80 (m, 6H, CH₃ alkyl); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.8; 151.1; 143.8; 137.1; 134.2; 129.1; 120.5; 120.3; 116.8; 112.4; 55.7; 53.7; 53.3; 49.4; 49.3; 31.7;

29.9; 29.8; 29.4; 29.1; 27.2; 22.5; 13.4; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₃₁H₅₁N₂O₂: 483.3951. Found: 483.3930.

5-((benzylamino)methyl)-2-(4-((benzylamino)methyl)phenoxy)phenol (38).

The product **38** was synthesized as described previously. Briefly, to a solution of compound **35** (78.6 mg, 0.18 mmol) dissolved in anhydrous dichloromethane (25 mL), boron tribromide (0.54 mL, 0.54 mmol) was added dropwise at -80 °C under argon. The mixture was stirred at the same temperature for 1 h, then warmed to room temperature for 4 h. Cold water (10 mL) was added and the solution was extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give **38** as a beige oil (78%, 62 mg). *R_f* = 0.31 (dichloromethane/methanol with a drop of ammonia solution; 90/10). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 7.37 – 7.23 (m, 12H, ArH); 6.96 (s, 1H, ArH); 6.94 – 6.88 (m, 2H, ArH); 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH); 6.77 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, ArH); 3.81 (d, *J* = 1.3 Hz, 4H, NH-CH₂ alkyl); 3.76 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 3.73 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 2.66 (br, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.2; 147.9; 142.5; 139.9; 139.8; 136.9; 134.8; 129.7; 128.44; 128.41; 128.2; 127.1; 127.0; 120.1; 119.3; 117.5; 116.3; 53.1; 53.0; 52.5; 52.3; HRMS (ESI, [M+H]⁺) Calculated for C₂₈H₂₉N₂O₂: 425.2229. Found: 425.2226.

5-((octylamino)methyl)-2-(4-((octylamino)methyl)phenoxy)phenol (39).

The product **39** was synthesized as described previously for compound **38**. Compound **37** (188.2 mg, 0.39 mmol) and boron tribromide (1.17 mL, 1.17 mmol) were used to give **39** as a yellow oil (90%, 182.8 mg). *R_f* = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate: 6/4 with few drops of ammonia solution). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.20 – 7.13 (m, 2H); 6.82 – 6.75 (m, 3H); 6.73 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); 6.66 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H); 4.42 – 4.16 (m, 3H); 3.68 (s, 2H); 3.62 (s, 2H); 2.59 (td, *J* = 7.3, 3.2 Hz, 4H); 1.56 – 1.40 (m, 4H); 1.35 – 1.18 (m, 20H); 0.94 – 0.76 (m, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.9; 149.3; 142.7; 136.6; 133.5; 129.7; 120.3; 119.5; 117.6; 116.9; 74.5; 53.18; 53.12; 49.3; 49.0; 31.76; 31.75; 29.5; 29.46; 29.43; 29.40; 29.20; 29.18; 27.28; 27.26; 22.6; 14.0; HRMS (DCI-CH₄, [M+H]⁺) Calculated for C₃₀H₄₉N₂O₂: 469.3794. Found: 469.3782.

4.5. Preparation and evaluation of inhibition of *InhA*

All experiments were carried out as recently described [22].

4.6. Crystallization and structure determination

To obtain crystals of the *InhA*/NAD⁺/**21** complex, cleaved *InhA* (in 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8) was incubated at 8 mg mL⁻¹ with 5.6 mM NAD⁺ for 1 h at 4 °C (corresponding to a protein/NAD⁺ ratio of 1:20) followed by 4 h incubation with compound **21** at a final concentration of 28 mM (corresponding to a protein/ligand ratio of 1:100) and 5.6% DMSO. Crystallization assays were performed using the vapor diffusion method by mixing, with the help of a Mosquito crystallization robot (SPT Labtech, Melbourn, UK), 200 nL of *InhA* previously incubated with NAD⁺ and compound **21** with 200 nL of reservoir containing 14% (w/v) PEG 4000, 100 mM ADA (*N*-2(acetamido)iminodiacetic acid), 100 mM ammonium acetate, 5 % (v/v) DMSO, pH 6.8. Crystals were obtained within a few days at 22 °C. These crystals were cryoprotected with glycerol before being flash frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the ESRF beamline ID30B [32] and processed with autoProc [33] and XDS [34] (**Table 3**). The structure was solved by molecular replacement with MOLREP [35] using the A chain of PDB 4TRO as template. Refinement was performed using Buster/TNT [36]. The dictionary for compound **21** (5-(((4-(2-hydroxyphenoxy)benzyl)(octyl)amino)methyl)-2-phenoxyphenol) was generated using Grade2 [37] and used in Coot (0.9.8.1) for model building [38].

Hydrogen bonds and non-bonded contacts between *InhA* and ligands were analysed using the LigPlot⁺ program [25].

Table 3. Crystallographic data for the InhA/NAD⁺/21 structure.

PDB code		8OTL	
Data Collection and processing			
Beamline		ESRF, ID30B	
Space group		C222 ₁	
Cell parameters			
<i>a, b, c</i> (Å)		80.85, 100.88, 376.07	
α, β, γ (°)		90.00, 90.00, 90.00	
Resolution range (Å)	62.22 – 2.11	62.22 – 5.72	2.14 – 2.11
No. observations	752,360	38,030	38,601
No. reflections	84,677	4,652	4,438
Multiplicity	8.9	8.2	8.7
Completeness (%)	95.0	98.3	99.2
$\langle I/\sigma \rangle$	9.7	22.1	2.4
R _{merge}	0.165	0.063	0.877
R _{pim}	0.058	0.031	0.310
CC(1/2)	0.996	0.998	0.673
Structure refinement			
Resolution range (Å)		30.65 – 2.11	
No. reflections (work/test)		80,266 / 4,373	
Rwork/Rfree		0.1998 / 0.2373	
No. non-H atoms			
Protein		11,603	
Cofactor		264	
Ligand		47	
Solvent		496	
Average B factors (Å²)			
Overall		31.57	
Protein		31.42	
Cofactor		27.63	
Ligand		33.60	
Solvent		36.83	
Model quality			
Rms deviation			
Bond lengths (Å)		0.0075	
Bond angles (°)		0.94	
Ramachandran plot			
Most favoured (%)		96.36	
Allowed/outliers (%)		3.26 0.38	

4.7. Inhibition of *Mtb* growth

Mycobacterium tuberculosis H37Rv reference strain was used. It was cultivated at 37 °C in Middlebrook 7H9 (liquid medium, Difco - Becton Dickinson), supplemented with 0.05% v/v Tween-80 (Sigma-Aldrich) or on Middlebrook 7H10, both supplemented with 0.2% v/v glycerol (Sigma-Aldrich) and 10% Middlebrook OADC enrichment (Difco - Becton Dickinson). All the tested compounds were dissolved in DMSO (Sigma Aldrich), instead Streptomycin (Duchefa Biochemie), used as control, was dissolved in water. Experiments

performed with Mtb strain were conducted in the BLS3 safety laboratory by authorized researchers.

The minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of the compounds against Mtb H37Rv strain was established using the REMA method [39]. Mtb H37Rv cultures in exponential phase of growth were diluted to concentrations of about 10⁵ bacteria/mL. 100 µL of bacterial suspensions were added to each 96-well black plate (Fluoronunc, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) containing 100 µL of Middlebrook 7H9 in the absence of Tween 80 and in the presence of a serial two-fold dilution of the tested compounds. A positive growth control and a negative control without inoculum were also included. After 7 days of incubation at 37°C, 10 µL of resazurin (0.025% w/v) was added to each well. Then, after an additional night of incubation, bacterial viability was assessed using a FluoroskanTM Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; excitation = 544 nm, emission = 590 nm). Finally, bacterial viability was measured as the percentage of resazurin turnover in the absence of the compound. Experiments were performed in duplicate at least twice.

Acknowledgments

We thank the staff of the mass spectrometry service, Institut de Chimie de Toulouse ICT-UAR 2599 (Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France, <https://ict.cnrs.fr>) for his help with chemical analyses. We thank the scientific staff of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France), SOLEIL (Gif sur Yvette, France) and ALBA (Barcelona, Spain). We particularly thank the staff of beamline ID30B at the European Synchrotron Radiation Facility, where the crystallographic experiments were conducted. We thank Valérie Guillet for managing synchrotron radiation trips. The crystallization and macromolecular crystallography equipment used in this study are part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA, <http://www.pict.ipbs.fr>).

Funding

We thank the Université de Toulouse, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), and CNRS for financial support. Rasoul Tamhaev thanks the Région Occitanie and the Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées (UFTMiP) for a PhD grant. This project has received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-23-CE44-0002) to C.L. and L.Mo. This research was partially supported by EU funding within the NextGenerationEU-MUR PNRR Extended Partnership initiative on Emerging Infectious Diseases (Project no. PE00000007, INF-ACT) to M.R.P.

References

- [1] WHO, Global Tuberculosis Report 2022, World Health Organization, Geneva, 2022.
- [2] D.T. Hoagland, J. Liu, R.B. Lee, R.E. Lee, New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 102 (2016) 55-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>.
- [3] C. Vilcheze, H.R. Morbidoni, T.R. Weisbrod, H. Iwamoto, M. Kuo, J.C. Sacchettini, W.R. Jacobs, Jr., Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 4059-67. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.14.4059-4067.2000>.
- [4] A. Bhatt, V. Molle, G.S. Besra, W.R. Jacobs, Jr., L. Kremer, The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development, *Mol. Microbiol.* 64 (2007) 1442-54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x>.
- [5] A. Chollet, L. Mourey, C. Lherbet, A. Delbot, S. Julien, M. Baltas, J. Bernadou, G. Pratviel, L. Maveyraud, V. Bernardes-Genisson, Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (*InhA*) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach, *J. Struct. Biol.* 190 (2015) 328-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.008>.
- [6] D.A. Rozwarski, C. Vilchèze, M. Sugantino, R. Bittman, J.C. Sacchettini, Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, *InhA*, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15582-9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15582>.
- [7] J.N. Torres, L.V. Paul, T.C. Rodwell, T.C. Victor, A.M. Amallraja, A. Elghraoui, A.P. Goodmanson, S.M. Ramirez-Busby, A. Chawla, V. Zadorozhny, E.M. Streicher, F.A. Sirgel, D. Catanzaro, C. Rodrigues, M.T. Gler, V. Crudu, A. Catanzaro, F. Valafar, Novel *katG* mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates, *Emerg. Microbes Infect.* 4 (2015) e42. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2015.42>.
- [8] A. Chollet, L. Maveyraud, C. Lherbet, V. Bernardes-Genisson, An overview on crystal structures of *InhA* protein: Apo-form, in complex with its natural ligands and inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 146 (2018) 318-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047>.
- [9] C.W. am Ende, S.E. Knudson, N. Liu, J. Childs, T.J. Sullivan, M. Boyne, H. Xu, Y. Gegina, D.L. Knudson, F. Johnson, C.A. Peloquin, R.A. Slayden, P.J. Tonge, Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether *InhA* inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 3029-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.04.038>.
- [10] M.E. Boyne, T.J. Sullivan, C.W. am Ende, H. Lu, V. Gruppo, D. Heaslip, A.G. Amin, D. Chatterjee, A. Lenaerts, P.J. Tonge, R.A. Slayden, Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*: evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity *InhA* inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 3562-7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00383-07>.
- [11] J.S. Freundlich, F. Wang, C. Vilchèze, G. Gulten, R. Langley, G.A. Schiehsler, D.P. Jacobus, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *ChemMedChem* 4 (2009) 241-248. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.200800261>.
- [12] S.R. Luckner, N. Liu, C.W. am Ende, P.J. Tonge, C. Kisker, A slow, tight binding inhibitor of *InhA*, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 14330-7. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.090373>.
- [13] P. Pan, S.E. Knudson, G.R. Bommineni, H.J. Li, C.T. Lai, N. Liu, M. Garcia-Diaz, C. Simmerling, S.S. Patil, R.A. Slayden, P.J. Tonge, Time-dependent diaryl ether inhibitors of

- InhA: structure-activity relationship studies of enzyme inhibition, antibacterial activity, and *in vivo* efficacy, *ChemMedChem* 9 (2014) 776-91. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300429>.
- [14] T.J. Sullivan, J.J. Truglio, M.E. Boyne, P. Novichenok, X. Zhang, C.F. Stratton, H.J. Li, T. Kaur, A. Amin, F. Johnson, R.A. Slayden, C. Kisker, P.J. Tonge, High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *ACS Chem. Biol.* 1 (2006) 43-53. <http://dx.doi.org/10.1021/cb0500042>.
- [15] M. Sabbah, V. Mendes, R.G. Vistal, D.M.G. Dias, M. Zahorszka, K. Mikusova, J. Kordulakova, A.G. Coyne, T.L. Blundell, C. Abell, Fragment-Based Design of *Mycobacterium tuberculosis* InhA Inhibitors, *J. Med. Chem.* 63 (2020) 4749-4761. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00007>.
- [16] P.S. Shirude, P. Madhavapeddi, M. Naik, K. Murugan, V. Shinde, R. Nandishaiah, J. Bhat, A. Kumar, S. Hameed, G. Holdgate, G. Davies, H. McMiken, N. Hegde, A. Ambady, J. Venkatraman, M. Panda, B. Bandodkar, V.K. Sambandamurthy, J.A. Read, Methyl-thiazoles: a novel mode of inhibition with the potential to develop novel inhibitors targeting InhA in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 8533-42. <http://dx.doi.org/10.1021/jm4012033>.
- [17] M.R. Kuo, H.R. Morbidoni, D. Alland, S.F. Sneddon, B.B. Gourlie, M.M. Staveski, M. Leonard, J.S. Gregory, A.D. Janjigian, C. Yee, J.M. Musser, B. Kreiswirth, H. Iwamoto, R. Perozzo, W.R. Jacobs, Jr., J.C. Sacchettini, D.A. Fidock, Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of Enoyl reductase: compound activity and structural data, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 20851-9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211968200>.
- [18] F. Rodriguez, N. Saffon, J.C. Sammartino, G. Degiacomi, M.R. Pasca, C. Lherbet, First triclosan-based macrocyclic inhibitors of InhA enzyme, *Bioorg. Chem.* 95 (2020). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103498>.
- [19] T. Armstrong, M. Lamont, A. Lanne, L.J. Alderwick, N.R. Thomas, Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* InhA: Design, synthesis and evaluation of new di-triclosan derivatives, *Bioorganic & medicinal chemistry* 28 (2020) 115744. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115744>.
- [20] S. Chetty, T. Armstrong, S. Sharma Kharkwal, W.C. Drewe, C.I. De Matteis, D. Evangelopoulos, S. Bhakta, N.R. Thomas, New InhA inhibitors based on expanded triclosan and di-triclosan analogues to develop a new treatment for tuberculosis, *Pharmaceuticals* 14 (2021). <http://dx.doi.org/10.3390/ph14040361>.
- [21] T.S. Ibrahim, E.S. Tahe, E. Samir, A.M. Malebar, A.N. Khayya, M.F.A. Mohamed, R.M. Bokhti, M.A. AlAwad, I.A. Seliem, H.Z. Asfou, N.A. Alhakamy, S.S. Panda, A.M.M. Al-Mahmoudy, In vitro antimycobacterial activity and physicochemical characterization of diaryl ether triclosan analogues as potential inhA reductase inhibitors, *Molecules* 25 (2020). <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25143125>.
- [22] M. Chebaiki, E. Delfourne, R. Tamhaev, S. Danoun, F. Rodriguez, P. Hoffmann, E. Grosjean, F. Goncalves, J. Azema-Despeyroux, A. Pal, J. Kordulakova, N. Preuilh, S. Britton, P. Constant, H. Marrakchi, L. Maveyraud, L. Mourey, C. Lherbet, Discovery of new diaryl ether inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* targeting the minor portal of InhA, *Eur. J. Med. Chem.* 259 (2023) 115646. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115646>.
- [23] H.J. Li, C.T. Lai, P. Pan, W. Yu, N. Liu, G.R. Bommineni, M. Garcia-Diaz, C. Simmerling, P.J. Tonge, A structural and energetic model for the slow-onset inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase InhA, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 986-93. <http://dx.doi.org/10.1021/cb400896g>.
- [24] H. Doğan, Ş.D. Doğan, M.G. Gündüz, V.S. Krishna, C. Lherbet, D. Sriram, O. Şahin, E. Sarıpınar, Discovery of hydrazone containing thiadiazoles as *Mycobacterium tuberculosis* growth and enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 188 (2020). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112035>.

- [25] R.A. Laskowski, M.B. Swindells, LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 2778-86. <http://dx.doi.org/10.1021/ci200227u>.
- [26] S.L. Kostiuk, T. Woodcock, L.F. Dudin, P.D. Howes, D.C. Harrowven, Unified syntheses of cavicularin and riccardin C: addressing the synthesis of an arene adopting a boat configuration, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 10906-15. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201101550>.
- [27] J. Stec, A. Fomovska, G.A. Afanador, S.P. Muench, Y. Zhou, B.-S. Lai, K. El Bissati, M.R. Hickman, P.J. Lee, S.E. Leed, J.M. Auschwitz, C. Sommerville, S. Woods, C.W. Roberts, D. Rice, S.T. Prigge, R. McLeod, A.P. Kozikowski, Modification of triclosan scaffold in search of improved inhibitors for enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase in *Toxoplasma gondii*, *ChemMedChem* 8 (2013) 1138-1160. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201300050>.
- [28] C. Fotsch, J.D. Sonnenberg, N. Chen, C. Hale, W. Karbon, M.H. Norman, Synthesis and structure-activity relationships of trisubstituted phenyl urea derivatives as neuropeptide Y5 receptor antagonists, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 2344-2356. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0004547>.
- [29] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605-12. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [30] E.C. Meng, E.F. Pettersen, G.S. Couch, C.C. Huang, T.E. Ferrin, Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera, *BMC Bioinform.* 7 (2006). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>.
- [31] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315-21. <http://dx.doi.org/10.1021/jm051197e>.
- [32] A.A. McCarthy, R. Barrett, A. Beteva, H. Caserotto, F. Dobias, F. Felisaz, T. Giraud, M. Guijarro, R. Janocha, A. Khadrouche, M. Lentini, G.A. Leonard, M. Lopez Marrero, S. Malbet-Monaco, S. McSweeney, D. Nurizzo, G. Papp, C. Rossi, J. Sinoir, C. Sorez, J. Surr, O. Svensson, U. Zander, F. Cipriani, P. Theveneau, C. Mueller-Dieckmann, ID30B - a versatile beamline for macromolecular crystallography experiments at the ESRF, *J. Synchrotron Radiat.* 25 (2018) 1249-1260. <http://dx.doi.org/doi:10.1107/S1600577518007166>.
- [33] C. Vonrhein, C. Flensburg, P. Keller, A. Sharff, O. Smart, W. Paciorek, T. Womack, G. Bricogne, Data processing and analysis with the autoPROC toolbox, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67 (2011) 293-302. <http://dx.doi.org/10.1107/s0907444911007773>.
- [34] W. Kabsch, XDS, *Acta crystallogr. D Biol. crystallogr.* 66 (2010) 125-32. <http://dx.doi.org/10.1107/s0907444909047337>.
- [35] A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 22-5. <http://dx.doi.org/10.1107/s0907444909042589>.
- [36] G. Bricogne, E. Blanc, M. Brandl, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, P. Roversi, A. Sharff, O.S. Smart, C. Vonrhein, T.O. Womack, BUSTER version 2.10.4. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd, 2017
- [37] O.S. Smart, A. Sharff, J. Holstein, T.O. Womack, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, C. Vonrhein, G. Bricogne, Grade2 version 1.3, 2021.
- [38] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126-32. <http://dx.doi.org/10.1107/s0907444904019158>.
- [39] J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720-2722. <http://dx.doi.org/doi:10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Exploring the plasticity of the InhA substrate-binding site using new diaryl ether inhibitors

Rasoul Tamhaev,^{a,b} Emeline Grosjean,^a Hikmat Ahamed,^a Mélina Chebaiki,^{a,b} Frédéric Rodriguez,^a Deborah Recchia,^c Giulia Degiacomi,^c Maria Rosalia Pasca,^c Laurent Maveyraud,^{b,*} Lionel Mourey,^{b,**} Christian Lherbet^{a,***}

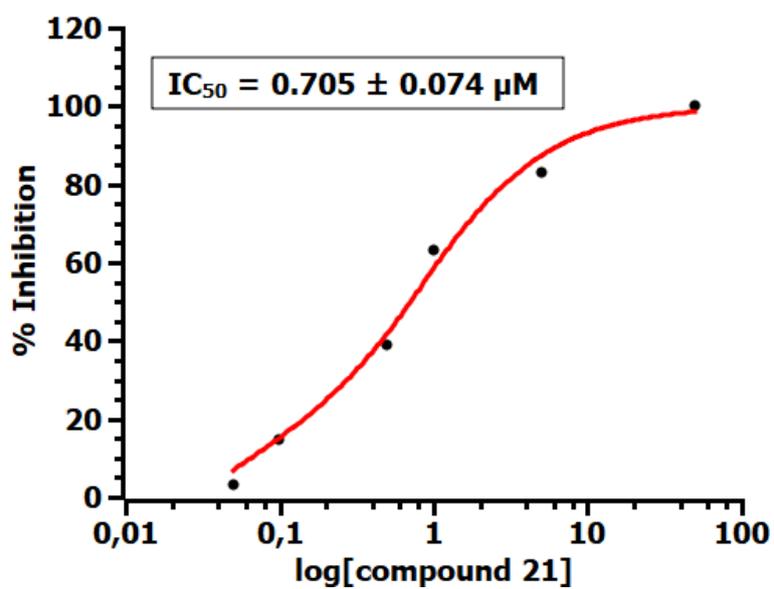
^a Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (LSPCMIB), UMR 5068, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France

^b Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France.

^c Department of Biology and Biotechnology “Lazzaro Spallanzani”, University of Pavia, 27100 Pavia, Italy.

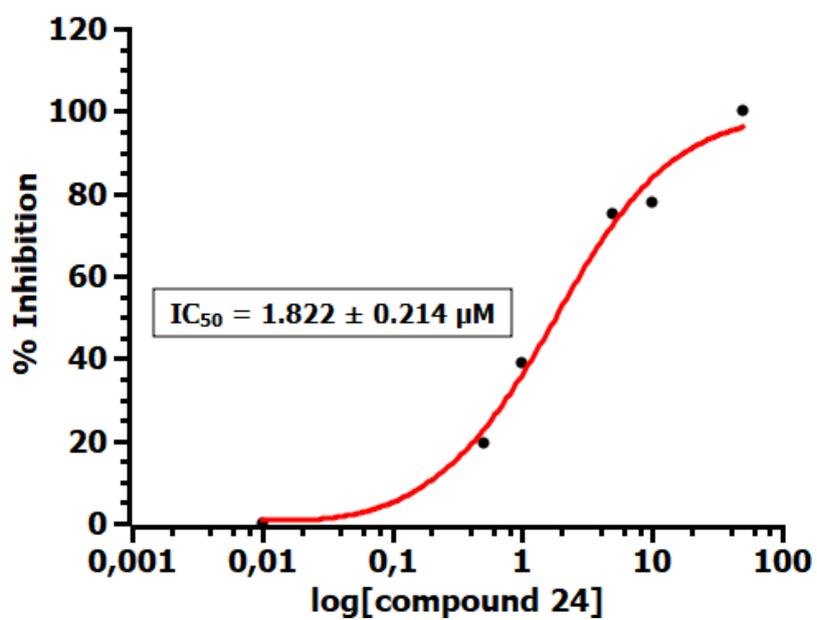
Determination of IC₅₀ for compound 21

[Inhibitor 24] (μM)	% Inhibition
50	100
5	83.2
1	63.0
0.5	39.0
0.1	14.6
0.05	3.3



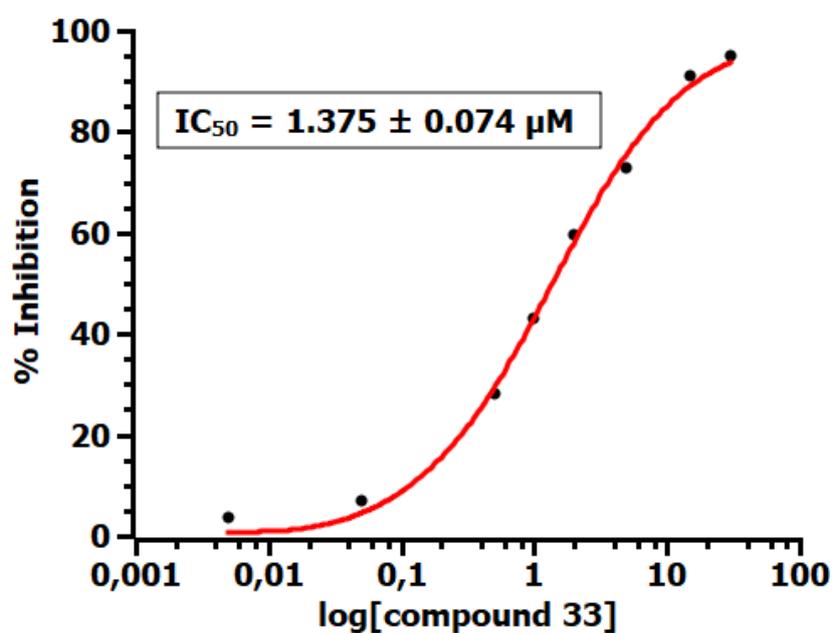
Determination of IC₅₀ for compound 24

[Inhibitor 24] (μM)	% Inhibition
50	100
10	78.0
5	75.0
1	38,9
0,5	19,3
0,01	0



Determination of IC₅₀ for compound 33

[Inhibitor 33] (μM)	% Inhibition
30	95.0
15	91.0
5	73.0
2	59.5
1	42.9
0.5	28.3
0.05	7.0
0.005	3.8



Molecular docking simulations on compound 21

Methods

Molecular graphics were performed with the UCSF Chimera package [1]. The protein structures were downloaded from the RCSB Protein Database and aligned with MatchMaker [2] on the reference structure 1BVR (1BVR:A) [3]. The protein structures were prepared (structure checks, rotamers, hydrogenation, splitting of chains) using Biovia (www.3dsbiovia.com) Discovery Studio Visualizer 2021 (DSV), UCSF Chimera and in-house Python codes. Molecular modeling studies were carried out with Molegro Virtual Docker 6 (www.molexus.com) software using PDB entry 2X22:A [4], characterized by an opened minor portal, as docking target. Three molecular docking protocols (MSE, OPT and OPT-S) and two internal scoring schemes (Moldock and Rerank) [5] were combined in a multimodal (docking) and consensus (scoring) approach. The OPT-S calculation set is similar to OPT protocol but it is extended to a higher number of runs.

The protocols share the same set of flexible residues: Ala154, Ala157, Ala164, Ala198, Ala201, Ala206, Arg195, Asn231, Asp148, Asp150, Gln214, Glu219, Ile202, Ile215, Leu217, Leu218, Lys165, Met98, Met103, Met155, Met161, Met199, Met232, Phe149, Phe97, Pro193, Thr162, Thr195, Trp160, Trp22, Tyr158. Softened potentials were used with a tolerance of 1 and a strength 0.9. According to structural studies, these residues cover different cases of minor and major portal fluctuations in known InhA structures. No displaceable water molecules were considered in the binding site (known as mainly hydrophobic). The corresponding NAD molecule (from 2X22:A) was treated as cofactor and was set as NAD⁺ with partial negative charges on phosphates and positive charge on nicotinamide group. Compound 21 was submitted to docking in hydrogenated (partial charge of +1 on central nitrogen) or neutral form. In both cases, no major differences were recorded, only charged forms are shown in paper. Clustering of poses (tabu clustering) was set with an RMS threshold of 1.9 Å in order to be a little more discriminant on the best poses. Templates (pharmacophoric profile) were used with a strength of -500 and a grid resolution of 0.4 Å using conserved atom positions along InhA ligands: ether group (oxygen, hydrogen donor); alcohol group (oxygen, hydrogen donor/acceptor) and ring (carbons) of ligand TCU (PT70, taken from 2X22:A), similarity measure parameters were let at their default values. In the case of OPT (Differential evolution algorithm) protocol, the docking process used 10,000 iteration steps, and a grid resolution of 0.3 Å, along 40 independent runs. The convergence was reached for all ligands, internal parameters (population size, crossover rate, scaling factor...) of the algorithm were let as default. A final minimization

(per run) was parameterized using 4,000 steps for side chains and 2,000 steps for protein backbone followed by a minimization and optimization (hydrogen bonds) of ligands. The same parameters were applied to the MSE (Simplex evolution algorithm) protocol, internal parameters (population size, number of iterations, energy threshold...) of the algorithm were let as default. These protocols were validated with ligands such as TCU of 2X22:A. Typical RMSD (Root Mean Square Deviation) values between the docking poses and X-ray structures were in the range 0.5-1.0 Å for the best poses. The most realistic complexes (best poses) were selected on the basis of best combination of MolDock, Rerank scores and similarities (or compliance) with X-ray crystal structure complexes of InhA with known inhibitors.

Results

As designed, compound **21** consists of three fragments: two diaryl ethers and one C8-alkyl chain. Each of these three fragments may bind into the TCL1 or the TCL2 site as shown in **Figure 1** of the main text. It is noteworthy that the nitrogen in compound **21** was considered to be protonated at the pH of the buffer used. Therefore, molecular docking of compound **21** to InhA was performed with Molegro Virtual Docker 6 (www.molexus.com) software to gain insights into the possible binding modes. The structure of InhA in complex with NAD⁺ and compound PT70 (2-(o-tolyloxy)-5-hexylphenol, ligand ID TCU in PDB 2X22, chain A, hereafter 2X22:A), in which the minor portal is opened, was chosen, offering more space in the vicinity of the protein substrate-binding site. The most realistic complex of compound **21** with InhA/NAD⁺ was selected on the basis of docking scores and similarities (or compliance) with X-ray crystal structure complexes of InhA with known inhibitors. After docking, the best poses show that compound **21** is able to dock with one diaryl ether group within the TCL1-binding site (site I) in the major portal and the other diaryl ether in the minor portal. For the first diaryl ether, typical π -stacking interactions between the hydroxyl-substituted (A) ring and the nicotinamide ring of the cofactor as well as hydrogen bonding between the hydroxyl moiety of the A ring and the 2-hydroxyl group of the cofactor and hydroxyl group of Tyr158 are observed as found for other complexes with diaryl ethers. The other diaryl ether expands in the minor portal with a higher degree of fluctuation, covering the entire binding site surface of site II. The corresponding poses can be classified in two clusters, H⁺ and B⁺, which share the same values of docking scores (**Figure S1**). In the case of the H⁺ set, the second diaryl ether is in the upper part of the minor portal and the alkyl chain in the lower part. In the case of the B⁺ set, the relative position of the alkyl chain and diaryl ether is inverted (i.e. with the alkyl chain in the

upper part of the minor portal). Interestingly, the position of the nitrogen atom is conserved in the two sets.

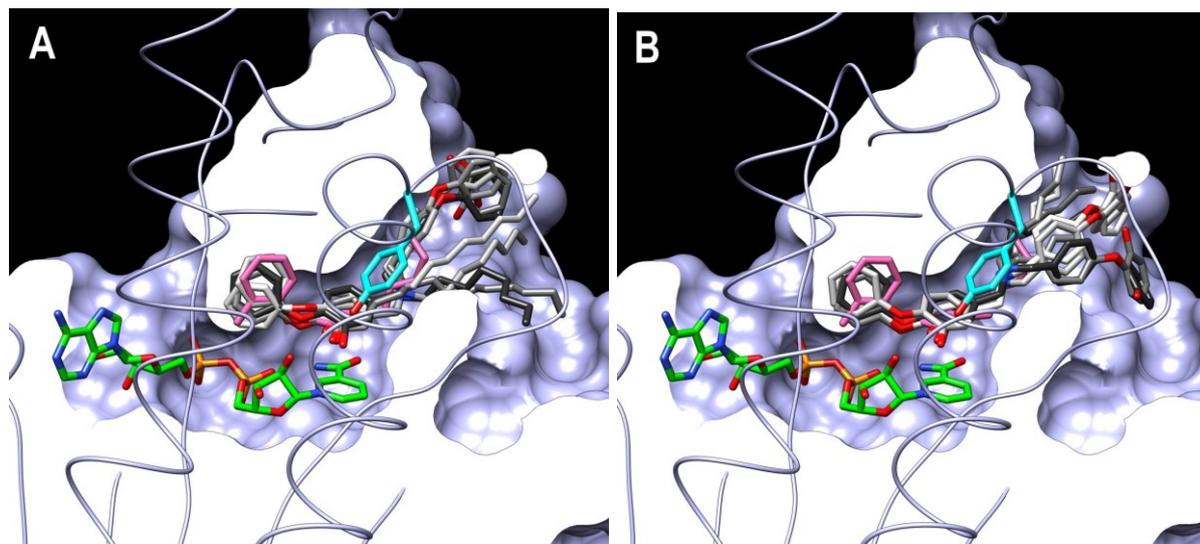


Figure S1. Best docking poses of compound **21** to the InhA structure (PDB 2X22, chain A). A. Fluctuation of type H⁺ (alkyl chain down). B. Fluctuation of type B⁺ (alkyl chain up). The different poses of compound **21** are shown as different shades of gray. Compound PT70 (ligand ID TCU, hot pink) and NAD⁺ (green) of 2X22:A (light blue surface) are shown.

References

- [1] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605-12. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [2] E.C. Meng, E.F. Pettersen, G.S. Couch, C.C. Huang, T.E. Ferrin, Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera, *BMC Bioinform.* 7 (2006). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>.
- [3] D.A. Rozwarski, C. Vilchèze, M. Sugantino, R. Bittman, J.C. Sacchettini, Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15582-9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15582>.
- [4] S.R. Luckner, N. Liu, C.W. am Ende, P.J. Tonge, C. Kisker, A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 14330-7. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.090373>.
- [5] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315-21. <http://dx.doi.org/10.1021/jm051197e>.

Chapitre 3 : Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs duaux

I. Introduction

La quête de nouvelles approches pour le traitement de pathologies complexes a conduit, lors de ces dernières années, vers de nouvelles stratégies visant simultanément plusieurs cibles et voies métaboliques. Ces stratégies s'éloignent du paradigme des traitements mono-cibles : une pathologie, une cible, un médicament. L'action simultanée sur plusieurs cibles ou voies métaboliques est susceptible de provoquer un effet synergique, aboutissant à une meilleure réponse au traitement^{146,147}. Ces stratégies sont actuellement employées dans le traitement des cancers, des troubles psychiatriques mais également de la tuberculose. Ceci permet de réduire, dans le cas de la tuberculose, la durée totale de traitement ainsi que les risques de développer une tuberculose résistante¹. Cependant, l'utilisation simultanée de plusieurs composés peut parfois être accompagnée d'une augmentation de la toxicité, notamment rénale, organe clé dans le métabolisme et l'élimination de médicaments. Dans de rares cas, cela peut également engendrer des interactions inter-médicaments conduisant à des effets néfastes.

L'approche basée sur la conception d'inhibiteurs multi-cibles présente plusieurs avantages évidents : la facilité de la prise du traitement pour les patients du fait de l'utilisation d'un seul composé mais également la diminution de risques de toxicité. La conception de composés multi-cibles est effectuée selon deux approches : le criblage de chimiothèques ou bien la conception rationnelle par combinaison. La première approche consiste à identifier, par des méthodes de criblages, des molécules capables de se fixer aux différentes cibles choisies. Dans le cas d'une action désirée à l'encontre de deux cibles particulières, les chances d'obtenir, par criblage, un inhibiteur dual efficace sur les deux cibles sont relativement faibles. Malgré tout, des molécules identifiées par criblage puis optimisées ont donné lieu à l'obtention d'inhibiteurs duaux¹⁴⁸.

La seconde approche pour la conception d'inhibiteurs multi-cibles est bien plus répandue et efficace. Celle-ci consiste à fusionner des pharmacophores déjà identifiés contre les différentes cibles (Schéma 7).

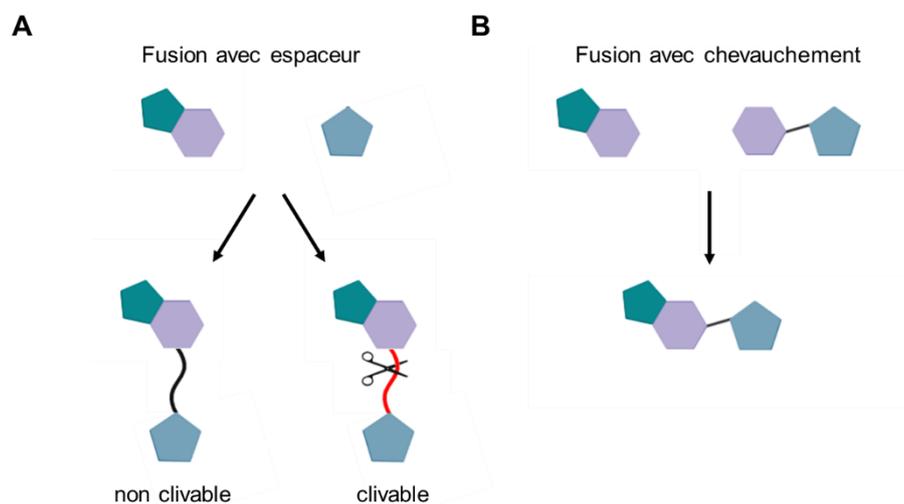


Schéma 7 : Schéma général de fusion de pharmacophores pour la confection d'inhibiteurs multi-cibles.

