

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**Institut de Chimie de Strasbourg – UMR 7177**

**THÈSE** présentée par :

**Alizée ALLAMAND**

soutenue le : 13 décembre 2023

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Vers la synthèse de prodrogues multimodales ciblant les bactéries endotumorales : le double rôle de la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine**  
**M. LIÈVREMONT Didier**

Professeur, Université de Strasbourg  
Maître de conférences, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. DU MOULINET D'HARDEMARE Amaury**  
**Mme PRADO Soizic**

Maître de conférences, Université Grenoble-Alpes  
Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. SPECHT Alexandre**  
**M. ABELL Andrew**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg  
Professeur, University of Adelaide



## Remerciements

Tout d'abord, je remercie Madame la Professeure Soizic Prado, Monsieur le Maître de Conférences Amaury du Moulinet d'Hardemare, Monsieur le Directeur de Recherche Alexandre Specht et Monsieur le Professeur Andrew Abell d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur de juger ces travaux. *A special thanks goes to Pr. Andrew Abell for coming all the way from Australia and for taking part to the defense in person.* Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir financé mon contrat doctoral.

Je tiens à remercier chaleureusement la Professeure Catherine Grosdemange-Billiard et le Docteur Didier Lièvremont pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et encadrée depuis mon stage de M2 et jusqu'au bout de ces trois années de thèse, qui sont passées très vite mine de rien. Catherine, merci pour les fous rires dans ton bureau à chercher des cadeaux farfelus à offrir à Didier et pour m'avoir poussée à me dépasser jusqu'au bout. Merci aussi d'avoir été un soutien, dans les bons moments comme les moins bons. Didier, merci pour ton humour et ta légèreté en toute circonstance, pour les anecdotes (on se souviendra longtemps de ton service militaire et du colonel), pour tes imitations, toujours hilarantes, et tous les fous rires associés ! Et, bien entendu, merci d'avoir réalisé tous les tests biologiques de mes composés. Merci aussi pour l'approvisionnement régulier en biscuits (personnellement, j'aime bien certains des Gerblés de Didier) !

Je remercie également le Professeur émérite Michel Rohmer, sans qui cette thèse n'aurait pas lieu d'être s'il n'avait pas découvert la voie du MEP trente ans plus tôt. Merci de m'avoir partagé un peu de votre immense savoir, nos discussions sont toujours très intéressantes et enrichissantes. Merci aussi pour toutes les petites gourmandises que vous ramenez et pour vos photos d'orchidées qui sont juste sublimes.

Ensuite, je remercie mes collègues du 5<sup>e</sup> Nord de l'ILB, qui y ont travaillé durant ma thèse ou qui y travaillent encore (Elena, Valérie, Yannick, Chheng, Chanantida, Marie, Alexis et Guillaume), avec qui nous avons partagé des moments de convivialité (les galettes en janvier, la chasse aux œufs de Pâques dans les labos et un secret Santa) qui resteront de bons souvenirs. Un merci tout particulier à Jean-Pierre pour tes talents de pâtissier et pour nous avoir fait goûter à une galette des Rois, aux crêpes de la Chandeleur, aux beignets de mardi gras et même à une tarte tatin, le tout fait maison. Je tiens également à remercier Laurence et Marie-Claire pour les repas (presque) hebdomadaires partagés avec nous dans la salle de pause... ce fut un plaisir de vous avoir rencontré et d'avoir croisé votre chemin !

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Ludo et Katia, collègues et amis sans qui la seconde moitié de ma thèse n'aurait pas eu la même saveur. Ludo, merci pour les discussions au labo, d'avoir été disponible dès que j'avais une question et de m'avoir partagé tes

connaissances et ton savoir-faire en orga. J'ai beaucoup appris à tes côtés, et, grâce à toi, j'ai même pu avoir quelques résultats supplémentaires à présenter. Pour cela, je t'en suis très reconnaissante et te souhaite une bonne continuation ! Katia, merci d'avoir été là quand ça n'allait pas et d'avoir partagé mes réussites aussi ! Il va sans dire que tu vas me manquer, tout comme tes encouragements, tes « Allez Alizée, allez ! », bien que la petite musique restera dans ma tête encore longtemps, je pense ! Bon courage pour la fin de ta thèse, tout va bien se passer, je crois en toi !

J'exprime toute ma gratitude aux membres du service de RMN (Maurice, Bruno et Lionel), du service de masse (Stéphanie), du magasin de Chimie et du service informatique (Jean-Christian et Zacharie), mais aussi à la gestionnaire du CBMB (Paula Sager) pour leur disponibilité, leur bienveillance, leur efficacité et leur compétence.

Un grand merci également à tous les stagiaires qui sont passés par le CBMB durant ma thèse et qui ont, pour la plupart, permis de faire avancer ce projet. Je vais essayer de n'oublier personne et je pense notamment à Thomas, Cédric, Fabio, Thibaut, Teresa, Manon, Jules, Léa, Léa, Mobina, Fatiha, Guillaume, Paula, Camille, Jordan et Marie.

Je tiens à remercier mes amies pour leur soutien indéfectible. Merci à la team Fermat (Alice, Myriam – dite Mimi, Océane et Noémie) pour les appels visio réconfortants à 5 (un jour, on arrivera à les rendre mensuels !) et d'être toujours présentes dans ma vie. Merci aussi à la team ECPM (Mathilde, Auriane, Irène, Laurianne et Lucie). Grâce à vous, ces trois années d'école ont été des plus agréables, que ce soit pour les révisions... ou les soirées ! Je remercie tout particulièrement Tessa et Anaïs qui sont, elles aussi, restées à Strasbourg pour cette folle aventure qu'est la thèse. Nos soirées resto vont me manquer ! En tout cas, vous m'avez donné la force de continuer et d'aller au bout de ces trois ans, alors merci !

Je remercie aussi Laurianne, rencontrée à un des BBQ annuels du labo et avec qui je me suis entendue tout de suite. Merci pour cette nouvelle amitié !

J'aimerais également adresser un remerciement un peu particulier à mon professeur de Physique-Chimie de Seconde, Monsieur Da Silva, qui a su me transmettre une passion pour sa matière. Merci, car, sans vous, je ne serai certainement pas arrivée là où j'en suis aujourd'hui.

Enfin, mille mercis à ma famille, et particulièrement mes parents et mon frère sur qui je peux compter et qui me soutiennent quoi qu'il arrive. Ce sont sûrement eux les plus fiers dans l'histoire et je suis heureuse de les avoir à mes côtés. Je vous aime.

Pour finir, je remercie celui qui est entré dans ma vie en prépa et n'en est pas ressorti depuis, mon meilleur ami, mon confident et mon amour : Axel. Merci pour ton soutien, ta bienveillance, ta compréhension. Merci d'être resté à mes côtés, de m'avoir épaulée et réconfortée quand la chimie avait décidé de ne plus fonctionner. Merci d'être là tout simplement.

## Liste des abréviations

- AACT : acétyl-CoA thiolase
- ACN : acétonitrile
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADP : adénosine diphosphate
- AMBPP : (*E*)-4-amino-2-méthylbut-2-én-1-yl diphosphate
- ATP : adénosine triphosphate
- Boc : *tert*-butoxycarbone
- CCM : chromatographie sur couche mince
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- d4T : 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxythymidine
- DCC : dicyclohexyle carbodiimide
- DCM : dichlorométhane
- D-G3P : D-glycéraldéhyde 3-phosphate
- DIAD : diisopropyle azodicarboxylate
- DIBAL-H : hydrure de diisobutylaluminium
- DIPEA : diisopropylamine
- DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine
- DMAPP : diphosphate de diméthylallyle
- DMB : 2,4-diméthoxybenzyle
- DMF : *N,N*-diméthylformamide
- DMP : Dess-Martin periodinane
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DTE : dithioéthanol
- DX : désoxyxylulose
- DXP : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
- DXR : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase
- DXS : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase

EC<sub>50</sub> : concentration efficace médiane

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EP (ou PE) : éther de pétrole (ou *petroleum ether* en anglais)

eq : équivalent(s)

ESI-MS : spectrométrie de masse à électrospray

FPP : diphosphate de farnésyle

GGPP : diphosphate de géranylgeranyle

GPP : diphosphate de géranyle

HBTU : *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate

HMBPP : (*E*)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl diphosphate

HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase

HMGS : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase

HOBt : hydroxybenzotriazole

HRMS : spectrométrie de masse haute résolution

IC<sub>50</sub> : concentration inhibitrice médiane

IDI : isopentényle diphosphate isomérase

IFN- $\gamma$  : interféron-  $\gamma$

IL-2 : interleukine-2

IPP : diphosphate d'isopentényle

IspD : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl transférase

IspE : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol kinase

IspF : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase

IspG : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate réductase

IspH : 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase

K<sub>i</sub> : constante d'inhibition

MDC : mévalonate 5-diphosphate décarboxylase

MEP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

MET : microenvironnement tumoral

MVA : mévalonate

MVK : mévalonate kinase  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NBS : *N*-bromosuccinimide  
NMM : *N*-méthylmorpholine  
NMO : *N*-oxyde de *N*-méthylmorpholine  
PAg : phosphoantigène  
PMEA : 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine ou adéfovir  
PMK : mévalonate 5-phosphate kinase  
PMPA : 9-(*R*)-(2-phosphonylméthoxypropyl)adénine ou ténofovir  
ppm : parties par millions  
PSA : acide *p*-aminosalicylique  
R<sub>F</sub> : rapport frontal  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RPE : résonance paramagnétique électronique  
SATE : *S*-acylthioéthanol  
t.a. : température ambiante (*r.t.* en anglais)  
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle  
TBHP : hydroperoxyde de *tert*-butyle  
TEA : triéthylamine  
TFA : acide trifluoroacétique  
THF : tétrahydrofurane  
TIPS : triisopropylsilyle  
TMBPP : (*E*)-4-thio-2-méthylbut-2-én-1-yl diphosphate  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$   
TPAP : perruthénate de tétrapropylammonium  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine



## TABLE DES MATIERES

|   |     |
|---|-----|
| <b>Remerciements</b> .....  | I   |
| <b>Liste des abréviations</b> .....   | III |
| <b>Introduction générale</b> .....  | 1   |
| I. Les tumeurs .....  | 3   |
| A. Généralités .....  | 3   |
| B. Microenvironnement tumoral .....   | 3   |
| C. Le rôle du microenvironnement tumoral dans les réponses aux thérapies anticancéreuses.....   | 5   |
| 1. Les différentes thérapies anticancéreuses .....  | 5   |
| 2. L'hypoxie et la résistance aux thérapies .....   | 7   |
| 3. Le rôle du microbiote intestinal et endotumoral dans la réponse aux thérapies.....           | 8   |
| II. La voie du MEP : cible thérapeutique pour le développement de nouveaux antibactériens ..... | 11  |
| A. Les isoprénoïdes : généralités .....   | 11  |
| B. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : voie du mévalonate <i>versus</i> voie du MEP.....         | 14  |
| 1. La voie du mévalonate (MVA).....   | 14  |
| 2. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) .....                                   | 15  |
| 3. Distribution des deux voies .....  | 17  |
| C. Étapes clés de la voie du MEP .....  | 18  |
| 1. Étape catalysée par la DXR/IspC : synthèse du MEP.....                                       | 18  |
| 2. Étape catalysée par IspH/LytB : synthèse de l'IPP et du DMAPP .....                          | 23  |
| III. La voie du MEP : source d'immunostimulants .....   | 28  |
| A. La stimulation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 .....                                 | 28  |
| B. Les phosphoantigènes naturels .....  | 30  |
| C. Les phosphoantigènes synthétiques .....  | 31  |
| 1. Les aminobisphosphonates .....   | 31  |
| 2. Les dérivés de l'IPP et du HMBPP .....   | 32  |
| IV. Les prodrogues .....  | 34  |
| A. Qu'est-ce qu'une prodrogue ?.....  | 34  |
| 1. Les prodrogues « transporteuses » ou <i>carrier prodrugs</i> .....                           | 35  |
| 2. Les bioprécurseurs.....  | 36  |
| B. Les prodrogues de phosphates et de phosphonates .....  | 36  |
| 1. Les esters de phosphates et de phosphonates .....  | 37  |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 2.   | Les amides de phosphates et de phosphonates .....  | 44  |
| 3.   | Les phosphoramidates et phosphonamidates.....  | 46  |
|      | Références .....   | 48  |
|      | <b>Objectifs du projet</b> .....   | 59  |
|      | <b>Chapitre 1 : Synthèse de prodrogues d'inhibiteurs phosphonates de la DXR et d'analogues monophosphates d'inhibiteurs d'IspH</b> .....                           | 65  |
|      | <b>Partie 1 : Prodrogues d'inhibiteurs phosphonate de la DXR</b> .....   | 67  |
| I.   | Introduction .....   | 67  |
| A.   | Les inhibiteurs de la DXR.....   | 67  |
| 1.   | Les inhibiteurs naturels .....   | 67  |
| 2.   | Les inhibiteurs synthétiques .....   | 69  |
| B.   | Amélioration de la biodisponibilité : les prodrogues d'inhibiteurs de la DXR.....  | 79  |
| C.   | Vers des inhibiteurs plus spécifiques : la stratégie bisubstrat .....  | 81  |
| II.  | Synthèse de prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR.....   | 84  |
| A.   | Stratégie de synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR .....  | 85  |
| B.   | Synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR .....   | 87  |
| 1.   | Synthèse des phosphonates intermédiaires <b>143a-d</b> .....   | 87  |
| 2.   | Synthèse des prodrogues finales <b>137a-d</b> .....  | 90  |
| III. | Evaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues protégées <b>148a-d</b> et des acides phosphoniques <b>145a-d</b> .....                                    | 93  |
| A.   | Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....  | 93  |
| B.   | Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....   | 97  |
| IV.  | Conclusion .....   | 98  |
|      | Références .....   | 100 |
|      | <b>Partie 2 : Prodrogues d'inhibiteurs phosphate de IspH/LytB</b> .....  | 105 |
| I.   | Introduction .....   | 105 |
| A.   | Les inhibiteurs d'IspH.....  | 105 |
| B.   | Les prodrogues de type <i>cycloSaligényle</i> ( <i>cycloSal</i> ).....   | 109 |
| 1.   | Le principe des prodrogues <i>cycloSal</i> .....   | 109 |
| 2.   | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> de nucléotide .....  | 110 |
| II.  | Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> d'analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH.....  | 111 |
| A.   | Préparation des saligénols fonctionnalisés et des <i>cycloSal</i> phosphochloridates pour la synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>180</b> à <b>183</b> ..... | 112 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 1.   | Préparation des saligénols fonctionnalisés .....   | 112 |
| 2.   | Préparation des <i>cycloSal</i> phosphochloridates <b>179a-d</b> .....   | 113 |
| B.   | Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> de l'AMBPP monophosphate (AMBP).....  | 113 |
| 1.   | Stratégie de synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> de l'AMBP .....   | 113 |
| 2.   | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> de l'AMBP .....  | 114 |
| C.   | Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> du TMBPP monophosphate (TMBP).....  | 120 |
| 1.   | Stratégie de synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> du TMBP.....  | 120 |
| 2.   | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> du TMBP .....  | 120 |
| D.   | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>182a-d</b> et <b>183a-d</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH..... | 123 |
| III. | Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>193a</b> , <b>182a-d</b> et <b>183a-c</b> .....                         | 124 |
| A.   | Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....  | 124 |
| B.   | Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....   | 127 |
| IV.  | Conclusion.....  | 128 |
|      | Références .....   | 131 |
|      | <b>Chapitre 2 : Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i>igényle d'un précurseur monophosphate de phosphoantigène</b> .....                           | 133 |
| I.   | Introduction .....   | 135 |
| II.  | Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> du HMBPP monophosphate (HMBP).....  | 139 |
| A.   | Synthèse de la prodrogue <i>cycloSal</i> <b>232a</b> du HMBP .....   | 141 |
| B.   | Synthèse de la double prodrogue <b>233a</b> du HMBP avec un <i>p</i> -nitrobenzyle .....   | 149 |
| III. | Conclusion.....  | 153 |
|      | Références .....   | 154 |
|      | <b>Chapitre 3 : Vers la synthèse de prodrogues multimodales</b> .....  | 157 |
| I.   | Introduction .....   | 159 |
| A.   | Les co-drogues ou <i>mutual prodrugs</i> : définition de la stratégie et avantages.....  | 159 |
| B.   | Exemples d'application des co-drogues.....   | 161 |
| C.   | Limites et inconvénients de la stratégie co-drogue.....  | 162 |
| II.  | La stratégie de prodrogue multimodale .....  | 163 |
| III. | Synthèse d'une prodrogue <i>cycloSal</i> fonctionnalisée par un acide aminé avec un inhibiteur de la DXR ou d'IspH.....                            | 164 |
| A.   | Stratégie de synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>261</b> , <b>262</b> et <b>263</b> .....   | 165 |
| 1.   | Rétrosynthèse de la prodrogue <b>261</b> de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR .   | 165 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 2.  | Rétrosynthèse des prodrogues <b>262</b> et <b>263</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH..... | 166 |
| B.  | Synthèse du <i>cycloSal</i> phosphochloridate <b>267</b> .....  | 166 |
| C.  | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>261</b> , <b>262</b> et <b>263</b> .....   | 167 |
| 1.  | Synthèse de la prodrogue <b>261</b> de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR.....  | 167 |
| 2.  | Synthèse des prodrogues <b>262</b> et <b>263</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH.....      | 168 |
| IV. | Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>271</b> et <b>262</b> .....                            | 169 |
| A.  | Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....                                       | 169 |
| B.  | Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....  | 170 |
| V.  | Conclusion.....   | 171 |
|     | Références .....  | 173 |
|     | <b>Conclusion générale et perspectives</b> .....  | 175 |
|     | <b>Experimental part</b> .....  | 181 |
| A.  | General methods .....   | 183 |
| B.  | General procedures .....  | 184 |
| C.  | Procedures.....   | 185 |
| D.  | Biological general procedures.....  | 221 |