Cette fusion de pharmacophores peut être effectuée par l'utilisation d'un groupement espaceur clivable ou non (Schéma 7A). Une des premières applications de cette approche est la conception d'inhibiteurs multivalents. Les composés possédant plusieurs copies d'un même pharmacophore présentent dans certains cas de meilleures activités qu'une concentration identique du pharmacophore¹⁴⁹. Dans le cas d'une association de pharmacophores à cibles différentes, l'utilisation d'un espaceur clivable permet de libérer les pharmacophores une fois dans l'organisme afin que ces derniers puissent agir indépendamment. Lorsque les pharmacophores possèdent une partie commune, la fusion peut être faite avec une partie chevauchante, sans nécessité d'un groupement espaceur (Schéma 7B). Cette dernière, par rapport à la fusion avec un espaceur, mène à des composés de poids moléculaire plus faible, bénéfique pour des administrations orales. La conception rationnelle d'inhibiteurs multi-cibles peut être appuyée par l'utilisation de méthodes bio-informatiques et de relations structure-affinité. Ainsi, par fusion de pharmacophores, un bon nombre de composés multi-cibles ont pu être conçus, en particulier dans le traitement de cancers ou bien de la maladie d'Alzheimer¹⁵⁰⁻¹⁵². Certains de ces inhibiteurs multi-cibles se montrent très prometteurs. Un inhibiteur dual ciblant les kinases dépendantes des cyclines 4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*, CDK4) ainsi que les histones désacétylases 1 (*Histone Deacetylases 1*, HDAC1) a été conçu à partir du Ribociclib utilisé en traitement de première intention du cancer du sein et du Vorinostat utilisé dans le traitement des lymphomes cutanés à cellules T (Schéma 8)¹⁵³. Ces deux protéines régulent des processus importants impliqués dans la cancérogenèse. L'inhibition des CDK4 permet de stopper la phase de division cellulaire, empêchant de ce fait la progression des cellules cancéreuses¹⁵⁴. L'inhibition de la protéine HDAC1 permet également de bloquer la

division cellulaire des cellules cancéreuses^{155,156}. L'action combinée d'inhibiteurs visant ces deux protéines s'est avérée efficace dans le traitement de plusieurs cancers différents^{157,158}. De ce fait, la conception d'un inhibiteur dual visant ces deux protéines présente un intérêt croissant. L'inhibiteur dual ainsi conçu affiche de très bonnes IC_{50} à l'encontre des deux protéines cibles, 2.2 et 8.8 nM. Plus important, cet inhibiteur multi-cibles se montre bien plus efficace dans l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses que l'utilisation, seuls ou en association, des pharmacophores ayant inspiré sa synthèse. D'autres inhibiteurs, également conçus à partir d'associations de pharmacophores présentent de meilleures biodisponibilités et efficacités mais également des cytotoxicités plus faibles que les pharmacophores de départ¹⁵⁹.

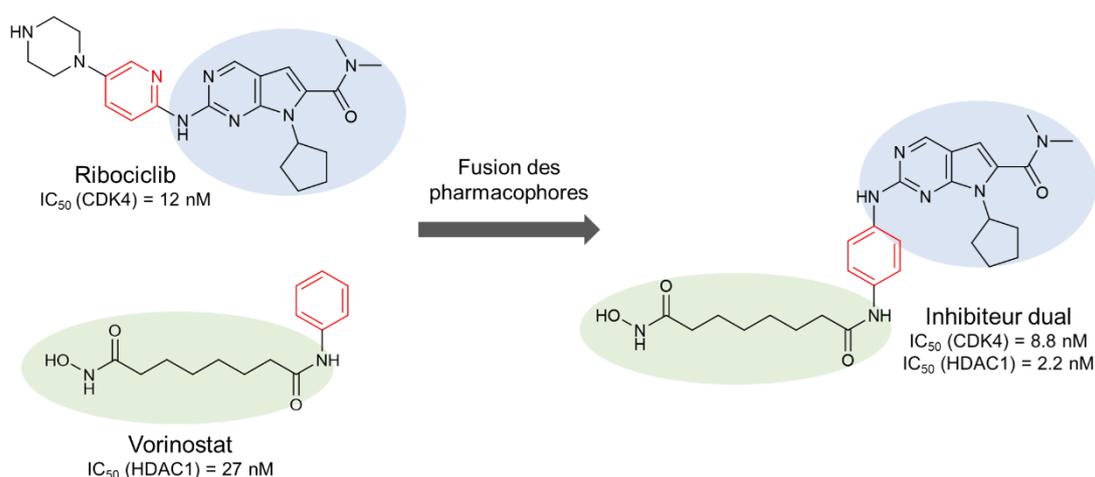


Schéma 8 : Conception de l'inhibiteur dual ciblant CDK4 et HDAC1. Les éléments importants pour la reconnaissance et l'inhibition des protéines CDK4 et HDAC1 conservés lors de la fusion sont respectivement encadrés en bleu et en vert. La partie chevauchante pour cette fusion est représentée en rouge. Figure adaptée de Cai et al., *J. Med. Chem.* 2010¹⁵³.

Sur la base de ces approches et travaux, l'objectif principal de ce chapitre est la conception, la synthèse et la caractérisation d'inhibiteurs duaux de Mtb.

II. Conception d'inhibiteurs duaux du système FAS-II de Mtb

Dans le traitement de la tuberculose, une des voies les utilisées pour lutter contre l'agent pathogène Mtb est l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques. Déjà évoqués précédemment, les systèmes FAS-I et FAS-II sont impliqués dans la biosynthèse de ces acides mycoliques, constituants membranaires importants pour la survie des mycobactéries. Le système FAS-II des mycobactéries est composé de quatre activités enzymatiques qui permettent – de façon itérative – d'allonger la chaîne d'acide gras en cours de synthèse (Figure 54). Les protéines exerçant ces activités enzymatiques n'étant présentes que chez les mycobactéries, ces

dernières sont des cibles de choix pour la conception d'inhibiteurs. Deux des activités enzymatiques de ce système sont très particulièrement étudiées : l'activité déshydratase catalysée par le complexe enzymatique hydroxyacyl-[Acyl-Carrier-Protein] déshydratase (HadABC), ainsi que l'activité énoyl réductase catalysée par InhA.

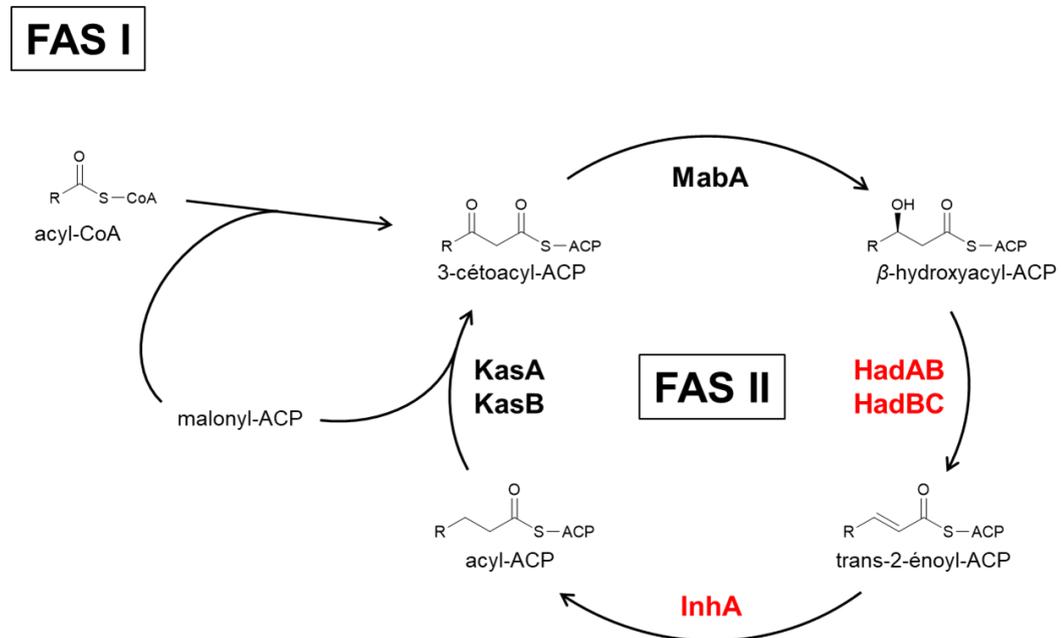


Figure 54 : Elongation des précurseurs d'acides mycoliques par le système FAS-II.

Dans le système FAS-II, les protéines du complexe HadABC forment des hétérodimères, HadAB et HadBC, afin d'exercer la fonction de déshydratation du β-hydroxyacyl-ACP en *trans*-2-énoyl-ACP au cours de l'élongation des précurseurs des acides mycoliques¹⁶⁰. Plusieurs inhibiteurs de ces enzymes sont connus dans la littérature, parmi lesquels l'isoxyl (ISO) ou encore la thiacétazone (TAC)^{161,162}. Ces différentes molécules, une fois activées par la monooxygénase EthA, forment une liaison covalente par l'intermédiaire du groupement thiol avec la cystéine 61 de HadA, inhibant ainsi l'activité déshydratase de l'hétérodimère HadAB^{163,164}. En conséquence, le processus d'élongation des acides gras est inhibé.

L'un des inhibiteurs cités, la TAC, a été très largement utilisé en combinaison avec l'isoniazide et la streptomycine jusqu'aux années 1990 pour le traitement de la tuberculose. Cependant, l'observation d'effets secondaires, notamment des atteintes cutanées, ainsi que l'apparition de mutants de Mtb résistants à la TAC, a provoqué un retrait de son utilisation¹⁶⁵. La TAC étant une molécule peu chère à la production et efficace envers l'inhibition de la croissance mycobactérienne, plusieurs analogues ont été produits. Certains de ces analogues, notamment

le diaryl éther D17, conduisent à une légère amélioration de l'efficacité contre la souche H37Rv de Mtb (Figure 55)^{166,167}.

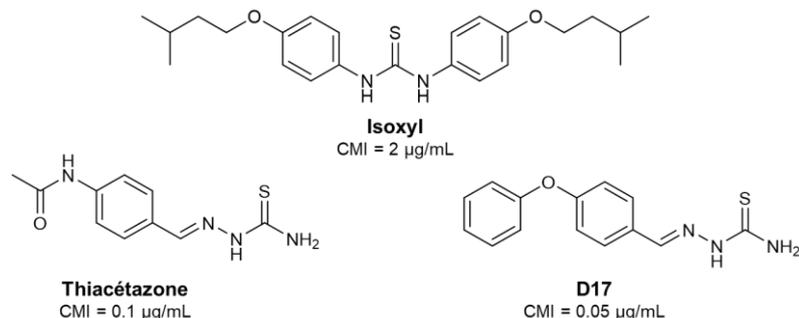


Figure 55 : Structures et concentrations minimales inhibitrices de l'isoxyl, de la thiacétazone ainsi que l'un de ses analogues, le D17 sur la souche H37Rv de Mtb.

InhA, l'énoyl-ACP réductase, prend le relais des enzymes du complexe HadABC dans le système FAS-II en réduisant le *trans*-2-énoyl-ACP en acyl-ACP. Plusieurs classes d'inhibiteurs de cette protéine déjà mentionnées dans ce manuscrit, sont largement décrites dans la littérature^{99,107,110,111}. Parmi ces inhibiteurs, les dérivés diaryl éthers aldéhydiques portant une chaîne hexyle ou bien un groupement cyclopropyl-triazole, étudiés lors du chapitre 1 (composé **11** et **17**), affichent de bonnes activités envers InhA.

Ainsi, la conception des inhibiteurs duaux sera inspirée des diaryl éthers ciblant la protéine InhA ainsi que de la TAC, ciblant les enzymes du complexe HadABC. La mise en évidence de l'efficacité du dérivé de la TAC avec un groupement diaryl éther (Figure 55) conforte l'idée de potentiels inhibiteurs duaux efficaces contre ces deux protéines (Schéma 9). La fonction hydroxyle du diaryl éther, importante pour la formation de liaisons hydrogène avec le résidu Tyr158 d'InhA et le cofacteur, la présence d'une chaîne alkyle ou d'un groupement de type alkyl-triazole en position 4 du cycle phénolique participent à augmenter l'efficacité du motif diaryl éther contre InhA. De ce fait, ces derniers seront conservés dans le but d'essayer d'obtenir de meilleures inhibitions envers InhA.

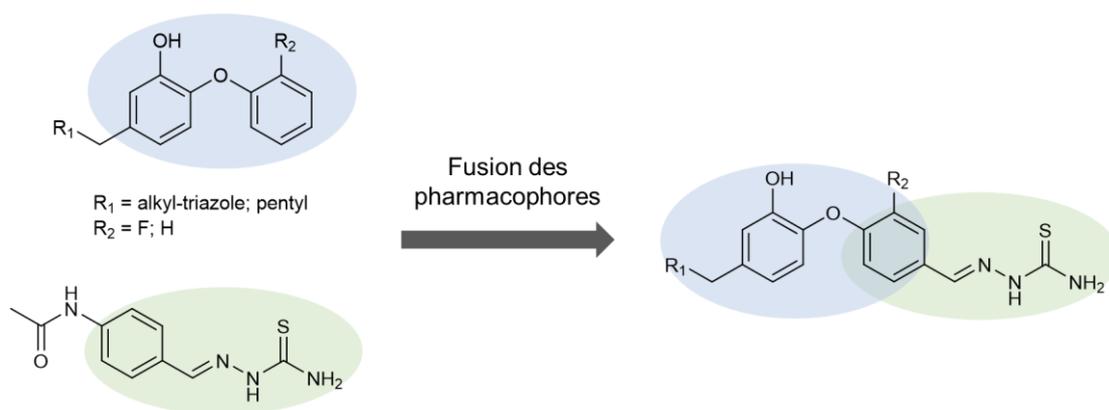


Schéma 9 : Conception des inhibiteurs duaux visant HadABC et InhA.

III. Résultats

1. Synthèse des inhibiteurs

Sur la base des différents travaux, notamment les molécules diaryl éthers **11** et **17** du criblage par DCX (chapitre 1), plusieurs inhibiteurs duaux ont été envisagés. En effet, à partir d'un diaryl éther possédant un groupement aldéhyde, les inhibiteurs duaux désirés peuvent être obtenus par condensation avec le composé thiosemicarbazide. De ce fait, en plus des aldéhydes **11** et **17** (Figure 56) déjà synthétisés précédemment, plusieurs dérivés triazoles ont été synthétisés par une voie de synthèse similaire à celle décrite dans le chapitre de criblage par DCX.

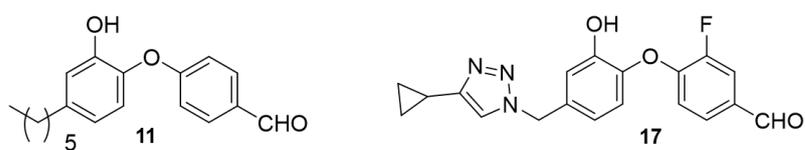


Figure 56 : Structures des diaryl éthers **11** et **17**.

1.1. Synthèse des diaryl éthers aldéhydiques

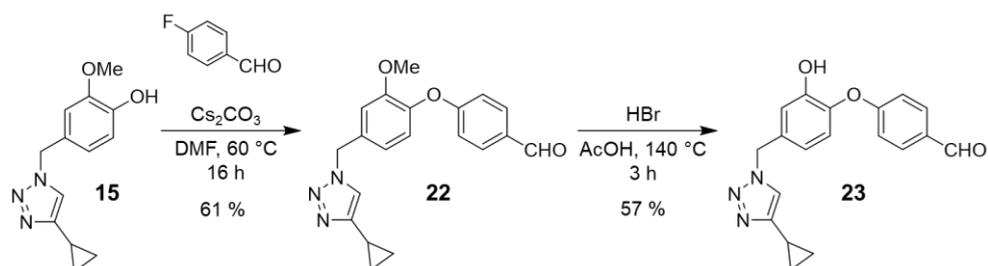


Schéma 10 : Synthèse du composé **23**.

La synthèse du composé **23** a été initiée à partir du composé **15**, intermédiaire de réaction synthétisé précédemment et présenté dans le chapitre 1. La substitution aromatique nucléophile du 4-fluorobenzaldéhyde par le composé **15** permet l'obtention du diaryl éther **22** *O*-méthoxylé. La déprotection de ce dernier à l'acide bromhydrique aboutit au diaryl éther **23** souhaité.

Deux autres diaryl éthers aldéhydiques comportant un groupement butyl-triazole sur le noyau phénolique ont été synthétisés.

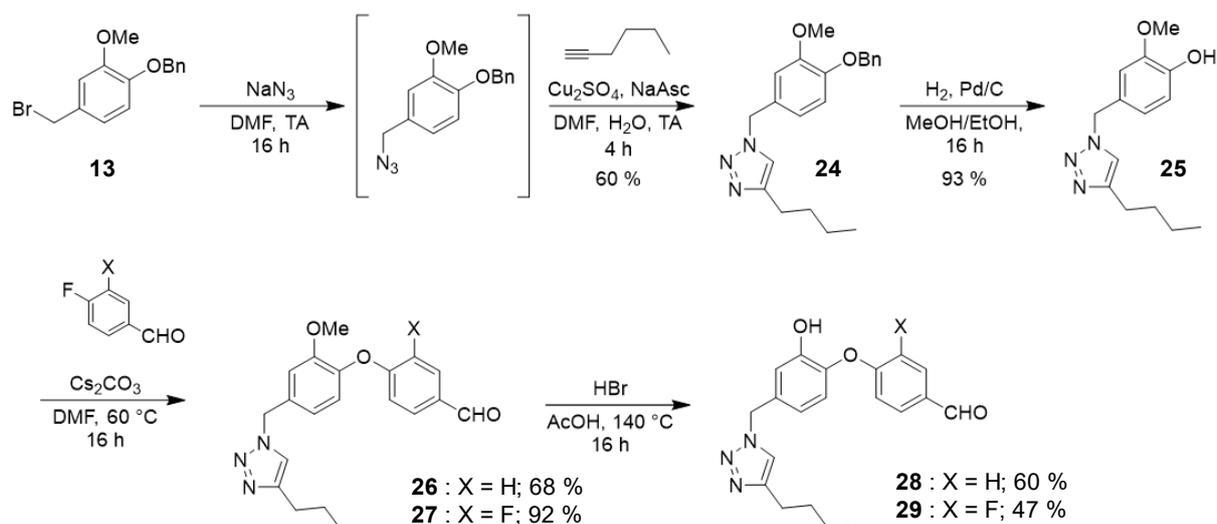


Schéma 11 : Voie de synthèse des composés 28 et 29.

Les diaryl éthers **28** et **29** ont été synthétisés à partir du composé **13**. Dans un premier temps, la substitution nucléophile par du NaN₃ permet la génération de l'azoture. Ce dernier, non isolé, est ensuite engagé dans une cycloaddition de Huisgen catalysé au cuivre(I) avec du 1-hexyne dans le but de former sélectivement le triazole **24**. La déprotection du groupement benzyle est réalisée par hydrogénation catalytique. Par la suite, l'intermédiaire **25** est engagé dans une substitution aromatique nucléophile avec du 4-fluorobenzaldéhyde ou du 3,4-difluorobenzaldéhyde pour former respectivement les composés **26** et **27**. Enfin, une étape de déprotection à l'acide bromhydrique permet l'obtention des composés souhaités **28** et **29**.

1.2. Condensation en inhibiteurs duaux

Les trois diaryl éthers aldéhydiques (**23**, **28**, et **29**) synthétisés ci-dessus ainsi que les composés **11** et **17** ont été utilisés comme précurseurs pour la synthèse des inhibiteurs duaux. La condensation de ces composés avec le thiosemicarbazide en condition acide mène à l'obtention des molécules souhaitées avec des rendements corrects (≥ 50 %). Les 5 dérivés

thiosemicarbazones produits ont été ensuite utilisés pour évaluer le concept d'inhibiteur dual visant InhA et HadABC sur la base d'un motif diaryl éther.

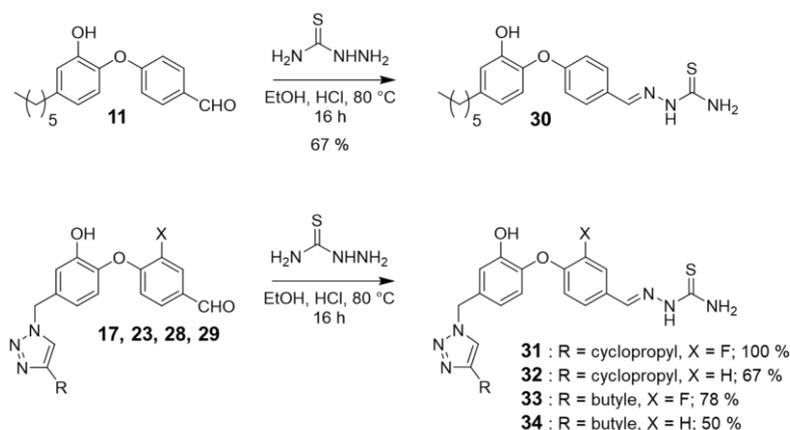


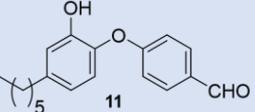
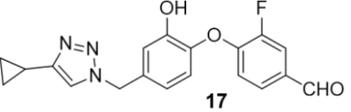
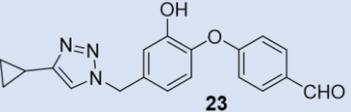
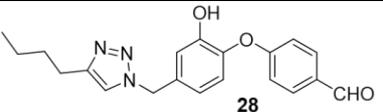
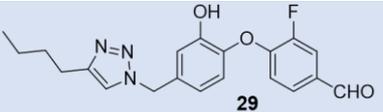
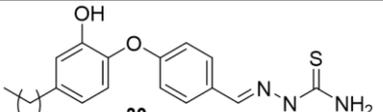
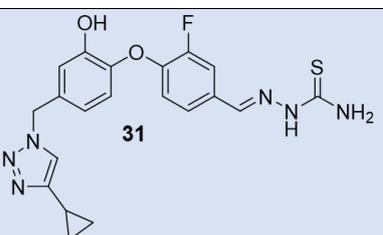
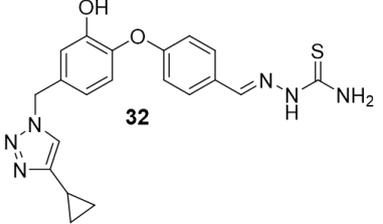
Schéma 12 : Synthèse des inhibiteurs duaux.

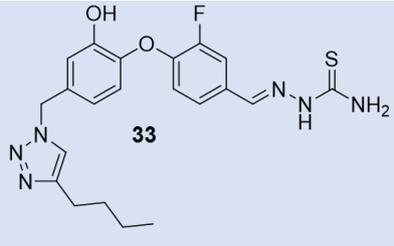
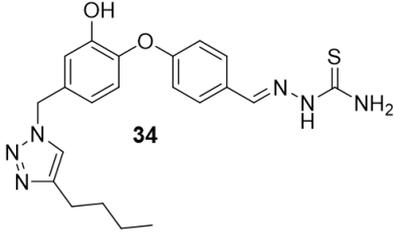
Les molécules duales, malgré la présence de la fonction thiosemicarbazone, ne sont pas sujets à une hydrolyse. Ces derniers présentent une stabilité sur une période de 7 jours à 40 °C en solution aqueuse à pH 6.8.

2. Evaluation biologique des inhibiteurs.

Les activités inhibitrices des différents composés synthétisés ont été évaluées, avant et après condensation, sur la protéine InhA ainsi que sur la croissance de Mtb (Tableau 6). Les déterminations de CMI sur les différentes souches de Mtb ont été réalisées par l'intermédiaire d'une collaboration en Italie avec l'équipe du Professeur Maria Rosalia Pasca de l'Université de Pavie.

Tableau 6 : Activités inhibitrices des diaryl éthers contre *InhA* et différentes souches de *Mtb*.

Composé	Log P ^a	IC ₅₀ <i>InhA</i> (μ M)	CMI <i>Mtb</i> H37Rv μ g/mL (μ M)	CMI <i>Mtb</i> 81.10 ^b IC1 ^c IC2 ^d μ g/mL (μ M)
 11	3.58	0.026 \pm 0.001	5 (16.75)	N.D.
 17	2.45	2.30 \pm 0.12	0.31 (0.88)	0.16 (0.44) 0.08 (0.23) 0.08 (0.23)
 23	2.83	1.08 \pm 0.04	2.5 (7.45)	N.D.
 28	3.28	0.44 \pm 0.06	2.5 (7.11)	N.D.
 29	2.76	0.76 \pm 0.04	0.16 (0.42)	0.04 (0.11) 0.16 (0.42) 0.04 (0.11)
 30	3.77	0.067 \pm 0.006	20 (56.27)	N.D.
 31	2.82	1.35 \pm 0.17	2.5 (5.86)	1.25 (2.93) 0.63 (1.47) 2.5 (5.86)
 32	3.1	1.37 \pm 0.20	2.5 (6.12)	5 (12.24) 2.5 (6.12) 5 (12.24)

 <p>33</p>	3.5	1.09 ± 0.15	1.25 (2.82)	1.25 (2.82) 0.625 (1.41) 0.312 (0.71)
 <p>34</p>	3.5	0.81 ± 0.07	1.25 (2.94)	1.25 (2.94) 1.25 (2.94) 1.25 (2.94)
Streptomycine	---	N.A.	0.25 (0.43)	N.D.
Thiacétazone	---	N.A.	0.1 (0.42)	N.D.

N.A. = Non applicable. N.D. = Non déterminé. ^a Coefficient de partage octanol/eau calculé par SwissADME. ^b souche Mtb dont EthA est mutée¹⁶⁸. ^c isolat clinique de Mtb résistant à la STR, INH, RIF, EMB, ETH¹⁶⁹. ^d isolat clinique de Mtb résistant à la STR, INH, RIF, EMB, PYR et à la capréomycine. STR : streptomycine ; INH : isoniazide ; RIF : rifampicine ; EMB : éthambutol ; ETH : éthionamide ; PYR : pyrazinamide¹⁶⁹.

2.1. Activités inhibitrices contre la protéine InhA

L'ensemble des molécules testées présentent une IC₅₀ envers InhA variant de 26 nM (précurseur **11**) à 2.30 µM (composé **17**). De ce fait, les différents composés, que ce soit sous forme de diaryl éthers aldéhydes ou bien après condensation, sont en mesure d'inhiber la protéine InhA. Déjà observé précédemment, les composés diaryl éthers avec un groupement alkyl-triazole sont de moins bons inhibiteurs que le diaryl éther alkylé **11**. En comparaison aux composés comportant un groupement cyclopropyl-triazole, ceux avec un groupement butyl-triazole présentent une meilleure activité inhibitrice (2.30 vs 0.76 pour les composés **17** et **29** et 1.08 vs 0.44 pour les composés **23** et **28**). La présence d'un atome de fluor en position *ortho* du motif diaryl éther est légèrement délétère pour l'activité inhibitrice de ces composés (**17** et **29**) envers InhA. De manière générale, les diaryl éthers sont plus actifs sur InhA sous forme aldéhydique que les diaryl éthers qui en découlent après condensation. L'ajout du groupement thiosemicarbazide sur les diaryl éthers nuit donc sensiblement à l'activité inhibitrice. Ceci est en accord avec les résultats obtenus avec les adduits formés lors des essais de DCX, où l'ajout d'hydrazine nuit aussi sensiblement à l'activité inhibitrice contre InhA.

L'inhibition des protéines du complexe HadABC par les composés duaux nécessitent une étape d'activation par EthA¹⁶³. L'efficacité de ces composés à inhiber l'activité enzymatique des protéines HadABC ne peut être déterminée directement.

2.2. Métabolisation des molécules duales par EthA

Afin d'explorer la capacité de la protéine EthA à activer les inhibiteurs duaux, des essais enzymatiques en présence de ces molécules ont été réalisés par l'intermédiaire d'une collaboration avec le Professeur Laurent Robert Chiarelli de l'université de Pavie.

En présence de substrats, la protéine EthA consomme le cofacteur NADPH dans le but de le métaboliser. Le suivi de l'oxydation du NADPH en NADP⁺ par spectrophotométrie à 340 nm indiquera si ces molécules sont substrats d'EthA. Les meilleurs substrats d'EthA provoqueront une vitesse importante de consommation en NADPH. Lors de ces tests, un substrat connu d'EthA, le composé **7947882**, a été utilisé comme témoin positif pour cette réaction¹⁷⁰.

Ces tests révèlent une consommation du NADPH en présence des composés duaux **31**, **32**, **33** et **34**, indiquant que ces quatre molécules sont métabolisables par EthA (Tableau 7). Parmi ces 4 composés duaux, les molécules **31** et **33**, présentant un atome de fluor, s'avèrent être de meilleurs substrats d'EthA que leur analogues **32** et **34**, non fluorés.

Tableau 7 : Oxydation du NADPH par EthA en présence des molécules duales.

Composé	Vitesse de consommation de NADPH ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)
31	2.62
32	1.03
33	2.78
34	0.79
7947882 ^a	5.34

^a Composé connu pour être activé par EthA¹⁷⁰.

2.3. Activités inhibitrices contre des souches mycobactériennes

Dans le but de tester l'efficacité des différentes molécules synthétisées contre Mtb, les CMI ont été déterminées vis-à-vis de la souche H37Rv mais également contre plusieurs souches résistantes. De manière générale, les diaryl éthers aldéhydiques substitués par un alkyl-triazole présentent de meilleures CMI que les molécules duales. D'autre part, le diaryl éther alkylé **11**

ainsi que la molécule duale correspondante **30**, montrant les meilleures inhibitions envers InhA, se trouvent être les moins efficaces contre la souche H37Rv de Mtb. Ces deux molécules présentent respectivement des CMI de 5 et 20 µg/mL (Tableau 6). La faible efficacité des diaryl éthers alkylés pourrait être principalement causée par leur fort caractère hydrophobe. En effet, comme il l'a été mentionné auparavant, ces molécules sont peu solubles et pourraient présenter des difficultés à pénétrer l'enveloppe cellulaire de Mtb^{109,111}. Le groupement triazole participe à améliorer la solubilité de ces composés¹¹¹. De ce fait, les dérivés triazole-diaryl éthers affichent des CMI bien plus encourageantes sur Mtb (H37Rv), avec des CMI inférieures à 1 µg/mL dans le cas des diaryl éthers **17** et **29**. La substitution des diaryl éthers par un atome de fluor, légèrement délétère pour l'inhibition de l'activité d'InhA, apporte une efficacité considérable contre Mtb. En effet, cet ajout améliore d'un facteur 8.5 et 16.9 les efficacités des dérivés triazole-diaryl éthers aldéhydiques fluorés **17** et **29** par rapport à leurs homologues non fluorés, respectivement **23** et **28**. Dans le cas des potentiels inhibiteurs duaux, l'efficacité contre Mtb des molécules fluorées **31** et **33** sont très similaires à celle de leur homologue **32** et **34**, non fluorés. Bien souvent, l'incorporation d'atomes de fluor sur les molécules améliore les propriétés pharmacologiques de celles-ci, expliquant que 20 à 25 % des nouvelles molécules mises sur le marché possèdent un fluor¹⁷¹⁻¹⁷³. L'effet bénéfique de l'incorporation de l'atome de fluor pourrait, ici, provenir d'une amélioration de la solubilité, le log P calculé pour les composés fluorés étant globalement inférieurs au log P des composés non fluorés (Tableau 6), facilitant ainsi le transport passif des molécules à travers la membrane. Les composés **17** et **29** se montrent autant efficaces dans l'inhibition de la croissance de Mtb que la streptomycine (Tableau 6). Les composés **31** et **33**, issus de la condensation des diaryl éthers **17** et **29** avec le thiosemicarbazide, sont moins efficaces contre Mtb et nécessitent des concentrations 6.7 fois supérieures pour une inhibition similaire.

Plus important, les composés **17** et **29** se montrent très efficaces contre des souches résistantes de Mtb, dont la souche 81.10 résistante à l'éthionamide (ETH) ainsi que les isolats cliniques I et II, tous deux des souches multi-résistantes notamment à INH et ETH^{168,169}. Les aldéhydes **17** et **29** affichent de bonnes CMI, qui atteignent une valeur de 0.04 µg/mL contre ces souches multi-résistantes. Les composés **31** et **33**, molécules duales issues des composés **17** et **29**, présentent une efficacité similaire ou légèrement moins bonne contre des souches mutantes pour EthA. Au vu de ces CMI, l'inhibition de la croissance mycobactérienne par les molécules duales semble principalement être provoquée par l'inhibition de la protéine InhA.

2.4. Etude de la cytotoxicité des composés

L'inhibition la croissance mycobactérienne par les différentes molécules synthétisées étant démontrée, en particulier par les molécules duales, nous avons évalué la toxicité de ces molécules. Cette étude a été réalisée par l'intermédiaire d'une collaboration locale, avec l'équipe du Dr Sébastien Britton (IPBS, Toulouse). Les études de cytotoxicité des 4 molécules les plus actives ont été menées sur 4 lignées cellulaires humaines : des cellules du cancer du côlon (HCT116 et CACO2), des cellules de cancer hépatique (HepG2) ainsi que des cellules de fibroblaste (WI38hTERT). Lors de ces tests, la viabilité des cellules a été évaluée 72 h après ajout de différentes concentrations en composés sur trois expériences indépendantes (Figure 57 et Tableau 8).

En présence des différentes molécules, que ce soient les deux diaryl éthers aldéhydiques (**17** et **29**) ou bien les 2 molécules duales qui en découlent (**31** et **33**), la viabilité des cellules diminue avec l'augmentation de la concentration en inhibiteurs (Figure 57), indiquant un certain degré de toxicité de ces derniers. Les composés **17** et **29** présentent un indice de sélectivité compris entre 10 et 90 (Tableau 8). Ces deux diaryl éthers aldéhydiques présentent une toxicité relativement faible ou modérée selon les lignées cellulaires. Ceci est en revanche différent pour les deux inhibiteurs duaux **31** et **33**. En effet, l'indice de sélectivité est bien plus faible (< 7) sur les 4 lignées cellulaires étudiées par rapport aux composés **17** et **29**, indiquant une toxicité importante. À contrario, la TAC affiche une cytotoxicité quasi nulle envers ces lignées cellulaires, même à des concentrations de 100 μM en composés.

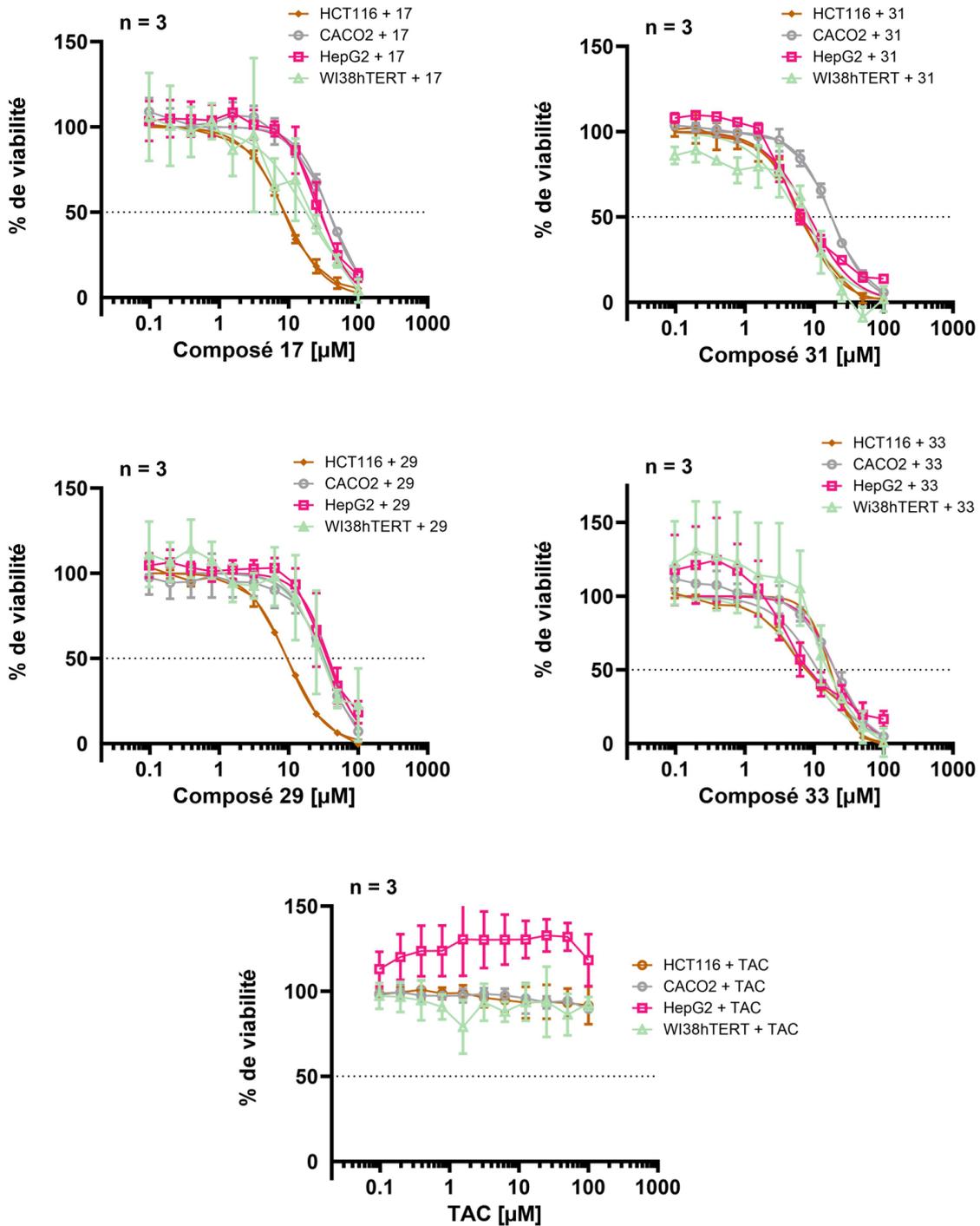


Figure 57 : Viabilité de cellules humaines en présence de différentes concentrations en composés 17, 29, 31, 33 et TAC. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat. HCT116 : cellules humaines de cancer du côlon. CACO2 : cellules humaines immortalisées d'adénocarcinome colorectal. HepG2 : cellules humaines de carcinome hépatocellulaire. WI38hTERT : cellules de fibroblaste humain.

Tableau 8 : Cytotoxicité des inhibiteurs aldéhydiques et duaux ainsi que de la TAC déterminés sur 4 types de lignées cellulaires à partir des courbes de viabilité.

Composé	CMI H37Rv	IC ₅₀ (μM) / Indice de sélectivité ^a			
		HTC116	CACO2	HepG2	WI38hTERT
17	0.88	8.68 / 9.86	37.76 / 42.9	28.99 / 32.94	17.79 / 20.22
29	0.42	9.44 / 22.48	30.27 / 72.07	37.75 / 89.88	32.26 / 76.81
31	5.86	6.58 / 1.12	17.79 / 3.04	8.52 / 1.45	6.15 / 1.05
33	2.82	7.95 / 2.82	19.89 / 7.05	11.23 / 3.98	17.05 / 6.05
TAC	0.42	> 100 / > 230	> 100 / > 230	> 100 / > 230	> 100 / > 230

^a Indice de sélectivité = IC₅₀ / CMI

3. Caractérisation structurale des complexes InhA-inhibiteurs duaux

Hormis les composés **11** et **17** pour lesquels des structures cristallographiques avaient déjà été résolues lors du criblage par DCX, des essais de co-cristallisation de la protéine en présence des différentes molécules produites ont été menés dans le but de comprendre les mécanismes d'inhibition d'InhA. Ces essais ont été réalisés en respectant un protocole expérimental similaire à celui employé lors du criblage DCX, à savoir une solution de protéine incubée avec du NAD⁺ ainsi que les inhibiteurs dans un rapport de concentration 1:10:10 avant l'ajout d'un volume équivalent de solution de cristallisation. De cette manière des cristaux d'InhA en incubation avec chacune de ces molécules ont été obtenus. En plus des 2 structures en présence des composé **11** et **17** du chapitre 1, la diffraction aux rayons X et le traitement des données issus de ces cristaux ont permis la résolution des structures d'InhA en complexe avec 6 autres composés (**23**, **28**, **30**, **32**, **33** et **34**). Des jeux de données de la protéine en présence des composés **29** et **31** ont également été obtenus et sont en cours de traitement.

Au sein de la protéine, l'ensemble de ces molécules, dérivés aldéhydes ou molécules duales, se fixent en conservant les interactions typiques des diaryl éthers avec la protéine et le cofacteur, déjà décrites pour les composés **11** et **17**, notamment les liaisons hydrogène avec le résidu Tyr158 et le π -stacking avec le cofacteur (Figure 58). Les groupements alkyl-triazoles et la chaîne alkyle de ces composés sont retrouvés dans la région du portail mineur et les fonctions aldéhydes dans le portail majeur. Plusieurs interactions de van der Waals, déjà évoquées précédemment, stabilisent les inhibiteurs. Celles-ci impliquent les résidus Gly96, Phe97, Met103, Phe149, Pro155, Ala156, Tyr157, Lys165, Ala198, Met199, Ile202, Val203, Ile215, et Leu218. À l'instar des adduits développés dans le chapitre portant sur le criblage par DCX, les groupements thiosemicarbazone des molécules duales sont capables d'interagir dans le portail majeur avec le résidu Met98 par l'intermédiaire de liaisons hydrogène.

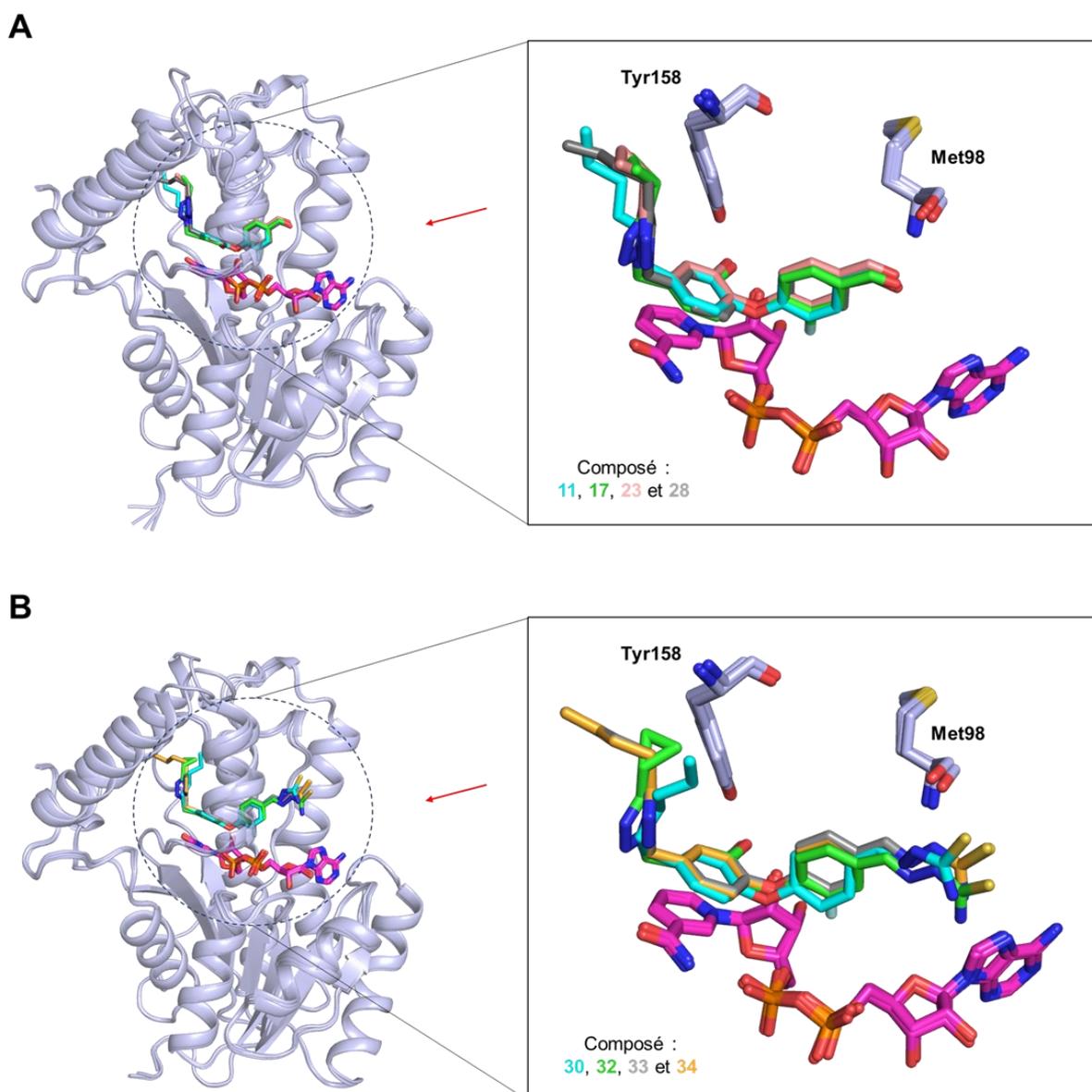


Figure 58 : Superposition des structures d’InhA en complexe avec les diaryl éthers aldéhydiques (A) et les inhibiteurs duaux (B). Les cofacteurs NAD⁺ sont représentés en magenta. Les flèches rouges indiquent l’accès vers le portail majeur.

Dans le cas des dérivés triazole-diaryl éthers, La présence d’un groupement butyl-triazole entraîne une amélioration de l’activité contre InhA d’un facteur 2 par rapport aux dérivés comportant un groupement cyclopropyl-triazole. Structuellement parlant, le groupement butyle provoque un encombrement stérique qui va déplacer la chaîne latérale de la leucine 218 (Figure 59). En conséquence, l’hélice H7 de la SBL adopte une conformation différente où le

résidu Glu219 qui était impliqué dans l'établissement d'une liaison hydrogène avec le triazole, se retrouve orienté vers l'extérieur de la structure.

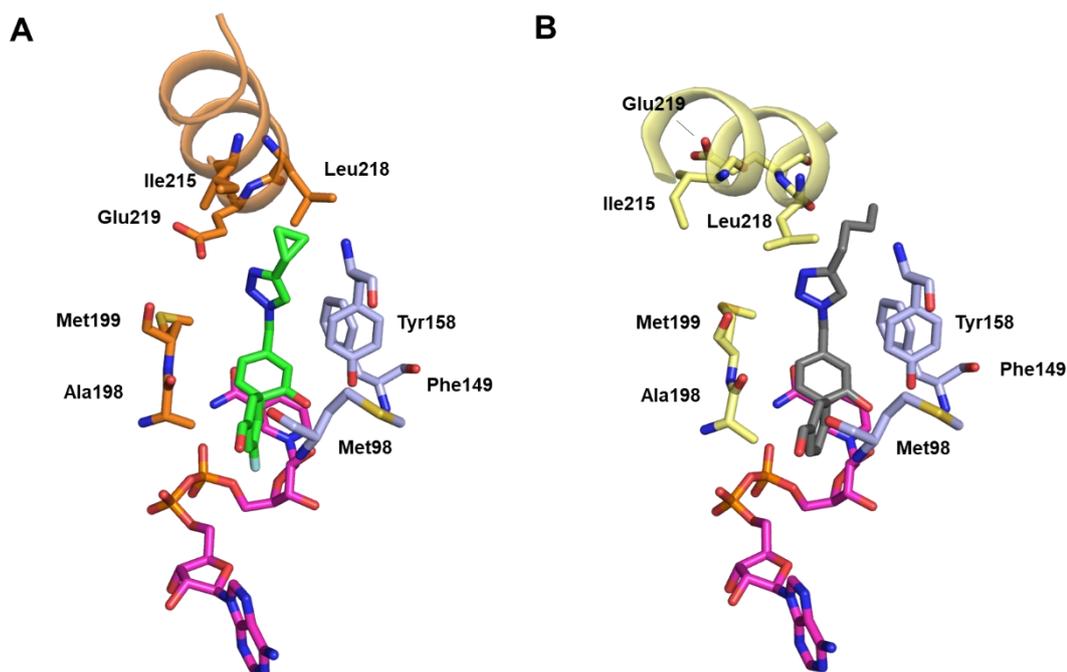


Figure 59 : Variation de l'interaction inhibiteur/ligand dans le portail majeur selon la nature du groupement dans le portail mineur. A) Structure d'InhA en complexe avec NAD⁺ et le composé 17 (en vert). B) InhA en complexe avec NAD⁺ et le composé 28 (en gris). Les hélices H7 ainsi que les résidus de la SBL sont respectivement colorés en orange et jaune.

IV. Conclusion

Basée sur l'approche multi-cibles, plusieurs molécules visant à cibler le complexe HadABC ainsi qu'InhA ont été synthétisées. Les études enzymatiques et biologiques sur les composés synthétisés montrent que ces derniers sont capables d'inhiber InhA mais également la croissance mycobactérienne aussi efficacement que la streptomycine. De plus, certains de ces composés s'avèrent également très actifs contre des souches multi-résistantes de Mtb. L'efficacité similaire de ces molécules sur des souches non résistantes (H37Rv) et résistantes à l'ETH, causées par des mutations sur EthA, nécessaire à l'activation des inhibiteurs duaux, pourrait suggérer une inhibition de la croissance mycobactérienne passant principalement par l'inhibition d'InhA. En effet, malgré une résistance à INH, causée par des mutations sur *katG*, les diaryl éthers ciblent directement InhA sans nécessité d'activation. Néanmoins, les inhibiteurs duaux synthétisés sont métabolisables par EthA. Des études supplémentaires,

notamment sur la nature des composés générés après métabolisation par EthA, sur l'évaluation de l'inhibition de l'activité du complexe HadABC et de la croissance de souches surexprimant les différentes protéines (EthA, HadABC, InhA), sont en cours afin d'élucider les mécanismes d'inhibition de la croissance mycobactérienne par ces composés duaux (collaboration Laurent Chiarelli, Pavie, Italie ; Jana Korduláková, Bratislavia, Slovaquie).

Chapitre 4 : Production,
purification et cristallisation
d'InhA de *Mycobacterium*
abscessus

I. Introduction

Les mycobactéries, retrouvées en très grande majorité dans les sols et les eaux, sont principalement séparées en deux classes : les mycobactéries tuberculeuses et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT)¹⁷⁴. Parmi les MNT, les mycobactéries du complexe *Mycobacterium abscessus*, des mycobactéries à croissance rapide identifiées pour la première fois en 1952¹⁷⁵, ont émergé comme pathogènes opportunistes de l'homme. Ce complexe regroupe 3 sous-espèces : *abscessus*, *bolletii* et *massiliense*¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Ces trois sous-espèces se distinguent par leur susceptibilité aux antibiotiques ainsi que par leur profil génétique¹⁸⁰. La sous-espèce *abscessus* est très communément appelée *Mycobacterium abscessus* (Mab). L'infection par ce pathogène, principalement nosocomiale, est facilitée par une immunodépression ainsi que des pathologies pulmonaires préexistantes comme une tuberculose ou bien la mucoviscidose¹⁸¹. L'incidence d'une infection par les MNT est 1000 fois plus élevée chez les personnes atteintes de mucoviscidose que les personnes en bonne santé¹⁷⁴. Il est estimé que 10 à 20 % des patients présentant une mucoviscidose sont infectés par une MNT¹⁸². Comme beaucoup d'autres mycobactéries, Mab est responsable d'atteintes pulmonaires, mais également d'infections cutanées et neurologiques en cas de franchissement de la barrière hémato-encéphalique^{183,184}. Les dernières recommandations pour le traitement d'une infection par Mab implique un traitement intensif par voie intraveineuse sur une durée supérieure à un mois, suivie de 12 mois de traitement par voie orale¹⁸⁵.

1. Mab, un modèle de bactérie multi-résistante

Malgré l'arsenal thérapeutique disponible et l'utilisation de cocktails d'antibiotiques multi-cibles, le traitement d'une infection par Mab ne présente qu'environ 40 % de taux de succès^{185,186}. Cette infection est reconnue comme l'une des plus difficiles à traiter¹⁸⁷. La faible efficacité des traitements est en majeure partie imputable à la très grande imperméabilité de Mab ainsi qu'à sa grande résistance aux médicaments. Mab est notamment résistante aux aminoglycosides, aux β -lactames, aux macrolides, aux rifamycines et aux tétracyclines. Ces résistances font intervenir divers mécanismes, que ce soit par efflux ou inactivation du médicament, mais également par modification de la cible¹⁶. Similairement à Mtb, l'infection par Mab peut provoquer la formation de biofilms ainsi que des granulomes, favorisant ainsi la survie et la résistance des colonies bactériennes^{188,189}. Des phénomènes de mutations aléatoires sont également susceptibles de procurer des résistances à INH, à ETH ainsi qu'aux fluoroquinolones¹⁶. L'ensemble de ces mécanismes et caractéristiques font de Mab un véritable

modèle de bactérie multi-résistante qui cause actuellement des problèmes de santé publique. Ainsi, il y a aujourd'hui, un besoin urgent d'identifier de nouvelles molécules efficaces pour le traitement des infections par ce pathogène.

2. Les inhibiteurs de Mab

Une des approches afin de lutter contre les mycobactéries est l'exploitation de la synergie entre au moins deux antibiotiques : un premier antibiotique inhibera ou déstabilisera l'intégrité de l'enveloppe cellulaire, jouant un rôle primordial dans le caractère imperméable et dans la résistance à de nombreux médicaments, alors qu'un deuxième antibiotique visera d'autres processus biologiques importants (synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines, *etc.*)¹⁹⁰⁻¹⁹².

Le processus de développement de médicaments étant très long et coûteux, une des méthodes de plus en plus employée est le repositionnement (*drug repurposing*). Ce dernier consiste à trouver de nouvelles cibles de molécules ou médicaments déjà commercialisés et ayant passé les phases d'essais cliniques. Au cours des 5 dernières années, plusieurs molécules ciblant des processus tels que la synthèse des acides nucléiques, des protéines, de l'ATP, du coenzyme A, le métabolisme du NAD(H) et bien d'autres ont été identifiées comme étant efficaces contre Mab¹⁹³, représentant un espoir pour le traitement de cet agent pathogène multi-résistant. Certaines de ces molécules ciblent différents processus importants pour la mise en place de l'enveloppe mycobactérienne.

Des inhibiteurs de la protéine DprE1, impliquée dans la synthèse des arabinogalactanes, constituants essentiel de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne, ont été montrées comme étant des molécules attractives pour le développement de médicaments contre la tuberculose¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Un de ces inhibiteurs, l'**OPC-167832** (Figure 60) actif contre Mtb¹⁹⁷, présente une activité prometteuse contre Mab et se révèle être bien toléré chez le modèle animal (souris)¹⁹⁸.

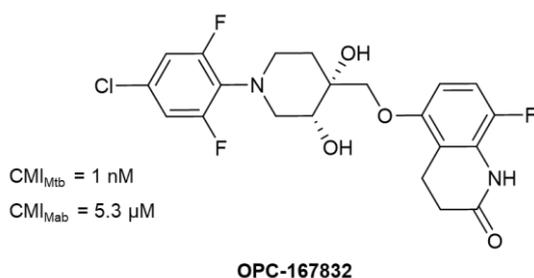


Figure 60 : Structure et activité de OPC-167832, un inhibiteur de la protéine DprE1.

Une autre option de choix pour l'inhibition de la synthèse de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne est la perturbation de la translocation des mono-mycolates de tréhalose (TMM) par les protéines MmpL3^{199,200}. Ces TMM, une fois transportés pourront, entre autres, être attachés aux arabinogalactanes, afin de contribuer à former la mycomembrane. Ainsi, plusieurs inhibiteurs visant la protéine MmpL3 mycobactérienne ont été développés. Ces inhibiteurs se sont avérés efficaces pour l'inhibition de la croissance de bon nombre d'espèces mycobactériennes, dont Mab²⁰¹. Parmi ces inhibiteurs, les indole-2-carboxamides **IC5** et **IC25**²⁰², mais également les dérivés de benzothiazole, dont le **CRS400393**²⁰³, présentent de très bonnes CMI (Figure 61).

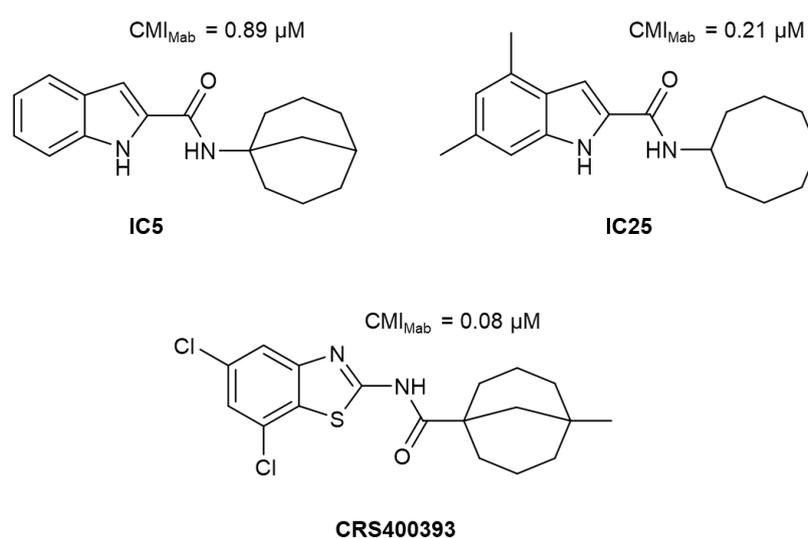


Figure 61 : Structures et activités des inhibiteurs de MmpL3.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques, constituants majeurs de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne, fait partie de l'approche la plus souvent employée dans le traitement des infections à mycobactéries. Celle-ci est médiée par l'inhibition d'une des quatre activités enzymatiques du système FAS-II. Comme évoqué plus haut, Mab est dans une grande majorité des cas résistante à l'INH, l'ETH et les analogues de thiacétazone, molécules, qui inhibent respectivement InhA et HadABC. Cependant, ces résistances, liées à l'incapacité de KatG et d'EthA à activer ces prodrogues, peuvent être contournées par la conception d'inhibiteurs directs des protéines InhA et HadABC. Actuellement, une seule molécule se montre relativement active dans l'inhibition d'une des activités enzymatiques du système FAS-II. Il s'agit de la pyridone **NITD-916**, qui inhibe InhA. Cette molécule montre une activité convenable contre Mab, avec une CMI de 5 μM (Figure 62)¹¹⁸.

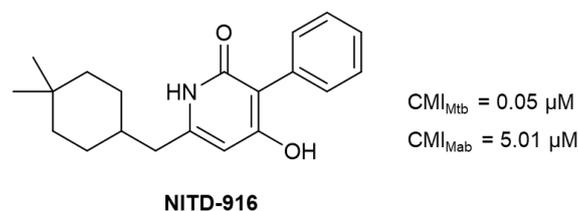


Figure 62 : Pyridone NITD-916 et activités associées contre Mtb et Mab.

Ainsi, le développement de nouveaux inhibiteurs du système FAS-II, notamment des inhibiteurs directs d’InhA pourrait également permettre de contribuer à lutter contre le véritable problème de santé publique que représente Mab. A cette finalité, un financement par l’Agence Nationale de la Recherche a été accordé aux laboratoires SPCMIB et IPBS pour la conception d’inhibiteurs directs d’InhA_{Mab} par des approches de FBDD (projet TagInhA, ANR-23-CE44-0002). Ce court chapitre traitera ainsi de la production, de la purification ainsi que de la mise au point de la cristallisation de InhA_{Mab} en absence et présence d’inhibiteurs, nécessaires afin d’essayer de mener à bien ce projet.

II. Résultats

Les protéines InhA_{Mtb} et InhA_{Mab} présentant une très grande identité de séquence (88 %) ¹¹⁸, les protocoles de production, de purification et de cristallisation déjà mis au point pour InhA_{Mtb} ont été transposés à InhA_{Mab}. Ainsi, la séquence codante pour InhA_{Mab} a été optimisée pour une expression chez *E. coli* BL21 (DE3) et insérée dans un plasmide pET15b. Contrairement à la construction utilisée lors des travaux sur NITD-916 ¹¹⁸, le plasmide pET15b apporte une étiquette histidine clivable en position N-terminale, cette dernière pouvant gêner l’étape de cristallisation. Un procédé similaire de production et de purification à celui de InhA_{Mtb} (voir le chapitre Matériels et méthodes) a été appliqué dans le but d’obtenir la protéine InhA_{Mab} recombinante pure et en quantité suffisante pour des études biochimiques et structurales. Ainsi, à l’issue de l’ensemble des étapes, la protéine InhA_{Mab} est obtenue dans de très bons rendements (30 mg/L de culture) après clivage de l’étiquette histidine.

Des essais de cristallisation ont été menés en s’appuyant sur les conditions de cristallisation d’InhA_{Mtb}, mais également celles décrites dans la récente publication sur la structure d’InhA_{Mab} en complexe avec la pyridone NITD-916 ¹¹⁸. Ces trois conditions sont représentées sur le Tableau 9.

Tableau 9 : Conditions de cristallisation de la protéine *InhA_{Mab}*.

	Agent précipitant	Tampon	pH
Condition 1	14 % PEG 4000 (m/v)	100 mM ADA, 100 mM acétate d'ammonium, 5 % DMSO (v/v)	pH 6.8
Condition 2	2 M sulfate d'ammonium	0.1 M Hepes	pH 7.5
Condition 3	1.09 M citrate de sodium dibasique	0.1 M sodium cacodylate	pH 6.3

Lors de ces essais, différentes concentrations en protéine et en cofacteur (NAD⁺ et NADH) ont été criblées. Ces essais ont été réalisés en présence ou non de différents ligands d'*InhA_{Mtb}* développés au sein du laboratoire, parmi eux, les diaryl éthers ED1727 et ED1785²⁰⁴. En effet, tout comme la pyridone NITD-916, qui inhibe les deux enzymes *InhA_{Mtb}* et de *InhA_{Mab}*, des inhibiteurs de *InhA_{Mtb}* sont susceptibles d'être également des inhibiteurs de *InhA_{Mab}*. À la suite de ces essais, des cristaux de *InhA_{Mab}* sous forme holo et aussi en présence des diaryl éthers ED1727 et ED1785 ont été obtenus dans les trois conditions de cristallisation à une concentration de 9.7 mg/mL en protéine, 2.8 mM de cofacteur (NAD⁺/NADH) et en présence ou absence de 5.6 mM de ligand. Après diffraction aux rayons X et traitement des données, les structures en présence des deux inhibiteurs ED1727 et ED1785 ont été résolues. En présence du composé ED1727, la structure été résolue à 1.9 Å dans le groupe d'espace *P2₁2₁2₁* (a = 87.44 Å, b = 92.30 Å, c = 157.81 Å), comprenant 4 molécules dans l'unité asymétrique. Il s'agit du même groupe d'espace obtenu précédemment pour la structure d'*InhA_{Mtb}* en complexe avec ED1727 (code PDB : 8OTN)²⁰⁴. Dans le cas de ED1785, le complexe, résolu à 1.3 Å, cristallise dans le groupe d'espace *I4₁22* (a = 120.07 Å, b = 120.07 Å, c = 88.12 Å), présentant une seule molécule dans l'unité asymétrique. L'analyse des cartes de densité électronique a révélé la présence de ligands dans la poche de fixation du substrat, juste au-dessus du cofacteur (Figure 63). La très bonne résolution des jeux de données de diffraction permet d'attribuer très clairement les densités aux diaryl éthers.

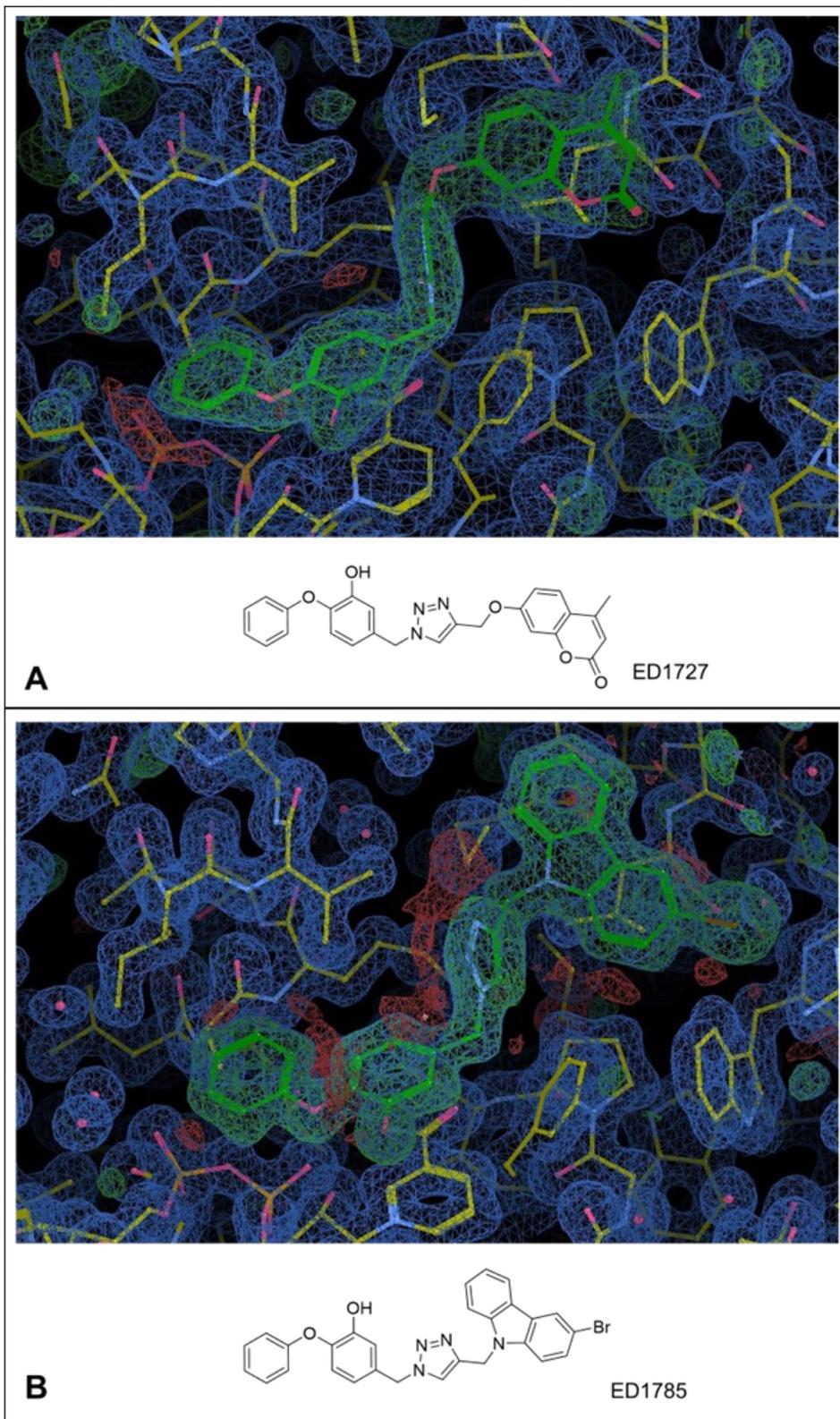


Figure 63 : Cartes de densité électronique de la protéine *InhA_{Mab}* obtenues après co-cristallisation avec ED1727 (A) et ED1785 (B). Les cartes 2Fo-Fc (en bleu) et Fo-Fc (en vert) sont contourées à 1 et 3 σ , respectivement. Les cristaux correspondants ont été obtenus à 9.7 mg/mL de protéine en présence de 2.8 mM de NAD^+ et 5.26 mM d'inhibiteurs. La solution du réservoir de cristallisation est une solution de 2 M d'ammonium sulfate, 0.1 M d'HEPES, pH 7.5.

Le diaryl éther ED1727 conserve un mode de fixation à InhA_{Mab} similaire à celui observé pour InhA_{Mtb} , où la partie diaryl éther est retrouvée dans la poche de fixation du substrat, au-dessus du cofacteur (Figure 64A). La partie coumarine de ce ligand se retrouve dans le fond du site actif, avec une conformation différente dans les deux structures (Figure 64B).

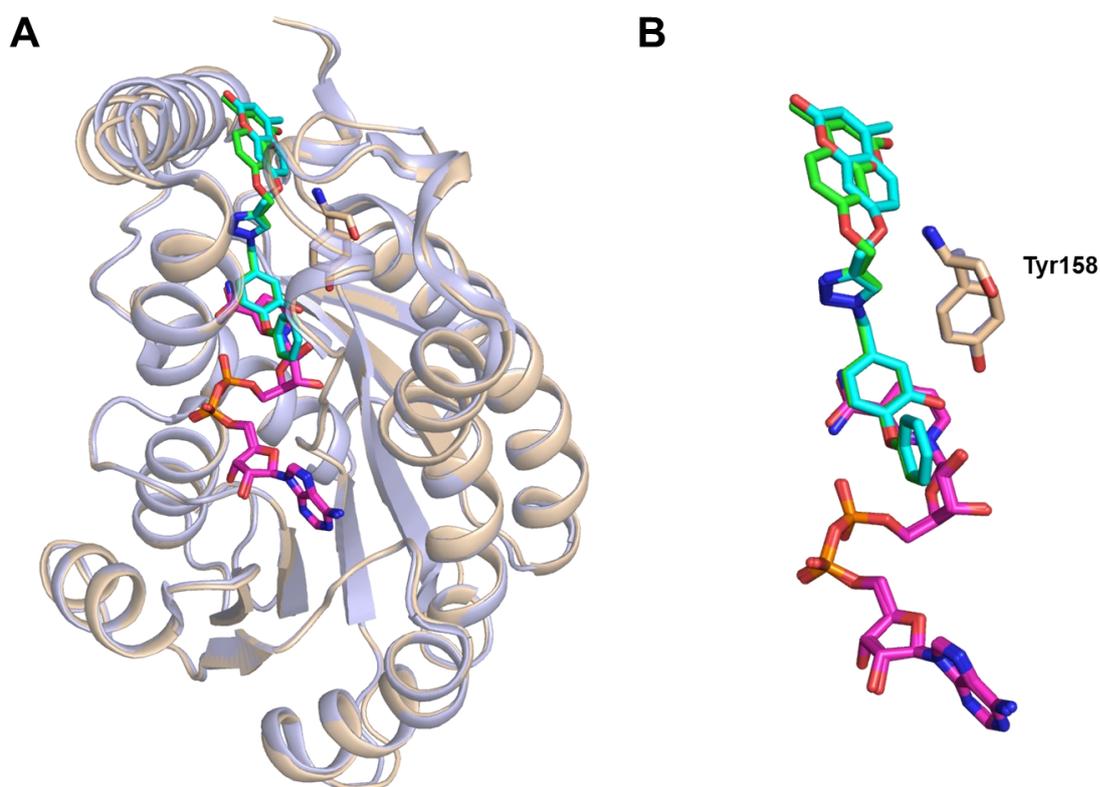


Figure 64 : Superposition des structures d'InhA de Mtb et Mab en complexe avec ED1727. (A) Vue générale. (B) Zoom dans le site actif. Le ligand de la structure d'InhA_{Mtb} (en bleu, 8OTN) est coloré en cyan. Le ligand de la structure d'InhA_{Mab} (en beige) est coloré en vert. Les cofacteurs sont colorés en magenta.

III. Conclusion

Les travaux préliminaires accomplis sur la protéine InhA_{Mab} ouvrent la voie à la recherche d'inhibiteurs directs de l'enzyme en transposant la stratégie utilisée pour InhA_{Mtb} . Les résultats obtenus permettent en effet d'envisager l'application directe des méthodes de criblage impliquant la pré-organisation de fragments, telles que la chimie combinatoire dynamique combinée à la cristallographie aux rayons X (présentée dans ce manuscrit) ainsi que la synthèse guidée par la cible (thèse de Méлина Chebaiki récemment soutenue²⁰⁵). Aussi, nous espérons que les études à venir pourront conduire à la découverte de nouveaux inhibiteurs afin de contribuer à lutter contre le problème de santé publique que représente Mab.

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse s'est efforcée au travers de plusieurs projets à développer de nouvelles molécules pour lutter contre les infections mycobactériennes, dont la tuberculose, une maladie causée par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) touchant plus de 10 millions de personnes chaque année. Une des approches les plus utilisées dans la lutte contre Mtb est l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques, des lipides spécifiques des mycobactéries et essentiels à leur survie. Cette thèse s'est axée principalement sur la conception d'inhibiteurs directs de la protéine InhA du système FAS-II impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques.

Plusieurs molécules étaient déjà connues pour être capables d'inhiber directement la protéine InhA. Parmi celles-ci on retrouve le triclosan, un antimicrobien et antifongique qui se lie dans la poche de fixation du substrat. Ainsi, les différents volets de cette thèse ont été orientés vers la synthèse, l'évaluation et la caractérisation de dérivés de diaryl éther, motif retrouvé dans le triclosan. Ces dérivés ont été conçus afin de cibler deux zones particulières de la protéine InhA, appelées portail majeur et portail mineur.

Une première approche par cristallographie combinatoire dynamique (DCX), une variante de la chimie combinatoire dynamique et qui s'apparente au *fragment-based drug design*, a été utilisée pour la conception d'inhibiteurs. L'utilisation de fragments diaryl éthers et hydrazines a conduit à la formation d'adduits à l'intérieur du site actif de la protéine InhA. Trois adduits, observés directement par cristallographie aux rayons X, se forment dans le portail majeur d'InhA. Malgré l'apport d'interactions supplémentaires par rapport aux fragments diaryl éthers de départ, les adduits obtenus présentent des inhibitions modestes contre InhA. Aucun des essais de DCX visant le portail mineur n'a conduit à l'obtention de cristaux de la protéine. Ces résultats représentent le deuxième exemple d'application de la DCX pour l'identification d'inhibiteurs et le premier exemple d'inhibiteurs obtenus par co-cristallisation.

Dans un second projet, nous avons exploré le site actif de la protéine InhA, en particulier le portail mineur, au travers de la synthèse de molécules comprenant plusieurs pharmacophores. Le portail mineur d'InhA est une région sous-exploitée pour l'inhibition de la protéine si l'on en juge par la littérature et le très grand nombre de structures de complexes d'InhA déposées dans la *Protein Data Bank*. Parmi les molécules que nous avons synthétisées, EG1-57, un bis-diaryl éther possédant une chaîne octyle, a montré une bonne activité inhibitrice ($IC_{50} = 0.70 \mu M$). La résolution de la structure cristallographique d'InhA en complexe avec cet inhibiteur a révélé un état d'ouverture du portail mineur inédit, dans lequel la chaîne alkyle et l'un des deux motifs diaryl éther sont simultanément retrouvés. Ceci montre la grande adaptabilité conformationnelle du site actif de la protéine InhA et laisse entrevoir la possibilité de concevoir

des inhibiteurs ciblant d'avantage cette zone. Cette grande ouverture observée soulève également la possibilité que ce portail puisse être le point d'entrée ou de sortie d'inhibiteurs et/ou des substrats énoyls en cours d'élongation.

Dans un troisième volet, nous avons développé une approche multi-cibles visant de façon concomitante le complexe HadABC et la protéine InhA. Cette approche combine un motif diaryl éther ainsi qu'un groupement thiosemicarbazide, qui une fois activé par l'enzyme EthA, sera capable d'inhiber HadABC par liaison covalente. Ainsi, cinq molécules duales ont été synthétisées et s'avèrent capables d'inhiber la protéine InhA, avec des IC_{50} comprises entre 63 nM et 2.30 μ M. Les tests d'activités enzymatiques menés indiquent que ces molécules sont métabolisables par EthA. Ces inhibiteurs ont montré une efficacité pour l'inhibition de la croissance de la souche H37Rv de Mtb mais également de souches multi-résistantes, en particulier à l'isoniazide et à l'éthionamide. Des études complémentaires, notamment par des approches protéomiques, sur la nature des dérivés générés par EthA ainsi que la possibilité de les voir former une liaison covalente avec le complexe HadABC, pourraient permettre de discriminer si ces molécules duales sont en mesure d'inhiber l'activité déshydratase.

Ces travaux sur l'inhibition des enzymes du système FAS-II sont transposables à d'autres mycobactéries, notamment à *Mycobacterium abscessus* (Mab) qui posent également de graves problèmes de santé publique. Ainsi, la production et la purification de la protéine InhA_{Mab} ont été réalisées durant cette thèse. Des essais de cristallisation menés en présence d'inhibiteurs de type diaryl éther conçus contre InhA_{Mtb} ont également conduit à l'obtention de structures de complexes d'InhA_{Mab}, illustrant de façon générale la possibilité de transposer des inhibiteurs d'une mycobactérie à une autre.

Ces différents résultats montrent que l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques, en passant par l'inhibition d'une ou plusieurs activités enzymatiques du système FAS-II, demeure une voie importante pour lutter contre le problème de santé publique que représente les infections mycobactériennes.

Material and methods

Biology

I. Production and purification of InhA

Plasmid:

Since 1995, production and purification of InhA_{Mtb} in *Escherichia coli* using plasmid vector containing *inhA* gene have been thoroughly described⁴³. The plasmid pET15b (GenScript), which encompasses a bacteriophage T7 promoter and a histidine tag with a thrombin-cleavable sequence upstream the multiple cloning site, has previously been used with success for InhA production. With this plasmid, the expression of inserted gene is inducible by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and an ampicillin resistance gene (AmpR) facilitates the selection of transformed bacteria. Consequently, we designed a pET15b plasmid with the optimized InhA sequence from Mtb (Uniprot P9WGR1) for *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain using the GenSmartTM Codon optimization tool (Genscript). This sequence was inserted using the BamHI and NdeI restriction sites (Figure 65).

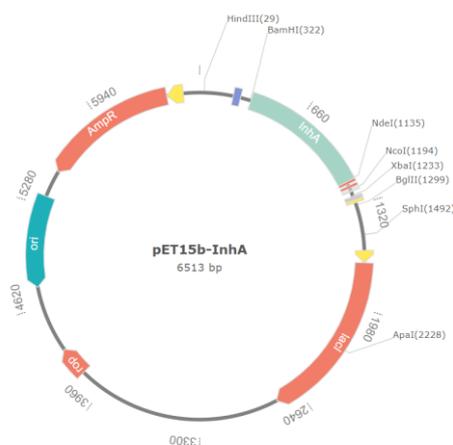


Figure 65 : Designed pET15b plasmid containing the *inhA* gene.