## **INTRODUCTION GENERALE**

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | Les tumeurs .....   | 3  |
| A.   | Généralités .....   | 3  |
| B.   | Microenvironnement tumoral .....  | 3  |
| C.   | Le rôle du microenvironnement tumoral dans les réponses aux thérapies anticancéreuses.....  | 5  |
| 1.   | Les différentes thérapies anticancéreuses .....   | 5  |
| 2.   | L'hypoxie et la résistance aux thérapies .....  | 7  |
| 3.   | Le rôle du microbiote intestinal et endotumoral dans la réponse aux thérapies.....          | 8  |
| II.  | La voie du MEP : cible thérapeutique pour le développement de nouveaux antibactériens ..... | 11 |
| A.   | Les isoprénoïdes : généralités .....  | 11 |
| B.   | Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : voie du mévalonate <i>versus</i> voie du MEP.....        | 14 |
| 1.   | La voie du mévalonate (MVA).....  | 14 |
| 2.   | La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) .....                                  | 15 |
| 3.   | Distribution des deux voies .....   | 17 |
| C.   | Étapes clés de la voie du MEP .....   | 18 |
| 1.   | Étape catalysée par la DXR/IspC : synthèse du MEP.....                                      | 18 |
| 2.   | Étape catalysée par IspH/LytB : synthèse de l'IPP et du DMAPP .....                         | 23 |
| III. | La voie du MEP : source d'immunostimulants .....  | 28 |
| A.   | La stimulation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 .....                                | 28 |
| B.   | Les phosphoantigènes naturels .....   | 30 |
| C.   | Les phosphoantigènes synthétiques .....   | 31 |
| 1.   | Les aminobisphosphonates .....  | 31 |
| 2.   | Les dérivés de l'IPP et du HMBPP .....  | 32 |
| IV.  | Les prodrogues .....  | 34 |
| A.   | Qu'est-ce qu'une prodrogue ?.....   | 34 |
| 1.   | Les prodrogues « transporteuses » ou <i>carrier prodrugs</i> .....                          | 35 |
| 2.   | Les bioprécurseurs.....   | 36 |
| B.   | Les prodrogues de phosphates et de phosphonates .....                                       | 36 |
| 1.   | Les esters de phosphates et de phosphonates .....   | 37 |
| 2.   | Les amides de phosphates et de phosphonates .....   | 44 |
| 3.   | Les phosphoramidates et phosphonamidates.....   | 46 |
|      | Références .....  | 48 |

## **I. Les tumeurs**

### **A. Généralités**

Une tumeur est une grosseur plus ou moins volumineuse pouvant se développer dans n'importe quel organe ou tissu et est due à une multiplication excessive de cellules normales (tumeur bénigne) ou anormales (tumeur maligne). Dans le premier cas, les cellules de la tumeur ressemblent et fonctionnent de manière similaire à des cellules normales. Elles sont confinées au sein de leur tissu et ne sont pas invasives. Elles peuvent donc aisément être retirées par chirurgie avec peu de risque de rechute. En revanche, elles peuvent mettre la vie des patients en danger dès lors que leur volume empêche le fonctionnement normal des organes ou qu'elles sont à l'origine de symptômes importants. Dans certains cas, leur localisation peut également être problématique, comme pour les tumeurs situées dans le cerveau par exemple. Concernant les tumeurs malignes, aussi appelées tumeurs cancéreuses ou néoplasmes, sont capables d'envahir les tissus environnants jusqu'à atteindre le système sanguin. Dès lors, elles peuvent migrer vers des parties plus éloignées du corps et former de nouvelles tumeurs secondaires appelées métastases<sup>1,2</sup>.

Ainsi, selon l'OMS, le terme « cancer » désigne de manière générale une grande variété de tumeurs malignes. En 2016, les cancers sont la première ou deuxième cause de mortalité dans le monde dans les pays développés, devant les maladies cardiovasculaires, et restent une des principales causes de mortalité en 2020 avec environ 10 millions de décès. Le cancer des poumons est le plus répandu dans le monde, tous sexes confondus, suivi de près par le cancer colorectal. Le cancer du sein est le plus meurtrier chez les femmes, tandis que le deuxième cancer le plus fréquent chez les hommes est celui de la prostate<sup>3,4</sup>. Les cancers ont également un coût économique important : rien qu'en France, le diagnostic, le traitement et le suivi des patients atteints de cancers a coûté 6,3 milliards d'euros en 2021<sup>5</sup>.

Il existe deux types de tumeurs cancéreuses. La majorité des tumeurs chez l'adulte sont des tumeurs solides : ce sont des amas de cellules cancéreuses enracinés et localisés dans les tissus dont ces cellules sont issues. Les tumeurs liquides, quant à elles, circulent à travers tout l'organisme dans les fluides tels que le sang. C'est le cas des lymphomes et des leucémies par exemple<sup>1,2</sup>. Dans la suite, nous nous concentrerons uniquement sur les tumeurs solides.

### **B. Microenvironnement tumoral**

Les tumeurs ont longtemps été vues uniquement comme des agrégats de cellules dysfonctionnelles, mais sont désormais considérées comme des organes à part entière, bien que possédant une structure et un fonctionnement anormaux<sup>6</sup>. Ainsi, au sein d'une tumeur, les cellules cancéreuses côtoient et interagissent avec des cellules saines génétiquement stables. La composition de ce microenvironnement tumoral (MET) varie d'un type de tumeur à l'autre, mais possède des caractéristiques communes telles que la présence de fibroblastes associés au

cancer, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et d'une matrice extracellulaire<sup>1</sup> (Figure 1).

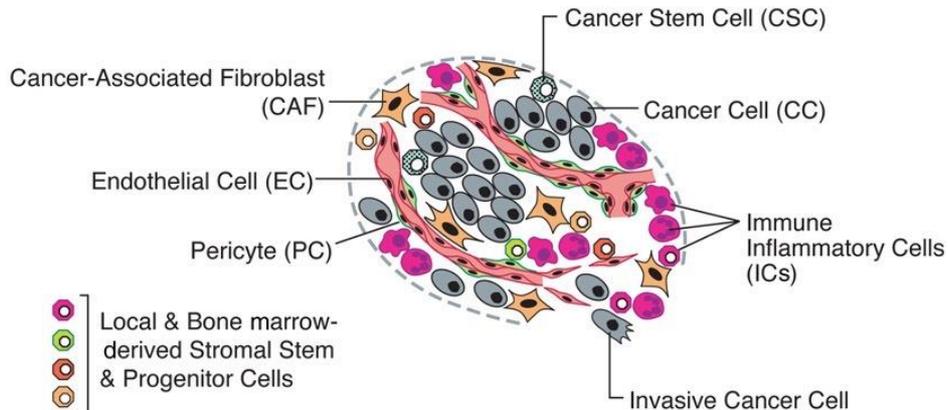


Figure 1. La plupart des tumeurs solides sont constituées d'un assemblage de divers types cellulaires qui permettent la croissance et la progression de la tumeur. En particulier, les cellules immunitaires inflammatoires présentes dans les tumeurs sont subdivisées en sous-catégories comprenant des cellules capables de favoriser la croissance tumorale et d'autres qui lysent les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg<sup>7</sup>).

Les différentes cellules saines recrutées par les cellules cancéreuses au sein du MET peuvent à la fois limiter la progression de la tumeur ou au contraire la favoriser. En effet, ces cellules sont reprogrammées au cours de la formation de la tumeur afin de maintenir ses fonctions biologiques et lui permettre de se développer<sup>8</sup>. Comprendre ce processus multi-étape pourrait permettre de lutter plus efficacement contre les cancers.

Ainsi, depuis 2000, Hanaban et Weinberg ont réussi à expliciter huit caractéristiques principales, ainsi que deux caractéristiques secondaires, qui pourraient être acquises par les cellules cancéreuses lors de leur formation et qui seraient communes à tous les types de cancers solides<sup>7,9</sup>. Entre autres, les cellules cancéreuses pourraient devenir autonomes et maintenir les signaux induisant la prolifération cellulaire, échappant ainsi aux mécanismes de régulation de cette prolifération. Elles seraient également capables de résister à l'apoptose, ce mécanisme mis en place par l'organisme pour programmer la mort cellulaire et empêcher le développement de cellules malignes. De ce fait, les cellules cancéreuses ne suivent pas le cycle cellulaire classique et paraissent immortelles, continuant de se diviser indéfiniment, ce qui conduit à la formation de la tumeur à l'échelle macroscopique. La croissance rapide de la tumeur induit un environnement particulier au sein du MET. En effet, l'accumulation de métabolites rend le pH de la matrice extracellulaire acide, tandis que le pH intracellulaire reste proche de celui des cellules saines<sup>10-12</sup>. Cette croissance rapide induit également un appauvrissement en dioxygène menant à un environnement hypoxique. Les cellules cancéreuses sont alors capables de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins jusqu'au MET afin d'évacuer les métabolites et de subvenir à leurs besoins en dioxygène. Dès lors, les cellules cancéreuses peuvent envahir les tissus voisins et une fois le système circulatoire atteint, former des

métastases. En outre, en conséquence de leur prolifération incontrôlée et continue, les cellules cancéreuses auraient la capacité de reprogrammer leur métabolisme énergétique. Enfin, elles seraient capables d'échapper à la surveillance par le système immunitaire<sup>1,7</sup>. Les cellules cancéreuses acquièrent ces fonctionnalités principales par le biais de caractéristiques secondaires telles que des altérations de leur génome et des mutations génétiques, mais également une inflammation due à la présence des cellules immunitaires au sein du MET qui favorisent paradoxalement la progression de la tumeur.

Récemment, des nouvelles caractéristiques principales et secondaires ont été proposées<sup>13</sup>. La différenciation cellulaire étant un frein à la prolifération des cellules cancéreuses, ces dernières auraient acquis une plasticité de leur phénotype afin de pouvoir reprogrammer leur différenciation. De plus, la présence de cellules en sénescence au sein du MET peut parfois empêcher la progression de la tumeur ou, au contraire, stimuler son développement. Si cette forme d'arrêt de la prolifération cellulaire est irréversible pour les cellules saines, les cellules cancéreuses pourraient entrer en sénescence pour résister aux stress induit par les thérapies qui visent les cellules à prolifération rapide et se « réveiller » par la suite pour continuer de se diviser. Enfin, l'influence positive ou négative du microbiote – intestinal ou endotumoral – sur la progression de la tumeur aurait été identifiée comme une des caractéristiques secondaires des cellules cancéreuses.

Ainsi, le MET joue un rôle essentiel dans la progression de la tumeur. Il est alors primordial de prendre en compte le jeu d'interactions complexes entre les cellules cancéreuses et le MET afin d'élaborer des thérapies plus efficaces et plus ciblées<sup>14</sup>.

## **C. Le rôle du microenvironnement tumoral dans les réponses aux thérapies anticancéreuses**

### **1. Les différentes thérapies anticancéreuses**

Actuellement, il existe plusieurs types de thérapies anticancéreuses. Suivant le type de cancer et le stade d'avancement de la maladie, une seule thérapie ou une combinaison des thérapies disponibles sera utilisée. Parmi les thérapies les plus utilisées, on retrouve notamment la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées<sup>1</sup>.

#### ***a) La chimiothérapie***

La chimiothérapie utilise des agents anticancéreux afin de ralentir ou inhiber la croissance des cellules cancéreuses, tels que des agents alkylants qui se lient à l'ADN et empêchent sa transcription et/ou sa réplication<sup>15</sup> ou des antimétabolites, des molécules structurellement proches de métabolites essentiels et capables de prendre leur place<sup>16</sup>. Les cellules dont l'ADN est endommagé sont alors poussées au suicide par l'organisme. Cependant, les effets secondaires de la chimiothérapie sont importants : outre les cellules cancéreuses, des cellules saines à croissance rapide, telles que les cellules à l'origine des cheveux par exemple, sont également touchées.

***b) La radiothérapie***

La radiothérapie consiste en l'exposition à de fortes doses de radiations telles que les rayons X afin d'endommager l'ADN des cellules cancéreuses. Des semaines, voire des mois de traitement sont nécessaires avant que l'ADN des cellules cancéreuses soit suffisamment endommagé pour stopper la division cellulaire. Toutefois, il se peut qu'elles continuent de mourir des semaines ou des mois après la fin du traitement. Parmi les types de radiation employées, on distingue les radiations externes, qui sont envoyés localement sur la peau, des radiations internes où un implant fait office de source de radiations localement au sein ou près de la tumeur. En revanche, une zone donnée du corps ne peut recevoir qu'une certaine quantité de radiation, ce qui limite l'utilisation de la radiothérapie en cas de rechute de la maladie. De plus, les cellules saines adjacentes sont également touchées et les effets secondaires varient suivant la zone traitée.

***c) L'immunothérapie***

Puisque les cellules cancéreuses échappent à la surveillance du système immunitaire, l'immunothérapie permet d'aider ce dernier à lutter contre la tumeur. Il existe plusieurs stratégies d'immunothérapie :

◆ Les inhibiteurs de *checkpoints* (points de contrôle) immunitaires, ou immunomodulateurs, permettent de « réactiver » les cellules du système immunitaire. En effet, les cellules cancéreuses inhibent leur propriété immunosuppressive en se liant, entre autres, aux cellules immunitaires par des récepteurs spécifiques. Ce processus leur permet d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Ainsi, les immunomodulateurs permettent de restaurer l'immunosurveillance de l'organisme en bloquant les récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses et les récepteurs associés à la surface des cellules du système immunitaire.

◆ Plusieurs immunothérapies se basent sur l'utilisation d'anticorps. Les anticorps monoclonaux ciblent un récepteur spécifique des cellules cancéreuses ou du MET et inhibent leur activité. Les anticorps bispécifiques, quant à eux, reconnaissent deux cibles en même temps et permettent le rapprochement d'une cellule cancéreuse et d'une cellule du système immunitaire capable de la détruire. Les anticorps conjugués sont des anticorps monoclonaux associés à une molécule cytotoxique, ce qui permet de cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses et de limiter les effets secondaires.

◆ La thérapie cellulaire consiste à prélever des cellules immunitaires du patient, les cultiver *in vitro* pour qu'elles expriment des récepteurs spécifiques capables de reconnaître un antigène tumoral, les multiplier et les réinjecter au patient en grande quantité. Malheureusement, cette méthode est peu efficace sur les tumeurs solides.

◆ Enfin, les vaccins thérapeutiques à visée curative ont pour objectif de stimuler le système immunitaire et le rediriger spécifiquement contre les cellules cancéreuses lors de la présentation à un antigène tumoral. Cette stratégie permet en théorie de construire une mémoire

immunitaire qui protège des rechutes. Cependant, les vaccins doivent être personnalisés et adaptés à chaque patient et nécessitent que le système immunitaire n'ait pas été inactivé par la tumeur. Une association est toutefois possible avec un immunomodulateur pour pallier ce dernier point. Actuellement, un seul vaccin est commercialisé contre le cancer de la prostate qui présente un antigène commun dans 95 % des cas.

#### ***d) Les thérapies ciblées***

Ce type de thérapies se concentre sur des protéines spécifiques du MET nécessaires au développement de la tumeur. Comme les anticorps monoclonaux ciblent des récepteurs spécifiques, ils peuvent également être considérés comme une thérapie ciblée. D'autres composés peuvent également cibler l'hypoxie ou l'angiogenèse. En revanche, les effets secondaires de ce type de thérapies sont incertains et dépendent de chaque individu.

Ainsi, malgré la diversité de traitements à disposition, les effets secondaires sont souvent importants et les résultats incertains. De plus, le MET influence grandement la réponse de la tumeur aux thérapies anticancéreuses, menant parfois à l'acquisition de résistance aux traitements, ce qui diminue encore leur efficacité<sup>17,18</sup>. Ces pourquoi nous nous intéresserons à deux paramètres du MET qui jouent un rôle important dans cette résistance : l'hypoxie et le microbiote intestinal et endotumoral.

## **2. L'hypoxie et la résistance aux thérapies**

L'influence de l'hypoxie sur le développement de la tumeur et sa réponse aux thérapies anticancéreuses a fait l'objet de plusieurs études<sup>19,20</sup>. Dans les tissus sains, le niveau de dioxygène, ou normoxie, varie suivant les organes entre 5 % environ dans le cerveau et 9 % environ dans les reins. L'hypoxie correspond à un niveau d'oxygène entre 1 et 2 %, voire inférieur, au sein des tissus<sup>17</sup>.