Culture medium and solution:

- Enriched LB culture medium (SOC) comprising 2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ and 10 mM MgCl₂ (Invitrogen).
- Culture medium LB agar (Sigma Aldrich) prepared at 35 g/L in milliQ water.
- Ampicillin solution at 100 mg/mL in milliQ water.
- Isopropyl- β -D-galactosylpyranoside (IPTG) solution prepared at 1 M in milliQ water.
- Phosphate buffered saline solution (PBS 10X, EUROMEDEX).

1. Transformation and production of InhA in *E. coli*

1.1. Transformation and preparation of stock bacteria

The transformation, involving the insertion of exogenous genetic information (in this case, the designed plasmid), was carried out using the thermal shock method. To 50 μL of competent *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), 1 μL of plasmid solution (40 ng/mL) was added. This bacteria solution was placed on ice for 1 h. Subsequently, a thermal shock lasting approximately 50 s at 42 $^{\circ}\text{C}$ was applied to rapidly increase the membrane fluidity, facilitating the crossing of the plasmid through the membrane. To promote bacterial growth post-transformation, preheated (at 37 $^{\circ}\text{C}$) enriched LB medium (SOC) (450 μL) was added to the solution. The bacterial mixture was then incubated for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ under agitation (250 rpm). 50 μL of this culture was dispensed onto a Petri dish containing LB-agar gel with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and underwent an overnight incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$. A pre-culture was carried out in LB medium (5 mL) containing ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by inoculating a colony from this plate and incubated for approximately 2 h under agitation (270 rpm). Following this, the pre-culture was diluted in LB medium (1.5 L) containing ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 4 h under agitation (170 rpm). This bacteria culture was supplemented with glycerol (25% v/v final), and 1 mL aliquots were stored at -80 $^{\circ}\text{C}$. These aliquots were subsequently used for InhA production.

1.2. Production and expression

Production of InhA was initiated with a pre-culture in LB medium (20 mL) contained ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by adding 100 μL of stock bacteria solution transformed with pET15b plasmid. This mixture was incubated overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ under agitation (180 rpm). Then, a culture was started in LB medium (990 L) containing ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by adding 10 mL of pre-culture solution. This solution was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ under agitation (150 rpm) until an optical density (OD) at 595 nm of 0.6 was reached, indicating the bacteria's exponential growth state. The production of InhA was induced by adding IPTG (1.0 mL at a concentration of 1 M). The solution was further incubated for 4 h at 30 $^{\circ}\text{C}$ under agitation (150 rpm). Following a centrifugation step at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min at 6000 $\times g$, the supernatant was discarded. Pelleted bacteria were recovered with PBS (25 mL) and subjected to another centrifugation at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min at 7000 $\times g$. After discarding the supernatant, pelleted bacteria were either used immediately for purification or stored at -80 $^{\circ}\text{C}$.

2. Purification of tagged and untagged InhA

The purification of InhA protein was conducted in multiple steps. A chromatography utilizing the affinity of the histidine tag for nickel atoms was performed to eliminate undesired proteins. Then, size-exclusion chromatography (SEC) was performed on histidine tag-cleaved or uncleaved InhA protein. All buffers were prepared in milliQ water and filtered off a 0.2 μm filter prior the use.

Tableau 10 : Buffers for affinity and size-exclusion chromatography.

Affinity chromatography buffers	
Buffer A: conditioning and loading buffer	Buffer B: elution buffer
20 mM Tris-HCl (3.73 g/L) 300 mM NaCl (17.5 g/L) 10 mM imidazole (0.68 g/L) pH = 7.9	20 mM Tris-HCl (3.73 g/L) 300 mM NaCl (17.5 g/L) 300 mM imidazole (20.41 g/L) pH = 7.9
Size-exclusion chromatography buffer	
Buffer C	
30 mM PIPES (9.05 g/L) 150 mM NaCl (8.75 g/L) pH = 6.8	

Equipment and instruments:

- Äkta purifier 10 (GE healthcare)
- DS-11 spectrophotometer (DeNovix)
- HisTrap HP 1 mL (Cytiva)
- PD10 desalting column (Cytiva)
- SepFast 16/60 6-600 kDa pg column (BioToolomics)
- Vivaspin 20 and Vivaspin 2, cut off 10 kDa (Cytiva)

2.1. Affinity chromatography

A bacterial pellet was resuspended in buffer A and lysed with an Emulsiflex-C5 cell disruptor (Avestin). The lysate was centrifugated at 4 °C for 30 min at 25000 \times g. The supernatant was filtered off with a 0.2 μm filter and injected onto the HisTrap column previously equilibrated with buffer A at a flow rate of 1 mL/min. Proteins that were not retained were directly eluted (Figure 66). The column was then washed off with buffer A until the OD value approached near 0, indicating no more proteins were eluting. Then, a step with 12% buffer B was employed to

elute low-affinity binding contaminant proteins. Finally, a gradient from 12% to 100% was applied to elute the tagged InhA protein.

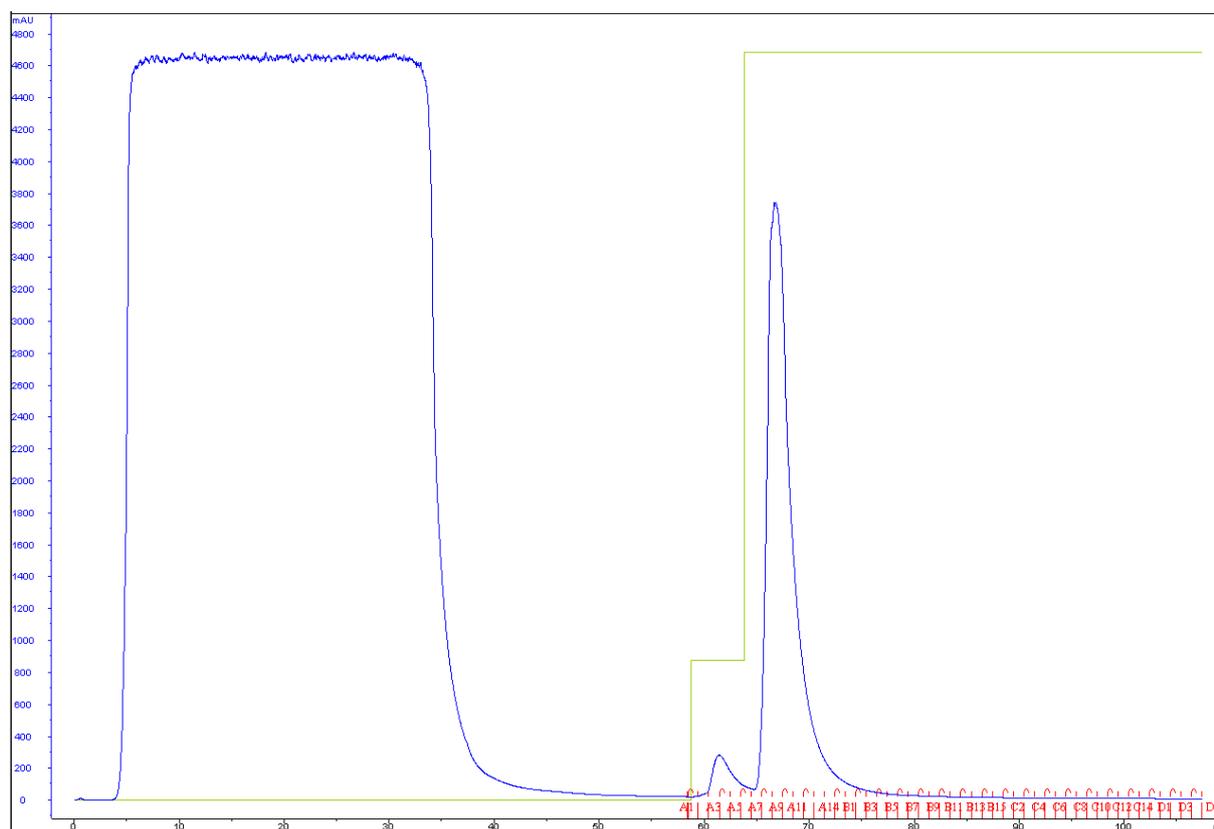


Figure 66 : Chromatogram obtained after the first affinity chromatography step of InhA. On this graph, the absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of the elution volume (in mL). The green curve represents the % of buffer B

2.2. Cleavage of the histidine tag

During this thesis, we used histidine-tagged InhA for enzymatic assays and untagged InhA for crystallization assays. The rationale behind using cleaved form is that the tag may inhibit protein crystallization.

Histidine tag cleavage was performed on pooled fractions of tagged InhA protein using the thrombin protease (Novagen). Since thrombin is sensitive to imidazole, 2.5 mL of concentrated InhA protein was loaded onto a PD10 column previously conditioned with SEC buffer. The elution was carried out using SEC buffer to recover tagged InhA protein free of imidazole. When loaded onto this column, small molecular weight compounds are rapidly eluted, allowing buffer exchanges. The protein solution was left to stand overnight at room temperature for thrombin cleavage after filling up with solutions as described in the following table.

Tableau 11: Solution for the cleavage of the InhA histidine tag.

Solution	Volume (mL)
10X cleavage buffer from thrombin (200 mM Tris-HCl, 1.5 mM NaCl, 25 mM CaCl ₂ , pH 8.4)	4
Tagged InhA	3.5 (corresponding to 22.4 mg)
Thrombin	13.2 μ L
MilliQ water	32.5

The cleavage by thrombin results in the release of native InhA protein with an excess of 3 residues at the N-terminal (Gly-Ser-His) position.

2.3. Affinity chromatography of untagged InhA

After overnight cleavage, the protein solution was filtered through a 0.2 μ m filter and reinjected onto the HisTrap affinity column pre-equilibrated with buffer A. The same protocol as described above was employed. Since the untagged InhA protein no longer has high-affinity binding to the column, the desired protein was eluted during the washing step with buffer A (Figure 67). The residual uncleaved InhA protein was eluted while increasing the percentage in buffer B.

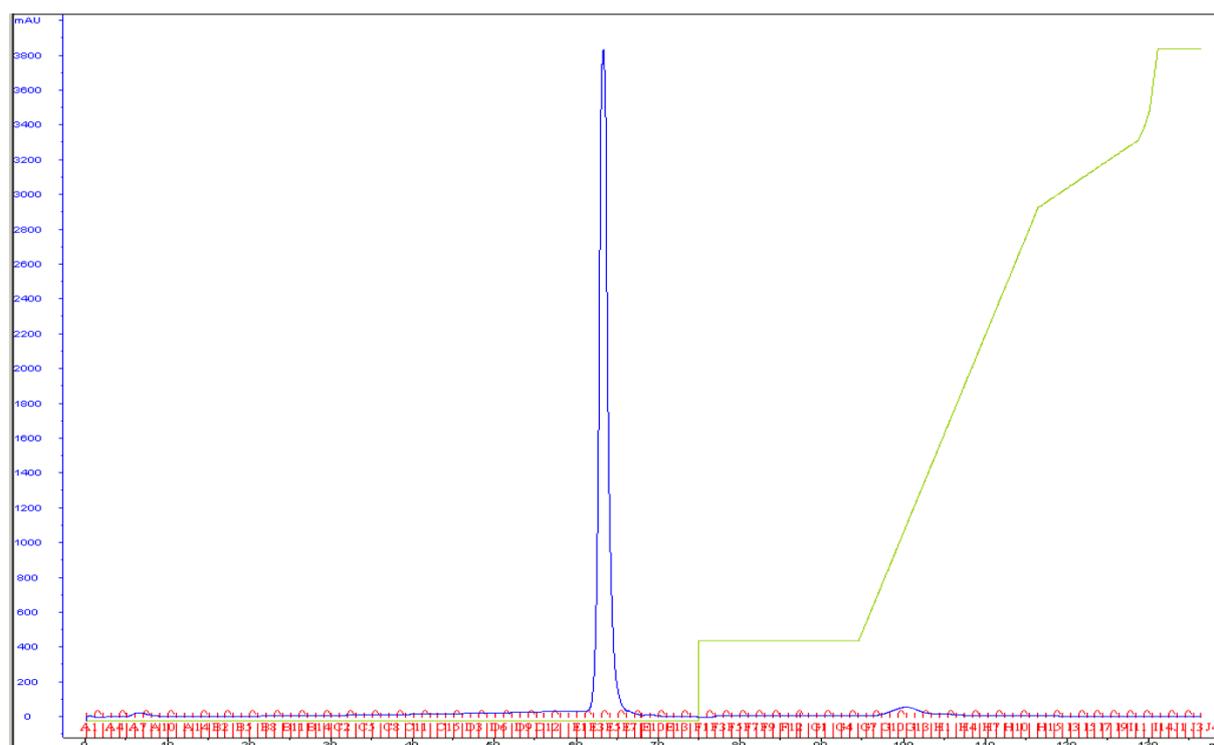


Figure 67 : Chromatogram obtained after affinity chromatography on cleaved InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as function of elution volume (mL). The green curve represents the B buffer %. The large peak corresponds to cleaved InhA. The small peak at 100 mL of elution corresponds to the residual uncleaved InhA.

2.4. Size-exclusion chromatography

To further enhance the purity of protein samples, a SEC was performed on a SepFast 16/60 6-600 kDa pg column. This column is composed of small particles of dextran and agarose with pores that allow the entry of small molecules, thereby increasing their time/volume of elution.

The fractions corresponding to the protein after affinity chromatography were concentrated to 2-2.5 mL and injected onto the SEC column previously equilibrated with buffer C at a flow rate of 1 mL/min. The desired proteins started to elute at 60 mL (Figure 68).

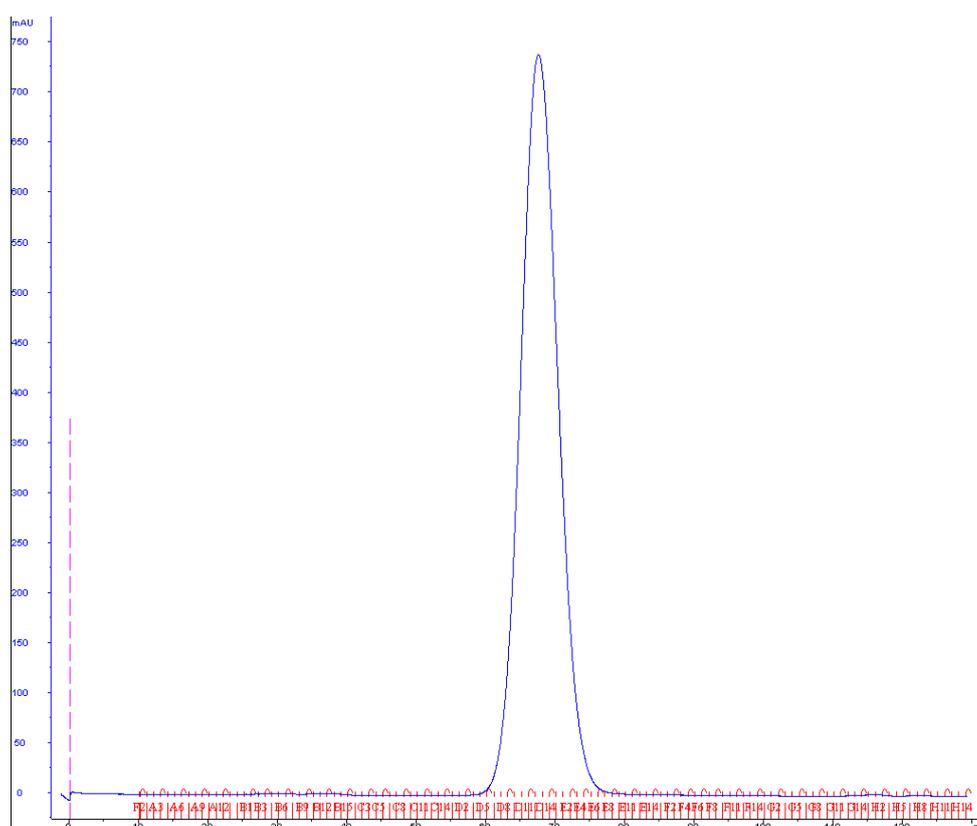


Figure 68 : Chromatogram obtained for size-exclusion chromatography for untagged *InhA*. The absorbance at 280 nm (in blue) is plotted as function of the elution volume (in mL).

During this purification, 10.3 mg of cleaved *InhA* were purified from the injected 11.7 mg. Typically, from 1 L bacterial culture, around 20 mg of pure cleaved protein are obtained.

The same method was applied to both tagged and untagged *InhA*.

2.5. Electrophoresis gel

During purification, fractions from different steps were denatured with 4X Laemmli buffer (Bio-Rad) supplemented with β -mercaptoethanol by heating at 95 °C and deposited on a

12% polyacrylamide gel to monitor purification and cleavage efficiency on InhA. Along with these samples, protein ladder (10-170K, Fermentas) was also added (Figure 69). Protein bands were revealed using a coloration buffer containing Coomassie blue (50% EtOH, 10% AcOH, 0.125% Coomassie blue R250). As shown in Figure 69, pure protein after the various steps of purification.

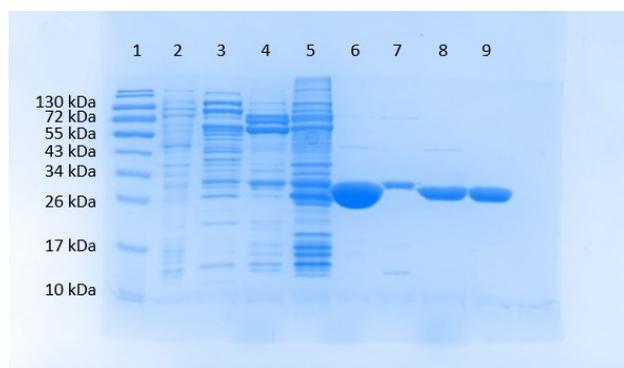


Figure 69 : *Electrophoresis gel of samples from the different InhA purification steps. 1: protein ladder; 2: cell lysate; 3: flow-through and 4: contaminant from the first affinity chromatography step; 5: another fraction corresponding to contaminant; 6: tagged InhA from affinity chromatography; 7: tagged InhA protein from SEC; 8 and 9: fractions of untagged InhA after SEC.*

The histidine tagged InhA, used for enzymatic assays, was diluted to a final concentration of 5 μM and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ after a flash freeze step in liquid nitrogen. Untagged InhA protein, for crystallization assays, was concentrated around 400 μM and flash frozen before storing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II. Crystallization and structure determination

Crystallization of untagged InhA were performed using various equipment accessible through the Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse (PICT). During this thesis, diffraction data were collected at various synchrotron facilities: ALBA (Barcelona); ESRF (Grenoble) and SOLEIL (Paris).

Crystallization assays were performed using the vapor diffusion method. In this method, a mixed solution of protein and precipitating agent is slowly concentrated by vapor diffusion from the crystallization drop to the more concentrated reservoir solution. This eventually leads to the nucleation of first crystals that will further grow with time.

1. Co-crystallization and soaking

1.1. Co-crystallization

Crystallization assays were performed with thawed untagged InhA protein obtained after size-exclusion chromatography and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Most suitable concentrations for InhA were 4 and 8 mg/mL (140 and 280 μM , respectively) during the incubation states with a 1:10 InhA:cofactor molar ratio, representing final cofactor concentrations of 1.4 or 2.8 mM, respectively. After 15 min at room temperature, 1 μL of ligands (typically at a final concentration of 50 mM in DMSO) was added to 19.0 μL aliquots of InhA-cofactor solutions. These aliquots were left 2 h at room temperature following the addition of ligands. Meanwhile, 96-well crystallization plates (MRC2, MRC Crystallization Plate - UV polymer MD11-00U-100) reservoirs were filled with 40 μL of crystallization solutions. Drops were prepared by mixing 200 nL of the prepared protein aliquots and 200 nL of reservoir with a Mosquito (SPT Labtech) and stored at either 12 or 20 $^{\circ}\text{C}$. The most suitable crystallization condition, using PEG or MPD, led to crystallization in two to five days at 20 $^{\circ}\text{C}$.

- MPD condition: 10% MPD (Sigma Aldrich), 100 mM HEPES, 50 mM sodium citrate, pH 7.5.
- PEG condition: 14% PEG 4000 (Sigma Aldrich), 100 mM ammonium acetate, 100 mM N-(2-acetamido)iminodiacetic acid (Fluka), 5% v/v DMSO, pH 6.8.

1.2. Soaking

Soaking experiments were carried out for DCX and for ligands that have not co-crystallized. InhA protein crystals obtained with either NADH or NAD^+ were used for these soaking experiments. For DCX experiments, soaking was performed only on crystals obtained in the PEG condition with cofactor NAD^+ . A soaking solution prepared by complementing the crystallization solution with cofactor, to prevent its back soaking from the crystals, was dispensed in reservoirs of a 24-well plate (Hampton Research), with 500 μL in each reservoir. A soaking solution was prepared by adding 1 μL of ligands in DMSO to 19 μL of the reservoir solution. 1 μL of this solution was deposited on a glass cover-slip, put upside down onto a well from the 24-well plate and sealed with grease. Various soaking times from few minutes to few days were performed.

Crystals from co-crystallization or soaking experiments were cryo-protected with either glycerol or paraffine to prevent ice formation during the cryocooling step in liquid nitrogen. The crystals were stored in Unipuck and sent to synchrotron facilities for diffraction experiments. These experiments were mainly done in remote mode. Throughout the experiments, paraffine was noticed as a better cryo-protectant in case of InhA.

It is worthwhile mentioning that InhA_{Mtb} -ligand complexes could only be obtained in the PEG condition. Furthermore, since imine, hydrazone and acylhydrazone formation is faster at acidic pH, co-crystallization and soaking experiments were also performed at various acidic pH (5.5, 6.0 and 6.5). Usable crystals were obtained at pH values of 6.0 and 6.5 but they diffracted poorly at high resolution.

2. Data processing and structure determination

Collected data were either used directly from the beamline automated process or processed using AutoProc²⁰⁶ and/or XDS²⁰⁷. Structures were determined and refined using the CCP4²⁰⁸ suite or Buster²⁰⁹.

2.1. Data processing

The data processing is separated in three main steps: indexation, integration, scaling and space group determination.

In the indexation step, crystal orientation and cell parameters are determined based on diffraction spots position. The use of a large number of images increases the reliability of the determined parameters. During this step, Miller indices (*hkl*) will be attributed to each diffraction spot. At this stage, few hypotheses on space group can be made based on the metrics of cell parameters. These hypotheses have to be confirmed at the scaling step, at the end of data processing.

Since a diffraction spot has a tridimensional volume and data are nowadays collected with small angle oscillations (0.05 – 0.1 ° per image), a same spot can be recorded on many successive images. During the integration step, a 3D profile is built and used to estimate the intensity for each spot.

Finally, the scaling step applies corrections to integrated intensities for each spot to take in account numerous factors such as the degradation caused by the radiation, variation of beam intensity and experimental geometry. Scaling is based on the comparison of symmetry equivalent reflections, according to the spacegroup hypothesis made at the indexing step.

Hence, scaling also allows to determine possible spacegroups. The analysis of systematic absences permits to determine the presence or the absence of any screw axis. In that case, the discrimination of enantiomorphic space groups is made at the molecular replacement step.

At the end, different statistics allow to evaluate the quality of the data, especially data completeness, R_{sim}, I/sigma and CC(1/2). The R_{sim} evaluates the dispersion around the mean of different observations of symmetry equivalent reflections. This value increases with the resolution. An R factor superior to 10% at low resolution is indicative of a wrong space group assignment. I/sigma corresponds to the signal to noise ratio. The CC(1/2) is the correlation between two randomly selected halves of the dataset. A good dataset will have a completeness close to 100%, R_{sim} as low as possible, I/sigma superior to 1 and a CC(1/2) as close as possible to 1. All these statistics help to choose the appropriate maximum resolution of the data.

2.2. Structure resolution

The structures of InhA were solved by molecular replacement with MOLREP²¹⁰ using InhA structures deposited on PDB as template. Refinement was performed using Refmac5²¹¹. The dictionary for compounds were generated using Grade2²¹² and used on Coot²¹³ for model building.

a. Molecular replacement

At the end of data processing, an *MTZ* file containing the intensities for all unique reflection is obtained. Since the diffraction data are in the reciprocal space, a Fourier transform is required to compute the electron density (ρ) for each x,y,z position in the unit cell:

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{ia(hkl)} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

x,y,z = position in direct space
h,k,l = in reciprocal space
V = volume of cell unit
|F(hkl)| = h,k,l reflection amplitudes
a(hkl) = phase of hkl reflection

The drawback of this is the requirement of phase information, which cannot directly be obtained from the diffraction experiment. Different methods can be applied to determine this phase information. Since structures of InhA are available on PDB, we used the molecular replacement method. During the molecular replacement, a virtual cell unit is generated with the same cell parameters as the experimental structure. Then by rotation and translation operations of the molecular replacement template, a virtual cell unit is constructed as close as possible as the unit cell of the crystal. At this stage, the phase information needed can be calculated from the virtual unit cell and used to compute the electron density map.

b. Electron density map analysis and structure refinement

Two electron density maps can be computed: $2Fo-Fc$ and $Fo-Fc$. The $2Fo-Fc$ corresponds to the electron density map of well-determined atoms in the model in the unit cell/.v The $Fo-Fc$ map corresponds to the electron density differences between observed and calculated electron densities. A positive peak in this difference map suggests that electrons are present in the observed electron density, ie in the crystal, but not in the calculated electron density, ie in the model. On the contrary, a negative peak indicates the presence of electron density in the model but not in the crystal (Figure 70). The first step is to check the whole electron density map and correct/construct the model accordingly. This will correct the molecular replacement model for conformational changes, for instance for the substrate binding loop. When the protein part of the model has been corrected and refined in reciprocal space with *refmac5*, solvent and other molecules, such as precipitant agent, buffer, salt, are added to the model. These correction to the model, performed in the direct space, will increase the correlation with the data in reciprocal space. This will result in the lowering of the R and R_{free} factors which are computed from the observed (F_{obs}) and calculated (F_{calc}) amplitudes of structure factors. Several refinement cycles are carried out until convergence.

At this stage, it is possible to model the cofactor and the inhibitor if positive peaks in the difference map indicate their presence (Figure 70). Dictionaries for the cofactor and ligands are generated using the *Grade2* and used in *coot* and *Refmac5*.

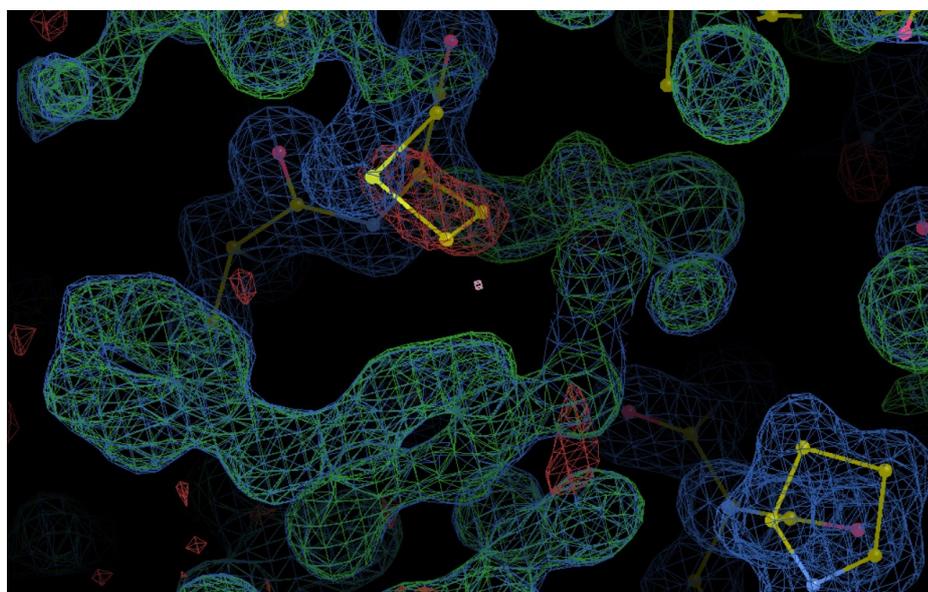


Figure 70 : Electron density map for *InhA* from *Mab* co-crystallized with *ED1785*. The $2Fo-Fc$ map is in blue, and the $Fo-Fc$ map is in green and red for positive and negative densities, respectively.

R and R_{free} factors are used to evaluate the progress of refinement. Both compare the amplitudes of the model derived structure factors to the observed data: the R factor is computed from the data used in refinement, whereas the R_{free} relies on a small set of randomly selected data, set apart to allow for cross validation. The values obtained at the end of refinement are dependent on the resolution of the data. R is usually around 0.2 and R_{free} should be only slightly higher.

III. Evaluation of InhA inhibition

Enzymatic assays to evaluate the inhibition of InhA activity by synthesized compounds were performed on the tagged protein. As mentioned in this manuscript, InhA protein catalyzes the reduction of the double bond of enoyl-ACP substrates by oxidizing NADH into NAD^+ . Since 1995, the *trans*-2-dodecenoyl-CoA (DDCoA) analogue is widely used as substrate for enzymatic assays⁴³. This analogue contains a coenzyme A and an enoyl chain, mimicking the natural substrate (Figure 71).

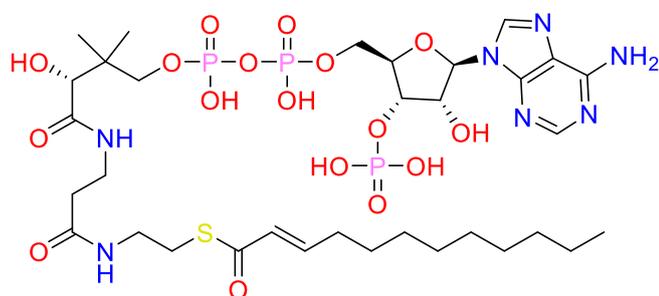


Figure 71 : Structure of *trans*-2-dodecenoyl-CoA.

The activity of InhA is monitored by following the absorbance at 340 nm, as only NADH absorbs at 340 nm (Figure 72). The rate of NADH consumption is proportional to the InhA activity.

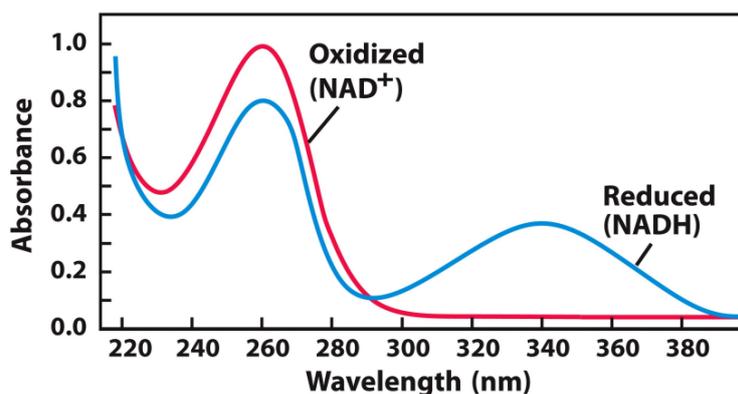


Figure 72 : Absorption spectra of NADH and NAD^+ .

Solution used during enzymatic assays:

- PIPES buffer (30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8).
- 2-*trans*-dodecenoyl-CoA (DDCoA) : a stock solution was prepared at 5 mM (4.7 mg/mL) in PIPES buffer. The concentration of a 1:50 diluted solution was checked at 260 nm ($\epsilon_{260} = 22600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). The concentrated solution was diluted to 1 mM and stored at -18 °C.
- NADH: a stock solution of 5 mM (3.5 mg/mL) was freshly prepared prior enzymatic assays. The concentration of the prepared solution was checked with a 1:20 dilution at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).
- Tagged InhA: stock solution of 5 μM in PIPES buffer.
- Inhibitors: stock solutions at 10 mM in DMSO. Various dilutions from these stock solutions were prepared during IC₅₀ determination.

Tableau 12: Volumes and final concentrations of solution for enzymatic assays.

Components	Concentration of stock solution	Volume to be added (μL)		Final concentrations
DDCoA	1 mM	50		50 μM
NADH	5 mM	50		250 μM
DMSO	-	45 (50) ^a	V _{tot} = 50 μL	5 % v/v
Inhibitor	10 mM	5 (0) ^a		50 μM
InhA enzyme	5 μM	10		50 nM
PIPER buffer	-	840		-

^a Volumes used for InhA reference activity, without inhibitors.

In a 1 mL cuvette, PIPES buffer, DMSO, inhibitors, NADH and DDCoA were added successively. The mixture was homogenized by inverting and incubated at 25 °C for 1 min. The reaction was initiated by the addition of the InhA protein. The mixture was homogenized by inverting and the oxidation of NADH was monitored by measuring absorbance at 340 nm over 3 min. Then, the percentage inhibition was determined as follows:

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{reference slope} - \text{inhibitor slope}}{\text{reference slope}} \times 100$$

For the most active compounds, the inhibition percentage of InhA activity was plotted as a function of the inhibitor concentration (using at least six different concentrations of compound) to evaluate IC₅₀. The IC₅₀ value was calculated using the SciDAVis software by solving the non-linear regression model formula as follows:

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

y = % inhibition
 x = compound concentration
 A = minimum value of y (here 0)
 B = maximum value of y (here 100)
 C = IC_{50}
 D = slope

IV. Mycobacterial growth inhibition assays

All the mycobacterial growth experiments were carried out thanks to an international collaboration with the group of Professor Maria Rosalia Pasca at the “Lazzaro Spallanzani” department of Biology and Biotechnology in Pavia, Italy.

Log-phase bacterial cultures (OD_{600} = 0.5 to 0.8) are diluted to a theoretical OD_{600} = 0.001. Then, 100 μ L of the bacterial suspensions is added in a 96-well black plate (Fluoronunc, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) containing 100 μ L of Middlebrook 7H9, without the addition of Tween 80, in the presence of serial compound dilution. A growth control containing no compound and a sterile control without inoculum are also included. After 7 days of incubation at 37 °C, 10 μ L of resazurin (0.025% w/v) are added and, after 24 h of further incubation, fluorescence is measured using a Fluoroskan™ Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific; excitation = 544 nm, emission = 590 nm). Bacterial viability is calculated as a percentage of resazurin turnover in the absence of compound.

V. Cell viability assays

All the cell viability assays carried out in collaboration with the Deciphering and Drugging DNA Repair team directed by Dr Sébastien Britton at IPBS.

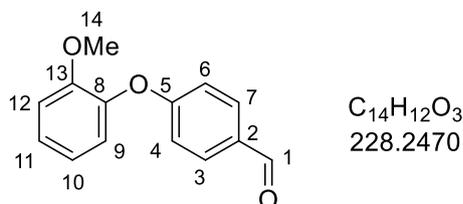
Human cell lines were grown at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator in DMEM high-glucose (Thermo Fisher Scientific) for HCT116 (Horizon Discovery), MEM containing Earle’s salts, sodium pyruvate and non-essential amino acids for CACO2 (DSMZ), HepG2 (ATCC) and WI38hTERT (generous gift from Dr Olivier Sordet, CRCT, Toulouse). All media contained 10% or 20% (for CACO2) fetal bovine serum (Eurobio), 2.5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. For SRB assays, cells were plated in 96-well plates (Nunc Edge) at 1500, 2500, 3500 and 9000 cells/well respectively for HCT116, CACO2, WI38hTERT and HepG2 24 h before treatment with the drug. Serial 2-fold dilutions were performed in medium and used to treat cells for 72 h. At the end of treatment, cells were fixed and stained with SRB as described previously²¹⁴. After resuspending the dye in a 10 mM Tris-

base solution, the OD at 490 nm of each well was measured (μ Quant plate reader, Bio-tek) as a readout of the cell number. For calculation, background absorbance was subtracted to each value and the data were normalized to the value measured in untreated wells. Each point was measured in duplicate and the IC_{50} were computed from at least three independent experiments using the GraphPad Prism software to perform a non-linear regression to a four-parameter logistic curve (Inhibitor vs response; variable slope). An approximate value was provided when the curve did not fit the logistic curve.

Chemistry

All commercial reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Alfa Aesar and were used without further purification. CH_2Cl_2 and *N,N*-dimethylformamide were purified over a solvent purification system. Proton and carbon nuclear magnetic resonance (1H NMR and ^{13}C NMR) spectra were recorded on Bruker advance (300 MHz/75 MHz or 500 MHz/125 MHz) spectrometers. Chemical shifts were recorded in parts per million (ppm, δ) relative to the corresponding deuterated solvent (7.26 ppm and 77.0 ppm for $CDCl_3$). 1H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), quintuplet (quint), sextuplet (sext), multiplet (m), broad (br)n apparent (app). Coupling constants (*J*) are reported in hertz (Hz). High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed on a Thermo-Finnigan MAT 95 XL instrument. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck 60 F254 pre-coated silica gel plates (0.2 mm thickness). Visualization was accomplished by UV irradiation at 254 nm. Flash column chromatography was performed on a Puriflash from Interchim or Combiflash from Serlabo.

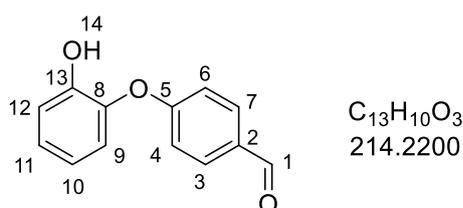
4-(2-Methoxyphenoxy)benzaldehyde (1)



To a solution of **guaiacol** (0.500 g, 4 mmol, 1eq) and **4-fluorobenzaldehyde** (0.600 g, 4.8 mmol, 1.2 eq) in DMF (20 mL), K_2CO_3 (1.39 g, 10 mmol, 2.1 eq) was slowly added. After 12 h at 120 $^{\circ}C$, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*.

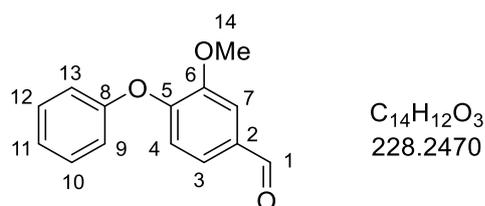
Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate: 95/5 to 90/10) gave compound **1** as a lightly yellow oil (75%, 0.801 g). $R_f = 0.27$ (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.90 (s, 1H (H_1)); 7.85 – 7.78 (m, 2H ($\text{H}_{3,7}$)); 7.28 – 7.19 (m, 1H (H_{11})); 7.10 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H (H_{12})); 7.06 – 6.95 (m, 4H ($\text{H}_{4,6,9,10}$)); 3.79 (s, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 190.8 (C_1); 163.5 (C_5); 151.6 (C_{13}); 142.8 (C_8); 131.8 (C_2); 130.8 ($\text{C}_{3,7}$); 126.4 (C_{11}); 122.5 (C_{10}); 121.3 (C_9); 116.2 ($\text{C}_{4,6}$); 113.0 (C_{12}); 55.8 (C_{14}).