L'hypoxie dans les tumeurs est due à leur développement extrêmement rapide, menant à une demande en O<sub>2</sub> qui surpasse le dioxygène disponible dans le milieu (Figure 2). Au sein même d'une tumeur, le niveau de dioxygène varie suivant les régions et on distingue deux types d'hypoxie : l'hypoxie aiguë et l'hypoxie chronique. L'hypoxie aiguë correspond à une exposition brève à un environnement hypoxique due à l'augmentation rapide de la masse cellulaire induisant une forte demande en dioxygène. Les cellules cancéreuses s'adaptent alors au stress hypoxique et déclenchent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par angiogénèse, ce qui conduit à un système circulatoire chaotique et immature. Ce système sanguin permet un apport en O<sub>2</sub> et l'élimination des métabolites qui se sont accumulés dans le MET. Dès lors, les cellules cancéreuses reprennent leur prolifération excessive, induisant un nouveau déficit en dioxygène. Ces cycles successifs d'hypoxie aiguë et de réoxygénation renforcent la capacité d'adaptation des cellules cancéreuses au stress oxydatif et l'agressivité de la progression tumorale. L'hypoxie chronique, quant à elle, est une forme sévère qui se retrouve souvent au sein des tumeurs plus volumineuses où la prolifération cellulaire est telle

que la distance entre les diverses cellules du MET et les vaisseaux sanguins les plus proches ne permet plus l'apport en dioxygène<sup>21</sup>.

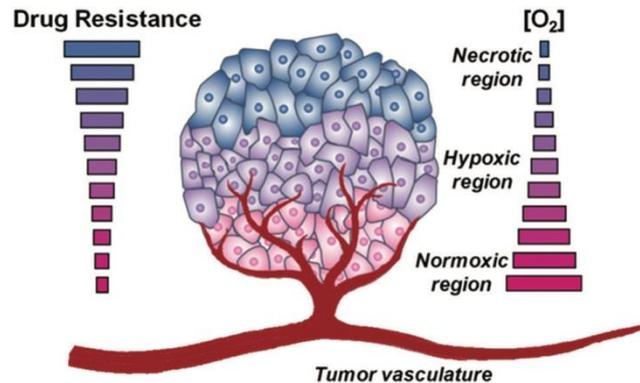


Figure 2. Hypoxie associée au micro-environnement tumoral (MET). Lorsque la prolifération cellulaire est trop importante, l'angiogenèse ne permet plus l'apport d'oxygène aux cellules cancéreuses et des régions hypoxiques se développent. Les tumeurs hypoxiques présentent une agressivité accrue, la formation de métastases et une plus grande résistance aux radiations et à la chimiothérapie (Sharma *et al*<sup>22</sup>)

Cette forme d'hypoxie chronique induit une adaptation du métabolisme des cellules cancéreuses qui peuvent alors résister à l'apoptose. Ainsi, les thérapies basées sur ce processus de mort cellulaire telles que la chimiothérapie et la radiothérapie deviennent inefficaces. De plus, l'hypoxie pourrait induire la quiescence des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait leur prolifération et les protégerait de toute forme de stress extérieur, notamment lors de la radiothérapie ou de l'administration de composés ciblant la division cellulaire<sup>19,20,23</sup>. Enfin, les radiothérapies nécessitent la présence de dioxygène pour exercer leur cytotoxicité par la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS), ce qui est fortement limité au sein de l'environnement hypoxique des tumeurs<sup>1</sup>.

L'hypoxie étant une caractéristique majeure des tumeurs solides, certaines stratégies thérapeutiques utilisent cette dernière afin de délivrer spécifiquement des composés dans le MET par l'intermédiaire de groupements pouvant se déprotéger par réduction *in vivo*. Ces composés peuvent être des inhibiteurs des mécanismes impliqués dans la survie des cellules en milieu hypoxique, par exemple<sup>22</sup>. Ces stratégies ciblées peuvent également être combinée avec d'autres thérapies et permettre l'atténuation de l'hypoxie et de l'acidité du MET afin d'améliorer l'efficacité des immunomodulateurs<sup>23-25</sup>.

### 3. Le rôle du microbiote intestinal et endotumoral dans la réponse aux thérapies

Certains tissus comme le sang ou la vessie ont longtemps été pensé stériles, mais de plus en plus d'études tendent à mettre en évidence la présence d'un microbiote au sein même de ces tissus<sup>26,27</sup>, probablement issu du tractus gastro-intestinal après une translocation<sup>28</sup>. En effet, la majorité du microbiote humain se situe dans le tube digestif et participe activement à différentes fonctions biologiques tel que le développement du système immunitaire, et joue un rôle majeur

dans la médiation de l'inflammation locale et systémique qui elle-même contribue au développement des tumeurs.

Plusieurs études suggèrent que la modulation du microbiote intestinal pourrait permettre d'influencer positivement la réponse des tumeurs aux thérapies anticancéreuses. En effet, chez des souris traitées aux antibiotiques ou dénuées de microbiote, une diminution de la cytotoxicité et une plus faible production de dérivés réactifs de l'oxygène sont observées après la chimiothérapie, indiquant que les cellules cancéreuses répondraient peu au traitement. En revanche, une réponse optimale à la chimiothérapie est obtenue avec une flore intestinale intacte<sup>29</sup>. En outre, l'action des immunomodulateurs pourrait être dépendante de la présence de *Bacteroides* comme *Bacteroides thetaiotaomicron* ou *Bacteroides fragilis*. En effet, des souris traitées aux antibiotiques ou dénuées de ces bactéries ne sont pas réceptives au traitement. En revanche, l'administration de *B. fragilis* a permis de restaurer la réponse aux immunomodulateurs<sup>30</sup>.

Par ailleurs, la présence d'un microbiote, et en particulier de bactéries, au sein même des tumeurs est de plus en plus documentée. Une majorité de protéobactéries dont *Escherichia*, *Salmonella* et *Acinetobacter* ont été détectées au sein de tumeurs prostatiques de patients issus de trois continents différents<sup>31</sup>, tandis que *Fusobacterium*, *Parvimonas* et *Streptococcus* ont été identifiées comme bactéries majoritaires dans les tumeurs des patients atteints d'un cancer colorectal<sup>32,33</sup>. Une étude de Nejman *et al* sur plus de 1500 tumeurs humaines, dont sept types de tumeurs différents, a permis de montrer qu'au sein du MET, les bactéries sont en majorité situées à dans le cytoplasme des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires. De plus, le microbiote endotumoral diffère d'un type de tumeur à l'autre et les tumeurs associées au cancer du sein possèdent le microbiote le plus riche et diversifié avec en moyenne 16 espèces de bactéries détectées au sein d'un même échantillon. Plus surprenant encore, certaines des bactéries désignées sous l'acronyme ESKAPE, et à l'origine de nombreuses infections nosocomiales, sont présentes au sein du MET et sont parfois identifiées dans plus de 30% des tumeurs étudiées pour un type donné (Figure 3). On retrouve notamment *Staphylococcus aureus* dans les mélanomes et tumeurs du sein avec une prévalence de 10 à 15 %, *Enterobacter asburiae* dans les tumeurs du sein (5 à 10 %) et dans plus de 30 % des tumeurs du pancréas, *Enterobacter cloacae* dans les glioblastomes multiformes, des tumeurs cérébrales de stade avancé, dans les tumeurs du sein et du pancréas, ainsi que *Klebsiella pneumoniae* identifiée dans plus de 30 % des tumeurs du pancréas et dans 5 à 10 % des tumeurs des poumons<sup>34</sup>.

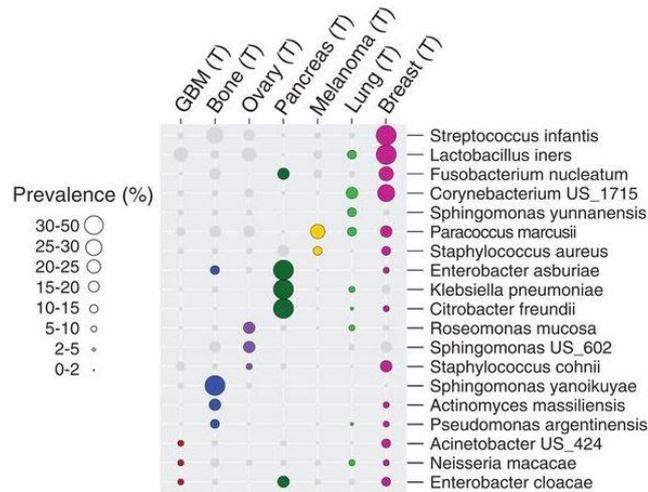


Figure 3. Prévalence de 19 bactéries dans différents types de tumeurs. Seules les bactéries présentes dans un type de tumeur donné sont représentées par des cercles de couleur. La taille des cercles indique le niveau de prévalence dans les échantillons. *US* : *unknown species* (Neijman *et al*<sup>34</sup>).

Le développement des tumeurs est parfois associé à une infection bactérienne, néanmoins, la plupart pourraient s'être installées dans les tumeurs après sa formation, par transfert depuis le tractus gastrointestinal. En effet, la faible quantité de O<sub>2</sub> au sein du MET fournirait un environnement unique, propice au développement de bactéries anaérobies, et la suppression de la réponse immunitaire au niveau des tumeurs pourrait permettre aux bactéries de pouvoir proliférer plus aisément<sup>35</sup>. Par ailleurs, ces bactéries endotumorales font partie intégrante du MET et jouent un rôle non négligeable dans la réponse des tumeurs aux thérapies anticancéreuses, qu'elle soit positive ou négative<sup>17</sup>.

En effet, la présence de *Pseudoxanthomonas*, *Streptomyces*, *Saccharopolyspora* et *Bacillus clausii* constituerait une signature bactérienne endotumorale associée à pronostic positif dans le cas du cancer du pancréas. De plus, le microbiote intestinal influencerait également l'évolution de ce type de cancer par modulation du microbiote endotumoral et de la réponse immunitaire<sup>36</sup>.

Cependant, les bactéries présentes au sein du MET peuvent aussi induire une résistance à la chimiothérapie. C'est notamment le cas de *Fusobacterium nucleatum* au sein des tumeurs colorectales. En effet, le rôle potentiel des *Fusobacterium* et du microbiote endotumoral dans la croissance des cellules cancéreuses a été mis en évidence par une étude chez des souris : l'administration d'un antibiotique a permis (i) de réduire la charge bactérienne de *Fusobacterium nucleatum* au sein de la tumeur, et (ii) de ralentir la prolifération des cellules cancéreuses<sup>37</sup>. De plus, *Fusobacterium nucleatum* favoriserait la chimiorésistance par l'activation d'un mécanisme d'autophagie chez les cellules cancéreuses. Ainsi, la présence des *Fusobacterium* au sein du MET est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints d'un cancer colorectal et un risque de rechute élevé<sup>38</sup>.

Certaines bactéries endotumorales sont également capables de métaboliser les agents anticancéreux. La présence de *Mycoplasma hyorhinis* au sein des tumeurs a été associée à une résistance à la gemcitabine, un anticancéreux administré dans le cadre des cancers du pancréas. En effet, *M. hyorhinis* et 13 autres espèces seraient capables de métaboliser la gemcitabine par action de la cytidine déaminase<sup>39-41</sup>. Une autre étude sur *E. coli* et *Listeria welshimeri* a également montré que ces deux bactéries permettent d'améliorer l'effet antitumoral pour six anticancéreux sur les trente testés, tandis qu'elles inhibent dix d'entre eux par l'action de mécanismes enzymatiques<sup>42</sup>.

Une approche thérapeutique possible afin de rendre leur efficacité aux anticancéreux serait d'inhiber la croissance et la prolifération de ces bactéries intracellulaires au sein du MET, tout en limitant au maximum l'apparition d'effets secondaires, déjà très importants lors des thérapies anticancéreuses. Cependant, l'environnement hypoxique du MET peut freiner le développement d'une telle approche en influençant la résistance des bactéries aux antibactériens. En effet, il a été montré chez *Pseudomonas aeruginosa* qu'un environnement hypoxique induirait des modifications de son métabolisme énergétique. La bactérie s'adapterait alors au stress oxydatif provoqué par l'hypoxie en modifiant la transcription de certaines protéines, notamment celles codant pour ses pompes à efflux, ce qui lui confère alors une multirésistance aux antibiotiques<sup>43</sup>.

La multirésistance aux antibactériens étant également un problème de santé mondial, touchant en particulier les bactéries ESKAPE également présentes au sein de certaines tumeurs, il est nécessaire et même urgent d'identifier de nouvelles cibles pour la conception de nouveau agent anti-infectieux. Ainsi, la voie du méthylérythritol phosphate pour la biosynthèse des isoprénoïdes, absente chez les humains, mais utilisée par la plupart des bactéries, apparaît comme une cible de choix pour la synthèse de nouveaux antibactériens ciblant les bactéries endotumorales.

## **II. La voie du MEP : cible thérapeutique pour le développement de nouveaux antibactériens**

### **A. Les isoprénoïdes : généralités**

Les isoprénoïdes représentent une famille de plus de 30 000 composés naturels présents chez tous les êtres vivants et possédant des propriétés physico-chimiques et biologiques diverses. Ces molécules sont soit des métabolites primaires essentiels, tels que les stérols pour la fluidité et la perméabilité des membranes ou les quinones dont les chaînes prényliques sont impliquées dans le transport d'électrons, soit des métabolites non essentiels, comme les mono- et diterpènes issus des huiles essentielles par exemple.

Malgré leur diversité structurale, les squelettes carbonés de tous les isoprénoïdes sont issus de la structure en C<sub>5</sub> du 2-méthyl-1,3-butadiène ou isoprène **1** (Figure 4). Wallach a été le

premier en 1887 à reconnaître l'existence du motif isoprénique et a proposé le concept de condensation « tête-à-queue » de ces unités en  $C_5$  pour former des composés en  $C_{5n}$  qui deviendra plus tard la « règle isoprénique »<sup>44,45</sup>. En 1953, l'idée est reprise par Ruzicka qui établit à son tour la « règle isoprénique biogénétique »<sup>46,47</sup>. Cette règle permet de déduire le nombre de condensations d'unités isopréniques nécessaires à la formation de n'importe quel squelette carboné d'isoprénoïdes, y compris pour les structures qui ne respectent pas la « règle isoprénique » de Wallach. Pour cela, Ruzicka s'appuie sur des considérations mécanistiques classiquement utilisées en chimie organique comme la formation d'isoprénoïdes acycliques par condensations successives d'unités en  $C_5$ , la formation de carbocations qui permettent la cyclisation de 1,5 polyènes ou encore les réarrangements de type Wagner-Meerwein.

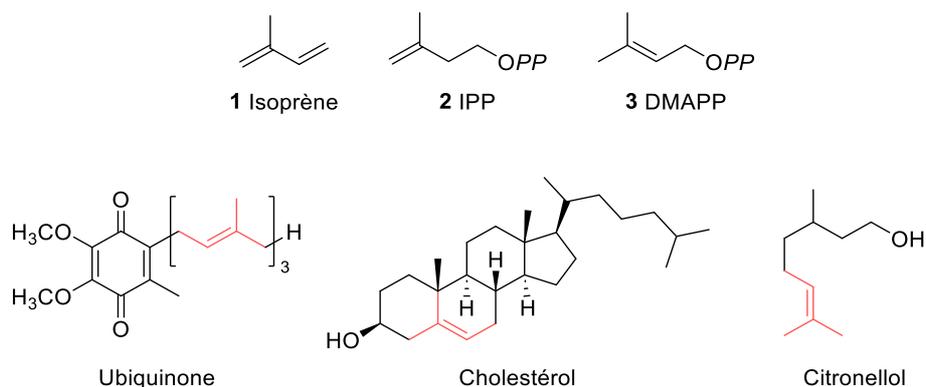


Figure 4. L'isoprène **1**, le diphosphate d'isopentényle (IPP) **2**, le diphosphate de diméthylallyle **3** et quelques exemples d'isoprénoïdes.

Les formes biologiques de l'isoprène sont le diphosphate d'isopentényle **2** (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle **3** (DMAPP) (Figure 4). Ce sont les deux précurseurs universels des isoprénoïdes chez tous les êtres vivants. Ainsi, la biosynthèse des isoprénoïdes est réalisée par assemblage de ces deux unités en  $C_5$  (Schéma 1). Elle démarre par une addition du type « tête-à-queue » de la double liaison terminale de l'IPP sur le carbone du DMAPP portant le diphosphate, bon groupe partant. Cette première étape conduit au diphosphate de géranyle **4** (GPP), précurseur des monoterpènes ( $C_{10}$ ) comme le citronellol et le limonène par exemple. L'ajout d'une molécule d'IPP au GPP **4** permet de former le diphosphate de farnésyle **5** (FPP) dont sont issus les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ) tel que le farnésol. Une nouvelle condensation « tête-à-queue » de l'IPP sur le FPP **5** permet d'obtenir le diphosphate de géranylgéranyle **6** (GGPP), précurseur des diterpènes ( $C_{20}$ ) et des caroténoïdes (tétraterpènes en  $C_{40}$ ). Enfin, des condensations successives avec l'IPP permettent l'obtention de diphosphates de polyprényles, précurseurs des polyprénols et des quinones.