4-(2-hydroxyphenoxy)benzaldehyde (**2**)



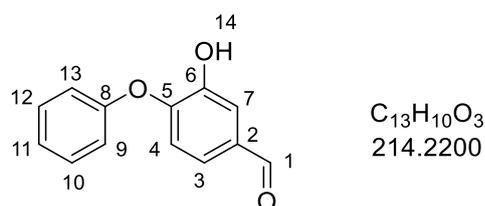
To a solution of aldehyde **1** (0.200 g, 0.876 mmol, 1 eq) in anhydrous dichloromethane (10 mL) under argon at -78°C was added dropwise **BBr₃ 1M in dichloromethane** (3.5 mL, 3.500 mmol, 4 eq). After 6 h (from -78°C to room temperature), cold methanol (5 mL) was added and the mixture was stirred for 5 minutes. Saturated aqueous NaHCO_3 (20 mL) was added and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 90/10) gave compound **2** as a beige solid (72%, 0.135 g). $R_f = 0.15$ (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 9.87 (s, 1H (H_1)); 7.84 – 7.78 (m, 2H ($\text{H}_{3,7}$)); 7.15 (ddd, $J = 8.5, 6.9, 1.7$ Hz, 1H (H_{11})); 7.11 – 7.04 (m, 3H ($\text{H}_{4,6,12}$)); 7.00 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H (H_9)); 6.92 (ddd, $J = 8.1, 6.9, 1.9$ Hz, 1H (H_{10})); 5.90 (bs, 1H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 190.9 (C_1); 162.5 (C_5); 147.9 (C_{13}); 141.5 (C_8); 132.1 (C_2); 131.5 ($\text{C}_{3,7}$); 126.4 (C_{11}); 121.0 (C_{10}); 120.8 (C_9); 117.1 ($\text{C}_{4,6}$); 117.0 (C_{12}); HRMS (DCI-CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) Calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3$: 215.0708. Found: 215.0706.

3-methoxy-4-phenoxybenzaldehyde (3)



The compound **3** was synthesized as described previously²¹⁵. To a solution of **phenol** (1.00 g, 10.6 mmol, 1eq) and **4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde** (1.80 g, 11.7 mmol, 1.1 eq) in DMF (40 mL), K_2CO_3 (3.68 g, 26.3 mmol, 2.5 eq) was slowly added. After 12 h at 120 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (linear gradient petroleum ether/ethyl acetate = 95/5 to 80/20) gave compound **3** as a lightly yellow oil (66%, 0.212 g). R_f = 0.26 (petroleum ether/ethyl acetate: 9/1). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.88 (s, 1H (H_1)); 7.52 (d, J = 1.9 Hz, 1H (H_7)); 7.40 – 7.32 (m, 3H ($H_{3,10,12}$)); 7.20 – 7.13 (m, 1H (H_{11})); 7.07 – 7.01 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.91 (d, J = 8.2 Hz (H_4)); 3.94 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 190.8 (C_1); 155.7 (C_8); 152.1 (C_6); 150.9 (C_5); 132.1 (C_2); 129.9 ($C_{10,12}$); 125.7 (C_4); 124.3 (C_3); 119.9 ($C_{9,13}$); 117.7 (C_{11}); 110.5 (C_7); 56.0 (C_{14}).

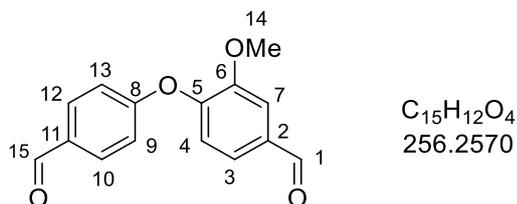
3-hydroxy-4-phenoxybenzaldehyde (4)



To a solution of aldehyde **3** (0.449 mg, 1.97 mmol) solubilized in AcOH (2mL), **HBr 48%** (2 mL) was added and the mixture was stirred for 5 h at 110 °C. Then a $NaHCO_{3(aq)}$ saturated was added slowly and was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). Then the organic solution was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 70/30) gave compound **4** as a yellow solid (62%, 0.257 g). R_f = 0.39 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.87 (s, 1H (H_1)); 7.55 (d, J = 2.0 Hz, 1H (H_7)); 7.46 – 7.38 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.35 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H (H_3)); 7.27 – 7.20 (m, 1H (H_{11})); 7.13 – 7.07 (m, 2H, ($H_{9,13}$)); 6.87 (d, J = 8.3 Hz, 1H (H_4)); 5.97 (bs, 1H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 191.0 (C_1); 154.9 (C_8); 150.0

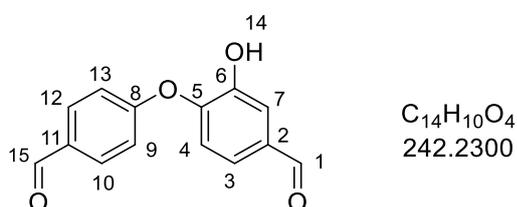
(C₆); 147.2 (C₅); 132.4 (C₂); 130.2 (C_{10,12}); 125.1 (C₄); 123.5 (C₃); 119.7 (C_{9,13}); 116.4 (C₁₁); 116.2 (C₇); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) Calculated for C₁₃H₁₁O₃: 215.0708. Found: 215.0706

4-(4-formylphenoxy)-3-methoxybenzaldehyde (**5**)



To a solution of vanilline (5.93 g, 39 mmol) dissolved in anhydrous DMF (70 mL), were added K₂CO₃ (10.78 g, 78 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (6.28 mL, 58.5 mmol). The solution was heated to 120 °C overnight and then the solvent was removed *in vacuo*. The mixture was dissolved with ethyl acetate and washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated at reduced pressure to give compound **5** as a beige solid (92%, 9.27 g). R_f = 0.48 (petroleum ether/ethyl acetate = 7/3). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.97 (s, 1H (H₁)); 9.94 (s, 1H (H₁₅)); 7.90 – 7.84 (m, 2H (H_{10,12})); 7.57 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H₇)); 7.50 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H₃)); 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, (H₄)); 7.11 – 7.00 (m, 2H (H_{9,13})); 3.89 (s, 3H (H₁₄)); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 190.7 (C₁); 190.6 (C₁₅); 162.0 (C₈); 151.9 (C₆); 148.9 (C₅); 134.1 (C₁₁); 131.9 (C_{10,12}); 131.8 (C₂); 125.3 (C₄); 121.4 (C₃); 117.3 (C_{9,13}); 111.2 (C₇); 56.0 (C₁₄); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) Calculated for C₁₅H₁₃O₄: 257.0814. Found: 257.0821.

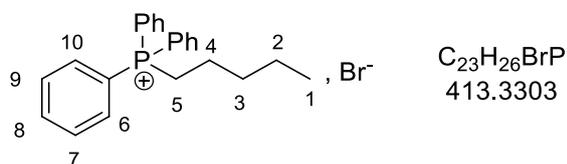
4-(4-formylphenoxy)-3-hydroxybenzaldehyde (**6**)



To a solution of **5** (0.101 g, 0.395 mmol) in AcOH (1 mL), **HBr 48%** (1 mL) was added and the mixture was stirred for 6 h at 120 °C. Then a NaHCO_{3(aq)} saturated solution was added slowly and was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). Then the organic solution was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 70/30) gave compound **6** as a pale solid (96%, 0.091 g). R_f = 0.27 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.97 (s, 1H (H₁₅)); 9.93 (s, 1H (H₁)); 7.97 – 7.88 (m, 2H (H_{10,12})); 7.60 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H₇)); 7.44 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H₃)), 7.22 – 7.15 (m, 2H (H_{9,13}), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H₄)); 5.95 (bs,

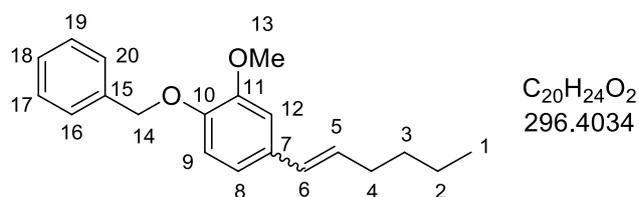
^1H (H_{14}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 191.3 (C_1); 191.1 (C_{15}); 161.2 (C_8); 148.5 (C_6); 147.7 (C_5); 133.8 (C_{11}); 132.1 ($\text{C}_{10,12}$); 131.9 (C_2); 123.6 (C_4); 120.1 (C_3); 118.0 ($\text{C}_{9,13}$); 117.2 (C_7); HRMS (DCI-CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 243.0652. Found: 243.0665.

Pentyltriphenylphosphonium bromide (7)



The compound **7** was synthesized as described previously²¹⁶. To a solution of **PPh₃** (3.170 g, 12.05 mmol, 1 eq) in CH_3CN (50 mL) under argon, was added dropwise **1-bromopentane** (2.730 g (2.241 mL), 18.08 mmol, 1.5 eq). After 16 h at 85 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (50 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 40 mL). Then the organic solution was dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/dichloromethane 100/0 to 90/10) gave compound **7** as white solid (100%, 4.997 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.71-7.55 (m, 15H ($\text{H}_{6,7,8,9,10}$)); 3.52 (m, 2H (H_5)); 1.48 (m, 4H ($\text{H}_{3,4}$)); 1.16 (sext_{app}, $J = 7.2$ Hz, 2H (H_2)); 0.67 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_1)).

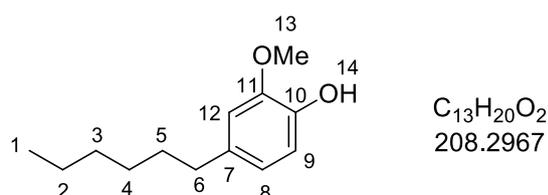
1-((4-(hex-1-enyl)-2-methoxyphenoxy)methyl)benzene (8)



The compound **8** was synthesized as described previously¹¹⁰. To a solution of **4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde** (5.014 g, 20.700 mmol, 1 eq) and **7** (9.500 g, 23.000 mmol, 1.1 eq) in dioxane (40 mL), were added K_2CO_3 (5.700 g, 41.240 mmol, 2 eq) and **(nBu)₄NBr** (13.200 g, 40.950 mmol, 2 eq). After 20 h at 110°C, the solution was cooled to room temperature and filtrated. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (petroleum ether/ethyl acetate from 100/0 to 80/20) to provide compound **8** (63%, 1.77 g) as a colorless oil in a cis/trans (35/65) ratio. $R_f = 0.8$ (petroleum ether/ethyl acetate 85/15). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.46-7.29 (m, 5H ($\text{H}_{16,17,18,19,20}$)); 6.92-6.77 (m, 3H ($\text{H}_{8,9,12}$)); 6.35-6.28 (m, 1H (H_6)); 6.09 (tt, $J = 6.9$ Hz, 1H ($\text{H}_{5\text{cis}}$)); 5.59 (dt, $J = 11.7, 7.2$ Hz, 1H ($\text{H}_{5\text{trans}}$)); 5.17 (s, 1H ($\text{H}_{14\text{trans}}$)); 5.15 (s, 1H ($\text{H}_{14\text{cis}}$)),

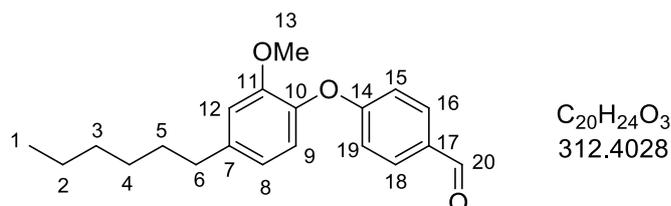
3.91 (s, 3H (H₁₃cis)); 3.89 (s, 3H (H₁₃trans)); 2.37-2.30 (m, 2H (H₄trans)); 2.23-2.16 (m, 2H (H₄cis)), 1.50-1.30 (m, 4 H (H_{2,3}), 0.92 (q_{app}, *J* = 6.9 Hz, 3H (H₁)); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 149.5 and 148.9 (C₁₁); 147.1 and 146.7 (C₁₀); 137.0 (C₁₅); 131.6 and 129.1 (C₆); 131.4 and 131.1 (C₇); 129.1 and 128.2 (C₅); 128.2 (2C, C_{17,19}); 127.5 (2C, C_{16,20}); 127.0 (C₁₈); 121.0 and 118.4 (C₈); 113.9 and 113.4 (C₉); 112.4 and 108.9 (C₁₂); 70.7 (C₁₄); 55.6 (C₁₃); 32.4 and 31.9 (C₄); 31.4 and 28.2 (C₃); 22.2 and 22.1 (C₂); 13.8 and 13.7 (C₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₀H₂₅O₂ 297.1855, found 297.1853.

4-hexyl-2-methoxyphenol (**9**)



The compound **9** was synthesized as described previously¹¹⁰. To a solution of **8** (0.636 g, 2.146 mmol, 1 eq) in 25 mL of methanol was added Pd/C (50 mg, 0.469 mmol, 0.22 eq) under H₂ stream at room temperature and atmospheric pressure during 12 h. After a filtration on celite, methanol was evaporated under reduce pressure to provide compound **9** (98%, 0.476 g) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H (H₉)); 6.68-6.71 (m, 2H (H_{8,12})); 5.78 (bs, 1H (H₁₄)); 3.87 (s, 3H (H₁₃)); 2.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H (H₆)); 1.61 (tt, *J* = 7.5, 7.2 Hz, 2H (H₅)); 1.46-1.34 (m, 6H (H_{2,3,4})); 0.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H₁)); ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 146.2 (C₁₁); 143.4 (C₁₀); 134.8 (C₇); 120.8 (C₈); 114.1 (C₉); 110.9 (C₁₂); 55.7 (C₁₃); 35.6 (C₆); 31.7 (C₃); 31.7 (C₅); 28.9 (C₄); 22.6 (C₂); 14.0 (C₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₁₃H₂₁O₂ 209.1542, found 209.1531.

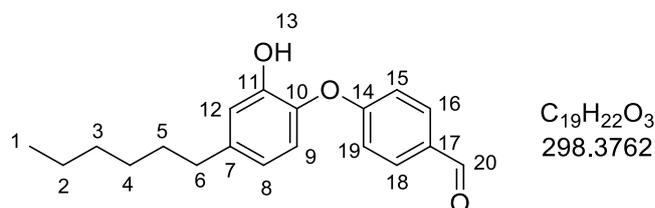
4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (**10**)



To a solution of compound **9** (0.472 g, 2.270 mmol, 1 eq) and **4-fluorobenzaldehyde** (0.337 g, 2.720 mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (25 mL) under argon was added K₂CO₃ (0.627 g, 4.540 mmol, 2.0 eq). After 23 h at 120 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the

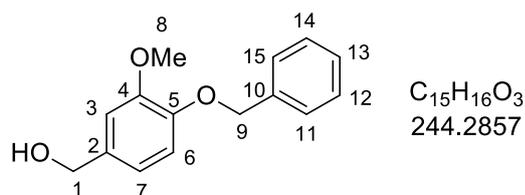
organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 90/10) gave compound **10** as a colorless oil (98%, 0.696 g). R_f = 0.40 (petroleum ether/ethyl acetate = 90/10). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.88 (s, 1H (H₂₀)); 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H (H_{16,18})); 6.98-6.95 (m, 3H (H_{9,15,19})); 6.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H₁₂)); 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H₈)); 3.76 (s, 3H (H₁₃)); 2.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H₆)); 1.67-1.62 (m, 2H (H₅)); 1.42-1.29 (m, 6H (H_{2,3,4})); 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H₁)); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 190.7 (C₂₀); 163.7 (C₁₄); 151.2 (C₁₁); 141.5 (C₁₀); 140.5 (C₇); 131.7 (C₁₇); 130.6 (2C, C_{16,18}); 122.1 (C₈); 120.9 (C₉); 115.9 (2C, C_{15,19}); 113.0 (C₁₂); 55.6 (C₁₃); 35.8 (C₆); 31.6 (C₃); 31.4 (C₅); 28.9 (C₄); 22.5 (C₂); 14.0 (C₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₀H₂₅O₃ 312.1725, found 312.1732.

4-(4-hexyl-2-hydroxyphenoxy)benzaldehyde (**11**)



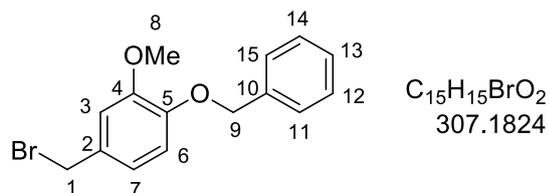
To a solution of compound **10** (0.399 g, 1.277 mmol, 1 eq) in anhydrous dichloromethane (20 mL) under argon at -78°C was added dropwise **BBr₃ 1M in dichloromethane** (5.200 mL, 5.200 mmol, 4 eq). After 6 h (from -78 °C to room temperature), cold methanol (5 mL) was added and the mixture was stirred for 5 minutes. Saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) was added and the aqueous phase was extracted with of dichloromethane (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 90/10) gave compound **11** as a colorless oil (92%, 0.349 g). R_f = 0.16 (petroleum ether/ethyl acetate = 90/10). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.89 (s, 1H (H₂₀)); 7.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H (H_{16,18})); 7.07 (2dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 2H (H_{15,19})); 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, (H₉); 6.85 d, *J* = 2.1 Hz, (H₁₂)); 6.73 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H (H₈)); 5.49 (bs, 1H (H₁₃)); 2.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H₆)); 1.63 (tt, *J* = 7.8, 7.5 Hz, 2H (H₅)); 1.39-1.26 (m, 6H (H_{2,3,4})), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, (H₁)) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 190.7 (C₂₀); 162.7 (C₁₄); 147.4 (C₁₁); 141.7 (C₁₀); 139.2 (C₇); 132.0 (2C, C_{16,18}); 131.5 (C₁₇);, 120.9 (C₈); 120.5 (C₉); 116.8 (2C, C_{15,19}); 116.8 (C₁₂); 35.5 (C₆); 31.7 (C₃); 31.3 (C₅); 28.9 (C₄); 22.5 (C₂); 14.0 (C₁); HRMS (DCI-CH₄) calculated for C₁₉H₂₃O₃ [M+H⁺]: 299.1647, found 299.1642.

(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)methanol (**12**)



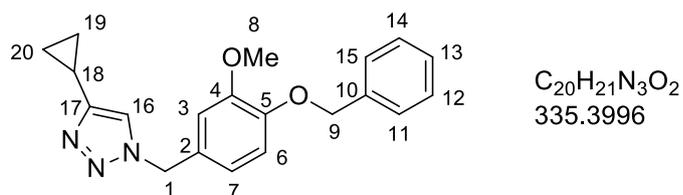
The compound **12** was synthesized as described previously²¹⁷. To a solution of **4-Benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde** (1.000 g, 4.128 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (10 mL) and MeOH (20 mL) at 4 °C, was added in portions $NaBH_4$ (0.500 g, 13.2 mmol, 3.2 eq). After 2 h at 4 °C, saturated $NH_4Cl_{(aq)}$ (10 mL) was added then the solvents were evaporated under reduced pressure. Water (10 mL) was added and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo* to give compound **12** as a white solid (100 %, 1.008 g). $R_f = 0.31$ (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.45-7.42 (m, 2H ($H_{11,15}$)); 7.39-7.34 (m, 2H ($H_{12,14}$)); 7.32-7.30 (m, 1H (H_{13})); 6.95-6.81 (m, 3H ($H_{3,7,6}$)); 5.14 (s, 2H (H_9)); 4.60 (s, 2H (H_1)); 3.88 (s, 3H (H_8)); 1.95 (bs, 1H (OH)).

4-(Bromomethyl)-2-methoxy-1-(phenylmethoxy)benzene (**13**)



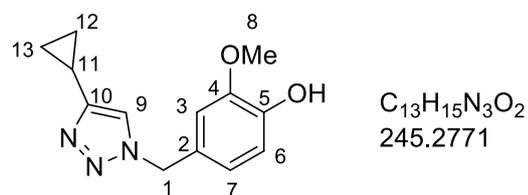
The compound **12** was synthesized as described previously²¹⁸. To a solution of **12** (1.000 g, 4.093 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (15 mL) at 4 °C, was added drop by drop a solution of PBr_3 (2.770 g, 10.23 mmol, 2.5 eq) in CH_2Cl_2 (10 mL). After 3 h from 4 °C to room temperature, cold water (40 mL) was added and aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). Then the organic solution was washed with saturated $NaHCO_{3(aq)}$, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo* to give compound **13** as a white solid (100 %, 1.240 g). $R_f = 0.91$ (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.49-7.45 (m, 2H ($H_{11,15}$)); 7.42-7.37 (m, 2H ($H_{12,14}$)); 7.36-7.33 (m, 1H (H_{13})); 6.96 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3)); 6.90 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_6)); 5.15 (s, 2H (H_9)); 4.49 (s, 2H (H_1)); 3.89 (s, 3H (H_8)).

1-(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazole (14)



To a solution of compound **13** (2.320 g, 7.55 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (20 mL) was added NaN_3 (0.696 g, 10.71 mmol, 1.4 eq). After 16 h at room temperature, **cyclopropylacetylene** (1.248 g, 18.9 mmol, 2.5 eq) was added followed by $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.264 g, 1.06 mmol, 0.14 eq) in H_2O (4 mL) then **sodium ascorbate** (0.524 g, 2.644 mmol, 0.35 eq) in H_2O (4 mL). After 24 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (50 mL) was added and aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Then the organic solution was washed with saturated $NaHCO_{3(aq)}$, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **14** as a white solid (79 %, 2.010 g). $R_f = 0.57$ (petroleum ether/ethyl acetate = 50/50). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.42-7.39 (m, 2H ($H_{11,15}$)); 7.38-7.32 (m, 2H ($H_{12,14}$)); 7.31-7.27 (m, 1H (H_{13})); 7.11 (s, 1H (H_{16})); 6.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.78 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3)); 6.75 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); 5.34 (s, 2H (H_1)); 5.13 (s, 2H (H_9)); 3.82 (s, 3H (H_8)); 1.89 (m, 1H (H_{18})); 0.85 (m, 4H ($H_{19,20}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 150.5 (C_4); 149.9 (C_5); 148.3 (C_{17}); 136.7 (C_{10}); 128.5 (3C, $C_{7,12,14}$); 127.8 (C_{13}); 127.7 (C_2); 127.1 (2C, $C_{12,14}$); 120.5 (C_{16}); 111.5 (2C, $C_{3,6}$); 70.8 (C_9); 55.9 (C_8); 53.7 (C_1); 7.6 (2C, $C_{19,20}$); 6.6 (C_{18}); HRMS (DCI- CH_4 , $[M+H]^+$) calculated for $C_{20}H_{22}N_3O_2$ 336.1712, found 336.1712.

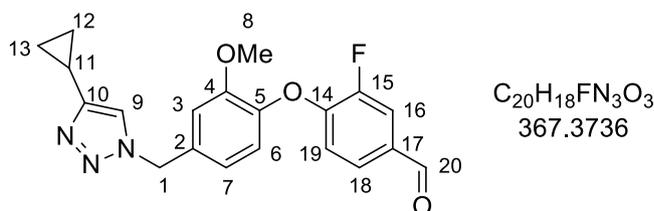
4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenol (15)



To a solution of compound **14** (2 g, 5.963 mmol, 1 eq) in MeOH/EtOH (80/40 mL, v/v) was added **Pd/C** (0.100 g, 1.034 mmol, 0.17 eq) at room temperature. The resulting mixture was stirred at room temperature for 6 h under H_2 atmosphere (balloon). Then the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo* to give compound **15** as a white solid (100 %, 1.460 g). $R_f = 0.42$ (petroleum ether/ethyl acetate = 50/50). 1H NMR ($CDCl_3$, 300

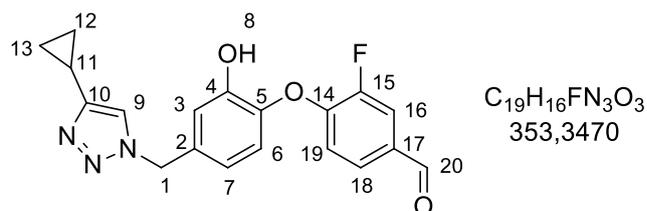
MHz) δ 7.11 (s, 1H (H₉)); 6.89 (d, J = 8.1 Hz, 1H (H₆)); 6.79 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H₇)); 6.75 (d, J = 1.8 Hz, 1H (H₃)); 5.35 (s, 2H (H₁)); 3.83 (s, 3H (H₈)); 1.90 (m, 1H (H₁₁)); 0.90 and 0.79 (2m, 4H (H_{12,13})); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 150.4 (C₄); 147.1 (C₅); 146.2 (C₁₀); 126.2 (C₂); 121.3 (C₉); 119.3 (C₇); 114.7 (C₆); 110.8 (C₃); 55.8 (C₈); 53.9 (C₁); 7.6 (2C, C_{12,13}); 6.6 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₁₃H₂₆N₃O₂ 246.1243, found 246.1232.

4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenoxy)-3-fluorobenzaldehyde (16)



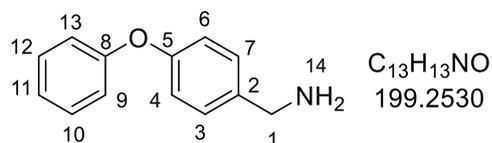
To a solution of compound **15** (0.500 g, 2.038 mmol, 1 eq) and **3,4-difluorobenzaldehyde** (0.322 g, 2.266 mmol, 1.1 eq) in anhydrous DMF (10 mL) under argon was added Cs₂CO₃ (2.000 g, 6.138 mmol, 3.0 eq). After 3 h at 120 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 30 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to give pure compound **16** as a pale yellow solid (100%, 0.300 g). R_f = 0.36 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.77 (d, J = 2.1 Hz, 1H (H₂₀)); 7.58 (dd, J = 10.8, 2.1 Hz, 1H (H₁₆)); 7.45 (ddd, J = 0.9, 8.1, 2.1 Hz, 1H (H₁₈)); 7.24 (s, 1H (H₉)); 6.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H (H₆)); 6.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H (H₃)); 6.81 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H₇)); 6.74 (t, J = 8.1 Hz, 1H (H₁₉)); 5.41 (s, 2H (H₁)); 3.67 (s, 3H (H₈)); 1.86 (m, 1H (H₁₁)); 0.85 and 0.75 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 189.6 (d, J = 1.8 Hz, C₂₀); 154.2 and 150.8 (d, J = 250 Hz, C₁₅); 151.4 (C₄); 150.7 (d, J = 12.45 Hz, C₁₄); 142.9 (C₅); 133.2 (2C, C_{2,10}); 131.6 (d, J = 5.1 Hz, C₁₇); 127.2 (d, J = 3.2 Hz, C₁₉); 121.7 (C₉); 120.5 (C₇); 119.6 (C₆); 117.0 (d, J = 1.1 Hz, C₁₈); 116.4 (d, J = 18.4 Hz, C₁₆); 112.5 (C₃); 55.8 (C₈); 53.4 (C₁); 7.6 (2C, C_{12,13}); 6.6 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₀H₁₉FN₃O₃ 368.1410, found 368.1400.

4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)-3-fluorobenzaldehyde (17)



To a solution of compound **16** (0.460 g, 1.252 mmol, 1 eq) in acetic acid (4 mL) was added **HBr 48%** (4 mL). After 4 h at 130 °C, water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 30 mL). Then the organic solution was washed with saturated $NaHCO_3(aq)$ and water, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 80/20) gave compound **17** as a white solid (43 %, 0.190 g). $R_f = 0.27$ (dichloromethane /ethyl acetate = 70/30). 1H NMR ($(CD_3)_3CO$, 300 MHz) δ 9.91 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_{20})); 7.74 (s, 1H (H_9)); 7.73 (dd, $J = 10.8, 2.1$ Hz, 1H (H_{16})); 7.68 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 0.9$ Hz, 1H (H_{18})); 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 7.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3)); 6.92 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.92 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_{19})); 5.53 (s, 2H (H_1)); 3.14 (s, 1H (H_8)); 1.93 (m, 1H (H_{11})); 0.88 and 0.74 (2m, 2H ($H_{12,13}$)); ^{13}C NMR ($(CD_3)_3CO$, 75 MHz) δ 191.7 (d, $J = 1.65$ Hz, C_{20}); 155.9 and 152.6 (d, $J = 247$ Hz, C_{15}); 152.7 (d, $J = 11.1$ Hz, C_{14}); 151.7 (C_4); 151.1 (C_5); 143.2 (C_{10}); 136.7 (C_2); 133.7 (d, $J = 4.95$ Hz, C_{17}); 129.2 (d, $J = 3.2$ Hz, C_{19}); 123.9 (C_9); 122.2 (C_7); 121.6 (C_6); 118.8 (C_3); 118.8 (d, $J = 1.2$ Hz, C_{18}); 117.8 (d, $J = 18.4$ Hz, C_{16}); 54.5 (C_1); 9.1 (2C, $C_{12,13}$); 8.2 (C_{11}); HRMS (DCI- CH_4 , $[M+H^+]$) calculated for $C_{19}H_{17}FN_3O_3$ 354.1254, found 354.1256.

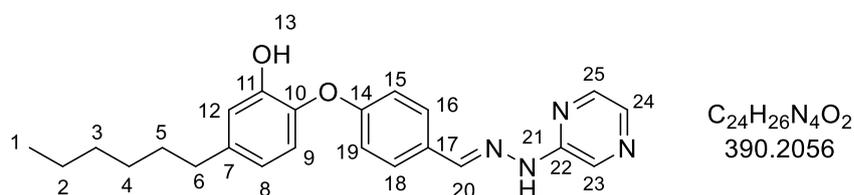
(4-Phenoxyphenyl)methanamine (18)



The compound **18** was synthesized as previously described²¹⁹. To a solution of $LiAlH_4$ (187 mg, 5.2 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL), was added 4-phenoxybenzotrile (500 mg, 2.6 mmol) at 4 °C. After 18 h of stirring, water (10 mL) was added and the mixture was stirred for another 45 minutes. The mixture was filtered, concentrated under vacuum, and then ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure to give compound **18** as a yellowish powder (100%, 0,513 g). ($R_f = 0.17$ dichloromethane/methanol: 90/10 with few drops of ammonia solution).

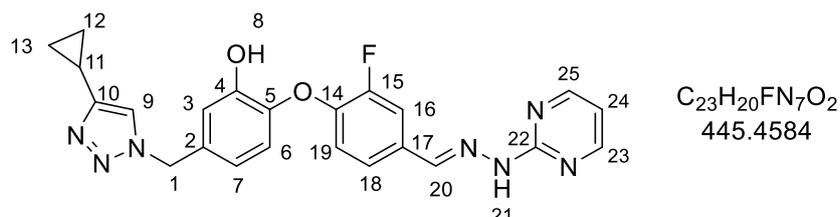
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.25 (m, 4H ($\text{H}_{3,7,10,12}$)); 7.13 – 7.05 (m, 1H (H_{11})); 7.04 – 6.96 (m, 4H ($\text{H}_{4,6,9,13}$)); 3.84 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.3 (C_5); 155.8 (C_8); 138.2 (C_2); 129.5 (2C, $\text{C}_{10,12}$); 128.3 (2C, $\text{C}_{3,7}$); 122.9 (C_{11}); 118.9 (2C, $\text{C}_{9,13}$); 118.5 (2C, $\text{C}_{4,6}$); 45.7 (C_1).

(E)-5-hexyl-2-(4-((2-(pyridin-2-yl)hydrazineylidene)methyl)phenoxy)phenol (19)



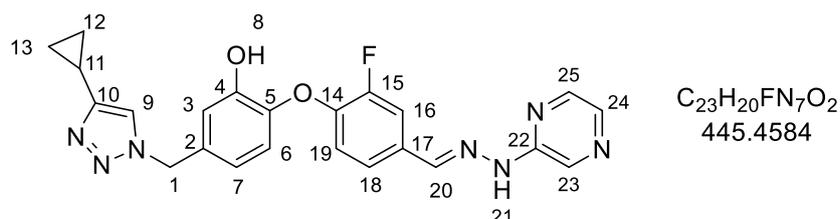
To a solution of compound **11** (0.067 g, 0.225 mmol, 1 eq) solubilized in dichloromethane (6 mL) with few drops of HCl (1M) and molecular sieves (10 Å), 2-hydrazinopyrazine (0.027 g, 0.247 mmol, 1.1 eq) was added. After 23 h of stirring at room temperature, water (20 mL) was added and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the organic solution was washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. A pale-yellow solid was obtained (98 %, 0.086 g). R_f = 0.26 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^1H NMR (DMSO- D_6 , 500 MHz) δ 11.05 (s, 1H (H_{21})); 9.43 (s, 1H (H_{20})); 8.58 (s, 1H (H_{23})); 8.12 – 8.06 (m, 1H); 8.01 (s, 1H (H_9)); 7.97 (d, J = 2.3 Hz, 1H (H_8)); 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 2H ($\text{H}_{16, 18}$)); 6.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H (H_{25})); 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H ($\text{H}_{15,19}$)); 6.80 (s, 1H (H_{12})); 6.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H (H_{24})); 2.54 – 2.50 (m, 2H (H_6)); 1.61 – 1.49 (m, 2H (H_5)); 1.36 – 1.21 (m, 6H ($\text{H}_{2,3,4}$)); 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR (DMSO- D_6 , 125 MHz) δ 159.1 (C_{14}); 152.9 (C_{22}); 149.0 (C_{11}); 141.9 (C_{20}); 140.7 (C_{25}); 140.1 (C_{10}); 139.8 (C_7); 134.7 (C_{23}); 130.6 (C_{24}); 128.8 (C_{17}); 127.8 (2C, $\text{C}_{16,18}$); 122.0 (C_8); 119.5 (C_9); 117.1 (C_{12}); 116.0 (2C, $\text{C}_{15,19}$); 34.7 (C_6); 31.1 (C_5); 30.8 (C_4); 28.3 (C_3); 22.1 (C_2); 14.0 (C_1); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2$ 391.2134, found 391.2137.

(E)-5-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-(2-fluoro-4-((2-(pyrimidin-2-yl)hydrazineylidene)methyl)phenoxy)phenol (20)



To a solution of compound **17** (0.030 g, 0.086 mmol, 1 eq) solubilized in dichloromethane (10 mL) with few drops of HCl (1M) and molecular sieves (10 Å), **2-hydrazinopyrimidine** (0.010 g, 0.092 mmol, 1.1 eq) was added. After 24 h of stirring at room temperature, water (20 mL) was added and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the organic solution was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/MeOH 100/0 to 90/10) gave compound **20** as a yellow solid (27 %, 0.010 g). $R_f = 0.62$ (dichloromethane/MeOH = 90/10). ¹H NMR (DMSO-D₆, 500 MHz) δ 11.26 (s, 1H (H₂₁)), 9.87 (s, 1H (H₂₀)), 8.46 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H (H_{23,25})), 8.06 (s, 1H, (H₈)), 7.88 (s, 1H, (H₉)), 7.59 (dd, $J = 12.2, 1.8$ Hz, 1 H (H₁₆)), 7.34 (dd, $J = 8.3, 1.1$ Hz, 1H (H₁₈)), 7.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H (H₆)), 6.84 (t_{app}, $J = 4.5$ Hz, 2H (H_{7,24})), 6.75 (t_{app}, $J = 8.2$ Hz, 2H (H_{3,19})), 5.45 (s, 2H (H₁)), 1.97 – 1.88 (m, 1H (H₁₁)), 0.89 - 0.73 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR (DMSO-D₆, 125 MHz) δ 159.8 (C₂₂); 158.8 (2C, C_{23,25}); 153.1 and 151.2 (d, $J = 245$ Hz (C₁₅); 149.3 (C₄); 148.9 (C₅); 145.6 – 145.5 (d, $J = 11.3$ Hz, (C₁₄)); 141.9 (C₁₀); 140.1 (d, $J = 2.1$ Hz (C₂₀)); 133.9 (C₂); 130.7 (d, $J = 6.8$ Hz (C₁₇); 123.3 (d, $J = 2.7$ Hz (C₁₉); 121.3 (C₉); 121.0 (C₇); 119.1 (C₆); 117.9 (C₁₈); 116.5 (C₃); 113.6 and 113.5 (d, $J = 19.2$ (C₁₆)); 113.1 (C₂₄); 52.2 (C₁); 7.7 (C_{12,13}); 6.6 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₃H₂₁FN₇O₂ 446.1741, found 446.1738.

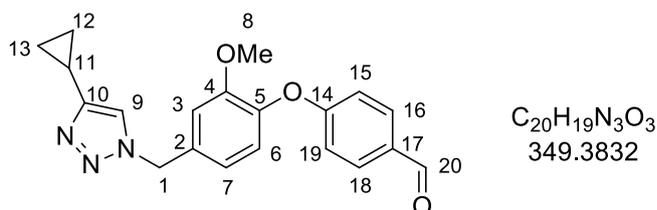
(E)-5-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-(2-fluoro-4-((2-(pyrazin-2-yl)hydrazineylidene)methyl)phenoxy)phenol (21)



To a solution of compound **17** (0.029g, 0.084 mmol, 1 eq) solubilized in dichloromethane (5 mL) with few drops of HCl (1M) and molecular sieves (10 Å), **2-hydrazinopyrazine** (0.011 g, 0.102 mmol, 1.2 eq) was added. After 20 h of stirring at room temperature, water (20 mL) was

added and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Then the organic solution was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/MeOH 100/0 to 90/10) gave compound **20** as a yellow solid (95 %, 0.035 g). R_f = 0.62 (dichloromethane/MeOH = 90/10). ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 11.19 (s, 1 (H₂₁)); 9.85 (s, 1H (H₂₀)); 8.64 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, (H₂₃)); 8.11 (dd, *J* = 4 Hz, 1H (H₂₄)); 8.00 (bs, 1H (H₈)); 7.98 (d, *J* = 4 Hz, 1H (H₂₅)); 7.88 (s, 1H (H₉)); 7.72 (dd, *J* = 12.1, 1.8 Hz, 1H (H₁₆)); 7.37 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H (H₁₈)); 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H₆)); 6.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H₃)); 6.76 (t, *J* = 8.4 (H₁₉)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H (H₇)), 5.45 (s, 2H (H₁)), 1.98 – 1.90 (m, 1H, (H₁₁)), 0.88 and 0.71 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR (DMSO-D₆, 125 MHz) δ 153-151 (C₁₅); 152.8 (C₂₂); 149.2 (C₄); 148.3 (C₅); 145.5 (d, *J* = 11.2 (C₁₄); 141.9 (C₁₀); 141.9 (C₂₅); 139.3 (d, *J* = 2.2 (C₂₀)); 135.1 (C₂₃); 133.8 (C₂); 130.8 (C₂₄); 130.4 (d, *J* = 6.7 Hz (C₁₇)); 123.4 (d, *J* = 3 Hz (C₁₉)); 121.1 (C₉); 121.0 (C₇); 119.0 (C₆); 117.9 (C₁₈); 116.5 (C₃); 113.5 (d, *J* = 19 Hz (C₁₆); 52.2 (C₁); 7.7 (C_{12,13}); 6.5 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₃H₂₁FN₇O₂ 446.1741, found 446.1740.

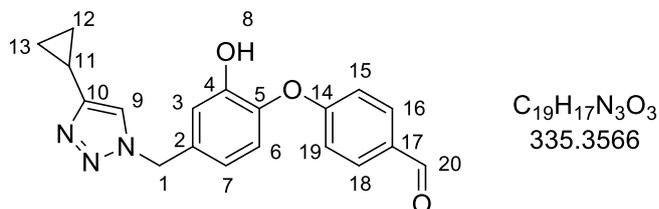
4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (**22**)



To a solution of **15** (0.260 g, 1.06 mmol, 1 eq) and **4-difluorobenzaldehyde** (0.157 g, 1.27 mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (5 mL) under argon was added Cs₂CO₃ (1.036 g, 3.18 mmol, 3.0 eq). After 16 h at 80 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 70/30) gave compound **22** as a pale-yellow oil (61 %, 0.226 g). R_f = 0.57 (dichloromethane/ethyl acetate = 70/30). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H₂₀)); 7.79 (2 ddd, *J* = 8.7, 2.1, 1.8 Hz, 2H (H_{16,18})); 7.28 (s, 1H (H₉)); 7.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H₆)); 6.98-6.93 (m, 3H (H_{3,15,19})); 6.87 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H₇)); 5.47 (s, 2H (H₁)); 3.73 (s, 3H (H₈)); 1.93 (m, 1H (H₁₁)); 0.94 and 0.82 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 190.6 (C₂₀); 162.8 (C₁₄); 151.8 (C₄); 150.6 (C₁₀); 142.9 (C₅); 133.2 (C₁₇); 130.9 (C₂); 130.6 (2C, C_{16,18}); 122.5 (C₉); 120.6 (C₇); 119.6 (C₆); 116.1 (2C, C_{15,19}); 112.4 (C₃); 55.8 (C₈);

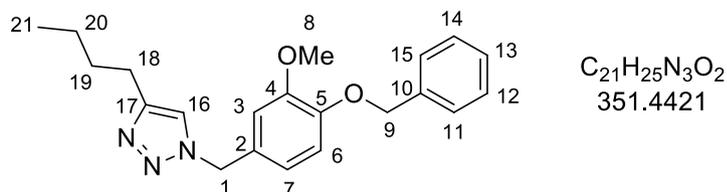
53.4 (C₁); 7.6 (2C, C_{12,13}); 6.5 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₀H₂₀N₃O₃ 350.1505, found 350.1505.

4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)benzaldehyde (**23**)



To a solution of compound **22** (0.250 g, 0.156 mmol, 1 eq) in acetic acid (2 mL) was added **HBr 48%** (2 mL). After 3 h at 140 °C, water (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated NaHCO_{3(aq)} and water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 60/40) gave compound **23** as an orange solid (57 %, 0.137 g). R_f = 0.32 (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). ¹H NMR ((CD₃)₃CO, 300 MHz) δ 9.92 (s, 1H (H₂₀)); 7.87 (2 ddd, *J* = 9.3, 2.4, 2.1 Hz, 2H (H_{16,18})); 7.74 (s, 1H (H₉)); 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H₆)); 7.05-6.99 (m, 3H (H_{3,15,19})); 6.91 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H₇)); 5.53 (s, 2H (H₁)); 1.95 (m, 1H (H₁₁)); 1.28 (b s, 1H (H₈)); 0.89 and 0.76 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR ((CD₃)₃CO, 75 MHz) δ 192.3 (C₂₀); 162.9 (C₁₄); 151.7 (C₄); 151.4 (C₁₀); 143.3 (C₅); 136.5 (C₁₇); 133.2 (C₂); 133.4 (2C, C_{16,18}); 124.4 (C₉); 122.2 (C₇); 121.6 (C₆); 118.8 (C₃); 118.1 (2C, C_{15,19}); 54.6 (C₁); 9.1 (2C, C_{12,13}); 8.3 (C₁₁); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₁₉H₁₈N₃O₃ 336.1348, found 336.1344.

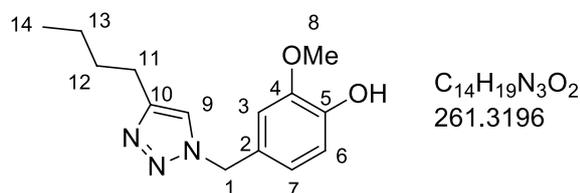
1-(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-butyl-1H-1,2,3-triazole (**24**)



To a solution of compound **13** (1.260 g, 4.09 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (20 mL) was added **NaN₃** (0.400 g, 6.135 mmol, 1.5 eq). After 16 h at room temperature, **hex-1-yne** (0.858 g, 10 mmol, 2.5 eq) was added followed by **CuSO₄·5H₂O** (0.150 g, 0.6 mmol, 0.15 eq) in H₂O (3 mL) then **sodium ascorbate** (0.317 g, 1.6 mmol, 0.39 eq) in H₂O (3 mL). After 5 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Then the organic solution was washed

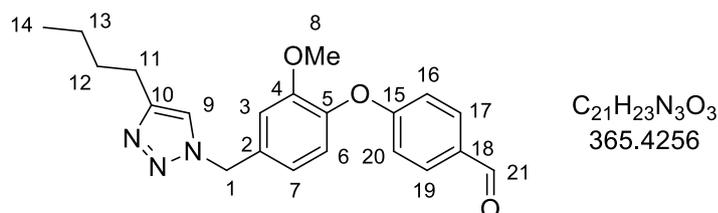
with saturated $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ and water, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **24** as a white solid (86 %, 1.230 g). $R_f = 0.52$ (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.43-7.40 (m, 2H ($\text{H}_{11,15}$)); 7.37-7.32 (m, 2H ($\text{H}_{12,14}$)); 7.31-7.27 (m, 1H (H_{13})); 7.17 (s, 1H (H_{16})); 6.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.77-6.74 (m, 2H ($\text{H}_{3,7}$)); 5.38 (s, 2H (H_1)); 5.13 (s, 2H (H_9)); 3.82 (s, 3H (H_8)); 2.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{18})); 1.61 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H_{19})); 1.35 (qt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H (H_{20})); 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{21})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 149.8 (C_4); 148.6 (C_5); 148.2 (C_{17}); 136.6 (C_{10}); 128.4 (2C, $\text{C}_{12,14}$); 127.8 (C_2); 127.7 (C_{13}); 127.1 (2C, $\text{C}_{11,15}$); 120.4 (C_{16}); 120.2 (C_7); 113.7 (C_6); 111.4 (C_3); 70.8 (C_9); 55.9 (C_8); 53.6 (C_1); 31.3 (C_{18}); 25.2 (C_{19}); 22.1 (C_{20}); 13.7 (C_{21}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$ 352.2025, found 352.2020.

4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenol (**25**)



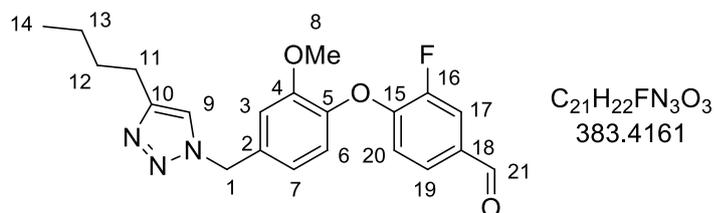
To a solution of compound **24** (1.230 g, 3.5 mmol, 1 eq) in MeOH (40 mL) was added **Pd/C** (0.080 g, 0.75 mmol, 0.2 eq) at room temperature. The resulting mixture was stirred at room temperature for 6 h under H_2 atmosphere (balloon). Then the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo* to give compound **25** as a yellow oil (100 %, 0.910 g). $R_f = 0.22$ (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.16 (s, 1H (H_9)); 6.88 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H (H_6)); 6.77-6.72 (dd, $J = 7.8, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3)); 5.34 (s, 2H (H_1)); 3.77 (s, 3H (H_8)); 2.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.56 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H_{12})); 1.35 (qt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H (H_{13})); 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 148.4 (C_4); 147.2 (C_5); 146.3 (C_{10}); 126.0 (C_2); 121.0 (C_9); 120.3 (C_7); 114.8 (C_6); 110.7 (C_3); 55.6 (C_8); 53.7 (C_1); 31.2 (C_{11}); 24.9 (C_{12}); 21.9 (C_{13}); 13.5 (C_{14}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ 262.1556, found 262.1542.

4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (26)



To a solution of compound **25** (0.300 g, 1.148 mmol, 1 eq) and **4-difluorobenzaldehyde** (0.171 g, 1.380 mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (5 mL) under argon was added Cs_2CO_3 (1.120 g, 3.450 mmol, 3.0 eq). After 16 h at 60 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **26** as a yellow oil (68 %, 0.287 g). $R_f = 0.13$ (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.85 (1H (H₂₁)); 7.77 (2 ddd, $J = 9.3, 2.7, 1.8$ Hz, 2H (H_{17,19})); 7.28 (s, 1H (H₉)); 7.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H₆)); 6.93 (2 dd, $J = 9.3, 2.7, 1.8$ Hz, 2H (H_{16,20})); 6.88 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H (H₃)); 6.85 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz 1H (H₇)); 5.47 (s, 2H (H₁)); 3.70 (s, 3H (H₈)); 2.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H₁₁)); 1.61 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H₁₂)); 1.33 (qt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H (H₁₃)); 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H₁₄)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 190.6 (C₂₁); 162.9 (C₁₅); 151.8 (C₄); 148.8 (C₁₀); 142.9 (C₅); 133.3 (C₁₈); 130.9 (C₂); 131.6 (2C, C_{17,19}); 122.5 (C₉); 120.6 (C₇); 120.5 (C₆); 116.1 (2C, C_{16,20}); 112.3 (C₃); 56.7 (C₈); 53.5 (C₁); 31.3 (C₁₁); 25.2 (C₁₂); 22.1 (C₁₃); 13.6 (C₁₄); HRMS (DCI- CH_4 , $[M+H]^+$) calculated for $C_{21}H_{24}N_3O_3$ 366.1818, found 366.1824.

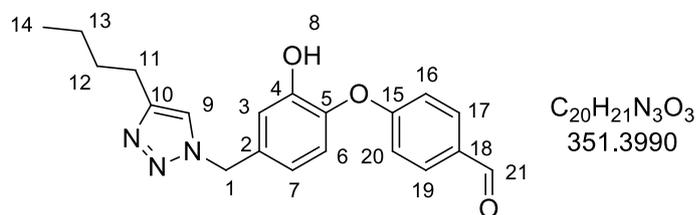
4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-methoxyphenoxy)-3-fluorobenzaldehyde (27)



To a solution of **25** (0.500 g, 2.038 mmol, 1 eq) and **3,4-difluorobenzaldehyde** (0.326 g, 2.296 mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (5 mL) under argon was added Cs_2CO_3 (1.870 g, 5.740 mmol, 3.0 eq). After 16 h at 60 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. Water (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Then the organic solution was washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in*

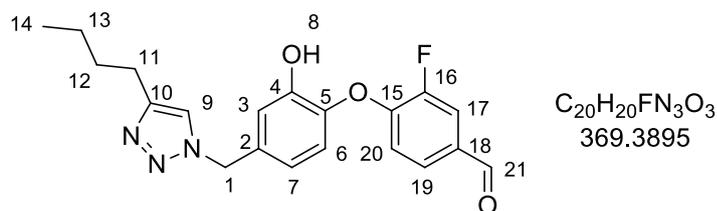
vacuo. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **27** as a yellow oil (92 %, 0.719 g). $R_f = 0.36$ (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.88 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H (H_{21})); 7.68 (dd, $J = 10.5, 1.8$ Hz, 1H (H_{17})); 7.54 (d_{app}, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_{19})); 7.30 (s, 1H (H_9)); 7.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.92-6.87 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3); dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.83 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_{20})); 5.51 (s, 2H (H_1)); 3.76 (s, 3H (H_8)); 2.73 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.66 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H_{12})); 1.38 (qt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H (H_{13})); 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 189.7 (d, $J = 1.7$ Hz, C_{21}); 154.2 and 150.9 (d, $J = 250$ Hz, C_{16}); 151.5 (C_4); 150.8 (d, $J = 11.25$ Hz, C_{15}); 149.0 (C_5); 143.0 (C_{10}); 133.5 (C_2); 131.6 (d, $J = 4.95$ Hz, C_{18}); 127.2 (d, $J = 3.2$ Hz, C_{20}); 121.7 (C_9); 120.5 (C_7); 120.5 (C_6); 117.1 (d, $J = 1.05$ Hz, C_{19}); 116.6 (d, $J = 18.3$ Hz, C_{17}); 112.4 (C_3); 55.9 (C_8); 53.5 (C_1); 31.4 (C_{11}); 25.3 (C_{12}); 22.2 (C_{13}); 13.7 (C_{14}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{O}_3$ 384.1723, found 384.1721.

4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)benzaldehyde (**28**)



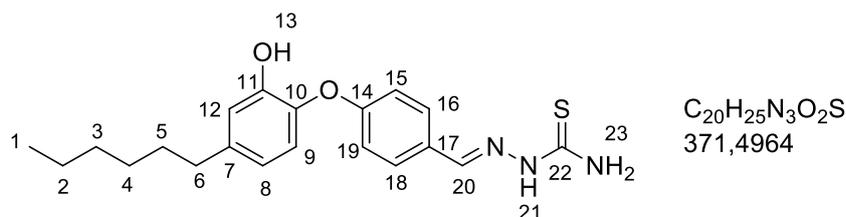
To a solution of compound **26** (0.280 g, 0.766 mmol, 1 eq) in acetic acid (2 mL) was added **HBr 48%** (2 mL). After 3 h at 140 °C, water (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ and water, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **28** as a pale white solid (60 %, 0.161 g). $R_f = 0.66$ (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.80 (1H (H_{21})); 7.75 (2 ddd, $J = 9.3, 2.4, 2.1$ Hz, 2H ($\text{H}_{17,19}$)); 7.31 (s, 1H (H_9)); 6.98-6.94 (m, 4H ($\text{H}_{3,6,16,20}$)); 6.75 (dd, $J = 8.1, 2.8$ Hz, 1H (H_7)); 5.39 (s, 2H (H_1)); 3.50 (bs, 1H (H_8)); 2.60 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.54 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H_{12})); 1.28 (qt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H (H_{13})); 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 191.1 (C_{21}); 162.9 (C_{15}); 149.5 (C_4); 148.5 (C_{10}); 141.9 (C_5); 132.8 (C_{18}); 130.7 (C_2); 131.7 (2C, $\text{C}_{17,19}$); 122.2 (C_9); 120.9 (C_7); 119.4 (C_6); 116.8 (C_3); 116.4 (2C, $\text{C}_{16,20}$); 53.4 (C_1); 31.1 (C_{11}); 24.9 (C_{12}); 21.9 (C_{13}); 13.5 (C_{14}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3$ 352.1661, found 352.1660.

4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)-3-fluorobenzaldehyde (29)



To a solution of compound **27** (0.350 g, 0.913 mmol, 1 eq) in acetic acid (2 mL) was added **HBr 48%** (2 mL). After 3 h at 130 °C, water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (4 x 30 mL). Then the organic solution was washed with saturated $NaHCO_{3(aq)}$ and water, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **29** as a white solid (47 %, 0.159 g). $R_f = 0.67$ (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). 1H NMR ($(CD_3)_3CO$, 300 MHz) δ 9.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_{21})); 7.76 (s, 1H (H_9)); 7.74 (dd, $J = 10.8, 1.8$ Hz, 1H (H_{17})); 7.68 (ddd, $J = 8.4, 2.1, 0.9$ Hz, 1H (H_{19})); 7.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_6)); 7.06 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H (H_3)); 6.92 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.92 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_{20})); 5.55 (s, 2H (H_1)); 3.00 (s, 3H (H_8)); 2.65 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.61 (tt, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 2H (H_{12})); 1.34 (qt, $J = 7.5, 7.2$ Hz, 2H (H_{13})); 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($(CD_3)_3CO$, 75 MHz) δ 191.7 (d, $J = 1.95$ Hz, C_{21}); 156.0 and 152.7 (d, $J = 247$ Hz, C_{16}); 152.9 (C_4); 151.1 (d, $J = 8.9$ Hz, C_{15}); 149.7 (C_5); 143.2 (C_{10}); 136.8 (C_2); 133.8 (d, $J = 4.95$ Hz, C_{18}); 129.2 (d, $J = 3.2$ Hz, C_{20}); 123.9 (C_9); 123.3 (C_7); 121.6 (C_6); 118.9 (C_3); 118.8 (d, $J = 1.3$ Hz, C_{19}); 117.9 (d, $J = 18.4$ Hz, C_{17}); 54.5 (C_1); 33.3 (C_{11}); 26.8 (C_{12}); 23.9 (C_{13}); 15.0 (C_{14}); HRMS (DCI- CH_4 , $[M+H^+]$) calculated for $C_{20}H_{21}FN_3O_3$ 370.1567, found 370.1565.

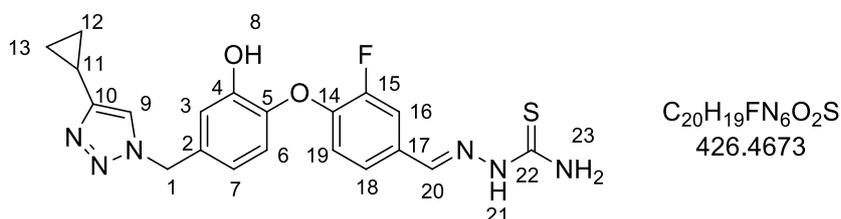
(E)-1-(4-(4-hexyl-2-hydroxyphenoxy)benzylidene)thiosemicarbazide (30)



To a solution of compound **11** (0.085 g, 0.285 mmol, 1 eq) and **thiosemicarbazide** (0.027 g, 0.296 mmol, 1.1 eq) in EtOH (15 mL) was added 10 to 15 drops of $HCl_{(aq)}$ 1 M. After 16 h at 80 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. $HCl_{(aq)}$ 0.5 M (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was

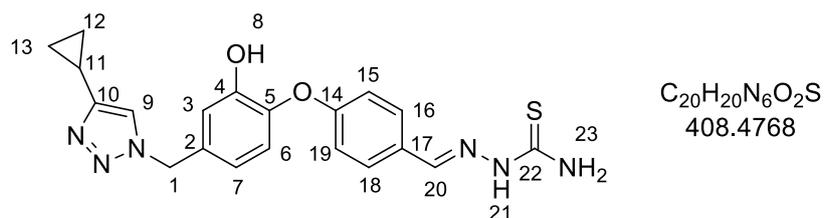
washed with saturated $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ and water, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo* to give pure compound **30** as a pale yellow solid (67 %, 0.070 g). $R_f = 0.40$ (petroleum ether /ethyl acetate = 70/30). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 300 MHz) δ 8.1 (s, 1H (H_{20})); 7.82 and 7.52 (2 b s, 2H (H_{23})), 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H ($\text{H}_{16,18}$)); 6.92-6.87 (m, 4H ($\text{H}_{9,12,15,19}$)); 6.70 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H (H_8)); 3.32 (s, 2H ($\text{H}_{13,21}$)); 2.55 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H (H_6)); 1.61 (quint, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 2H (H_5)); 1.38-1.25 (m, 6H ($\text{H}_{2,3,4}$)); 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H (H_1)); $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 75 MHz) δ 180.5 (C_{22}); 162.0 (C_{14}); 150.7 (C_{11}); 142.5 (C_{10}); 144.4 (C_{20}); 141.8 (C_7); 130.5 (2C, $\text{C}_{16,18}$); 129.7 (C_{17}); 123.3 (C_8); 121.7 (C_9); 118.9 (C_{12}); 117.9 (2C, $\text{C}_{15,19}$); 36.9 (C_6); 33.3 (C_3); 33.0 (C_5); 30.5 (C_4); 24.1 (C_2); 15.3 (C_1); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 372.1746, found 372.1742.

(E)-1-(4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)-3-fluorobenzylidene)thiosemicarbazide (31)



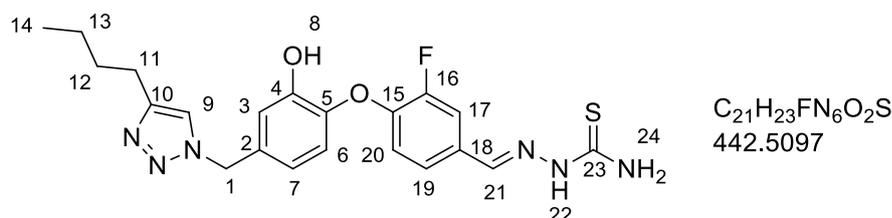
To a solution of compound **17** (0.110 g, 0.311 mmol, 1 eq) and **thiosemicarbazide** (0.057 g, 0.622 mmol, 2 eq) in EtOH (15 mL) was added 10 to 15 drops of $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1 M. After 16 h at 80 $^{\circ}\text{C}$, the solvent was evaporated under reduced pressure. $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 0.5 M (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ and water, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo* to give pure compound **31** as a pale yellow solid (100 %, 0.133 g). $R_f = 0.49$ (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 300 MHz) δ 8.14 (s, 1H (H_{20})); 8.02 and 7.62 (2 b s, 2H (H_{23})); 7.84 (dd, $J = 1.8, 12.3$ Hz, 1H (H_{16})); 7.71 (s, 1H (H_9)); 7.41 (d_{app}, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_{18})); 7.03 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H (H_3)); 6.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.87 (dd, $J = 2.1, 8.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.84 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_{19})); 5.51 (s, 2H (H_1)); 3.22 (bs, 2H ($\text{H}_{8,21}$)); 1.92 (m, 1H (H_{11})); 0.86 and 0.74 (2 m, 2H ($\text{H}_{12,13}$)); $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 75 MHz) δ 181.1 (C_{22}); 156.3 and 153.1 (d, $J = 245$ Hz, C_{15}); 151.7 (C_4); 150.7 (C_5); 148.5 (d, $J = 11.8$ Hz, C_{14}); 142.9 (d, $J = 1.95$ Hz, C_{20}); 144.3 (C_{10}); 135.6 (C_2); 131.9 (d, $J = 6.9$ Hz, C_{17}); 126.6 (d, $J = 3.2$ Hz, C_{19}); 122.5 (C_9); 122.1 (C_7); 121.4 (C_6); 119.8 (d, $J = 1.05$ Hz, C_{18}); 118.7 (C_3); 115.7 (d, $J = 19.6$ Hz, C_{16}); 54.5 (C_1); 9.1 (2C, $\text{C}_{12,13}$); 8.2 (C_{11}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}$ 427.1352, found 427.1350.

(E)-1-(4-(4-((4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)benzylidene)thiosemicarbazide (32)



To a solution of compound **23** (0.075 g, 0.224 mmol, 1 eq) and **thiosemicarbazide** (0.041 g, 0.447 mmol, 2 eq) in EtOH (15 mL) was added 10 to 15 drops of HCl_(aq) 1 M. After 16 h at 80 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. HCl_(aq) 0.5 M (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated NaHCO_{3(aq)} and water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane /ethyl acetate 100/0 to 60/40) gave compound **32** as a pale yellow solid (67 %, 0.0586 g). R_f = 0.34 (petroleum ether /ethyl acetate = 70/30). ¹H NMR ((CD₃)₃CO, 300 MHz) δ 8.14 (s, 1H (H₂₀)); 7.82 and 7.46 (2 b s, 2H (H₂₃)), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H (H_{16,18})); 7.71 (s, 1H (H₉)); 7.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H₆)); 7.00 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H₃)); 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H (H_{15,19})); 6.86 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H₇)); 5.50 (s, 2H (H₁₁)); 3.00 (b s, 2H (H_{8,21})); 1.94 (m, 1H (H₁₁)); 1.29 (b s, 1H (H₈)); 0.88 and 0.76 (2m, 2H (H_{12,13})); ¹³C NMR ((CD₃)₃CO, 75 MHz) δ 180.5 (C₂₂); 161.5 (C₁₄); 151.2 (C₄); 144.3 (C₂₀); 144.1 (C₁₀); 135.8 (C₅); 130.7 (2C, C_{16,18}); 130.4 (C₁₇); 123.6 (C₉); 122.1 (C₇); 121.5 (C₆); 118.7 (C₃); 118.5 (2C, C_{15,19}); 54.5 (C₁); 9.1 (2C, C_{12,13}); 8.3 (C₁₁); MS (TOF, ES⁺, [M+H⁺]) calculated for C₂₀H₂₁N₃O₂S 409.1447, found 409.1455.

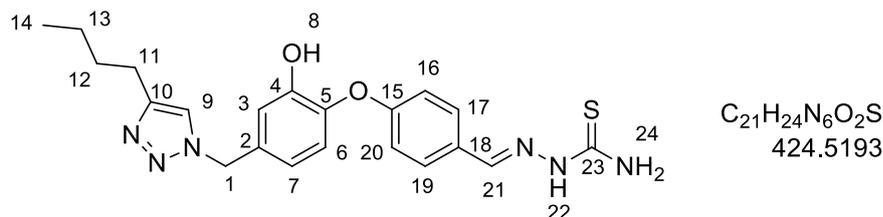
(E)-1-(4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)-3-fluorobenzylidene)thiosemicarbazide (33)



To a solution of compound **29** (0.100 g, 0.271 mmol, 1 eq) and **thiosemicarbazide** (0.049 g, 0.541 mmol, 2 eq) in EtOH (15 mL) was added 10 to 15 drops of HCl_(aq) 1 M. After 16 h at 80 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. HCl_(aq) 0.5 M (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated NaHCO_{3(aq)} and water, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in*

vacuo. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether /ethyl acetate 100/0 to 40/60 then to 0/100) gave compound **33** as a pale yellow solid (78 %, 0.0907 g). $R_f = 0.26$ (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 300 MHz) δ 8.14 (s, 1H (H_{21})); 8.00 and 7.62 (2 b s, 2H (H_{24})); 7.84 (dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz, 1H (H_{17})); 7.74 (s, 1H (H_9)); 7.40 (d_{app}, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_{19})); 7.04 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H (H_3)); 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.88 (dd, $J = 2.1, 8.1$ Hz, 1H (H_7)); 6.84 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H (H_{20})); 5.54 (s, 2H (H_1)); 3.17 (b s, 2H ($\text{H}_{8,22}$)); 2.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.59 (tt, $J = 7.5, 7.2$ Hz, 2H (H_{12})); 1.32 (qt, $J = 7.2, 7.5$ Hz, 2H (H_{13})); 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 75 MHz) δ 181.1 (C_{23}); 156.4 and 153.1 (d, $J = 245$ Hz, C_{16}); 150.7 (C_4); 149.7 (C_5); 148.5 (d, $J = 11.6$ Hz, C_{15}); 144.4 (C_{10}); 142.8 (C_{21}); 135.7 (C_2); 131.9 (d, $J = 6.8$ Hz, C_{18}); 126.6 (d, $J = 3.2$ Hz, C_{20}); 123.2 (C_9); 122.5 (C_7); 121.4 (C_6); 119.9 (d, $J = 1.1$ Hz, C_{19}); 118.7 (C_3); 115.7 (d, $J = 19.6$ Hz, C_{17}); 54.5 (C_1); 33.2 (C_{11}); 26.7 (C_{12}); 23.8 (C_{13}); 15.0 (C_{14}); HRMS (DCI- CH_4 , $[\text{M}+\text{H}^+]$) calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}$ 443.1665, found 443.1674.

(E)-1-(4-(4-((4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-hydroxyphenoxy)benzylidene)thiosemicarbazide (34)



To a solution of compound **28** (0.100 g, 0.285 mmol, 1 eq) and **thiosemicarbazide** (0.052 g, 0.569 mmol, 2 eq) in EtOH (15 mL) was added 10 to 15 drops of $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1 M. After 16 h at 80 °C, the solvent was evaporated under reduced pressure. $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 0.5 M (20 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). Then the organic solution was washed with saturated $\text{NaHCO}_3_{(\text{aq})}$ and water, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether /ethyl acetate 100/0 to 40/60 then to 0/100) gave compound **34** as a pale yellow solid (50 %, 0.0588 g). $R_f = 0.33$ (petroleum ether /ethyl acetate = 40/60). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 300 MHz) δ 8.17 (s, 1H (H_{21})); 7.85 and 7.52 (2 b s, 2H (H_{24})), 7.75 (2 dd, $J = 2.1, 2.7, 8.7$ Hz, 2H ($\text{H}_{17,19}$)); 7.76 (s, 1H (H_9)); 7.05 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H (H_3)); 7.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H (H_6)); 6.94-9.87 (m, 3H ($\text{H}_{7,16,20}$)); 5.55 (s, 2H (H_1)); 3.13 (b s, 2H ($\text{H}_{8,22}$)); 2.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H (H_{11})); 1.62 (tt, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 2H (H_{12})); 1.35 (qt, $J = 7.2, 7.8$ Hz, 2H (H_{13})); 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H (H_{14})); $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_3\text{CO}$, 75 MHz) δ 181.1 (C_{23}); 161.4 (C_{15}); 151.3 (C_4); 149.7 (C_{10}); 144.2 (C_5); 144.1 (C_{21}); 135.8

(C₁₈); 130.7 (2C, C_{17,19}); 130.3 (C₂); 123.6 (C₉); 123.2 (C₇); 121.5 (C₆); 118.7 (C₃); 118.5 (2C, C_{16,20}); 54.5 (C₁); 33.2 (C₁₁); 26.8 (C₁₂); 23.8 (C₁₃); 15.0 (C₁₄); HRMS (DCI-CH₄, [M+H⁺]) calculated for C₂₁H₂₅N₆O₂S 425.1760, found 425.1761.

HPLC analyses for the stability test of compound 30.

A stock solution of compound **30** (1.73 mg, 4.657 mM) in DMSO (1 mL) was prepared. Three solutions were prepared at the same concentration (C_f = 0.449 mM): 54 μL of stock solution, 156 μL of DMSO and 350 μL of PIPES buffer (30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8). The final percentage in DMSO was 37.5% for each solution. These solutions were stocked at 40 °C for 1, 3 or 7 days. A control solution was prepared just before the analysis: 54 μL of stock solution, 156 μL of DMSO and 350 μL of PIPES buffer. HPLC analyses were carried out in a Waters Acquity UHPLC-DAD-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector). UV-Vis spectra were recorded within a range of 200-800 nm, chromatograms were extracted at a wavelength of 319 nm. The chromatographic column used is a X-Terra Phenyl (150 x 3.9 mm), packed with 3.5 μm silica particles. The mobile phase was A (0.1% HCOOH in H₂O) / B (0.1% HCOOH in MeOH) using the following gradient: A/B 30/70 (11 min); 0/100 (12 min); 0/100 (13 min); 30/70 (14 min); 30/70 (16 min) at a flow of 0.6 mL.min⁻¹. The temperature of the column and samples was set at 40°C.

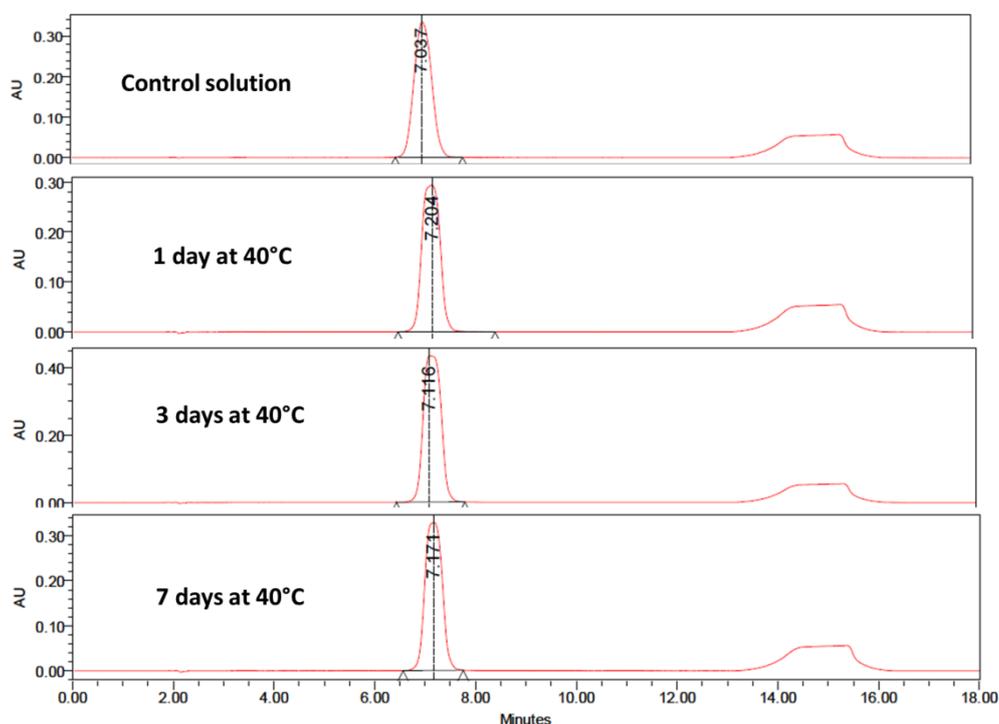


Figure 73 : Stability of the dual inhibitor 30 in aqueous solution over time.