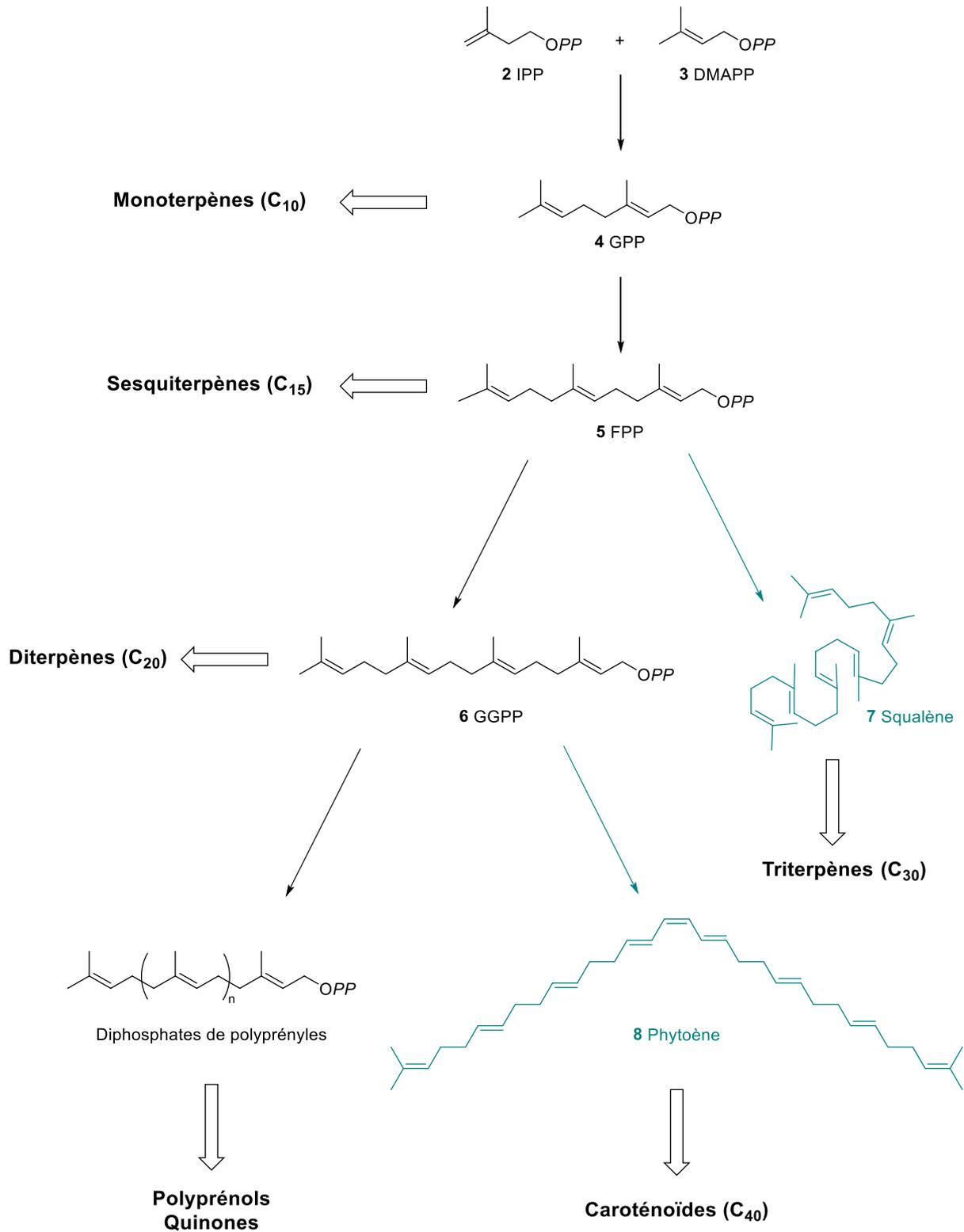


Schéma 1. Biosynthèse des isoprénoïdes. Deux types de condensations sont possibles : « tête-à-queue » (flèches noires) et « tête-à-tête » (flèches vertes). GPP : diphosphate de géranyle, FPP : diphosphate de farnésyle, GGPP : diphosphate de géranylgéranyle, PP : diphosphate.

Il existe également un autre type de condensation appelée « tête-à-tête ». Elle peut avoir lieu entre deux molécules de FPP **5** pour conduire au squalène **7** (Schéma 1), précurseur des triterpènes (C<sub>30</sub>) dont font partie les stérols et les hopanoïdes, mais également entre deux molécules de GGPP **6** pour former le phytoène **8**, précurseur des caroténoïdes.

Ces réactions d'élongation, catalysées par des prényltransférases<sup>48</sup>, permettent l'obtention de squelettes carbonés. Ces précurseurs acycliques sont alors engagés dans diverses réactions chimiques telles que des cyclisations, des oxydations et des réarrangements, pour accéder à la grande diversité de structures des isoprénoïdes.

## **B. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : voie du mévalonate *versus* voie du MEP**

L'IPP et le DMAPP sont biosynthétisés *via* deux voies distinctes. Découverte dans les années 50, la voie du mévalonate (MVA) a longtemps été considérée comme la voie de biosynthèse universelle pour ces deux précurseurs<sup>49</sup>. Toutefois, au début des années 90, une nouvelle voie de biosynthèse indépendante de la première est mise en évidence par l'équipe de Rohmer<sup>50</sup>. Il s'agit de la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).

### **1. La voie du mévalonate (MVA)**

Des études de la biosynthèse du cholestérol par incorporation d'acétate marqué au deutérium chez la souris ont permis de mettre en évidence l'existence de la voie du MVA et d'identifier l'acétate comme étant un de ses précurseurs<sup>51</sup>. Par la suite, de nombreux autres travaux ont permis d'élucider toutes les étapes de cette voie de biosynthèse<sup>49,52-57</sup>.

La voie du MVA débute par deux condensations successives du type Claisen à partir de trois molécules d'acétyl-CoA **9** conduisant au 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) **11** (Schéma 2). La réduction de ce dernier par la HMG-CoA réductase permet la formation de l'intermédiaire clé de cette synthèse : le mévalonate (ou acide mévalonique) (MVA). Deux phosphorylations successives, suivies d'une décarboxylation ATP-dépendante par la mévalonate 5-diphosphate décarboxylase, permettent finalement d'accéder à l'IPP **2**. Ce dernier est alors isomérisé en DMAPP **3** par l'isopentényl diphosphate isomérase (IDI).

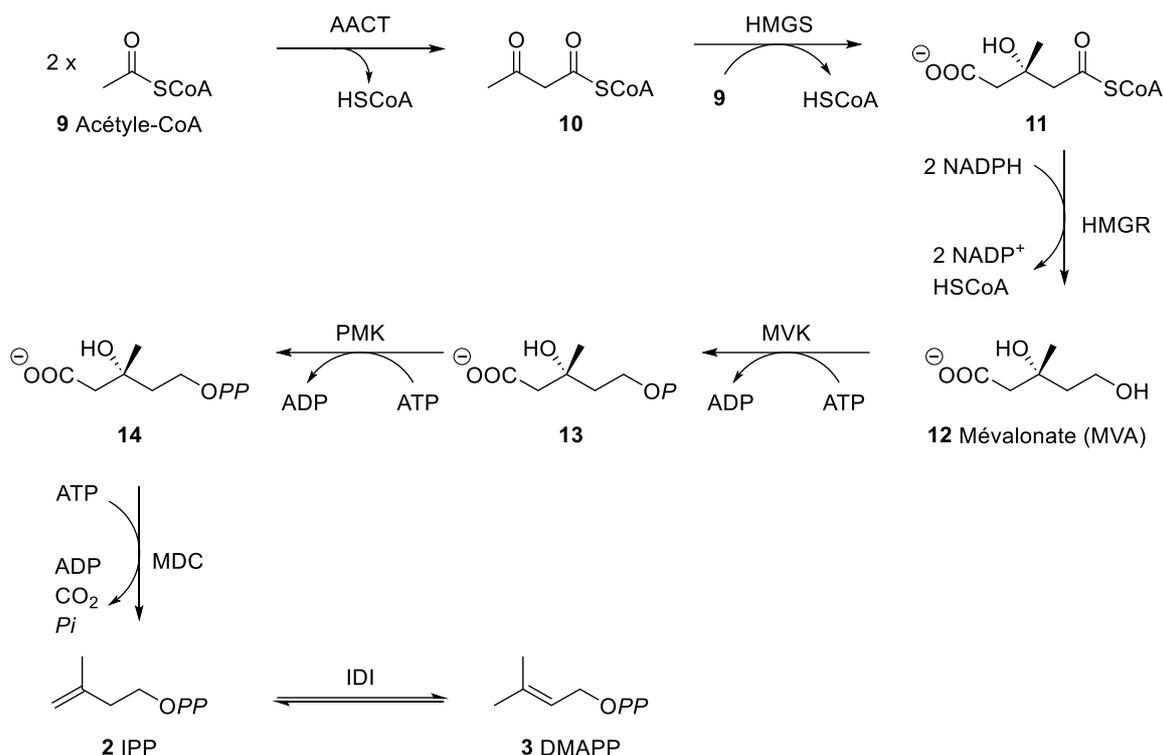


Schéma 2. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP suivant la voie du mévalonate. AACT : Acétyl-CoA thiolase, HMGS : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase, HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase, MVK : mévalonate kinase, PMK : mévalonate 5-phosphate kinase, MDC : mévalonate 5-diphosphate décarboxylase, IDI : isopentényle diphosphate isomérase. *P* : monophosphate, *PP* : diphosphate.

## 2. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

Lors d'expériences d'incorporation d'acétate et de MVA marqués au <sup>13</sup>C chez certaines plantes et bactéries, des résultats surprenants ont été obtenus. En effet, ces derniers ne correspondaient pas aux observations attendues pour la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MVA et l'existence d'une nouvelle voie de biosynthèse a été suggérée<sup>58-61</sup>. Ainsi, des expériences de marquage d'acétate et de glucose au <sup>13</sup>C chez des bactéries ont permis la mise en évidence de cette nouvelle voie de biosynthèse des isoprénoïdes<sup>62</sup>, mais également l'identification de ses deux précurseurs, le pyruvate et le D-glycéraldéhyde 3-phosphate (D-G3P) et l'élucidation de ses deux premières étapes<sup>50,63,64</sup>. En parallèle, des expériences d'incorporation de glucose marqué chez *Ginkgo biloba* ont montré la présence de cette voie du MEP chez les plantes supérieures<sup>65</sup>.

La première étape de la voie du MEP consiste en une condensation du pyruvate **15** sur le D-G3P **16** pour former le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **17**, métabolite aux rôles multiples qui est également impliqué dans la biosynthèse de cofacteurs essentiels comme le phosphate de pyridoxal (vitamine B6)<sup>66,67</sup> ou encore le diphosphate de thiamine (vitamine B1)<sup>68,69</sup> (Schéma 3). Le MEP **18**, intermédiaire clé de cette voie de biosynthèse, est obtenu par un réarrangement intramoléculaire du DXP catalysé par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR ou IspC). S'en suivent alors des étapes de modifications structurales

du MEP. La 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl transférase (IspD) permet la formation du 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) **19** et la 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol kinase (IspE) catalyse la phosphorylation de l'alcool tertiaire pour donner le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol (CDP-MEP) **20**. La 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF), quant à elle, catalyse la cyclisation intramoléculaire du CDP-MEP en un intermédiaire à 8 chaînons, le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MEcPP) **21**. Les deux dernières étapes sont des étapes de réduction catalysées par des enzymes utilisant un cluster [4Fe-4S]. La 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate réductase (IspG) réduit le MEcPP **21** en (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate (HMBPP) **22**, dernier intermédiaire de cette voie. Enfin, le HMBPP **22** est réduit à son tour par la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase (IspH ou LytB) soit en IPP **2**, soit en DMAPP **3**.

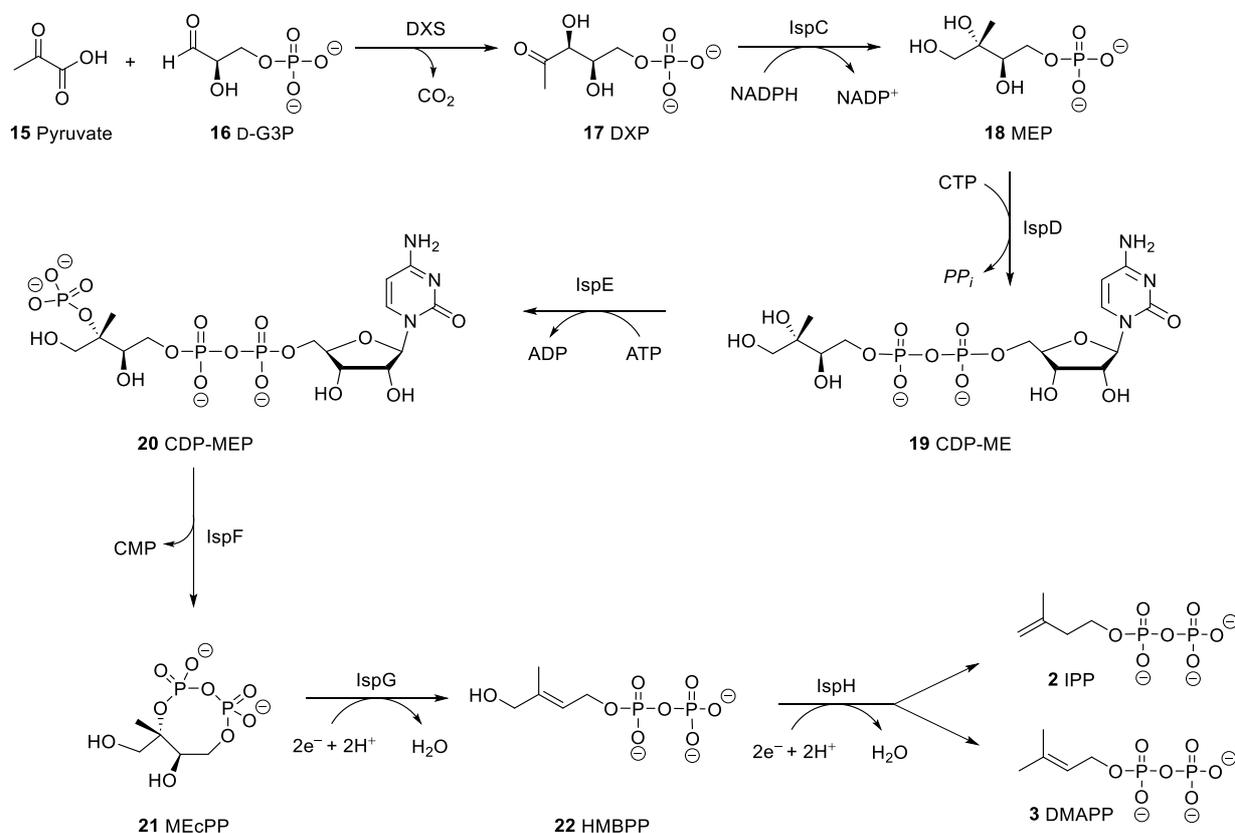


Schéma 3. Biosynthèse de l'IPP et du DMAPP suivant la voie du méthylérythritol phosphate. DXS : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXR/IspC : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase, IspD : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl transférase, IspE : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol kinase, IspF : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, IspG : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate réductase, IspH : 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase. D-G3P : D-glycéraldéhyde 3-phosphate, DXP : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate, MEP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate, CDP-ME : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol, CDP-MEP : 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol, MecPP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate, HMBPP : (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate.

### 3. Distribution des deux voies

Après la découverte de la voie du MEP, la distribution des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes chez les organismes vivants a fait l'objet de nombreuses études<sup>70-75</sup>. Les animaux, les champignons et les Archées produisent leurs motifs isopréniques uniquement *via* la voie du MVA<sup>64</sup>. D'autres organismes telles que les algues vertes unicellulaires ou les protozoaires comme *Plasmodium falciparum* utilisent exclusivement la voie du MEP<sup>64,76</sup>.

Les végétaux, quant à eux, possèdent les deux voies qui sont compartimentées. La voie du MVA est localisée dans le cytoplasme et permet la synthèse des triterpènes, des stérols et des motifs isopréniques de la chaîne latérale de l'ubiquinone, tandis que la voie du MEP opère dans les chloroplastes où sont synthétisés le phytol et les caroténoïdes<sup>77,78</sup>.

Concernant les bactéries, la plupart utilisent seulement la voie du MEP, dont de nombreux agents pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*<sup>70</sup> ou certaines ESKAPE telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *K. pneumoniae*<sup>79</sup>, tandis que certaines possèdent uniquement la voie du MVA, comme c'est le cas de *S. aureus*<sup>72</sup>. Toutefois, chez certaines bactéries, une coexistence des deux voies est observée<sup>80-82</sup>, mais elles n'opèrent pas simultanément. En effet, il a été montré que chez *Streptomyces* spp. la voie du MEP est utilisée en phase de croissance exponentielle pour synthétiser des métabolites primaires tels que les métaquinones, tandis que la voie du MVA permet d'accéder à des métabolites non essentiels, dont ceux possédant une activité antibiotique, lors de la phase stationnaire<sup>80</sup>.

Cette distribution complexe au sein des bactéries pourrait être expliquée par le métabolisme énergétique de ces deux voies. En effet, le bilan énergétique réalisé par Ershov montre qu'en utilisant la voie du MEP, les bactéries dépenseraient globalement moins d'énergie. Ce bilan est également en accord avec les ratios IPP/DMAPP produits par la voie du MEP (ratio 5/1) et du MVA (ratio 3/7) puisque pour la biosynthèse des isoprénoïdes, il est nécessaire d'avoir une molécule de DMAPP pour une ou plusieurs molécules d'IPP<sup>83</sup>. Ainsi, dans le cas de *Streptomyces* spp. où les deux voies coexistent, il ne serait pas étonnant que la voie du MEP, moins gourmande en énergie, soit favorisée en phase de croissance exponentielle et que la voie du MVA prenne le relais lors de la phase stationnaire.