Tables des illustrations

I. Table des figures

Figure 1 : Estimation de l'incidence de la tuberculose à travers le monde en 2021.	9
Figure 2 : Nombre de cas de tuberculose en fonction de l'âge et du genre en 2021.	10
Figure 3 : Nombre de cas de tuberculose déclarés en France entre 2000 et 2021.	11
Figure 4 : Progression des stratégies de lutte contre la tuberculose pour l'étape 2025. ..	12
Figure 5 : Evolution du nombre de cas de tuberculose notifiés par an.	13
Figure 6 : Les antituberculeux de 1 ^{ère} ligne et leurs structures.	22
Figure 7 : Structures d'antituberculeux de 2 ^{ème} ligne.	23
Figure 8 : Estimation des cas de tuberculoses résistantes à l'isoniazide et/ou la rifampicine.	25
Figure 9 : Structures des nouveaux antituberculeux.	26
Figure 10 : Nouveaux médicaments en cours d'études.	27
Figure 11 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.	30
Figure 12 : Schéma de l'enveloppe de Mtb.	32
Figure 13 : Structures des 3 principales classes d'acides mycoliques de Mtb.	33
Figure 14 : Schéma de la biosynthèse, de l'inhibition et de la régulation des acides mycoliques.	36
Figure 15 : Structure cristallographique d'InhA. A) Structure tertiaire (PDB : 1ENY).	39
Figure 16 : Vue du site actif de la protéine InhA en présence du cofacteur et d'un analogue de substrat.	40
Figure 17 : Mécanisme de réduction de la double liaison du substrat énoyl par la protéine InhA.	41
Figure 18 : SBL de la protéine InhA. Superposition de la structure d'InhA en complexe avec le NADH (PDB : 1ENY, en gris) et de la structure de la protéine en complexe avec le NAD ⁺ et le THT (PDB : 1BVR, en bleu).	42
Figure 19 : Visualisation des résidus formant la partie supérieure du portail majeur. Vue de face du portail majeur d'InhA (1ENY).	43
Figure 20 : Les portails majeur et mineur de la protéine InhA.	43
Figure 21 : Les arylamides et mode de fixation du composé GENZ10850.	48
Figure 22 : Structures des pyrrolidines carboxamides et leur fixation dans le site actif.	50
Figure 23 : Structures des thiadiazoles et leurs interactions avec InhA.	51
Figure 24 : Structure générale des pyridones et celle du composé NITD-916.	52
Figure 25 : Structure de la protéine InhA en complexe avec le NITD-916 (PDB : 4R9S).	53
Figure 26 : Structures des sulfonamides actifs contre InhA.	54
Figure 27 : Mode de fixation du sulfonamide dans le site actif d'InhA (PDB : 6SQL).	54
Figure 28 : Structures du pyrazole hit obtenu après criblage d'une banque de fragments couplés à l'ADN et molécule tête de série développée (lead).	55
Figure 29 : Interactions avec le portail majeur d'InhA médiées par le pyrazole 7 (PDB : 4COD).	56
Figure 30 : Structure générale des diaryl éthers et mode d'inhibition du TCL.	57
Figure 31 : Structures des diaryl éthers alkylés.	58
Figure 32 : Superposition des structures d'InhA en complexe avec les composés 5PP et PT70.	59
Figure 33 : Les états ouverts et fermés des portails majeur et mineur d'InhA.	60

Figure 34 : Structures générales des diaryl éthers portant un groupement triazole.	61
Figure 35 : Superposition des structures en complexes avec PT70 (PDB : 2X23) et PT504 (PDB : 5UGT).	61
Figure 36 : Structure de la pyridomycine et du composé AN12855 (A), ainsi que leur positionnement dans le site actif (B).	63
Figure 37 : Superposition des structures d’InhA en complexe avec des ligands interagissant dans les sites I, II et III.	64
Figure 38 : Principe de fonctionnement de la KTGS.	69
Figure 39 : Illustration des deux types de DCC.	70
Figure 40 : Les principales réactions utilisées lors de la DCC guidée par une cible.	71
Figure 41 : Inhibiteurs et fragments contre l’endothiapepsine.	72
Figure 42 : Mise en place de la DCX et son analyse par cristallographie aux rayons X.	73
Figure 43 : Motif diaryl éther et structure du triclosan.	74
Figure 44 : Représentation de la fixation du motif diaryl éther dans le site actif d’InhA.	75
Figure 45 : Les différents fragments aldéhydes, amines, hydrazines et hydrazides utilisés lors du criblage DCX appliqué à InhA.	79
Figure 46 : Structure d’InhA obtenue par DCX à partir de l’aldéhyde 11.	85
Figure 47 : Modélisation des différents adduits dans les cartes de densité électronique.	86
Figure 48 : Structures cristallographiques des complexes d’InhA obtenues par DCX avec l’aldéhyde 17.	87
Figure 49 : Superposition des trois structures obtenues par DCX.	88
Figure 50 : Superposition des protomères des complexes InhA-NAD⁺-aldéhyde.	89
Figure 51 : Etat d’ouverture des portails majeur et mineur.	90
Figure 52 : Superposition des conformations du diaryl éther 11 de chaque monomère (A) et des différents diaryl éthers avant et après DCX (B).	91
Figure 53 : Superposition des structures issues de DCX avec (en marron) et sans (en bleu) pré-incubation.	94
Figure 54 : Elongation des précurseurs d’acides mycoliques par le système FAS-II.	152
Figure 55 : Structures et concentrations minimales inhibitrices de l’isoxyl, de la thiacétazone ainsi que l’un de ses analogues, le D17 sur la souche H37Rv de Mtb.	153
Figure 56 : Structures des diaryl éthers 11 et 17.	154
Figure 57 : Viabilité de cellules humaines en présence de différentes concentrations en composés 17, 29, 31, 33 et TAC.	162
Figure 58 : Superposition des structures d’InhA en complexe avec les diaryl éthers aldéhydiques (A) et les inhibiteurs duaux (B).	164
Figure 59 : Variation de l’interaction inhibiteur/ligand dans le portail majeur selon la nature du groupement dans le portail mineur.	165
Figure 60 : Structure et activité de OPC-167832, un inhibiteur de la protéine DprE1.	169
Figure 61 : Structures et activités des inhibiteurs de MmpL3.	170
Figure 62 : Pyridone NITD-916 et activités associées contre Mtb et Mab.	171
Figure 63 : Cartes de densité électronique de la protéine InhA_{Mab} obtenues après co-cristallisation avec ED1727 (A) et ED1785 (B).	173
Figure 64 : Superposition des structures d’InhA de Mtb et Mab en complexe avec ED1727.	174
Figure 65 : Designed pET15b plasmid containing the inhA gene.	179

Figure 66 : Chromatogram obtained after the first affinity chromatography step of InhA.....	182
Figure 67 : Chromatogram obtained after affinity chromatography on cleaved InhA protein.....	183
Figure 68 : Chromatogram obtained for size-exclusion chromatography for untagged InhA.....	184
Figure 69 : Electrophoresis gel of samples from the different InhA purification steps.	185
Figure 70 : Electron density map for InhA from Mab co-crystallized with ED1785.	189
Figure 71 : Structure of trans-2-dodecenoyl-CoA.....	190
Figure 72 : Absorption spectra of NADH and NAD⁺.....	190
Figure 73 : Stability of the dual inhibitor 30 in aqueous solution over time.....	215

II. Table des schémas

Schéma 1 : Illustration d'une chimie combinatoire.	49
Schéma 2 : Synthèse des diaryl éthers 2, 4 et 6.	76
Schéma 3 : Synthèse du diaryl éther 11.	77
Schéma 4 : Synthèse du diaryl éther 17.	77
Schéma 5 : Synthèse du diaryl éther aminé 18.	78
Schéma 6 : Synthèse des adduits 19 (C11), 20 (E17) et 21 (J17).	92
Schéma 7 : Schéma général de fusion de pharmacophores pour la confection d'inhibiteurs multi-cibles.	150
Schéma 8 : Design de l'inhibiteur dual ciblant CDK4 et HDAC1.	151
Schéma 9 : Design des inhibiteurs duaux visant HadABC et InhA.	154
Schéma 10 : Synthèse du composé 23.	154
Schéma 11 : Voie de synthèse des composés 28 et 29.	155
Schéma 12 : Synthèse des inhibiteurs duaux.	156

III. Table des tableaux

Tableau 1 : Structures des inhibiteurs directs d’InhA et données biologiques associées.	45
Tableau 2 : Criblage de fragments pour la formation d’imines.....	81
Tableau 3 : Criblages de fragments pour la formation d’hydrazones et d’acylhydrazones.....	83
Tableau 4 : Mélanges ayant donné des adduits en complexe avec la protéine InhA.....	84
Tableau 5 : Activités inhibitrices des diaryl éthers synthétisés contre la protéine InhA.	93
Tableau 6 : Activités inhibitrices des diaryl éthers contre InhA et différentes souches de Mtb.....	157
Tableau 7 : Oxydation du NADPH par EthA en présence des molécules duales.	159
Tableau 8 : Cytotoxicité des inhibiteurs aldéhydiques et duaux ainsi que de la TAC déterminés sur les 4 types de lignées cellulaires à partir des courbes de viabilité.....	163
Tableau 9 : Conditions de cristallisation de la protéine InhA_{Mab}.....	172
Tableau 10 : Buffers for affinity and size exclusion chromatography.	181
Tableau 11: Solution for InhA histidine tag cleavage.....	182
Tableau 12: Volumes and final concentrations of solution for enzymatic assays.	191

Références bibliographiques

- (1) *Who, Global tuberculosis report 2022, World Health Organization, Geneva, 2022.* <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061729> (accessed 2023-07-06).
- (2) Daniel, T. M.; Iversen, P. A. Hippocrates and Tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2015**, *19* (4), 373–374. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0736>.
- (3) Murray, J. F.; Rieder, H. L.; Finley-Croswhite, A. The King’s Evil and the Royal Touch: The Medical History of Scrofula. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2016**, *20* (6), 713–716. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0229>.
- (4) Murray, J. F. The Industrial Revolution and the Decline in Death Rates from Tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2015**, *19* (5), 502–503. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0856>.
- (5) Épidémiologie de la tuberculose. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2004**, *34* (8), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2004.07.012>.
- (6) *Tuberculose en France: les chiffres 2021.* <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2023/tuberculose-en-france-les-chiffres-2021> (accessed 2023-08-03).
- (7) *Global tuberculosis report 2020.* <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131> (accessed 2023-08-12).
- (8) Bruchfeld, J.; Correia-Neves, M.; Källenius, G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5* (7), a017871. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017871>.
- (9) *The end TB strategy.* <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HTM-TB-2015.19> (accessed 2023-08-06).
- (10) Floyd, K.; Glaziou, P.; Houben, R. M. G. J.; Sumner, T.; White, R. G.; Raviglione, M. Global Tuberculosis Targets and Milestones Set for 2016–2035: Definition and Rationale. *Int J Tuberc Lung Dis* **2018**, *22* (7), 723–730. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0835>.
- (11) Werf, M. J. van der; Langendam, M. W.; Huitric, E.; Manissero, D. Multidrug Resistance after Inappropriate Tuberculosis Treatment: A Meta-Analysis. *European Respiratory Journal* **2012**, *39* (6), 1511–1519. <https://doi.org/10.1183/09031936.00125711>.
- (12) Iradukunda, A.; Ndayishimiye, G.-P.; Sinarinzi, D.; Odjidja, E. N.; Ntakaburimvo, N.; Nshimirimana, I.; Izere, C. Key Factors Influencing Multidrug-Resistant Tuberculosis in Patients under Anti-Tuberculosis Treatment in Two Centres in Burundi: A Mixed Effect Modelling Study. *BMC Public Health* **2021**, *21* (1), 2142. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-12233-2>.
- (13) Zhang, H.; Liu, M.; Fan, W.; Sun, S.; Fan, X. The Impact of Mycobacterium Tuberculosis Complex in the Environment on One Health Approach. *Front Public Health* **2022**, *10*, 994745. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.994745>.
- (14) Fine, A. E.; O’Brien, D. J.; Winterstein, S. R.; Kaneene, J. B. An Effort to Isolate *Mycobacterium Bovis* from Environmental Substrates during Investigations of Bovine Tuberculosis Transmission Sites (Cattle Farms and Wildlife Areas) in Michigan, USA. *International Scholarly Research Notices* **2011**, *2011*, e787181. <https://doi.org/10.5402/2011/787181>.

- (15) Tortoli, E.; Meehan, C. J.; Grottola, A.; Fregni Serpini, G.; Fabio, A.; Trovato, A.; Pecorari, M.; Cirillo, D. M. Genome-Based Taxonomic Revision Detects a Number of Synonymous Taxa in the Genus *Mycobacterium*. *Infection, Genetics and Evolution* **2019**, *75*, 103983. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103983>.
- (16) Johansen, M. D.; Herrmann, J.-L.; Kremer, L. Non-Tuberculous *Mycobacteria* and the Rise of *Mycobacterium Abscessus*. *Nat Rev Microbiol* **2020**, *18* (7), 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>.
- (17) Lawn, S. D.; Myer, L.; Edwards, D.; Bekker, L.-G.; Wood, R. Short-Term and Long-Term Risk of Tuberculosis Associated with CD4 Cell Recovery during Antiretroviral Therapy in South Africa. *AIDS* **2009**, *23* (13), 1717–1725. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832d3b6d>.
- (18) Diedrich, C. R.; Mattila, J. T.; Klein, E.; Janssen, C.; Phuah, J.; Sturgeon, T. J.; Montelaro, R. C.; Lin, P. L.; Flynn, J. L. Reactivation of Latent Tuberculosis in Cynomolgus Macaques Infected with SIV Is Associated with Early Peripheral T Cell Depletion and Not Virus Load. *PLoS One* **2010**, *5* (3), e9611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009611>.
- (19) Huebner, R. E.; Schein, M. F.; John B. Bass, Jr. The Tuberculin Skin Test. *Clinical Infectious Diseases* **1993**, *17* (6), 968–975.
- (20) Farhat, M.; Greenaway, C.; Pai, M.; Menzies, D. False-Positive Tuberculin Skin Tests: What Is the Absolute Effect of BCG and Non-Tuberculous *Mycobacteria*? *Int J Tuberc Lung Dis* **2006**, *10* (11), 1192–1204.
- (21) Carrère-Kremer, S.; Kolia-Diafouka, P.; Pisoni, A.; Bolloré, K.; Peries, M.; Godreuil, S.; Bourdin, A.; Van de Perre, P.; Tuaillon, E. QuantiFERON-TB Gold Plus Assay in Patients With Latent vs. Active Tuberculosis in a Low Incidence Setting: Level of IFN- γ , CD4/CD8 Responses, and Release of IL-2, IP-10, and MIG. *Front Microbiol* **2022**, *13*, 825021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825021>.
- (22) Zhang, Y.; Zhou, G.; Shi, W.; Shi, W.; Hu, M.; Kong, D.; Long, R.; He, J.; Chen, N. Comparing the Diagnostic Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus with QFT-GIT, T-SPOT.TB and TST: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Infectious Diseases* **2023**, *23* (1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08008-2>.
- (23) Majlessi, L.; Brodin, P.; Brosch, R.; Rojas, M.-J.; Khun, H.; Huerre, M.; Cole, S. T.; Leclerc, C. Influence of ESAT-6 Secretion System 1 (RD1) of *Mycobacterium Tuberculosis* on the Interaction between *Mycobacteria* and the Host Immune System. *J Immunol* **2005**, *174* (6), 3570–3579. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3570>.
- (24) Organization, W. H. BCG Vaccine: WHO Position Paper, February 2018 - Recommendations. *Vaccine* **2018**, *36* (24), 3408–3410. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.009>.
- (25) Andersen, P.; Doherty, T. M. The Success and Failure of BCG - Implications for a Novel Tuberculosis Vaccine. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3* (8), 656–662. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1211>.

- (26) Calmette, A. On Preventive Vaccination of the New-Born against Tuberculosis by B.C.G. *British Journal of Tuberculosis* **1928**, 22 (4), 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0366-0850\(28\)80052-4](https://doi.org/10.1016/S0366-0850(28)80052-4).
- (27) Milstien, J. B.; Gibson, J. J. Quality Control of BCG Vaccine by WHO: A Review of Factors That May Influence Vaccine Effectiveness and Safety. *Bull World Health Organ* **1990**, 68 (1), 93–108.
- (28) Angelidou, A.; Conti, M.-G.; Diray-Arce, J.; Benn, C. S.; Shann, F.; Netea, M. G.; Liu, M.; Potluri, L. P.; Sanchez-Schmitz, G.; Husson, R.; Ozonoff, A.; Kampmann, B.; van Haren, S. D.; Levy, O. Licensed Bacille Calmette-Guérin (BCG) Formulations Differ Markedly in Bacterial Viability, RNA Content and Innate Immune Activation. *Vaccine* **2020**, 38 (9), 2229–2240. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.060>.
- (29) Fifteen Year Follow up of Trial of BCG Vaccines in South India for Tuberculosis Prevention. Tuberculosis Research Centre (ICMR), Chennai. *Indian J Med Res* **1999**, 110, 56–69.
- (30) Corsenac, P.; Parent, M.-É.; Mansaray, H.; Benedetti, A.; Richard, H.; Stäger, S.; Rousseau, M.-C. Early Life Bacillus Calmette-Guerin Vaccination and Incidence of Type 1, Type 2, and Latent Autoimmune Diabetes in Adulthood. *Diabetes & Metabolism* **2022**, 48 (3), 101337. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2022.101337>.
- (31) Dias, H. F.; Mochizuki, Y.; Kühtreiber, W. M.; Takahashi, H.; Zheng, H.; Faustman, D. L. Bacille Calmette Guerin (BCG) and Prevention of Types 1 and 2 Diabetes: Results of Two Observational Studies. *PLoS One* **2023**, 18 (1), e0276423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276423>.
- (32) Faustman, D. L.; Lee, A.; Hostetter, E. R.; Aristarkhova, A.; Ng, N. C.; Shpilsky, G. F.; Tran, L.; Wolfe, G.; Takahashi, H.; Dias, H. F.; Braley, J.; Zheng, H.; Schoenfeld, D. A.; Kühtreiber, W. M. Multiple BCG Vaccinations for the Prevention of COVID-19 and Other Infectious Diseases in Type 1 Diabetes. *Cell Rep Med* **2022**, 3 (9), 100728. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100728>.
- (33) Singh, M.; Dutta, M.; Kodan, P.; Tripathy, S. Vaccination against Tuberculosis: Beyond BCG. *J Respir Dis Med* **2020**, 2 (3). <https://doi.org/10.15761/JRDM.1000117>.
- (34) Day, C. L.; Tameris, M.; Mansoor, N.; van Rooyen, M.; de Kock, M.; Geldenhuys, H.; Erasmus, M.; Makhethhe, L.; Hughes, E. J.; Gelderbloem, S.; Bollaerts, A.; Bourguignon, P.; Cohen, J.; Demoitié, M.-A.; Mettens, P.; Moris, P.; Sadoff, J. C.; Hawkridge, A.; Hussey, G. D.; Mahomed, H.; Ofori-Anyinam, O.; Hanekom, W. A. Induction and Regulation of T-Cell Immunity by the Novel Tuberculosis Vaccine M72/AS01 in South African Adults. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, 188 (4), 492–502. <https://doi.org/10.1164/rccm.201208-1385OC>.
- (35) Didierlaurent, A. M.; Laupèze, B.; Di Pasquale, A.; Hergli, N.; Collignon, C.; Garçon, N. Adjuvant System AS01: Helping to Overcome the Challenges of Modern Vaccines. *Expert Rev Vaccines* **2017**, 16 (1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>.
- (36) Tozer, L. Promising Tuberculosis Vaccine Gets US\$550-Million Shot in the Arm. *Nature* **2023**. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-02171-x>.

- (37) Grode, L.; Seiler, P.; Baumann, S.; Hess, J.; Brinkmann, V.; Nasser Eddine, A.; Mann, P.; Goosmann, C.; Bandermann, S.; Smith, D.; Bancroft, G. J.; Reyrat, J.-M.; van Soolingen, D.; Raupach, B.; Kaufmann, S. H. E. Increased Vaccine Efficacy against Tuberculosis of Recombinant Mycobacterium Bovis Bacille Calmette-Guérin Mutants That Secrete Listeriolysin. *J Clin Invest* **2005**, *115* (9), 2472–2479. <https://doi.org/10.1172/JCI24617>.
- (38) Iseman, M. D. Tuberculosis Therapy: Past, Present and Future. *Eur Respir J Suppl* **2002**, *36*, 87s–94s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00309102>.
- (39) Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ. *Br J Exp Pathol* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (40) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr Opin Microbiol* **2019**, *51*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- (41) Woodruff, H. B. Selman A. Waksman, Winner of the 1952 Nobel Prize for Physiology or Medicine. *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80* (1), 2–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01143-13>.
- (42) Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R. J.; Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1998**, *279* (5347), 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.279.5347.98>.
- (43) Quemard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R.; Blanchard, J. S. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in Mycobacterium Tuberculosis. *Biochemistry* **1995**, *34* (26), 8235–8241. <https://doi.org/10.1021/bi00026a004>.
- (44) Yang, J.; Liu, Y.; Bi, J.; Cai, Q.; Liao, X.; Li, W.; Guo, C.; Zhang, Q.; Lin, T.; Zhao, Y.; Wang, H.; Liu, J.; Zhang, X.; Lin, D. Structural Basis for Targeting the Ribosomal Protein S1 of Mycobacterium Tuberculosis by Pyrazinamide. *Mol Microbiol* **2015**, *95* (5), 791–803. <https://doi.org/10.1111/mmi.12892>.
- (45) Fàbrega, A.; Madurga, S.; Giralt, E.; Vila, J. Mechanism of Action of and Resistance to Quinolones. *Microb Biotechnol* **2009**, *2* (1), 40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>.
- (46) Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Locht, C.; Besra, G. S. Activation of the Pro-Drug Ethionamide Is Regulated in Mycobacteria*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (36), 28326–28331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003744200>.
- (47) Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Mechanism of Thioamide Drug Action against Tuberculosis and Leprosy. *J Exp Med* **2007**, *204* (1), 73–78. <https://doi.org/10.1084/jem.20062100>.
- (48) Bruning, J. B.; Murillo, A. C.; Chacon, O.; Barletta, R. G.; Sacchettini, J. C. Structure of the Mycobacterium Tuberculosis D-Alanine:D-Alanine Ligase, a Target of the Antituberculosis Drug d-Cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55* (1), 291–301. <https://doi.org/10.1128/AAC.00558-10>.
- (49) Ippolito, J. A.; Kanyo, Z. F.; Wang, D.; Franceschi, F. J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A.; Duffy, E. M. Crystal Structure of the Oxazolidinone Antibiotic Linezolid Bound to the 50S

Ribosomal Subunit. *J Med Chem* **2008**, *51* (12), 3353–3356. <https://doi.org/10.1021/jm800379d>.

(50) Gan, W. C.; Ng, H. F.; Ngeow, Y. F. Mechanisms of Linezolid Resistance in Mycobacteria. *Pharmaceuticals (Basel)* **2023**, *16* (6), 784. <https://doi.org/10.3390/ph16060784>.

(51) Klopper, M.; Warren, R. M.; Hayes, C.; Gey van Pittius, N. C.; Streicher, E. M.; Müller, B.; Sirgel, F. A.; Chabula-Nxiweni, M.; Hoosain, E.; Coetzee, G.; David van Helden, P.; Victor, T. C.; Trollip, A. P. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. *Emerg Infect Dis* **2013**, *19* (3), 449–455. <https://doi.org/10.3201/EID1903.120246>.

(52) Haagsma, A. C.; Abdillahi-Ibrahim, R.; Wagner, M. J.; Krab, K.; Vergauwen, K.; Guillemont, J.; Andries, K.; Lill, H.; Koul, A.; Bald, D. Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (3), 1290–1292. <https://doi.org/10.1128/AAC.01393-08>.

(53) Khoshnood, S.; Taki, E.; Sadeghifard, N.; Kaviar, V. H.; Haddadi, M. H.; Farshadzadeh, Z.; Kouhsari, E.; Goudarzi, M.; Heidary, M. Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 717045. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717045>.

(54) Stover, C. K.; Warrener, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A Small-Molecule Nitroimidazopyran Drug Candidate for the Treatment of Tuberculosis. *Nature* **2000**, *405* (6789), 962–966. <https://doi.org/10.1038/35016103>.

(55) Stancil, S. L.; Mirzayev, F.; Abdel-Rahman, S. M. Profiling Pretomanid as a Therapeutic Option for TB Infection: Evidence to Date. *Drug Des Devel Ther* **2021**, *15*, 2815–2830. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S281639>.

(56) *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis: Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment, 2022 Update*; WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee; World Health Organization: Geneva, 2022.

(57) *Pipeline | Working Group for New TB Drugs*. <https://www.newtbdugs.org/pipeline/clinical> (accessed 2023-08-18).

(58) Darby, E. M.; Trampari, E.; Siasat, P.; Gaya, M. S.; Alav, I.; Webber, M. A.; Blair, J. M. A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited. *Nat Rev Microbiol* **2023**, *21* (5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>.

(59) Tao, S.; Chen, H.; Li, N.; Wang, T.; Liang, W. The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2022**, *2022*, 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>.

(60) Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **2010**, *35* (4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>.

- (61) Fernández, L.; Hancock, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* **2012**, *25* (4), 661–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>.
- (62) Wright, G. D. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.
- (63) Flores, A. R.; Parsons, L. M.; Pavelka. Genetic Analysis of the β -Lactamases of Mycobacterium Tuberculosis and Mycobacterium Smegmatis and Susceptibility to β -Lactam Antibiotics. *Microbiology* **2005**, *151* (2), 521–532. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27629-0>.
- (64) DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry, C. E. Ethionamide Activation and Sensitivity in Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97* (17), 9677–9682. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9677>.
- (65) Vilchèze, C.; Jacobs, W. R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiology Spectrum* **2014**, *2* (4), 10.1128/microbiolspec.mgm2-0014–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mgm2-0014-2013>.
- (66) Liou, G. F.; Yoshizawa, S.; Courvalin, P.; Galimand, M. Aminoglycoside Resistance by ArmA-Mediated Ribosomal 16S Methylation in Human Bacterial Pathogens. *J Mol Biol* **2006**, *359* (2), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.038>.
- (67) Vetting, M. W.; Hegde, S. S.; Wang, M.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C.; Blanchard, J. S. Structure of QnrB1, a Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Factor. *J Biol Chem* **2011**, *286* (28), 25265–25273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226936>.
- (68) Webber, M. A.; Piddock, L. J. V. The Importance of Efflux Pumps in Bacterial Antibiotic Resistance. *J Antimicrob Chemother* **2003**, *51* (1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.
- (69) Du, D.; Wang-Kan, X.; Neuberger, A.; van Veen, H. W.; Pos, K. M.; Piddock, L. J. V.; Luisi, B. F. Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation. *Nat Rev Microbiol* **2018**, *16* (9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.
- (70) De Kievit, T. R.; Parkins, M. D.; Gillis, R. J.; Srikumar, R.; Ceri, H.; Poole, K.; Iglewski, B. H.; Storey, D. G. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45* (6), 1761–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1761-1770.2001>.
- (71) Balganesch, M.; Kuruppath, S.; Marcel, N.; Sharma, S.; Nair, A.; Sharma, U. Rv1218c, an ABC Transporter of Mycobacterium Tuberculosis with Implications in Drug Discovery. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54* (12), 5167–5172. <https://doi.org/10.1128/AAC.00610-10>.
- (72) Pasca, M. R.; Gugliera, P.; Arcesi, F.; Bellinzoni, M.; De Rossi, E.; Riccardi, G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC Fluoroquinolone Efflux Pump in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48* (8), 3175–3178. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004>.

- (73) Lu, J.; Liu, M.; Wang, Y.; Pang, Y.; Zhao, Z. Mechanisms of Fluoroquinolone Monoresistance in Mycobacterium Tuberculosis. *FEMS Microbiol Lett* **2014**, *353* (1), 40–48. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12401>.
- (74) Jarlier, V.; Nikaido, H. Permeability Barrier to Hydrophilic Solutes in Mycobacterium Chelonae. *J Bacteriol* **1990**, *172* (3), 1418–1423.
- (75) McNeil, M. R.; Brennan, P. J. Structure, Function and Biogenesis of the Cell Envelope of Mycobacteria in Relation to Bacterial Physiology, Pathogenesis and Drug Resistance; Some Thoughts and Possibilities Arising from Recent Structural Information. *Res Microbiol* **1991**, *142* (4), 451–463. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90120-y](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90120-y).
- (76) Singh, P.; Rameshwaram, N. R.; Ghosh, S.; Mukhopadhyay, S. Cell Envelope Lipids in the Pathophysiology of Mycobacterium Tuberculosis. *Future Microbiology* **2018**, *13* (6), 689–710. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0135>.
- (77) Raffetseder, J. Interplay of Human Macrophages and Mycobacterium Tuberculosis Phenotypes. **2016**.
- (78) Asselineau, J.; Lederer, E. Structure of the Mycolic Acids of Mycobacteria. *Nature* **1950**, *166* (4227), 782–783. <https://doi.org/10.1038/166782a0>.
- (79) Nataraj, V.; Varela, C.; Javid, A.; Singh, A.; Besra, G. S.; Bhatt, A. Mycolic Acids: Deciphering and Targeting the Achilles' Heel of the Tubercle Bacillus. *Mol Microbiol* **2015**, *98* (1), 7–16. <https://doi.org/10.1111/mmi.13101>.
- (80) Barkan, D.; Hedhli, D.; Yan, H.-G.; Huygen, K.; Glickman, M. S. Mycobacterium Tuberculosis Lacking All Mycolic Acid Cyclopropanation Is Viable but Highly Attenuated and Hyperinflammatory in Mice. *Infect Immun* **2012**, *80* (6), 1958–1968. <https://doi.org/10.1128/IAI.00021-12>.
- (81) Yuan, Y.; Zhu, Y.; Crane, D. D.; Barry, C. E. 3rd. The Effect of Oxygenated Mycolic Acid Composition on Cell Wall Function and Macrophage Growth in Mycobacterium Tuberculosis. *Mol Microbiol* **1998**, *29* (6), 1449–1458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01026.x>.
- (82) Parsons, J. B.; Frank, M. W.; Subramanian, C.; Saenkham, P.; Rock, C. O. Metabolic Basis for the Differential Susceptibility of Gram-Positive Pathogens to Fatty Acid Synthesis Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (37), 15378–15383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109208108>.
- (83) Elad, N.; Baron, S.; Peleg, Y.; Albeck, S.; Grunwald, J.; Raviv, G.; Shakked, Z.; Zimhony, O.; Diskin, R. Structure of Type-I Mycobacterium Tuberculosis Fatty Acid Synthase at 3.3 Å Resolution. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 3886. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06440-6>.
- (84) Bhatt, A.; Molle, V.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Kremer, L. The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Condensing Enzymes: Their Role in Mycolic Acid Biosynthesis, Acid-Fastness, Pathogenesis and in Future Drug Development. *Mol Microbiol* **2007**, *64* (6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x>.

- (85) Cantaloube, S.; Veyron-Churlet, R.; Haddache, N.; Daffé, M.; Zerbib, D. The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS One* **2011**, *6* (12), e29564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029564>.
- (86) Singh, A.; Varela, C.; Bhatt, K.; Veerapen, N.; Lee, O. Y. C.; Wu, H. H. T.; Besra, G. S.; Minnikin, D. E.; Fujiwara, N.; Teramoto, K.; Bhatt, A. Identification of a Desaturase Involved in Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacterium Smegmatis. *PLoS One* **2016**, *11* (10), e0164253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164253>.
- (87) Daffé, M.; Quémar, A.; Marrakchi, H. Mycolic Acids: From Chemistry to Biology. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*; Geiger, O., Ed.; Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0_18-1.
- (88) Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R. inhA, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1994**, *263* (5144), 227–230. <https://doi.org/10.1126/science.8284673>.
- (89) Rozwarski, D. A.; Vilchèze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C. Crystal Structure of the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD⁺ and a C16 Fatty Acyl Substrate*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (22), 15582–15589. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15582>.
- (90) Persson, B.; Bray, J. E.; Bruford, E.; Dellaporta, S. L.; Favia, A. D.; Gonzalez Duarte, R.; Jörnvall, H.; Kallberg, Y.; Kavanagh, K. L.; Kedishvili, N.; Kisiela, M.; Maser, E.; Mindnich, R.; Orchard, S.; Penning, T. M.; Thornton, J. M.; Adamski, J.; Oppermann, U. The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related Enzymes) Nomenclature Initiative. *Chem Biol Interact* **2009**, *178* (1–3), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.040>.
- (91) Khan, R.; Zeb, A.; Roy, N.; Thapa Magar, R.; Kim, H. J.; Lee, K. W.; Lee, S.-W. Biochemical and Structural Basis of Triclosan Resistance in a Novel Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62* (8), e00648-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00648-18>.
- (92) Molle, V.; Gulten, G.; Vilchèze, C.; Veyron-Churlet, R.; Zanella-Cléon, I.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R.; Kremer, L. Phosphorylation of InhA Inhibits Mycolic Acid Biosynthesis and Growth of Mycobacterium Tuberculosis. *Mol Microbiol* **2010**, *78* (6), 1591–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07446.x>.
- (93) Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The Isoniazid-NAD Adduct Is a Slow, Tight-Binding Inhibitor of InhA, the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Reductase: Adduct Affinity and Drug Resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (24), 13881–13886. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235848100>.
- (94) Medvedev, K. E.; Kinch, L. N.; Schaeffer, R. D.; Grishin, N. V. Functional Analysis of Rossmann-like Domains Reveals Convergent Evolution of Topology and Reaction Pathways. *PLoS Comput Biol* **2019**, *15* (12), e1007569. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007569>.

- (95) Dessen, A.; Quémard, A.; Blanchard, J. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1995**, 267 (5204), 1638–1641. <https://doi.org/10.1126/science.7886450>.
- (96) Parikh, S.; Moynihan, D. P.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *Biochemistry* **1999**, 38 (41), 13623–13634. <https://doi.org/10.1021/bi990529c>.
- (97) Vögeli, B.; Rosenthal, R. G.; Stoffel, G. M. M.; Wagner, T.; Kiefer, P.; Cortina, N. S.; Shima, S.; Erb, T. J. InhA, the Enoyl-Thioester Reductase from Mycobacterium Tuberculosis Forms a Covalent Adduct during Catalysis. *J Biol Chem* **2018**, 293 (44), 17200–17207. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005405>.
- (98) Filling, C.; Berndt, K. D.; Benach, J.; Knapp, S.; Prozorovski, T.; Nordling, E.; Ladenstein, R.; Jörnvall, H.; Oppermann, U. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-Chain Dehydrogenases/Reductases *. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (28), 25677–25684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202160200>.
- (99) Chollet, A.; Maveyraud, L.; Lherbet, C.; Bernardes-Génisson, V. An Overview on Crystal Structures of InhA Protein: Apo-Form, in Complex with Its Natural Ligands and Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 146, 318–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047>.
- (100) Kumar, V.; Sobhia, M. E. Insights into the Bonding Pattern for Characterizing the Open and Closed State of the Substrate-Binding Loop in Mycobacterium Tuberculosis InhA. *Future Med Chem* **2014**, 6 (6), 605–616. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.27>.
- (101) Kuo, M. R.; Morbidoni, H. R.; Alland, D.; Sneddon, S. F.; Gourlie, B. B.; Staveski, M. M.; Leonard, M.; Gregory, J. S.; Janjigian, A. D.; Yee, C.; Musser, J. M.; Kreiswirth, B.; Iwamoto, H.; Perozzo, R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Fidock, D. A. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase: Compound Activity and Structural Data. *J Biol Chem* **2003**, 278 (23), 20851–20859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211968200>.
- (102) He, X.; Alian, A.; Ortiz de Montellano, P. R. Inhibition of the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase InhA by Arylamides. *Bioorg Med Chem* **2007**, 15 (21), 6649–6658. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.013>.
- (103) Martínez-Hoyos, M.; Perez-Herran, E.; Gulten, G.; Encinas, L.; Álvarez-Gómez, D.; Alvarez, E.; Ferrer-Bazaga, S.; García-Pérez, A.; Ortega, F.; Angulo-Barturen, I.; Rullas-Trincado, J.; Blanco Ruano, D.; Torres, P.; Castañeda, P.; Huss, S.; Fernández Menéndez, R.; González Del Valle, S.; Ballell, L.; Barros, D.; Modha, S.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J. D.; García-Bustos, J. F.; Lavandera, J. L.; Sacchettini, J. C.; Jimenez, M. S.; Martín-Casabona, N.; Castro-Pichel, J.; Mendoza-Losana, A. Antitubercular Drugs for an Old Target: GSK693 as a Promising InhA Direct Inhibitor. *EBioMedicine* **2016**, 8, 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.006>.
- (104) Manjunatha, U. H.; S Rao, S. P.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynn, R.; Smith, P. W.;

Diagana, T. T. Direct Inhibitors of InhA Are Active against Mycobacterium Tuberculosis. *Sci Transl Med* **2015**, *7* (269), 269ra3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010597>.

(105) Sabbah, M.; Mendes, V.; Vistal, R. G.; Dias, D. M. G.; Záhorská, M.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Coyne, A. G.; Blundell, T. L.; Abell, C. Fragment-Based Design of Mycobacterium Tuberculosis InhA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4749–4761. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00007>.

(106) Encinas, L.; O’Keefe, H.; Neu, M.; Remuiñán, M. J.; Patel, A. M.; Guardia, A.; Davie, C. P.; Pérez-Macías, N.; Yang, H.; Convery, M. A.; Messer, J. A.; Pérez-Herrán, E.; Centrella, P. A.; Álvarez-Gómez, D.; Clark, M. A.; Huss, S.; O’Donovan, G. K.; Ortega-Muro, F.; McDowell, W.; Castañeda, P.; Arico-Muendel, C. C.; Pajk, S.; Rullás, J.; Angulo-Barturen, I.; Álvarez-Ruíz, E.; Mendoza-Losana, A.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J.; Evindar, G. Encoded Library Technology as a Source of Hits for the Discovery and Lead Optimization of a Potent and Selective Class of Bactericidal Direct Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis InhA. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1276–1288. <https://doi.org/10.1021/jm401326j>.

(107) Sullivan, T. J.; Truglio, J. J.; Boyne, M. E.; Novichenok, P.; Zhang, X.; Stratton, C. F.; Li, H.-J.; Kaur, T.; Amin, A.; Johnson, F.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium Tuberculosis*. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (1), 43–53. <https://doi.org/10.1021/cb0500042>.

(108) am Ende, C. W.; Knudson, S. E.; Liu, N.; Childs, J.; Sullivan, T. J.; Boyne, M.; Xu, H.; Gegina, Y.; Knudson, D. L.; Johnson, F.; Peloquin, C. A.; Slayden, R. A.; Tonge, P. J. Synthesis and in Vitro Antimycobacterial Activity of B-Ring Modified Diaryl Ether InhA Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18* (10), 3029–3033. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.04.038>.

(109) Luckner, S. R.; Liu, N.; am Ende, C. W.; Tonge, P. J.; Kisker, C. A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *J Biol Chem* **2010**, *285* (19), 14330–14337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090373>.

(110) Pan, P.; Knudson, S. E.; Bommineni, G. R.; Li, H.-J.; Lai, C.-T.; Liu, N.; Garcia-Diaz, M.; Simmerling, C.; Patil, S. S.; Slayden, R. A.; Tonge, P. J. Time-Dependent Diaryl Ether Inhibitors of InhA: Structure–Activity Relationship Studies of Enzyme Inhibition, Antibacterial Activity, and in Vivo Efficacy. *ChemMedChem* **2014**, *9* (4), 776–791. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300429>.

(111) Spagnuolo, L. A.; Eltschkner, S.; Yu, W.; Daryae, F.; Davoodi, S.; Knudson, S. E.; Allen, E. K. H.; Merino, J.; Pschibul, A.; Moree, B.; Thivalapill, N.; Truglio, J. J.; Salafsky, J.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. Evaluating the Contribution of Transition-State Destabilization to Changes in the Residence Time of Triazole-Based InhA Inhibitors. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (9), 3417–3429. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b11148>.

(112) Armstrong, T.; Lamont, M.; Lanne, A.; Alderwick, L. J.; Thomas, N. R. Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis InhA: Design, Synthesis and Evaluation of New Di-Triclosan Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2020**, *28* (22), 115744. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115744>.

- (113) Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Röttger, S.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Towards a New Tuberculosis Drug: Pyridomycin – Nature’s Isoniazid. *EMBO Mol Med* **2012**, *4* (10), 1032–1042. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201689>.
- (114) Xia, Y.; Zhou, Y.; Carter, D. S.; McNeil, M. B.; Choi, W.; Halladay, J.; Berry, P. W.; Mao, W.; Hernandez, V.; O’Malley, T.; Korkegian, A.; Sunde, B.; Flint, L.; Woolhiser, L. K.; Scherman, M. S.; Gruppo, V.; Hastings, C.; Robertson, G. T.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J.; Tonge, P. J.; Lenaerts, A. J.; Parish, T.; Alley, M. Discovery of a Cofactor-Independent Inhibitor of Mycobacterium Tuberculosis InhA. *Life Sci Alliance* **2018**, *1* (3), e201800025. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800025>.
- (115) Chollet, A.; Mori, G.; Menendez, C.; Rodriguez, F.; Fabing, I.; Pasca, M. R.; Madacki, J.; Korduláková, J.; Constant, P.; Quéward, A.; Bernardes-Génisson, V.; Lherbet, C.; Baltas, M. Design, Synthesis and Evaluation of New GEQ Derivatives as Inhibitors of InhA Enzyme and Mycobacterium Tuberculosis Growth. *Eur J Med Chem* **2015**, *101*, 218–235. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.035>.
- (116) He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. R. Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *J Med Chem* **2006**, *49* (21), 6308–6323. <https://doi.org/10.1021/jm060715y>.
- (117) Shirude, P. S.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G.; Davies, G.; McMiken, H.; Hegde, N.; Ambady, A.; Venkatraman, J.; Panda, M.; Bandodkar, B.; Sambandamurthy, V. K.; Read, J. A. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8533–8542. <https://doi.org/10.1021/jm4012033>.
- (118) Alcaraz, M.; Roquet-Banères, F.; Leon-Icaza, S. A.; Abendroth, J.; Boudehen, Y.-M.; Cougoule, C.; Edwards, T. E.; Kremer, L. Efficacy and Mode of Action of a Direct Inhibitor of Mycobacterium Abscessus InhA. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8* (10), 2171–2186. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.2c00314>.
- (119) Clark, M. A.; Acharya, R. A.; Arico-Muendel, C. C.; Belyanskaya, S. L.; Benjamin, D. R.; Carlson, N. R.; Centrella, P. A.; Chiu, C. H.; Creaser, S. P.; Cuzzo, J. W.; Davie, C. P.; Ding, Y.; Franklin, G. J.; Franzen, K. D.; Gefter, M. L.; Hale, S. P.; Hansen, N. J. V.; Israel, D. I.; Jiang, J.; Kavarana, M. J.; Kelley, M. S.; Kollmann, C. S.; Li, F.; Lind, K.; Mataruse, S.; Medeiros, P. F.; Messer, J. A.; Myers, P.; O’Keefe, H.; Oliff, M. C.; Rise, C. E.; Satz, A. L.; Skinner, S. R.; Svendsen, J. L.; Tang, L.; van Vloten, K.; Wagner, R. W.; Yao, G.; Zhao, B.; Morgan, B. A. Design, Synthesis and Selection of DNA-Encoded Small-Molecule Libraries. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (9), 647–654. <https://doi.org/10.1038/nchembio.211>.
- (120) Girona-Martínez, A.; Donckele, E. J.; Samain, F.; Neri, D. DNA-Encoded Chemical Libraries: A Comprehensive Review with Successful Stories and Future Challenges. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (4), 1265–1279. <https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00118>.
- (121) Dann, A. B.; Hontela, A. Triclosan: Environmental Exposure, Toxicity and Mechanisms of Action. *Journal of Applied Toxicology* **2011**, *31* (4), 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>.