De par cette distribution des deux voies, nous pouvons voir que la voie du MEP est présente chez de nombreux agents pathogènes, telle que *K. pneumoniae* que l'on retrouve également au sein du MET, mais est complètement absente chez les humains. De ce fait, les sept enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse constituent des cibles potentielles et attractives pour le développement de nouveaux antibactériens avec des effets secondaires minimes.

### C. Étapes clés de la voie du MEP

Nous nous limiterons ici à la description de deux étapes clés de la voie du MEP. Nous nous intéresserons d'abord à la formation du MEP, catalysée par la DXR, puis à la dernière étape de cette voie de biosynthèse, catalysée par IspH/LytB.

#### 1. Étape catalysée par la DXR/IspC : synthèse du MEP

La DXR (aussi appelée IspC) est la deuxième enzyme de la voie du MEP, codée par le gène *dxr*, aussi nommé *ispC* ou *yaeM*<sup>84</sup>. Elle catalyse la transformation du DXP **17** en MEP **18** via deux réactions concomitantes : un réarrangement intramoléculaire immédiatement suivi d'une réduction (Schéma 4). La présence d'un cation métallique divalent, tel que  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  suivant les espèces, et du réducteur biologique NADPH est nécessaire à l'enzyme<sup>85</sup>.

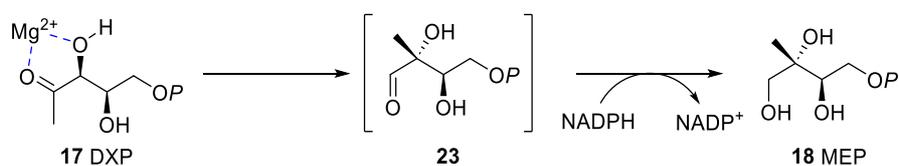


Schéma 4. Réaction de transformation du DXP **17** en MEP **18** catalysée par la DXR.

La première étape de réarrangement intramoléculaire du DXP conduit à un aldéhyde intermédiaire non isolable, le 2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **23**, qui est instantanément réduit en MEP par le NADPH<sup>85</sup> (Schéma 4). Deux mécanismes réactionnels ont été proposés pour la formation de l'aldéhyde intermédiaire. Le premier est un réarrangement du type  $\alpha$ -cétolique acido-catalysé avec rupture de la liaison entre les carbones C3 et C4 et formation d'une nouvelle liaison C2-C4 pour donner un carboxonium intermédiaire (Schéma 5, mécanisme 1). Le second est un réarrangement du type rétro-aldol/aldol où une déprotonation de l'hydroxyle en C4 induit la rupture de la liaison C3-C4 par une réaction de rétroaldolisation, ce qui conduirait à un énol et un aldéhyde. Puis, une réaction d'aldolisation permettrait de former la nouvelle liaison C-C entre les carbones C2 et C4 (Schéma 5, mécanisme 2)<sup>85</sup>.

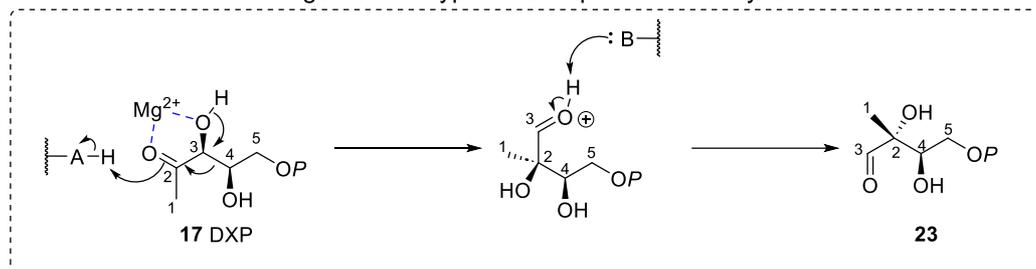
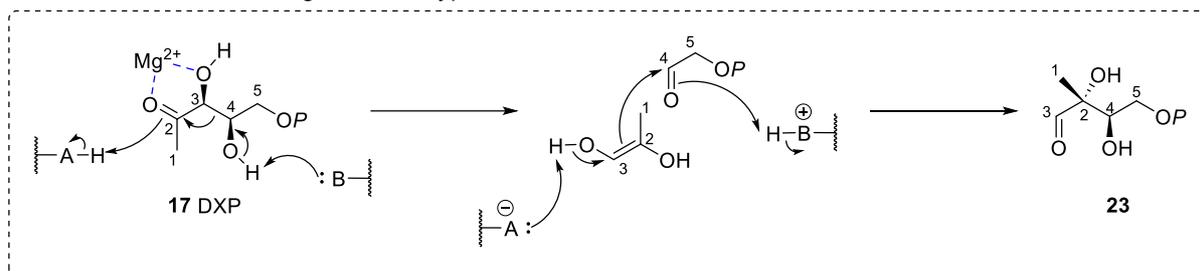
**Mécanisme 1 : réarrangement du type  $\alpha$ -cétolique acido-catalysé****Mécanisme 2 : réarrangement du type rétro-aldol/aldol**

Schéma 5. Mécanismes proposés pour le réarrangement intramolécule du DXP **17** en 2-C-méthyl-d-érythrose 4-phosphate **23**.

Afin d'élucider le mécanisme de ce réarrangement, Fox et Poulter ont synthétisé des analogues mono- **24**, di- **25** et trifluoré **26** du DXP en position C1. En effet, ils se sont basés sur le fait qu'un ou plusieurs atomes de fluor pourraient (i) déstabiliser le carboxonium intermédiaire formé dans le cas du mécanisme 1 et (ii) favoriser la formation de l'énol, donc la rupture de la liaison C-C, dans le cas du mécanisme 2 (Figure 5). Parmi ces trois composés préparés, seul l'analogue monofluoré **24** est substrat de l'enzyme et les composés **25** et **26** se sont révélés être de faibles inhibiteurs de la DXR. Une étude cinétique de l'incubation de la DXR en présence de ses cofacteurs avec le monofluoré **24**, d'une part, et le DXP d'autre part, a montré que le réarrangement intramolécule est légèrement plus rapide avec le composé **24** qu'avec le DXP, ce qui serait compatible avec un mécanisme du type rétro-aldol/aldol<sup>86,87</sup>.

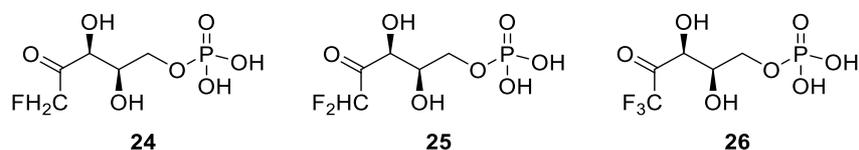


Figure 5. Analogues mono- **24**, di- **25** et trifluorés **26** du DXP.

Dans le but de confirmer qu'il s'agit d'un mécanisme rétro-aldol/aldol, les équipes de Cox et Liu ont mené une étude sur les effets cinétiques isotopiques secondaires du DXP marqué au deutérium en position C3 ou C4. En effet, les deux mécanismes proposés diffèrent en termes de liaisons rompues et formées, mais également de réhybridation des carbones, et l'étude des effets cinétiques isotopiques secondaires est un outil particulièrement utile pour analyser ce dernier paramètre. Pour un mécanisme du type  $\alpha$ -cétol, le carbone en position C3 passerait

d'une hybridation  $sp^3$  à  $sp^2$  alors que celui en position C4 garderait son caractère  $sp^3$  tout au long de la réaction. En revanche, pour un mécanisme du type rétro-aldol/aldol, les carbones en position C3 et C4 subiraient une réhybridation de  $sp^3$  vers  $sp^2$  pendant la rétroaldolisation, puis le carbone en C4 retrouverait son caractère  $sp^3$  après l'aldolisation. Les deux équipes ont ainsi obtenu des résultats en faveur d'un mécanisme du type rétro-aldol/aldol<sup>88,89</sup>.

Une preuve supplémentaire est apportée par l'étude de Wong et Cox qui a permis de mettre en évidence la formation du L-désoxyribulose 5-phosphate **27** en faible concentration après l'incubation du DXP et de l'apoenzyme, c'est-à-dire la DXR sans ses cofacteurs (cation métallique divalent et NADPH). La formation de ce diastéréoisomère du DXP ne peut s'expliquer que par un réarrangement du type rétro-aldol/aldol. En effet, en présence du cation métallique, l'aldéhyde formé après la rétroaldolisation est fixé dans le site actif par le cation et une rotation libre est impossible. Ainsi, seule la face *Si* peut être attaquée par l'énol. En l'absence du cation métallique, il peut y avoir une rotation de l'aldéhyde à  $180^\circ$  et la face *Re* peut à son tour être attaquée (Schéma 6). Malgré une isomérisation lente, la faible concentration de diastéréoisomère formé permet de confirmer un réarrangement du type rétro-aldol/aldol<sup>88</sup>.

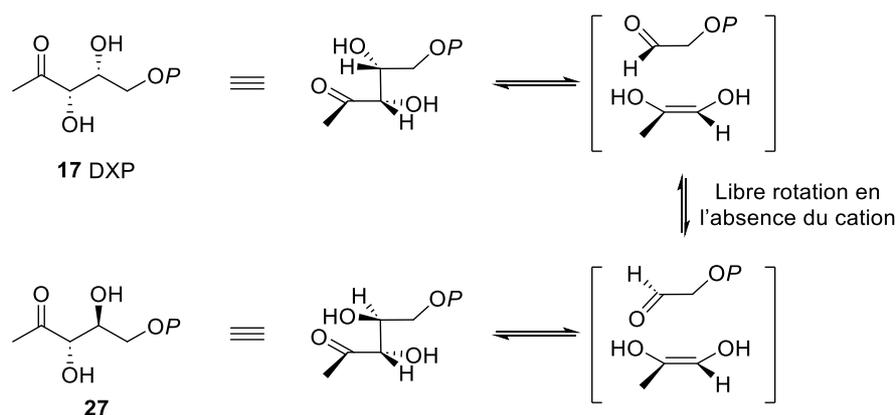
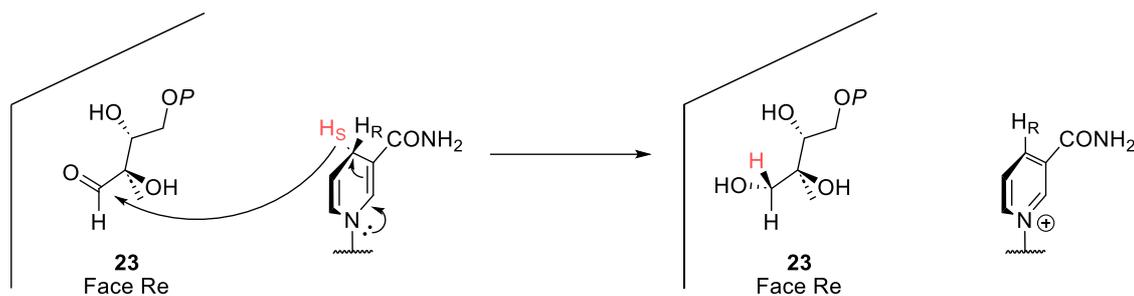


Schéma 6. Formation du diastéréoisomère **27** du DXP par libre rotation de l'aldéhyde dans le site actif en l'absence de cation métallique.

La formation de l'aldéhyde intermédiaire non isolable **23** est immédiatement suivie d'une réduction par le NADPH. Plusieurs groupes ont étudié la stéréochimie de cette réaction de réduction, notamment chez *Liriodendron tulipifera*, une plante supérieure<sup>90</sup>, chez *Synechocystis* sp. PCC6803<sup>91</sup> et chez *E. coli*<sup>92</sup>. Les résultats obtenus ont montré que le proton pro-*S* en C1 du MEP est issu du proton en C3 du DXP. L'attaque de l'hydrure du NADPH a donc eu lieu sur la face *Re* de l'aldéhyde (Schéma 7). De plus, c'est l'hydrure pro-*S* du NADPH qui est délivré, ce qui fait de la DXR une enzyme de la famille des déshydrogénases de classe B.

Schéma 7. Stéréochimie de la réduction de l'aldéhyde **23** en MEP.

La DXR est l'enzyme de la voie du MEP la plus étudiée avec pas moins de trente structures cristallographiques qui ont été décrites chez différents micro-organismes, notamment celles de *E. coli*<sup>93-96</sup>, *M. tuberculosis*<sup>97,98</sup> ou encore *Zymomonas mobilis*<sup>99</sup>. Toutes les DXR possèdent une structure homodimérique et se composent de deux sous-unités d'environ 40 kDa chacune en forme de « V » et surmontées d'une boucle flexible. Chaque monomère est constitué de trois domaines (Figure 6).

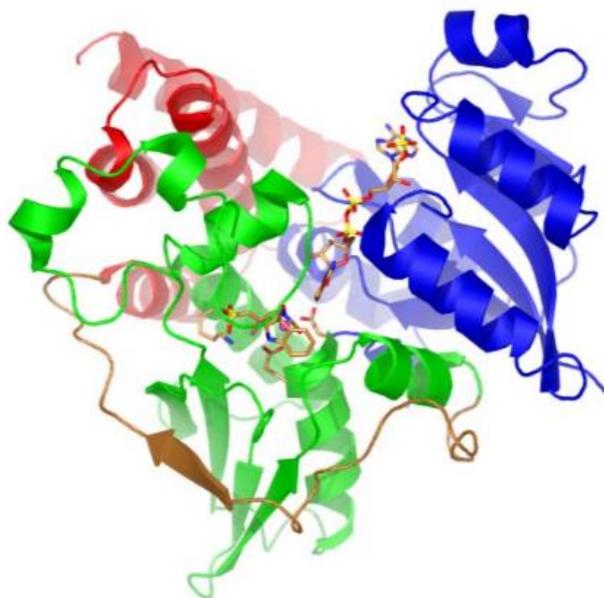


Figure 6. Représentation de la structure en « V » d'un monomère de la DXR de *M. tuberculosis* en présence du NADPH, du substrat ou d'un inhibiteur et d'un cation  $Mn^{2+}$ . Le domaine *N*-terminal est en bleu, le domaine *C*-terminal en rouge et le domaine catalytique en vert (Henriksson *et al*<sup>98</sup>).

Chez *E. coli* par exemple, le domaine *N*-terminal (domaine bleu) correspond aux résidus 1 à 149. Il compose un des « bras » du V et contient le site d'ancrage du NADPH. Le domaine *C*-terminal (domaine rouge), possède un rôle structural et soutient le domaine catalytique. Il forme le second « bras » et correspond aux résidus 312 à 398. Le domaine catalytique, en vert, s'étend des résidus 150 à 285 et permet la connexion entre les deux autres domaines ainsi que l'association des deux monomères pour former l'homodimère. Il contient le siège de la réaction

avec le site de fixation du cation métallique et celui du DXP. Ce domaine est également recouvert par la boucle flexible correspondant aux résidus 206 à 216, nécessaire à la réaction.

Lors de la réaction enzymatique, il y a d'abord fixation du NADPH au niveau du domaine *N*-terminal, puis le DXP s'ancre dans le domaine catalytique<sup>100</sup>. Le phosphate se place au niveau d'une poche chargée et les oxygènes portés par les carbones C2 et C3 se chélatent au cation métallique divalent. La boucle flexible qui recouvre le domaine catalytique joue un rôle essentiel en adoptant différentes conformations. Dans l'apoenzyme, la boucle est ouverte. Lorsque le substrat entre dans le site catalytique, des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes entre le DXP et certains résidus d'acides aminés de la boucle induisent sa fermeture. Ce mouvement resserre les cavités du domaine catalytique et rapproche le NADPH et le DXP afin de permettre la réaction de réduction.

Afin de pouvoir développer des inhibiteurs spécifiques de la DXR, une meilleure compréhension des interactions entre l'enzyme et le substrat est nécessaire. Ainsi, les études des structures cristallines de la DXR d'*E. coli* avec la fosmydomycine<sup>95</sup> et de la DXR de *M. tuberculosis* avec le FR-900098<sup>101</sup>, des phosphonohydroxamates et inhibiteurs naturels de l'enzyme (cf. Chapitre 1, I.), ont permis de caractériser le site catalytique de la DXR<sup>102</sup>. Ce dernier peut lui aussi être divisé en trois parties : une poche chargée positivement, une région amphipatique et une région hydrophobe (Figure 7).

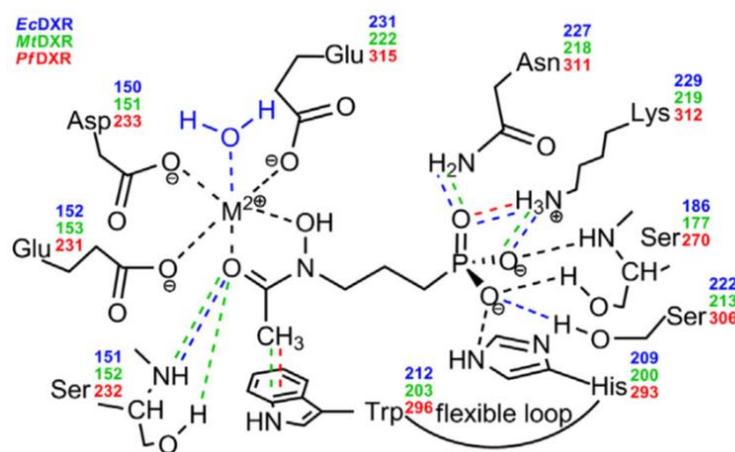


Figure 7. Interactions entre les résidus du site actif de la DXR et un de ses inhibiteurs, le FR-900098. Ces interactions sont similaires dans le cas du DXP. Les interactions et résidus conservés sont en noir, les interactions spécifiques sont en couleur pour *E. coli* (bleu), *M. tuberculosis* (vert) et *P. falciparum* (rouge) (Murkin *et al*<sup>102</sup>).

La poche positivement chargée permet la fixation du phosphate du DXP ou du phosphonate de la fosmidomycine par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes avec les résidus d'acides aminés hautement conservés d'une espèce à l'autre comme la Ser186, l'His209, la Ser222, l'Asn227 ou encore la Lys228 chez *E. coli*<sup>94,96</sup>. De plus, des études montrent que le désoxyxylulose (DX), analogue du DXP dépourvu de phosphate, n'est pas un substrat de

l'enzyme, soulignant l'importance de la présence du groupement 5-phosphate du substrat pour sa fixation au site actif<sup>103,104</sup>.

Dans la région amphipathique, le groupement (*N*-formyl-*N*-hydroxyl)amine de la fosmidomycine, ou de son analogue méthylé le FR-900098, se chélate au cation divalent, Mg<sup>2+</sup> chez *E. coli* et Mn<sup>2+</sup> chez *M. tuberculosis*<sup>102</sup>. Le cation est également lié à deux glutamates et une asparagine et la sphère octaédrique est complétée par une molécule d'eau chez *E. coli* (Figure 7).

La région hydrophobe, quant à elle, permet des interactions hydrophobes entre le squelette carboné du substrat, ou celui des inhibiteurs, avec des résidus d'acides aminés également très conservés tels que la Met214, la Met276 et le Trp212 pour *E. coli*<sup>94,96</sup>. C'est ce dernier résidu, le Trp212, qui permet la mise en mouvement de la boucle catalytique.

Ainsi, l'architecture du domaine catalytique est très similaire d'une espèce à l'autre<sup>102</sup> (Figure 7). Ce haut degré de conservation des résidus d'acides aminés permet d'envisager la conception d'antimicrobiens à large spectre.

## 2. Étape catalysée par IspH/LytB : synthèse de l'IPP et du DMAPP

La septième et dernière enzyme de la voie du MEP, IspH, est codée par le gène *lytB*, découvert en 1993<sup>105</sup> et caractérisé en 1997<sup>106</sup>. C'est en 2000 que l'étude de Cunningham *et al* fait le lien entre ce gène et la voie du MEP<sup>107</sup>. Peu de temps après, le HMBPP est identifié comme substrat de la protéine LytB associée. En effet, une accumulation de ce métabolite est observée chez des souches d'*E. coli* privées du gène *lytB*<sup>108</sup>. En parallèle, le rôle de l'enzyme au sein de la voie du MEP est également élucidé<sup>109,110</sup> : LytB, ou IspH, catalyse la septième et dernière étape de la voie du MEP qui permet la réduction du HMBPP en un mélange d'IPP et de DMAPP obtenus en proportions 6/1 environ<sup>111,112</sup> (Schéma 8).

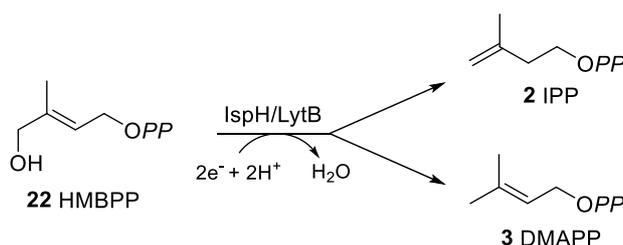


Schéma 8. Réduction du HMBPP 22 en IPP 2 et DMAPP 3 catalysée par IspH/LytB.

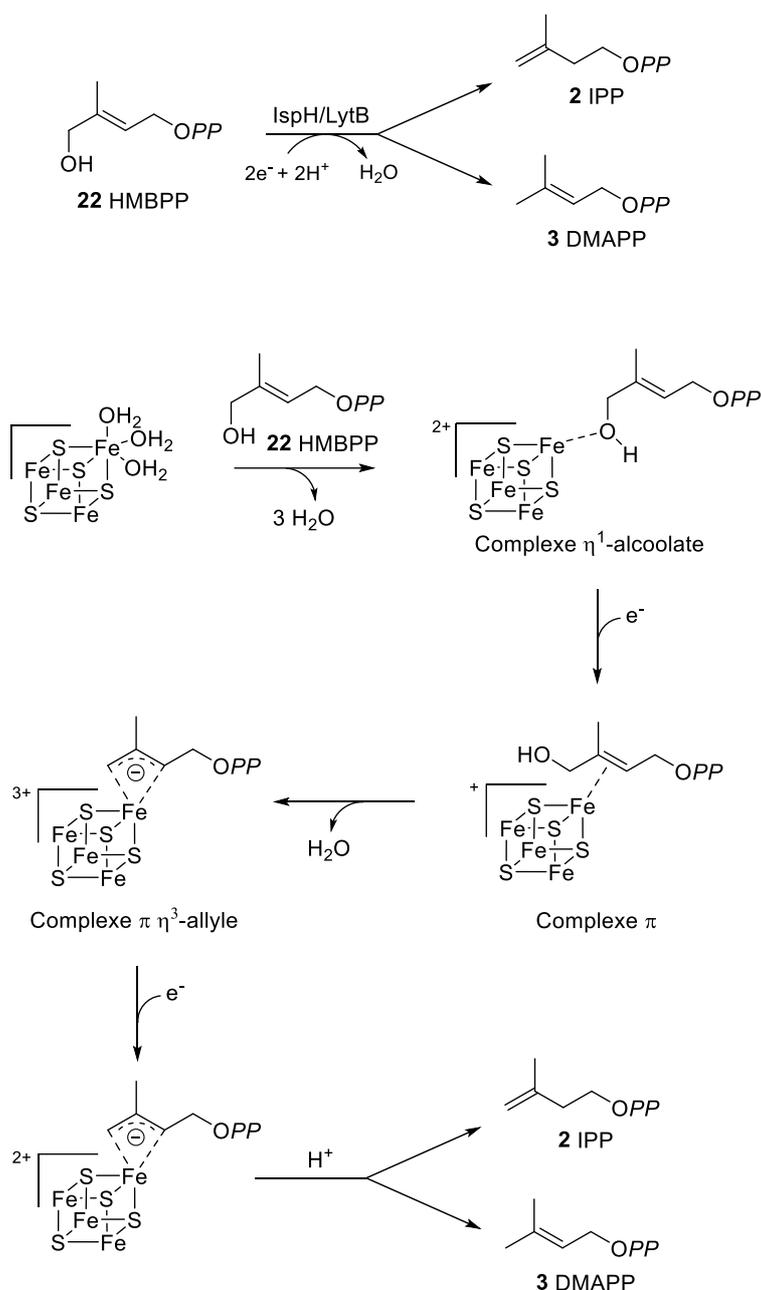
Tout comme IspG, la pénultième enzyme de la voie du MEP (cf Schéma 3, p28), IspH est une réductase dépendante d'un cluster [4Fe-4S]. Son activité enzymatique dépend également d'un système réducteur biologique tel que le système flavodoxine/flavodoxine réductase/NADPH<sup>111-113</sup>. Des réducteurs chimiques tel que le système dithionite/méthyle viologène réduit<sup>109</sup> ou la déazaflavine photoréduite<sup>111-113</sup> ont aussi été utilisés lors d'essais *in vitro*. Il est intéressant de noter que si ces différents systèmes sont utilisés par *E. coli*, ils ne

le sont pas forcément par d'autres micro-organismes. C'est le cas de *P. falciparum* qui ne contient pas de flavodoxine, mais de la ferrédoxine. Le système réducteur biologique utilisé chez les protozoaires, et éventuellement dans les plastes des végétaux, serait donc plutôt le système ferrédoxine/ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase<sup>114</sup>.

L'étude du mécanisme de la réaction catalysée par IspH, à la fois une réduction et une déshydroxylation du HMBPP, a été rendue difficile par la sensibilité de l'enzyme au dioxygène et ce mécanisme est resté un mystère pendant une dizaine d'années. La transformation du HMBPP en IPP et DMAPP met en jeu l'élimination de l'hydroxyle du HMBPP, un transfert de deux électrons du cluster vers le substrat et une protonation finale. Plusieurs types de mécanismes ont été proposés, avec des intermédiaires cationiques<sup>109</sup>, anioniques<sup>112</sup>, radicalaires<sup>111,115,116</sup> ou un ferraoxétane<sup>117</sup>.

Cependant, lors d'une étude du mécanisme de l'enzyme avec des analogues du substrat substitués par des atomes de fluor, les auteurs ont conclu qu'un mécanisme passant par un carbocation est peu probable<sup>116</sup>. De même, l'étude de Li *et al* a éliminé la possibilité d'un intermédiaire ferraoxétane en utilisant du HMBPP marqué avec du <sup>17</sup>O au niveau de l'oxygène de son hydroxyle, montrant qu'aucune liaison de coordination Fe–O n'est formée<sup>118</sup>. De plus, grâce à de la spectroscopie à résonance paramagnétique électronique (RPE) et à du marquage isotopique au deutérium, à l'<sup>17</sup>O et au <sup>57</sup>Fe, Wang *et al* ont pu caractériser deux intermédiaires de cette réaction : un complexe  $\pi$  où le CH<sub>2</sub>–OH du HMBPP a subi une rotation pour s'éloigner du cluster et un complexe  $\eta^3$ -allyle formé après la déshydroxylation<sup>119</sup>. Les études spectroscopiques tendent donc plutôt vers un mécanisme impliquant des intermédiaires organométalliques et des interactions Fe–C. En revanche, aucun intermédiaire radicalaire n'a pu être détecté, excluant un mécanisme radicalaire ou passant par un ferraoxétane<sup>119</sup> qui ne sont pas non plus compatibles avec la rotation de l'hydroxyle du HMBPP observée par l'équipe de Groll<sup>120</sup>.

Le mécanisme accepté à l'heure actuelle et décrit dans la littérature<sup>121–123</sup> démarre par la chélation de l'oxygène du HMBPP à l'atome de fer à l'extrémité du cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> conduisant à un complexe alcoolate (Schéma 9). Puis, la réduction du cluster en [4Fe-4S]<sup>+</sup> par ajout d'un électron et la rotation du CH<sub>2</sub>–OH du HMBPP permettent la formation d'un complexe  $\pi$  entre le cluster et le motif isoprénique du substrat. Après protonation de l'hydroxyle et élimination d'une molécule d'eau, deux électrons sont transférés du cluster vers le substrat pour former un complexe  $\eta^3$ -allyle. Enfin, une réduction à un électron, suivie par une protonation de ce complexe  $\eta^3$ -allyle conduit aux produits, l'IPP et le DMAPP, et au cluster sous sa forme oxydée initiale [4Fe-4S]<sup>2+</sup>.

Schéma 9. Mécanisme actuellement admis pour la réduction du HMBPP **22** en IPP **2** et DMAPP **3**.

La détermination et l'étude de la structure cristallographique d'IspH a également permis de mieux comprendre son mécanisme. La première structure cristallographique décrite est celle de l'IspH d'*Aquifex aeolicus*<sup>124</sup>, suivie de près par celle d'*E. coli*<sup>125</sup> ainsi que celle de *P. falciparum*<sup>126</sup>.

Les IspH des différents micro-organismes se ressemblent fortement. L'enzyme se trouve sous la forme d'un monomère d'environ 36 kDa divisé en trois domaines chacun constitué d'un feuillet  $\beta$  encadré par deux groupes d'hélices  $\alpha$  (Figure 8). Une poche hydrophobe, située à l'interface des trois domaines, contient le cluster Fe-S. Chez *A. aeolicus*, le site actif est protégé du solvant extérieur par une dimérisation de l'enzyme, tandis que chez *E. coli* et *P. falciparum*, l'existence d'une boucle liée au domaine C-terminal permet de le couvrir.

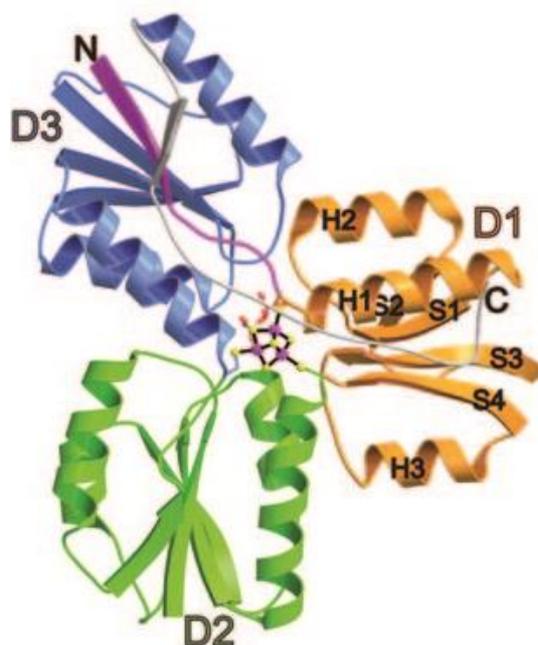


Figure 8. Structure de l'IspH d'*E. coli* constituée de trois domaines en vert, en bleu (*N*-terminal) et en orange (*C*-terminal). La poche hydrophobe contenant le cluster [4Fe-4S] se situe au centre (Gräwert *et al*<sup>125</sup>).

La détermination de la stœchiométrie du cluster a été difficile du fait de sa sensibilité au dioxygène. Les premières tentatives de sa caractérisation ont conclu à un cluster [3Fe-4S]<sup>113</sup> avant que des conditions anaérobiques soient appliquées pour la cristallisation de l'enzyme. L'équipe de Rohmer en a alors déduit qu'il s'agissait en réalité d'un produit issu de l'oxydation du cluster [4Fe-4S] initial<sup>112</sup>. En effet, lorsque l'enzyme est liée à son substrat, c'est un cluster [4Fe-4S] qui est identifié<sup>127</sup> et l'enzyme naturelle utilise un cluster [4Fe-4S] lié à trois molécules d'eau<sup>128</sup>.

Avant l'entrée du HMBPP dans le site actif, un des domaines du monomère est incliné d'environ 20° par rapport aux deux autres, permettant ainsi l'accès à la cavité centrale. Lorsque le substrat se fixe à l'enzyme, un nouveau mouvement du domaine incliné permet de « fermer » l'enzyme et ainsi de protéger le site actif de l'environnement extérieur<sup>125,127</sup>. Au sein du site actif, le cluster est maintenu par trois cystéines absolument conservées<sup>129</sup> qui appartiennent chacune à un domaine différent : Cys13, 96 et 193 pour *A. aeolicus*<sup>124</sup>, Cys12, 93 et 196 pour *E. coli*<sup>125</sup> et Cys14, 98 et 196 pour *P. falciparum*<sup>126</sup>. Le substrat s'ancre dans une poche polaire et son diphosphate est fixé par un grand nombre de liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés très conservés<sup>125,127</sup>. En outre, des analogues du HMBPP où le diphosphate est remplacé par des carbamates n'ont montré aucune activité biologique et ne sont donc pas substrat d'IspH<sup>130</sup>. Ainsi, le groupement diphosphate du substrat est nécessaire pour sa fixation dans le site actif. Le HMBPP adopte alors une conformation courbée, son motif isoprénique coincé entre le cluster et son diphosphate (Figure 9). Le groupement hydroxyle est, quant à lui, proche d'un acide glutamique (Glu126) avec lequel il se lie par liaison hydrogène. C'est grâce

à la présence de cet acide que la protonation et l'élimination d'une molécule d' $\text{H}_2\text{O}$  semble possible<sup>120</sup>.

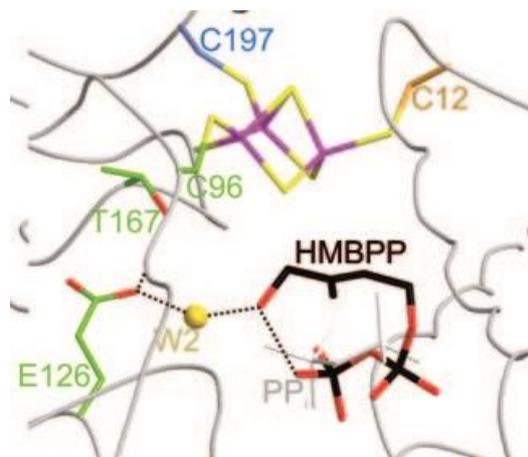


Figure 9. Structure du site actif d'IspH d'*E. coli* en présence du HMBPP (en noir) et d'une molécule d'eau (en jaune). Le cluster métallique n'est pas représenté (Gräwert *et al*<sup>125</sup>).

Concernant la protonation finale, le diphosphate du substrat pourrait fournir le proton nécessaire à cette dernière étape<sup>116</sup>. En effet, la conformation courbée du HMBPP permettrait d'expliquer la régiosélectivité de la protonation qui a lieu uniquement en C2 ou en C4, mais pas en C5, puisque le diphosphate se trouve à proximité de ces deux positions. De plus, dans cette conformation, seule la face *Si* pourrait être protonée, ce qui serait en accord avec les observations faites<sup>112,119,127</sup>. Enfin, la libération des produits est possiblement induite par le transfert des deux électrons du cluster vers le substrat au sein de la poche polaire, ainsi que par les diphosphates chargés négativement des deux produits formés, l'IPP et le DMAPP<sup>125,127</sup>.