- (122) McMurry, L. M.; Oethinger, M.; Levy, S. B. Triclosan Targets Lipid Synthesis. *Nature* **1998**, *394* (6693), 531–532. <https://doi.org/10.1038/28970>.
- (123) Boyne, M. E.; Sullivan, T. J.; amEnde, C. W.; Lu, H.; Gruppo, V.; Heaslip, D.; Amin, A. G.; Chatterjee, D.; Lenaerts, A.; Tonge, P. J.; Slayden, R. A. Targeting Fatty Acid Biosynthesis for the Development of Novel Chemotherapeutics against Mycobacterium Tuberculosis: Evaluation of A-Ring-Modified Diphenyl Ethers as High-Affinity InhA Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51* (10), 3562–3567. <https://doi.org/10.1128/AAC.00383-07>.
- (124) Tummino, P. J.; Copeland, R. A. Residence Time of Receptor–Ligand Complexes and Its Effect on Biological Function. *Biochemistry* **2008**, *47* (20), 5481–5492. <https://doi.org/10.1021/bi8002023>.
- (125) Lu, H.; Tonge, P. J. Drug-Target Residence Time: Critical Information for Lead Optimization. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14* (4), 467–474. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.176>.
- (126) Stec, J.; Vilchèze, C.; Lun, S.; Perryman, A. L.; Wang, X.; Freundlich, J. S.; Bishai, W.; Jacobs, W. R.; Kozikowski, A. P. Biological Evaluation of Potent Triclosan-Derived Inhibitors of the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase InhA in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Strains of Mycobacterium Tuberculosis. *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2528–2537. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402255>.
- (127) Hartkoorn, R. C.; Pojer, F.; Read, J. A.; Gingell, H.; Neres, J.; Horlacher, O. P.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Pyridomycin Bridges the NADH- and Substrate-Binding Pockets of the Enoyl Reductase InhA. *Nat Chem Biol* **2014**, *10* (2), 96–98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1405>.
- (128) Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The Isoniazid-NAD Adduct Is a Slow, Tight-Binding Inhibitor of InhA, the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Reductase: Adduct Affinity and Drug Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (24), 13881–13886. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235848100>.
- (129) Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty Years on: The Impact of Fragments on Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (9), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.109>.
- (130) Camberlein, V.; Fléau, C.; Sierocki, P.; Li, L.; Gealageas, R.; Bosc, D.; Guillaume, V.; Warenghem, S.; Leroux, F.; Rosell, M.; Cheng, K.; Medve, L.; Prigent, M.; Decanter, M.; Piveteau, C.; Biela, A.; Eveque, M.; Dumont, J.; Mpakali, A.; Giastas, P.; Herledan, A.; Couturier, C.; Haupenthal, J.; Lesire, L.; Hirsch, A. K. H.; Deprez, B.; Stratikos, E.; Bouvier, M.; Deprez-Poulain, R. Discovery of the First Selective Nanomolar Inhibitors of ERAP2 by Kinetic Target-Guided Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, *61* (39), e202203560. <https://doi.org/10.1002/anie.202203560>.
- (131) Huc, I.; Lehn, J. M. Virtual Combinatorial Libraries: Dynamic Generation of Molecular and Supramolecular Diversity by Self-Assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (6), 2106–2110. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2106>.
- (132) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol. *European Journal of Organic Chemistry* **2019**, *2019* (22), 3581–3590. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900327>.

- (133) Canal-Martín, A.; Pérez-Fernández, R. Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: An Efficient Strategy in Drug Design. *ACS Omega* **2020**, *5* (41), 26307–26315. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03800>.
- (134) Mondal, M.; Radeva, N.; Fanlo-Virgós, H.; Otto, S.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55* (32), 9422–9426. <https://doi.org/10.1002/anie.201603074>.
- (135) Scott, D. E.; Dawes, G. J.; Ando, M.; Abell, C.; Ciulli, A. A Fragment-Based Approach to Probing Adenosine Recognition Sites by Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *ChemBioChem* **2009**, *10* (17), 2772–2779. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900537>.
- (136) Saiz, C.; Castillo, V.; Fontán, P.; Bonilla, M.; Salinas, G.; Rodríguez-Haralambides, A.; Mahler, S. G. Discovering Echinococcus Granulosus Thioredoxin Glutathione Reductase Inhibitors through Site-Specific Dynamic Combinatorial Chemistry. *Mol Divers* **2014**, *18* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11030-013-9485-3>.
- (137) Frei, P.; Pang, L.; Silbermann, M.; Eriş, D.; Mühlethaler, T.; Schwardt, O.; Ernst, B. Target-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Study on Potentials and Pitfalls as Exemplified on a Bacterial Target. *Chemistry* **2017**, *23* (48), 11570–11577. <https://doi.org/10.1002/chem.201701601>.
- (138) Mondal, M.; Radeva, N.; Köster, H.; Park, A.; Potamitis, C.; Zervou, M.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. Structure-Based Design of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin by Exploiting Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53* (12), 3259–3263. <https://doi.org/10.1002/anie.201309682>.
- (139) Congreve, M. S.; Davis, D. J.; Devine, L.; Granata, C.; O'Reilly, M.; Wyatt, P. G.; Jhoti, H. Detection of Ligands from a Dynamic Combinatorial Library by X-Ray Crystallography. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (37), 4479–4482. <https://doi.org/10.1002/anie.200351951>.
- (140) Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. Nucleophilic Catalysis of Acylhydrazone Equilibration for Protein-Directed Dynamic Covalent Chemistry. *Nature Chem* **2010**, *2* (6), 490–497. <https://doi.org/10.1038/nchem.658>.
- (141) Cabezas, E.; Satterthwait, A. C. The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (16), 3862–3875. <https://doi.org/10.1021/ja983212t>.
- (142) Cousins, G. R. L.; Poulsen, S.-A.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Libraries of Pseudo-Peptide Hydrazone Macrocycles. *Chem. Commun.* **1999**, No. 16, 1575–1576. <https://doi.org/10.1039/A904091I>.
- (143) Crisalli, P.; Kool, E. T. Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation. *J Org Chem* **2013**, *78* (3), 1184–1189. <https://doi.org/10.1021/jo302746p>.
- (144) Eltschkner, S.; Kehrein, J.; Le, T. A.; Davoodi, S.; Merget, B.; Basak, S.; Weinrich, J. D.; Schiebel, J.; Tonge, P. J.; Engels, B.; Sottriffer, C.; Kisker, C. A Long Residence Time Enoyl-Reductase Inhibitor Explores an Extended Binding Region with Isoenzyme-Dependent

Tautomer Adaptation and Differential Substrate-Binding Loop Closure. *ACS Infect Dis* **2021**, *7* (4), 746–758. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00437>.

(145) Tamhaev, R.; Grosjean, E.; Ahamed, H.; Chebaiki, M.; Rodriguez, F.; Recchia, D.; Degiacomi, G.; Pasca, M. R.; Maveyraud, L.; Mourey, L.; Lherbet, C. Exploring the Plasticity of the InhA Substrate-Binding Site Using New Diaryl Ether Inhibitors. *Bioorganic Chemistry* **2023**, 107032. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.107032>.

(146) Tallarida, R. J. Drug Synergism: Its Detection and Applications. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *298* (3), 865–872.

(147) Tallarida, R. J. Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes Cancer* **2011**, *2* (11), 1003–1008. <https://doi.org/10.1177/1947601912440575>.

(148) Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From Magic Bullets to Designed Multiple Ligands. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (15), 641–651. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03163-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03163-0).

(149) Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-Tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. Steps toward Novel Drugs for Treating Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* **1996**, *271* (39), 23646–23649. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23646>.

(150) Shirbhate, E.; Singh, V.; Jahoriya, V.; Mishra, A.; Veerasamy, R.; Tiwari, A. K.; Rajak, H. Dual Inhibitors of HDAC and Other Epigenetic Regulators: A Novel Strategy for Cancer Treatment. *Eur J Med Chem* **2023**, *263*, 115938. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115938>.

(151) Stanković, T.; Dinić, J.; Podolski-Renić, A.; Musso, L.; Burić, S. S.; Dallavalle, S.; Pešić, M. Dual Inhibitors as a New Challenge for Cancer Multidrug Resistance Treatment. *Curr Med Chem* **2019**, *26* (33), 6074–6106. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180607094856>.

(152) Mishra, P.; Kumar, A.; Panda, G. Anti-Cholinesterase Hybrids as Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease (1998–2018). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27* (6), 895–930. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.01.025>.

(153) Li, Y.; Luo, X.; Guo, Q.; Nie, Y.; Wang, T.; Zhang, C.; Huang, Z.; Wang, X.; Liu, Y.; Chen, Y.; Zheng, J.; Yang, S.; Fan, Y.; Xiang, R. Discovery of N1-(4-((7-Cyclopentyl-6-(Dimethylcarbamoyl)-7 H-Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidin-2-Yl)Amino)Phenyl)-N8-Hydroxyoctanediamide as a Novel Inhibitor Targeting Cyclin-Dependent Kinase 4/9 (CDK4/9) and Histone Deacetylase1 (HDAC1) against Malignant Cancer. *J Med Chem* **2018**, *61* (7), 3166–3192. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00209>.

(154) Sherr, C. J.; Beach, D.; Shapiro, G. I. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discovery* **2016**, *6* (4), 353–367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>.

(155) Carew, J. S.; Giles, F. J.; Nawrocki, S. T. Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms of Cell Death and Promise in Combination Cancer Therapy. *Cancer Letters* **2008**, *269* (1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.037>.

(156) Lane, A. A.; Chabner, B. A. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *JCO* **2009**, *27* (32), 5459–5468. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.1291>.

- (157) Heijkants, R.; Willekens, K.; Schoonderwoerd, M.; Teunisse, A.; Nieveen, M.; Radaelli, E.; Hawinkels, L.; Marine, J.-C.; Jochemsen, A. Combined Inhibition of CDK and HDAC as a Promising Therapeutic Strategy for Both Cutaneous and Uveal Metastatic Melanoma. *Oncotarget* **2017**, *9* (5), 6174–6187. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23485>.
- (158) Huang, J.-M.; Sheard, M. A.; Ji, L.; Sposto, R.; Keshelava, N. Combination of Vorinostat and Flavopiridol Is Selectively Cytotoxic to Multidrug-Resistant Neuroblastoma Cell Lines with Mutant TP53. *Molecular Cancer Therapeutics* **2010**, *9* (12), 3289–3301. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0562>.
- (159) Bancet, A.; Raingeval, C.; Lomberget, T.; Le Borgne, M.; Guichou, J.-F.; Krimm, I. Fragment Linking Strategies for Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (20), 11420–11435. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00242>.
- (160) Sacco, E.; Covarrubias, A. S.; O'Hare, H. M.; Carroll, P.; Eynard, N.; Jones, T. A.; Parish, T.; Daffé, M.; Bäckbro, K.; Quémar, A. The Missing Piece of the Type II Fatty Acid Synthase System from Mycobacterium Tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (37), 14628–14633. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704132104>.
- (161) Brown, A. K.; Papaemmanouil, A.; Bhowruth, V.; Bhatt, A.; Dover, L. G.; Besra, G. S. Flavonoid Inhibitors as Novel Antimycobacterial Agents Targeting Rv0636, a Putative Dehydratase Enzyme Involved in Mycobacterium Tuberculosis Fatty Acid Synthase II. *Microbiology (Reading)* **2007**, *153* (Pt 10), 3314–3322. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009936-0>.
- (162) Phetsuksiri, B.; Baulard, A. R.; Cooper, A. M.; Minnikin, D. E.; Douglas, J. D.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43* (5), 1042–1051. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1042>.
- (163) Dover, L. G.; Alahari, A.; Gratraud, P.; Gomes, J. M.; Bhowruth, V.; Reynolds, R. C.; Besra, G. S.; Kremer, L. EthA, a Common Activator of Thiocarbamide-Containing Drugs Acting on Different Mycobacterial Targets. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51* (3), 1055–1063. <https://doi.org/10.1128/AAC.01063-06>.
- (164) Grzegorzewicz, A. E.; Eynard, N.; Quémar, A.; North, E. J.; Margolis, A.; Lindenberger, J. J.; Jones, V.; Korduláková, J.; Brennan, P. J.; Lee, R. E.; Ronning, D. R.; McNeil, M. R.; Jackson, M. Covalent Modification of the Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. *ACS Infect Dis* **2015**, *1* (2), 91–97. <https://doi.org/10.1021/id500032q>.
- (165) Nunn, P.; Kibuga, D.; Gathua, S.; Brindle, R.; Imalingat, A.; Wasunna, K.; Lucas, S.; Gilks, C.; Omwega, M.; Were, J. Cutaneous Hypersensitivity Reactions Due to Thiacetazone in HIV-1 Seropositive Patients Treated for Tuberculosis. *Lancet* **1991**, *337* (8742), 627–630. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92447-a](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92447-a).
- (166) Alahari, A.; Trivelli, X.; Guérardel, Y.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Sacchettini, J. C.; Reynolds, R. C.; Coxon, G. D.; Kremer, L. Thiacetazone, an Antitubercular Drug That Inhibits Cyclopropanation of Cell Wall Mycolic Acids in Mycobacteria. *PLoS One* **2007**, *2* (12), e1343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001343>.

- (167) Coxon, G. D.; Craig, D.; Corrales, R. M.; Vialla, E.; Gannoun-Zaki, L.; Kremer, L. Synthesis, Antitubercular Activity and Mechanism of Resistance of Highly Effective Thiacetazone Analogues. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e53162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053162>.
- (168) Chiarelli, L. R.; Mori, G.; Orena, B. S.; Esposito, M.; Lane, T.; de Jesus Lopes Ribeiro, A. L.; Degiacomi, G.; Zemanová, J.; Szádocka, S.; Huszár, S.; Palčeková, Z.; Manfredi, M.; Gosetti, F.; Lelièvre, J.; Ballell, L.; Kazakova, E.; Makarov, V.; Marengo, E.; Mikusova, K.; Cole, S. T.; Riccardi, G.; Ekins, S.; Pasca, M. R. A Multitarget Approach to Drug Discovery Inhibiting Mycobacterium Tuberculosis PyrG and PanK. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 3187. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21614-4>.
- (169) Menendez, C.; Rodriguez, F.; Ribeiro, A. L. de J. L.; Zara, F.; Frongia, C.; Lobjois, V.; Saffon, N.; Pasca, M. R.; Lherbet, C.; Baltas, M. Synthesis and Evaluation of α -Ketotriazoles and α,β -Diketotriazoles as Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis. *Eur J Med Chem* **2013**, *69*, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.042>.
- (170) Mori, G.; Chiarelli, L. R.; Esposito, M.; Makarov, V.; Bellinzoni, M.; Hartkoorn, R. C.; Degiacomi, G.; Boldrin, F.; Ekins, S.; de Jesus Lopes Ribeiro, A. L.; Marino, L. B.; Centárová, I.; Svetlíková, Z.; Blaško, J.; Kazakova, E.; Lepioshkin, A.; Barilone, N.; Zanoni, G.; Porta, A.; Fondi, M.; Fani, R.; Baulard, A. R.; Mikušová, K.; Alzari, P. M.; Manganelli, R.; de Carvalho, L. P. S.; Riccardi, G.; Cole, S. T.; Pasca, M. R. Thiophenecarboxamide Derivatives Activated by EthA Kill Mycobacterium Tuberculosis by Inhibiting the CTP Synthetase PyrG. *Chem Biol* **2015**, *22* (7), 917–927. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.016>.
- (171) Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in Medicinal Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 320–330. <https://doi.org/10.1039/B610213C>.
- (172) Barnes-Seeman, D.; Beck, J.; Springer, C. Fluorinated Compounds in Medicinal Chemistry: Recent Applications, Synthetic Advances and Matched-Pair Analyses. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14* (7), 855–864. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140202204242>.
- (173) Chandra, G.; Singh, D. V.; Mahato, G. K.; Patel, S. Fluorine-a Small Magic Bullet Atom in the Drug Development: Perspective to FDA Approved and COVID-19 Recommended Drugs. *Chem Zvesti* **2023**, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02804-5>.
- (174) Falkinham, J. O. Surrounded by Mycobacteria: Nontuberculous Mycobacteria in the Human Environment. *J Appl Microbiol* **2009**, *107* (2), 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x>.
- (175) MOORE, M.; FRERICHS, J. B. An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-like Lesions of the Gluteal Region; Report of a Case with a Study of the Organism, Mycobacterium Abscessus, n. Sp. *J Invest Dermatol* **1953**, *20* (2), 133–169. <https://doi.org/10.1038/jid.1953.18>.
- (176) Kusunoki, S.; Ezaki, T. Proposal of Mycobacterium Peregrinum Sp. Nov., Nom. Rev., and Elevation of Mycobacterium Chelonae Subsp. Abscessus (Kubica et al.) to Species Status: Mycobacterium Abscessus Comb. Nov. *Int J Syst Bacteriol* **1992**, *42* (2), 240–245. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-240>.

- (177) Adékambi, T.; Reynaud-Gaubert, M.; Greub, G.; Gevaudan, M.-J.; La Scola, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. Amoebal Coculture of “Mycobacterium Massiliense” Sp. Nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia. *J Clin Microbiol* **2004**, *42* (12), 5493–5501. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5493-5501.2004>.
- (178) Adékambi, T.; Berger, P.; Raoult, D.; Drancourt, M. rpoB Gene Sequence-Based Characterization of Emerging Non-Tuberculous Mycobacteria with Descriptions of Mycobacterium Bolletii Sp. Nov., Mycobacterium Phocaicum Sp. Nov. and Mycobacterium Aubagnense Sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2006**, *56* (Pt 1), 133–143. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63969-0>.
- (179) Tortoli, E.; Kohl, T. A.; Brown-Elliott, B. A.; Trovato, A.; Leão, S. C.; Garcia, M. J.; Vasireddy, S.; Turenne, C. Y.; Griffith, D. E.; Philley, J. V.; Baldan, R.; Campana, S.; Cariani, L.; Colombo, C.; Taccetti, G.; Teri, A.; Niemann, S.; Wallace, R. J.; Cirillo, D. M. Emended Description of Mycobacterium Abscessus, Mycobacterium Abscessus Subsp. Abscessus and Mycobacteriumabscessus Subsp. Bolletii and Designation of Mycobacteriumabscessus Subsp. Massiliense Comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2016**, *66* (11), 4471–4479. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001376>.
- (180) Minias, A.; Żukowska, L.; Lach, J.; Jagielski, T.; Strapagiel, D.; Kim, S.-Y.; Koh, W.-J.; Adam, H.; Bittner, R.; Truden, S.; Žolnir-Dovč, M.; Dziadek, J. Subspecies-Specific Sequence Detection for Differentiation of Mycobacterium Abscessus Complex. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 16415. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73607-x>.
- (181) Bryant, J. M.; Grogono, D. M.; Greaves, D.; Foweraker, J.; Roddick, I.; Inns, T.; Reacher, M.; Haworth, C. S.; Curran, M. D.; Harris, S. R.; Peacock, S. J.; Parkhill, J.; Floto, R. A. Whole-Genome Sequencing to Identify Transmission of Mycobacterium Abscessus between Patients with Cystic Fibrosis: A Retrospective Cohort Study. *Lancet* **2013**, *381* (9877), 1551–1560. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60632-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60632-7).
- (182) Roux, A.-L.; Catherinot, E.; Ripoll, F.; Soismier, N.; Macheras, E.; Ravilly, S.; Bellis, G.; Vibet, M.-A.; Le Roux, E.; Lemonnier, L.; Gutierrez, C.; Vincent, V.; Fauroux, B.; Rottman, M.; Guillemot, D.; Gaillard, J.-L.; Jean-Louis Herrmann for the OMA Group. Multicenter Study of Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis in France. *J Clin Microbiol* **2009**, *47* (12), 4124–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01257-09>.
- (183) Griffith, D. E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B. A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; Holland, S. M.; Horsburgh, R.; Huitt, G.; Iademarco, M. F.; Iseman, M.; Olivier, K.; Ruoss, S.; von Reyn, C. F.; Wallace, R. J.; Winthrop, K.; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**, *175* (4), 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>.
- (184) Lee, M.-R.; Sheng, W.-H.; Hung, C.-C.; Yu, C.-J.; Lee, L.-N.; Hsueh, P.-R. Mycobacterium Abscessus Complex Infections in Humans. *Emerging Infectious Diseases* **2015**, *21* (9), 1638. <https://doi.org/10.3201/2109.141634>.
- (185) Haworth, C. S.; Banks, J.; Capstick, T.; Fisher, A. J.; Gorsuch, T.; Laurenson, I. F.; Leitch, A.; Loebinger, M. R.; Milburn, H. J.; Nightingale, M.; Ormerod, P.; Shingadia, D.;

Smith, D.; Whitehead, N.; Wilson, R.; Floto, R. A. British Thoracic Society Guidelines for the Management of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease (NTM-PD). *Thorax* **2017**, *72* (Suppl 2), ii1–ii64. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210927>.

(186) Kwak, N.; Dalcolmo, M. P.; Daley, C. L.; Eather, G.; Gayoso, R.; Hasegawa, N.; Jhun, B. W.; Koh, W.-J.; Namkoong, H.; Park, J.; Thomson, R.; van Ingen, J.; Zweijpfenning, S. M. H.; Yim, J.-J. Mycobacterium Abscessus Pulmonary Disease: Individual Patient Data Meta-Analysis. *Eur Respir J* **2019**, *54* (1), 1801991. <https://doi.org/10.1183/13993003.01991-2018>.

(187) Lopeman, R. C.; Harrison, J.; Desai, M.; Cox, J. A. G. Mycobacterium Abscessus: Environmental Bacterium Turned Clinical Nightmare. *Microorganisms* **2019**, *7* (3), 90. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030090>.

(188) Tomaszefski, J. F.; Stern, R. C.; Demko, C. A.; Doershuk, C. F. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. An Autopsy Study. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**, *154* (2), 523–528. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.2.8756832>.

(189) Saxena, S.; Spaink, H. P.; Forn-Cuní, G. Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology (Basel)* **2021**, *10* (2), 96. <https://doi.org/10.3390/biology10020096>.

(190) Yajko, D. M.; Kirihara, J.; Sanders, C.; Nassos, P.; Hadley, W. K. Antimicrobial Synergism against Mycobacterium Avium Complex Strains Isolated from Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* **1988**, *32* (9), 1392–1395. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.9.1392>.

(191) Falkinham, J. O. Challenges of NTM Drug Development. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01613>.

(192) Mukherjee, D.; Wu, M.-L.; Teo, J. W. P.; Dick, T. Vancomycin and Clarithromycin Show Synergy against Mycobacterium Abscessus In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61* (12), e01298-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01298-17>.

(193) Cocorullo, M.; Bettoni, C.; Foadelli, S.; Stelitano, G. Moles of Molecules against Mycobacterium Abscessus: A Review of Current Research. *Future Pharmacology* **2023**, *3* (3), 637–663. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol3030041>.

(194) Christophe, T.; Jackson, M.; Jeon, H. K.; Fenistein, D.; Contreras-Dominguez, M.; Kim, J.; Genovesio, A.; Carralot, J.-P.; Ewann, F.; Kim, E. H.; Lee, S. Y.; Kang, S.; Seo, M. J.; Park, E. J.; Skovierová, H.; Pham, H.; Riccardi, G.; Nam, J. Y.; Marsollier, L.; Kempf, M.; Joly-Guillou, M.-L.; Oh, T.; Shin, W. K.; No, Z.; Nehrbass, U.; Brosch, R.; Cole, S. T.; Brodin, P. High Content Screening Identifies Decaprenyl-Phosphoribose 2' Epimerase as a Target for Intracellular Antimycobacterial Inhibitors. *PLoS Pathog* **2009**, *5* (10), e1000645. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000645>.

(195) Makarov, V.; Manina, G.; Mikusova, K.; Möllmann, U.; Ryabova, O.; Saint-Joanis, B.; Dhar, N.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; Lucarelli, A. P.; Milano, A.; De Rossi, E.; Belanova, M.; Bobovska, A.; Dianiskova, P.; Kordulakova, J.; Sala, C.; Fullam, E.; Schneider, P.; McKinney, J. D.; Brodin, P.; Christophe, T.; Waddell, S.; Butcher, P.; Albrethsen, J.; Rosenkrands, I.; Brosch, R.; Nandi, V.; Bharath, S.; Gaonkar, S.; Shandil, R. K.; Balasubramanian, V.; Balganesh, T.; Tyagi, S.; Grosset, J.; Riccardi, G.; Cole, S. T. Benzothiazinones Kill

Mycobacterium Tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* **2009**, *324* (5928), 801–804. <https://doi.org/10.1126/science.1171583>.

(196) Chikhale, R. V.; Barmade, M. A.; Murumkar, P. R.; Yadav, M. R. Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis. *J Med Chem* **2018**, *61* (19), 8563–8593. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00281>.

(197) Hariguchi, N.; Chen, X.; Hayashi, Y.; Kawano, Y.; Fujiwara, M.; Matsuba, M.; Shimizu, H.; Ohba, Y.; Nakamura, I.; Kitamoto, R.; Shinohara, T.; Uematsu, Y.; Ishikawa, S.; Itotani, M.; Haraguchi, Y.; Takemura, I.; Matsumoto, M. OPC-167832, a Novel Carbostyryl Derivative with Potent Antituberculosis Activity as a DprE1 Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **2020**, *64* (6), e02020-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02020-19>.

(198) Sarathy, J. P.; Zimmerman, M. D.; Gengenbacher, M.; Dartois, V.; Dick, T. Mycobacterium Tuberculosis DprE1 Inhibitor OPC-167832 Is Active against Mycobacterium Abscessus In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **2022**, *66* (12), e0123722. <https://doi.org/10.1128/aac.01237-22>.

(199) Varela, C.; Rittmann, D.; Singh, A.; Krumbach, K.; Bhatt, K.; Eggeling, L.; Besra, G. S.; Bhatt, A. MmpL Genes Are Associated with Mycolic Acid Metabolism in Mycobacteria and Corynebacteria. *Chemistry & Biology* **2012**, *19* (4), 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.03.006>.

(200) Grzegorzewicz, A. E.; Pham, H.; Gundi, V. A. K. B.; Scherman, M. S.; North, E. J.; Hess, T.; Jones, V.; Gruppo, V.; Born, S. E. M.; Korduláková, J.; Chavadi, S. S.; Morisseau, C.; Lenaerts, A. J.; Lee, R. E.; McNeil, M. R.; Jackson, M. Inhibition of Mycolic Acid Transport across the Mycobacterium Tuberculosis Plasma Membrane. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (4), 334–341. <https://doi.org/10.1038/nchembio.794>.

(201) Dupont, C.; Viljoen, A.; Dubar, F.; Blaise, M.; Bernut, A.; Pawlik, A.; Bouchier, C.; Brosch, R.; Guérardel, Y.; Lelièvre, J.; Ballell, L.; Herrmann, J.-L.; Biot, C.; Kremer, L. A New Piperidinol Derivative Targeting Mycolic Acid Transport in Mycobacterium Abscessus. *Molecular Microbiology* **2016**, *101* (3), 515–529. <https://doi.org/10.1111/mmi.13406>.

(202) Pandya, A. N.; Prathipati, P. K.; Hegde, P.; Li, W.; Graham, K. F.; Mandal, S.; Drescher, K. M.; Destache, C. J.; Ordway, D.; Jackson, M.; North, E. J. Indole-2-Carboxamides Are Active against Mycobacterium Abscessus in a Mouse Model of Acute Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2019**, *63* (3), e02245-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02245-18>.

(203) De Groot, M. A.; Jarvis, T. C.; Wong, C.; Graham, J.; Hoang, T.; Young, C. L.; Ribble, W.; Day, J.; Li, W.; Jackson, M.; Gonzalez-Juarrero, M.; Sun, X.; Ochsner, U. A. Optimization and Lead Selection of Benzothiazole Amide Analogs Toward a Novel Antimycobacterial Agent. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 2231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02231>.

(204) Chebaiki, M.; Delfourne, E.; Tamhaev, R.; Danoun, S.; Rodriguez, F.; Hoffmann, P.; Grosjean, E.; Goncalves, F.; Azéma-Despeyroux, J.; Pál, A.; Korduláková, J.; Preuilh, N.; Britton, S.; Constant, P.; Marrakchi, H.; Maveyraud, L.; Mourey, L.; Lherbet, C. Discovery of New Diaryl Ether Inhibitors against Mycobacterium Tuberculosis Targeting the Minor Portal of InhA. *Eur J Med Chem* **2023**, *259*, 115646. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115646>.

- (205) Chebaiki, M. Etude de Nouveaux Inhibiteurs de La Protéine InhA de Mycobacterium Tuberculosis Découverts Par Chimie Click in Situ, Université Toulouse 3, 2023.
- (206) Vonnrhein, C.; Flensburg, C.; Keller, P.; Sharff, A.; Smart, O.; Paciorek, W.; Womack, T.; Bricogne, G. Data Processing and Analysis with the autoPROC Toolbox. *Acta Cryst D* **2011**, *67* (4), 293–302. <https://doi.org/10.1107/S0907444911007773>.
- (207) Kabsch, W. XDS. *Acta Cryst D* **2010**, *66* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- (208) Agirre, J.; Atanasova, M.; Bagdonas, H.; Ballard, C. B.; Baslé, A.; Beilsten-Edmands, J.; Borges, R. J.; Brown, D. G.; Burgos-Mármol, J. J.; Berrisford, J. M.; Bond, P. S.; Caballero, I.; Catapano, L.; Chojnowski, G.; Cook, A. G.; Cowtan, K. D.; Croll, T. I.; Debreczeni, J. É.; Devenish, N. E.; Dodson, E. J.; Drevon, T. R.; Emsley, P.; Evans, G.; Evans, P. R.; Fando, M.; Foadi, J.; Fuentes-Montero, L.; Garman, E. F.; Gerstel, M.; Gildea, R. J.; Hatti, K.; Hekkelman, M. L.; Heuser, P.; Hoh, S. W.; Hough, M. A.; Jenkins, H. T.; Jiménez, E.; Joosten, R. P.; Keegan, R. M.; Keep, N.; Krissinel, E. B.; Kolenko, P.; Kovalevskiy, O.; Lamzin, V. S.; Lawson, D. M.; Lebedev, A. A.; Leslie, A. G. W.; Lohkamp, B.; Long, F.; Malý, M.; McCoy, A. J.; McNicholas, S. J.; Medina, A.; Millán, C.; Murray, J. W.; Murshudov, G. N.; Nicholls, R. A.; Noble, M. E. M.; Oeffner, R.; Pannu, N. S.; Parkhurst, J. M.; Pearce, N.; Pereira, J.; Perrakis, A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Rigden, D. J.; Rochira, W.; Sammito, M.; Sánchez Rodríguez, F.; Sheldrick, G. M.; Shelley, K. L.; Simkovic, F.; Simpkin, A. J.; Skubak, P.; Sobolev, E.; Steiner, R. A.; Stevenson, K.; Tews, I.; Thomas, J. M. H.; Thorn, A.; Valls, J. T.; Uski, V.; Usón, I.; Vagin, A.; Velankar, S.; Vollmar, M.; Walden, H.; Waterman, D.; Wilson, K. S.; Winn, M. D.; Winter, G.; Wojdyr, M.; Yamashita, K. The CCP4 Suite: Integrative Software for Macromolecular Crystallography. *Acta Cryst D* **2023**, *79* (6), 449–461. <https://doi.org/10.1107/S2059798323003595>.
- (209) Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vonnrhein C., Womack T.O. (2017). BUSTER Version X.Y.Z. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd., 2017.
- (210) Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J Appl Cryst* **1997**, *30* (6), 1022–1025. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>.
- (211) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, *53* (Pt 3), 240–255. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>.
- (212) Smart, O.S., Sharff A., Holstein, J., Womack, T.O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Vonnrhein, C. and Bricogne G. (2021) Grade2 Version 1.5.0. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- (213) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66* (Pt 4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- (214) Grzegorzewicz, A. E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S. E. M.; Belardinelli, J. M.; Vaquié, A.; Gundi, V. A. K. B.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H. R.; Brennan, P. J.; Quémard, A.; McNeil, M. R.; Jackson,

M. A Common Mechanism of Inhibition of the Mycobacterium Tuberculosis Mycolic Acid Biosynthetic Pathway by Isoxyl and Thiacetazone*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (46), 38434–38441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400994>.

(215) Verma, R.; Boshoff, H. I. M.; Arora, K.; Bairy, I.; Tiwari, M.; Bhat, V. G.; Shenoy, G. G. Synthesis, Antitubercular Evaluation, Molecular Docking and Molecular Dynamics Studies of 4,6-Disubstituted-2-Oxo-Dihydropyridine-3-Carbonitriles. *Journal of Molecular Structure* **2019**, *1197*, 117–133. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.035>.

(216) Hu, L.; Liu, Y.; Fang, X.; zheng, Y.; Liao, R.; Li, M.; Xie, Y. An Intermolecular Hydroarylation of Highly Deactivated Styrenes Catalyzed by Re₂O₇/HReO₄ in Hexafluoroisopropanol. *ACS Catalysis* **2022**, *12*, 5857–5863. <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c01223>.

(217) Jang, H. Y.; Park, H. J.; Damodar, K.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G. Dihydrostilbenes and Diarylpropanes: Synthesis and in Vitro Pharmacological Evaluation as Potent Nitric Oxide Production Inhibition Agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26* (22), 5438–5443. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.10.034>.

(218) Rečnik, L.-M.; J. Thatcher, R.; Mallah, S.; P. Butts, C.; L. Collingridge, G.; Molnár, E.; E. Jane, D.; L. Willis, C. Synthesis and Pharmacological Characterisation of Arctigenin Analogues as Antagonists of AMPA and Kainate Receptors. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2021**, *19* (42), 9154–9162. <https://doi.org/10.1039/D1OB01653A>.

(219) Fotsch, C.; Sonnenberg, J. D.; Chen, N.; Hale, C.; Karbon, W.; Norman, M. H. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Trisubstituted Phenyl Urea Derivatives as Neuropeptide Y5 Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (14), 2344–2356. <https://doi.org/10.1021/jm0004547>.

Conception, synthèse et caractérisation de dérivés diaryl éthers comme nouveaux inhibiteurs directs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mots-clés : tuberculose, InhA, inhibiteurs directs, chimie combinatoire, inhibiteurs duaux, cristallographie des protéines.

La tuberculose, bien que maladie très ancienne, est toujours une des causes majeures de mortalité due à un agent infectieux unique. En 2021, 10 millions de personnes ont contracté la maladie et 1.5 millions de décès étaient directement imputables à cette dernière. Malgré la disponibilité de toute une panoplie d'antibiotiques, peu d'entre eux s'avèrent efficaces contre l'agent pathogène responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. Cette inefficacité est principalement due au caractère imperméable de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne, composée majoritairement d'acides mycoliques. L'isoniazide, l'antituberculeux de première ligne le plus utilisé, cible la biosynthèse de ces acides mycoliques *via* la protéine InhA. L'isoniazide agit comme une pro-drogue nécessitant une activation par la protéine KatG. Cependant, l'émergence de résistances lors de l'étape d'activation de l'isoniazide implique la nécessité de développer des inhibiteurs directs d'InhA.

Les travaux réalisés durant cette thèse avaient pour objectif de développer de nouveaux inhibiteurs directs d'InhA. Ces derniers ont été développés autour de la structure d'un motif diaryl éther, connu pour sa capacité à inhiber l'enzyme. La chimie combinatoire dynamique combinée à la cristallographie aux rayons X a été utilisée comme méthode de criblage de fragments pour découvrir de nouveaux inhibiteurs. Trois adduits, visualisés directement à l'intérieur du site actif de la protéine, ont ainsi été caractérisés et montrent des interactions avec le portail majeur de la protéine. Dans un autre projet, une nouvelle famille de diaryl éthers comportant trois pharmacophores a été conçue afin d'occuper entièrement le site de liaison du substrat. Une des molécules synthétisées possède une activité inhibitrice inférieure au micromolaire contre InhA. La structure du complexe correspondant a été résolue par cristallographie aux rayons X, mettant en évidence une ouverture inédite d'une des régions de la protéine, appelée portail mineur. Enfin, des approches multi-cibles, ciblant à la fois InhA et le complexe déshydratase HadABC du système FAS-II, ont également été développées durant cette thèse. Plusieurs molécules duales ont été produites et montrent une inhibition de l'activité d'InhA de l'ordre du nanomolaire. Ces molécules montrent également une inhibition de la croissance de différentes souches mycobactériennes.

Design, synthesis and characterization of diaryl ether derivatives as new direct inhibitors of the InhA protein of *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: tuberculosis, InhA, direct inhibitors, combinatorial chemistry, dual inhibitors, protein crystallography.

Tuberculosis, despite being a very ancient disease, remains one of the major causes of mortality due to a single infectious agent. In 2021, 10 million people contracted the disease and 1.5 million deaths were directly attributable to it. Despite the availability of a variety of antibiotics, few of them prove effective against the pathogen responsible for tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*. This ineffectiveness is primarily due to the impermeable nature of the mycobacterial cell envelope, composed mainly of mycolic acids. Isoniazid, the most widely used first-line antitubercular drug, targets the biosynthesis of these mycolic acids through the protein InhA. Isoniazid acts as a pro-drug requiring activation by the protein KatG. However, the emergence of resistance during the activation stage of isoniazid necessitates the development of direct inhibitors of InhA. The work carried out during this thesis aimed to develop new direct inhibitors of InhA. These inhibitors were designed based on the structure of a diaryl ether motif, known for its ability to inhibit the enzyme. Dynamic combinatorial chemistry combined with X-ray crystallography was used as a fragment screening method to discover new inhibitors. Three adducts, visualized directly within the active site of the protein, were characterized and showed interactions with the major portal of the protein. In another project, a new family of diaryl ethers with three pharmacophores was designed to fully occupy the substrate binding site. One of the synthesized molecules exhibited sub-micromolar inhibitory activity against InhA. The structure of the corresponding complex was resolved by X-ray crystallography, highlighting a wider opening of one of the protein's regions, called the minor portal. Finally, multi-target approaches, targeting both InhA and the dehydratase complex HadABC of the FAS-II system, were also developed during this thesis. Several dual molecules were produced, showing inhibition of InhA activity in the nanomolar range. These molecules also demonstrated inhibition of the growth of different mycobacterial strains.