Encore aujourd'hui, le mécanisme de la réaction catalysée par IspH n'est pas élucidé entièrement et il reste des zones d'ombre, notamment concernant les étapes d'élimination de  $\text{H}_2\text{O}$  et du transfert d'électrons<sup>122,131</sup>. L'origine du proton lors de la protonation finale fait également débat, tandis que d'autres questions se posent autour de la formation des produits et des systèmes réducteurs. Qu'est-ce qui fait que c'est la formation de l'IPP, moins stable thermodynamiquement que le DMAPP, qui se forme en majorité ? Comment les électrons des systèmes réducteurs sont-ils transférés au cluster d'IspH *in vivo* ? Et comment font les micro-organismes vivant en conditions aérobiques pour continuer d'utiliser ce cluster [4Fe-4S] sensible au dioxygène ? D'autres enzymes sont-elles impliquées dans le maintien de l'intégrité du cluster ?

Malgré toutes ces interrogations, IspH reste une cible de choix pour le développement de nouveaux antimicrobiens. En effet, IspG et IspH utilisent toutes deux un cluster [4Fe-4S] et les inhibiteurs ciblant le cluster de l'une a de fortes chances d'inhiber l'activité enzymatique de l'autre. Ainsi, des inhibiteurs capables de cibler les deux enzymes pourraient prévenir l'émergence de phénomènes de résistance. De plus, inhiber spécifiquement IspH pourrait permettre l'accumulation de HMBPP *in vivo*, molécule capable d'activer des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

### **III. La voie du MEP : source d'immunostimulants**

La voie du MEP présente également un deuxième rôle très intéressant, bien que paradoxal : la production de composés capables de déclencher une réponse immunitaire de l'hôte, permettant ainsi de combattre l'infection bactérienne.

#### **A. La stimulation des cellules T $V\gamma 9V\delta 2$**

Chez les vertébrés, l'existence de deux grands types de réponses immunitaires est généralement admise : une réponse innée (ou non-spécifique) et une réponse acquise (ou adaptative). La réponse innée est la première réponse face à un pathogène avant même son identification et permet une protection immédiate lors d'une infection, tandis que l'immunité acquise est initiée par l'immunité innée et met plus de temps à se développer. Elle nécessite la prolifération et la différenciation de lymphocytes avant de pouvoir fournir une défense immunitaire spécifique et efficace contre les pathogènes d'une part, et garantir une mémoire immunitaire, d'autre part<sup>132</sup>.

Historiquement, deux classes de lymphocytes sont considérées comme étant les principaux effecteurs de cette immunité acquise : les lymphocytes B pour la réponse humorale et les lymphocytes T pour la réponse cellulaire. L'identification en 1986 d'un deuxième sous-ensemble de lymphocytes T humains, portant un récepteur de cellules T qui exprime les gènes  $\gamma\delta$ <sup>133</sup>, vient bouleverser ce point de vue. Il est désormais admis que, chez les vertébrés à mâchoire, le système immunitaire repose sur un type de lymphocytes B et deux types de lymphocytes T, les T  $\alpha\beta$  et les T  $\gamma\delta$ <sup>134</sup>.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  se différencient des lymphocytes T  $\alpha\beta$  par leur phénotype cellulaire de surface, la diversité combinatoire de leur récepteurs cellulaires T respectifs et leur localisation anatomique<sup>135</sup>. D'une espèce à l'autre, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  présentent un répertoire de récepteur, des activités et une localisation variable, et chez les humains, ils représentent seulement 1 à 5 % des cellules T<sup>136</sup>. Ils expriment des ensembles de gènes  $V\gamma$  et  $V\delta$  spécifiques suivant leur localisation dans le corps, donnant naissance à des sous-ensembles de ces lymphocytes aux fonctions différentes<sup>137</sup>. Chez l'Homme, la chaîne  $V\delta 1$  est principalement exprimée dans les tissus tandis que la chaîne  $V\delta 2$  est, quant à elle, exprimée dans le sang périphérique et les organes lymphatiques secondaires. Cette dernière est généralement associée à la chaîne  $V\gamma 9$  et les cellules T  $V\gamma 9V\delta 2$  (parfois notées T  $V\gamma 2V\delta 2$ ) constituent donc le sous-ensemble majoritaire des cellules T  $\gamma\delta$  dans le sang périphérique (entre 50 à 90 %) <sup>138</sup>.

Possédant à la fois des caractéristiques de l'immunité innée et adaptative, ce sous-ensemble est un médiateur essentiel du système immunitaire puisque ces lymphocytes sont capables de lyser des cellules infectées et/ou transformées par la libération de molécules effectrices cytotoxiques, contribuent à l'élimination de pathogènes et induisent une maturation des cellules dendritiques<sup>134,138-141</sup>. Elles sont également capables de présenter des antigènes aux cellules

T  $\alpha\beta$ , notamment lors d'infections par *Plasmodium falciparum*<sup>142</sup>. De plus, une expansion des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est observée en réponse à des infections d'origine bactérienne. Ces cellules peuvent ainsi jouer le rôle d'effecteurs contre une grande variété de bactéries pathogènes tel que *M. tuberculosis*, et de protozoaires, comme *P. falciparum*, par exemple<sup>135,143</sup>.

En outre, les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont impliqués dans l'immuno-surveillance des tumeurs et présentent une activité antitumorale<sup>144</sup>. Ainsi, la détection de la présence d'une concentration élevée de cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le sang et dans les tumeurs à un stade précoce pourrait être associée à une évolution positive de la maladie. C'est le cas par exemple chez les patients atteints de mélanomes où une diminution de la mortalité et des recrudescences a été corrélée avec la présence de ces cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>145</sup>.

De par leur cytotoxicité contre les cellules tumorales humaines, les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 apparaissent comme des effecteurs cellulaires prometteurs pour l'immunothérapie anticancéreuse<sup>134,140,141,146</sup>. Cependant, dans certains cas, les cellules T  $\gamma\delta$  peuvent favoriser la croissance des tumeurs, notamment par la production de l'interleukine-17 (IL-17) qui joue un rôle immunosuppresseur et favorise l'angiogenèse chez des patients atteints du cancer de la vésicule biliaire. De plus, dans le cas du cancer du sein, la sécrétion d'IL-10 par les cellules cancéreuses permet le recrutement d'un sous-ensemble de cellules T  $\gamma\delta$  qui suppriment la réponse des cellules T et empêche la maturation des cellules dendritiques<sup>138</sup>.

Contrairement aux lymphocytes B et T  $\alpha\beta$  qui répondent à des antigènes peptidiques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité, les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 reconnaissent des petites molécules non peptidiques. Il existe deux types d'antigènes pour ces cellules :

- ◆ les antigènes « directs » induisent eux-mêmes une réponse des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ce sont des petites molécules non peptidiques phosphorylées appelées phosphoantigènes (PAGs) dont la reconnaissance par les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 fait intervenir une protéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines, la butyrophiline-3A1 (BTN3A1). Chez les humains, il existe trois isoformes de la butyrophiline-3, BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3, mais seule la BTN3A1 est capable de fixer les PAGs au niveau d'un site actif de son domaine intracellulaire B30.2<sup>141,147,148</sup>. Toutefois, le mécanisme de reconnaissance par les récepteurs des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est encore en cours d'élucidation<sup>137</sup>.

- ◆ les antigènes « indirects » permettent une accumulation d'antigènes directs dans le milieu<sup>149</sup>. Ce sont soit des PAGs synthétiques, les aminobisphosphonates<sup>150</sup>, soit des alkylamines naturelles<sup>151</sup>.

Les études de la relation entre structure et activité des PAGs sont basées sur l'évaluation des fonctions effectrices des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, *i.e.* leur prolifération cellulaire, la production de

cytokines comme l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ou encore leur cytotoxicité<sup>152</sup>. Ainsi, pour un même PAg, son activité décrite dans la littérature varie suivant la méthode utilisée. Dans les parties suivantes, le facteur pris en compte pour l'évaluation immunostimulante des différents composés sera précisé pour les valeurs de concentrations efficaces médianes (EC<sub>50</sub>) citées. Nous nous limiterons aux PAg directs naturels et synthétiques, ainsi qu'aux aminobisphosphonates.

## B. Les phosphoantigènes naturels

Le premier PAg naturel identifié est l'IPP **2**<sup>153</sup> qui induit la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à des concentrations de l'ordre du micromolaire (IPP EC<sub>50</sub> = 1 – 36  $\mu$ M)<sup>148,154–158</sup>. Son isomère, le DMAPP **3**, est lui aussi décrit comme un PAg avec une efficacité généralement similaire à celle de l'IPP (DMAPP EC<sub>50</sub> = 1 – 20  $\mu$ M)<sup>155,158</sup>, bien que le groupe de Bauer ait montré une meilleure efficacité du DMAPP (prolifération cellulaire : IPP EC<sub>50</sub> = 21  $\mu$ M *versus* DMAPP EC<sub>50</sub> = 230 nM)<sup>157</sup>. Cependant, les conclusions d'une étude récente montrent plutôt que le DMAPP agirait indirectement et son activité immunostimulante serait due à sa conversion intracellulaire en IPP, catalysée par l'IDI<sup>159</sup> (cf. Schéma 2, p27).

Malgré ses propriétés immunostimulantes, la concentration en IPP au sein des cellules humaines saines n'est pas suffisante pour déclencher l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En revanche, il a été observé dans plusieurs cellules tumorales, qu'un dysfonctionnement de la régulation de la voie du mévalonate conduit à une accumulation d'IPP endogène, ce qui induit une réponse des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>150</sup>.

En parallèle de la découverte du rôle de l'IPP et du DMAPP pour l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, il a été constaté que certains micro-organismes pathogènes possédant la voie du MEP, tels que *M. tuberculosis*, *E. coli*, ou encore *P. falciparum*, produisent des PAg qui activent spécifiquement les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>108,160</sup>. L'IPP n'étant pas présent dans les bactéries en quantité suffisante pour déclencher une réponse des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, l'activité précédemment observée proviendrait donc d'autres métabolites issus de la voie du MEP<sup>161</sup>. De plus, d'après une étude d'Eberl *et al.*, lors de la suppression du gène *lytB* chez *E. coli* codant pour la dernière enzyme de la voie du MEP, un métabolite s'accumule, induisant la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, ainsi qu'une forte production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ <sup>162</sup>.

En 1999, un PAg a été extrait de *Mycobacterium fortuitum* et identifié par le groupe de Fournié comme étant le diphosphate de 3-formyl-1-butyle<sup>163</sup>. En 2001, l'équipe de Jomaa a, quant à elle, conclu à une autre structure qui s'avère être le PAg responsable de l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : le HMBPP **22**, dernier intermédiaire de la voie du MEP<sup>108</sup>. Le HMBPP induit une prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec une EC<sub>50</sub> comprise entre 0,070 et 0,51 nM suivant les études<sup>148,156,157</sup>, soit une activité immunostimulante environ 10<sup>4</sup> fois plus intense que pour l'IPP et le DMAPP. De même, lorsque la production de TNF- $\alpha$  est évaluée, le HMBPP se

trouve être plus efficace que l'IPP, là encore d'un facteur  $10^4$  environ (HMBPP  $EC_{50} = 0,39$  nM *versus* IPP  $EC_{50} = 81$   $\mu$ M)<sup>164</sup> et s'impose comme le PAg naturel le plus efficace.

Ainsi, le rôle du dernier intermédiaire de la voie du MEP est double puisqu'il est nécessaire à la croissance bactérienne tout en étant capable de déclencher une réponse immunitaire de l'hôte à faible concentration.

## C. Les phosphoantigènes synthétiques

### 1. Les aminobisphosphonates

Les aminobisphosphonates sont initialement développés comme traitement contre les maladies osseuses telles que l'ostéoporose ou les maladies osseuses métastatiques<sup>165</sup>. En 1989, une réaction de phase aiguë est observée lors de la première prise de pamidronate **28** chez 20 à 50 % des patients atteints de diverses maladies osseuses<sup>166</sup>, indiquant une stimulation du système immunitaire. L'utilisation clinique des aminobisphosphonates évolue ensuite avec la découverte d'effets anticancéreux<sup>167,168</sup>. En 2002, une étude fait le lien entre l'activité antitumorale de trois aminobisphosphonates, le pamidronate **28**, l'alendronate **29** et l'ibandronate **30**, et la stimulation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, possiblement à l'origine de cette activité (Figure 10). En effet, après traitement avec ces aminobisphosphonates et l'interleukine-2 (IL-2), une prolifération de ces cellules dans le sang périphérique et une production d'IFN- $\gamma$  est observée, ainsi qu'une cytotoxicité spécifique contre des lignées cellulaires de lymphome (Daudi) et de myélome. Il est intéressant de noter que seuls les bisphosphonates comportant un azote (*i.e.* les aminobisphosphonates) sont capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T  $\gamma\delta$ <sup>169</sup>.

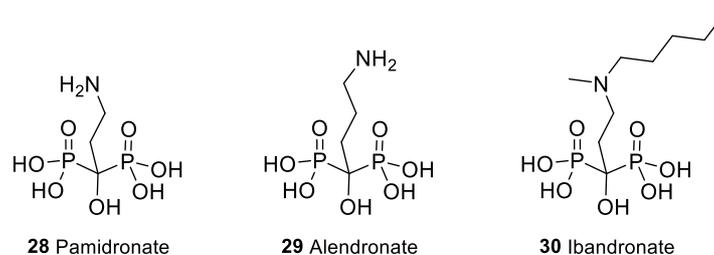


Figure 10. Pamidronate **28**, alendronate **29** et ibandronate **30**.

Des études ont montré que les aminobisphosphonates activent les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par un mécanisme indirect : ils inhibent la farnesyl diphosphate synthase (FPPS), une enzyme en aval de l'IPP, ce qui a pour conséquence l'accumulation intracellulaire d'IPP et de DMAPP qui peuvent se lier à la BTN3A1<sup>150,170</sup>.

Parmi les trois générations d'aminobisphosphonates existantes, le risedronate **31** et le zoledronate **32**, de la troisième génération, se trouvent être les PAg indirects les plus efficaces avec une inhibition de la FPPS de l'ordre du nanomolaire ( $IC_{50}$  respectifs de 10 et 3 nM) et une activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par la production de TNF- $\alpha$  de l'ordre du micromolaire ( $EC_{50}$  respectifs de 6,9 et 5,2  $\mu$ M)<sup>152</sup> (Figure 11).

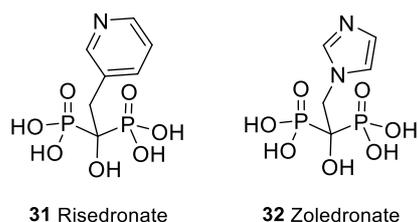


Figure 11. Risedronate **31** et zoledronate **32**.

Malgré leur faible toxicité en tests cliniques, l'efficacité du pamidronate et du zoledronate reste modeste et nécessite l'administration conjointe d'IL-2. De plus, les groupements bisphosphonates limitent l'entrée de ces composés dans les cellules par diffusion passive, ce qui diminue leur biodisponibilité<sup>171</sup>.

## 2. Les dérivés de l'IPP et du HMBPP

La différence notable d'activité entre le HMBPP et le DMAPP montre l'importance du groupement hydroxyle en position C4 pour une activation optimale des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Cependant, l'efficacité de la reconnaissance du HMBPP par les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 semble limitée puisque le HMBPP est produit en très faible quantité par les bactéries, et en particulier par celles possédant une croissance lente comme *M. tuberculosis* par exemple. De plus, bien que cette reconnaissance des PAg soit rapide et spécifique, elle semble inefficace lors d'une infection puisque de nombreuses bactéries qui produisent le HMBPP parviennent tout de même à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte<sup>172</sup>. C'est pourquoi plusieurs groupes se sont penchés sur la synthèse de nouveaux PAg agonistes des lymphocytes T  $\gamma\delta$  en se basant sur la structure de l'IPP et du HMBPP<sup>173</sup>.

Parmi ces composés, les diphosphates d'halohydrine possèdent des propriétés biologiques similaires à celles des PAg naturels, et, bien qu'ils ne possèdent pas d'alcool en position allylique, ils induisent la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à des concentrations proches de celle du HMBPP. Les dérivés iodé (IHPP) **33** et bromé (BrHPP) **34** sont les plus efficaces avec des EC<sub>50</sub> d'environ 1 nM et 10 nM respectivement (Figure 12)<sup>154,173</sup>. De plus, lors d'essais cliniques pour le traitement d'hémopathies malignes et de tumeurs solides, le BrHPP **34** associé en co-traitement à de faibles doses d'IL-2 s'est montré très prometteur pour une thérapie ciblée sur l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>174,175</sup>. Cependant, aucun développement clinique n'a été décrit dans la littérature depuis lors<sup>171</sup>. Une des causes possibles pourrait être la rapide dégradation du BrHPP **34** dans le plasma puisque son temps de demi-vie a été estimé à quelques minutes seulement. De plus, les études cliniques montrent que la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 diminue au fur et à mesure des cycles de thérapie. Ainsi, des doses de BrHPP **34** de plus en plus importantes sont nécessaires pour garder une certaine efficacité du traitement<sup>175,176</sup>.

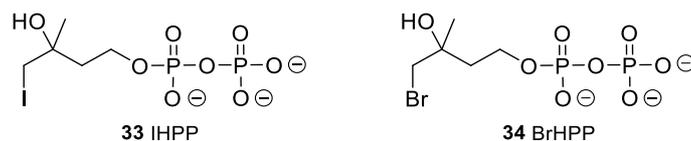


Figure 12. Diphosphate d'iodohydrine (IHPP) **33** et diphosphate de bromohydrine (BrHPP) **34**.

Afin d'augmenter la stabilité du HMBPP **22** et du BrHPP **34** *in vivo*, des dérivés du HBMPP ont été synthétisés avec des modifications structurales au niveau du groupement diphosphate, sensible à l'hydrolyse chimique ou enzymatique.

La substitution du groupement diphosphate du HMBPP par un groupement diphosphonate diminue drastiquement sa capacité à induire la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (CC-HMBPP **35** EC<sub>50</sub> = 26  $\mu$ M)<sup>177</sup>. De la même manière, une perte d'activité est observée lorsque le second phosphate uniquement est substitué par un phosphonate (HMBPCP **36**) avec des valeurs d'EC<sub>50</sub> pour la prolifération cellulaire autour de 5  $\mu$ M<sup>156,157</sup> (Figure 13). En revanche, la substitution de l'oxygène du premier phosphate par un CH<sub>2</sub> (C-HMBPP **37**) n'entraîne qu'une légère diminution de la production de TNF- $\alpha$  comparé au HBMPP (C-HMBPP **37** EC<sub>50</sub> = 0,91 nM *versus* HMBPP **22** EC<sub>50</sub> = 0,39 nM) tout en augmentant sa stabilité<sup>164</sup>. Ces résultats suggèrent que la présence du second phosphate est essentielle pour la reconnaissance des PAgS par la BTN3A1.

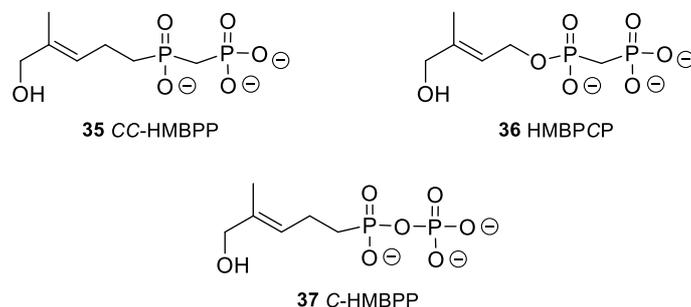


Figure 13. Dérivés synthétiques du HBMPP : CC-HMBPP **35**, HMBPCP **36** et C-HMBPP **37**.

Certains groupes ont également évalué l'activité immunostimulante des dérivés monophosphate et monophosphonate du HBMPP (Figure 14). Le monophosphonate C-HMBP **38** induit la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (EC<sub>50</sub> = 4  $\mu$ M)<sup>148</sup> et la production de TNF- $\alpha$  (C-HMBP **38** EC<sub>50</sub> = 2,5  $\mu$ M)<sup>164</sup> avec une efficacité bien plus faible que celle du HMBPP **22** (EC<sub>50</sub> de 0,51 nM et 0,39 nM respectivement). De même, le monophosphate HMBP **39** voit son activité immunostimulante diminuer (EC<sub>50</sub> = 120 nM) en comparaison avec son analogue diphosphate (HMBPP **22** EC<sub>50</sub> = 0,070 nM)<sup>157</sup>. Ici encore, ces résultats soulignent l'importance de la présence du second phosphate pour une activité immunostimulante optimale. De plus, la configuration de la double liaison du motif isoprène joue un rôle majeur pour leur reconnaissance par les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, les PAgS dans leur configuration (*E*) naturelle se sont révélés être environ 600 fois plus efficaces que leur isomères (*Z*) (production de TNF- $\alpha$  : *E*-HMBPP EC<sub>50</sub> = 0,39 nM *versus* *Z*-HMBPP EC<sub>50</sub> = 252 nM)<sup>164</sup>.

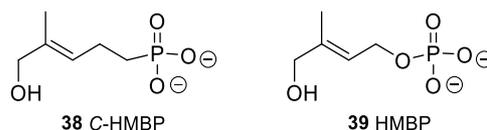


Figure 14. Dérivés synthétiques monophosphonate **38** et monophosphate **39** du HBMPP.

Ces phosphoantigènes synthétiques possèdent des difficultés à entrer dans les cellules à cause des groupements phosphates ou phosphonates chargés à pH physiologique. Ainsi, la synthèse de ces composés sous la forme de prodrogues où les charges du phosphonates sont masquées pourrait permettre d'augmenter leur lipophilie et faciliter leur passage au travers des membranes par diffusion passive.

#### IV. Les prodrogues

Dans cette partie, les définitions des termes signalés par un astérisque (\*) sont regroupées par Wermuth *et al* dans le *Glossary of terms used in medicinal chemistry*<sup>178</sup>, et ceux signalés par un double astérisque (\*\*) figurent dans le *Glossary of terms used in medicinal chemistry part II*<sup>179</sup>.

##### A. Qu'est-ce qu'une prodrogue ?

Lors de la conception de nouveaux médicaments, l'identification d'une cible thérapeutique, la détermination d'un pharmacophore et l'optimisation de l'interaction entre les composés étudiés et leur cible sont des facteurs clés. Toutefois, la prise en compte de leurs propriétés pharmacocinétiques\* et de leur toxicité *in vivo* est également primordiale. En effet, ces propriétés pharmacocinétiques se basent sur les différents types de barrières rencontrées par un médicament lors de son administration : l'Absorption par l'organisme, la Distribution\*\* dans le corps, le Métabolisme, l'Excrétion et la Toxicité (abrégées en ADMET\*\* ou parfois en ADME\* sans la toxicité). Ainsi, des composés qui sont difficilement absorbables par l'organisme ou rapidement métabolisés par exemple ne seront pas considérés comme des candidats médicaments. L'optimisation de la formulation pharmaceutique peut parfois permettre d'améliorer les paramètres ADMET, mais cela ne suffit pas toujours. C'est pourquoi la conception de médicaments sous la forme de prodrogues est souvent nécessaire.

La première utilisation du terme prodrogue\* remonte à 1958 par Albert. Il décrit l'action de certaines molécules qui deviennent actives après avoir été « cassées » *in vivo*<sup>180</sup> et désigne ainsi par *pro-drug* (ou *pro-agent*) un composé qui présente des effets pharmacologiques après avoir subi une biotransformation\*<sup>180,181</sup>. En 1959, Harper définit lui aussi le concept de prodrogue comme étant « une modification chimique d'un composé biologiquement actif pour former un nouveau composé qui, après une attaque enzymatique *in vivo*, libère le composé initial » et utilise le terme *drug latention*\* (ou latence médicamenteuse)<sup>182</sup>.

En plus d'optimiser les paramètres ADMET, l'utilisation de prodrogues permet, entre autres, d'augmenter les effets pharmacologiques du composé (solubilité en phase aqueuse, lipophilie,

perméabilité, stabilité métabolique, etc.), d'obtenir une meilleure spécificité pour le site actif ou encore d'améliorer la formulation pharmaceutique<sup>183-185</sup>. Cette stratégie s'est donc largement développée depuis les années 60 pour la conception de nouveaux médicaments. Entre 2008 et 2017, environ 10 % de tous les médicaments approuvés et mis sur le marché mondial sont considérés comme des prodrogues<sup>186</sup>.

Les prodrogues peuvent être classées en deux grandes catégories décrites par Choi-Seleski et Warmuth dans *The Practice of Medicinal Chemistry*<sup>185</sup> : les prodrogues dites « porteuses » ou « transporteuses » (*carrier prodrugs\** en anglais) et les bioprécuseurs\*.

### 1. Les prodrogues « transporteuses » ou *carrier prodrugs*

Le principe de ce type de prodrogue repose sur la présence d'un groupement dit « transporteur », parfois considéré comme un groupement protecteur ou masquant, lié à la molécule active par une liaison covalente. Cette prodrogue – molécule active et son transporteur – est inactive biologiquement, ou, à défaut, possède une activité biologique moindre par rapport à la molécule active. Une fois la prodrogue absorbée dans l'organisme et la cible atteinte, la liaison entre la molécule active et le transporteur est généralement hydrolysée par un mécanisme enzymatique et/ou chimique (Figure 15). Cette hydrolyse doit être suffisamment lente pour permettre au composé d'atteindre sa cible et suffisamment rapide afin de minimiser la dégradation métabolique de la prodrogue ou l'inactivation progressive du principe actif.

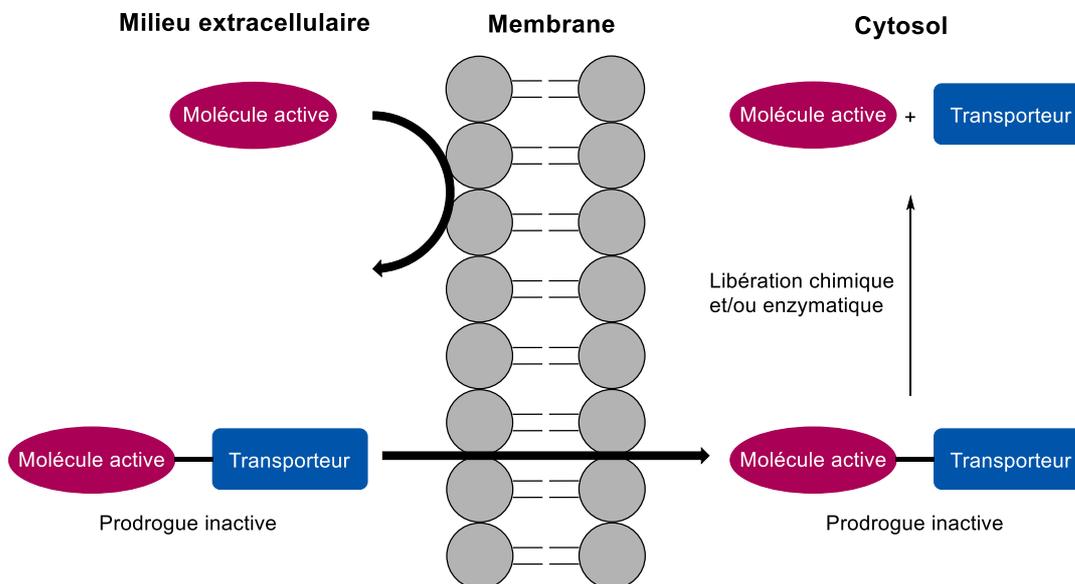


Figure 15. Principe d'une prodrogue "transporteuse".

Les prodrogues « transporteuses » peuvent être bipartites, c'est-à-dire composées de deux parties où le transporteur est directement lié à la molécule active qui est libérée après l'hydrolyse du transporteur, ou tripartite : le transporteur est séparé du composé actif par un espaceur, une première hydrolyse libère le transporteur et une seconde est nécessaire pour séparer le principe actif de l'espaceur.

On peut distinguer plusieurs sous-catégories de prodrogues « transporteuses »<sup>185,187</sup> :

- ◆ Les prodrogues macromoléculaires utilisent un polymère comme transporteur et permettent une distribution et une libération ciblées du principe actif. C'est le cas des anticorps conjugués par exemple, un système tripartite où le principe actif cytotoxique est relié à un anticorps par un espaceur complexe.
- ◆ Dans le cas des prodrogues transporteuses classiques, la liaison covalente entre le transporteur et la molécule active est parfois trop stable pour être hydrolysée efficacement. Les prodrogues cascade permettent de pallier cette stabilité par un mécanisme en deux étapes avec la génération *in vivo* d'un nucléophile qui va pouvoir déclencher la libération de la molécule active.
- ◆ Les co-drogues désignent quant à elles une molécule unique qui contient au moins deux principes actifs, généralement synergiques, et qui jouent chacun le rôle de transporteur pour l'autre. Ce type de prodrogues sera développé dans le chapitre 3.
- ◆ Les doubles prodrogues peuvent être considérées comme des prodrogues de prodrogues. Une première étape permet la formation d'une prodrogue, elle-même inactive, ce qui peut permettre de cibler un site biologique spécifique, avec un groupe protecteur qui se déprotège en milieu anoxique pour cibler une tumeur par exemple. La prodrogue ainsi formée nécessite alors une biotransformation pour délivrer le principe actif.

## 2. Les bioprécurseurs

Les bioprécurseurs sont des composés inactifs qui nécessitent une ou plusieurs modifications chimiques *in vivo* pour générer la molécule active désirée. Les modifications apportées sont issues principalement de réactions d'oxydation et de réduction, mais aussi de réactions qui ne modifient pas le degré d'oxydation telles que l'hydrolyse, l'hydratation et la déshydratation de liaisons multiples ou encore la phosphorylation.

### B. Les prodrogues de phosphates et de phosphonates

De nombreuses molécules actives telles que les antiviraux, les anticancéreux et certains antibactériens, possèdent des groupements phosphate et phosphonate. Cependant, l'administration de tels composés fait face à deux barrières majeures. Premièrement, ce sont des composés qui sont sous forme mono- ou di-anionique à pH physiologique. Si ces charges négatives sont souvent nécessaires à la complexation de la molécule dans son site actif, elles diminuent drastiquement sa perméabilité aux cellules par diffusion passive au travers des membranes plasmiques. Par conséquent, la biodisponibilité de ces composés est considérablement réduite. En outre, contrairement aux phosphonates, les phosphates ont une faible stabilité *in vivo* puisqu'ils sont rapidement hydrolysés par des phosphatases<sup>188,189</sup>.

Utiliser des prodrogues du type « transporteuses » permettrait de masquer temporairement ces charges et ainsi de pallier ces problèmes de biodisponibilité, tout en augmentant la stabilité des molécules parentes. Différents groupes protecteurs peuvent être utilisés pour la synthèse de prodrogues de phosphate et de phosphonate et sont généralement des esters ou des amides. Dans chaque cas, les prodrogues peuvent être symétriques et comporter deux groupes protecteurs identiques, ou asymétriques et posséder deux groupes masquant différents.

La suite de cette partie détaille les différentes prodrogues les plus utilisées. Ces dernières ont fait l'objet de nombreuses études et sont décrites dans plusieurs revues<sup>188,190,191</sup>.

## 1. Les esters de phosphates et de phosphonates

### a) Les diesters d'alkyle, de benzyle et d'aryle

Les diesters de phosphate et phosphonate les plus simples sont des diesters d'alkyle symétriques, comme un diester de méthyle ou d'éthyle par exemple (composé **40**, Figure 16). Cependant, leur trop grande stabilité métabolique empêche la libération du principe actif.

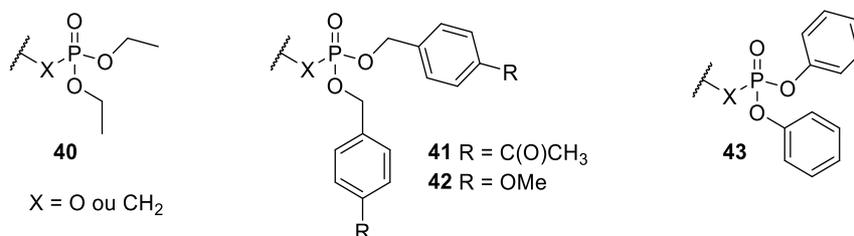


Figure 16. Exemples de structures de diesters d'alkyle **40**, de benzyle **41-42** et de phényle **43** de phosphate ou phosphonate.

Des diesters benzyliques ont alors été développés comme alternative, mais leur déprotection *in vivo* est ici encore trop lente. Il est tout de même possible de moduler la cinétique de libération par substitution du cycle aromatique. Ainsi, le groupement acétate du diester de *p*-acetoxybenzyle **41** (Figure 16) est plus facilement hydrolysé par des estérases<sup>192</sup>. De même, dans le cas du diester de *p*-méthoxybenzyle **42**, la déprotection est facilitée et s'effectue via une déméthylation ou une oxydation de la position benzylique<sup>193</sup>.

Enfin, les diesters d'aryle (composé **43** Figure 16) sont les plus réactifs de par la stabilité des phénolates et montrent une bien meilleure efficacité que les diesters d'alkyle. Romanowska *et al* se sont intéressés à la synthèse de diesters phényliques et pyridiniques de trois nucléosides monophosphates efficaces contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ils ont montré, d'une part, que tous les composés synthétisés possèdent une bonne perméabilité et inhibent la réplication du VIH-1 avec des EC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire, et d'autre part, que la libération du nucléoside monophosphate semble se faire en deux temps : une hydrolyse chimique suivie d'une hydrolyse enzymatique, probablement par des phosphoestérases<sup>194</sup>. L'inconvénient majeur de ce type de prodrogues est la formation de phénols toxiques comme sous-produits.

**b) Les diesters d'acyloxyalkyle**

Une autre stratégie, d'abord développée pour des monoesters de phosphate<sup>195</sup> avant d'être étendue aux phosphonates, permet de pallier les problèmes de stabilité des prodrogues précédentes : les esters d'acyloxyalkyle. Il s'agit du type de prodrogue de phosphates et de phosphonates le plus communément étudié dans le cadre d'une stratégie prodrogue et le groupement le plus utilisé est le pivaloyloxyméthyle (POM). Ces prodrogues possèdent une bonne biodisponibilité puisqu'elles traversent les membranes et délivrent le principe actif *in vivo*.

Les bis(POM) sont des prodrogues tripartites et leur hydrolyse se fait en deux étapes (Schéma 10). L'ester final est d'abord hydrolysé par des estérases non spécifiques. L'hémiacétal ainsi formé s'hydrolyse spontanément pour donner le monoester de phosphate (ou de phosphonate), du formaldéhyde et de l'acide pivalique. Pour le deuxième ester, soit le même mécanisme se répète, soit l'hydrolyse est réalisée par une phosphodiesterase.

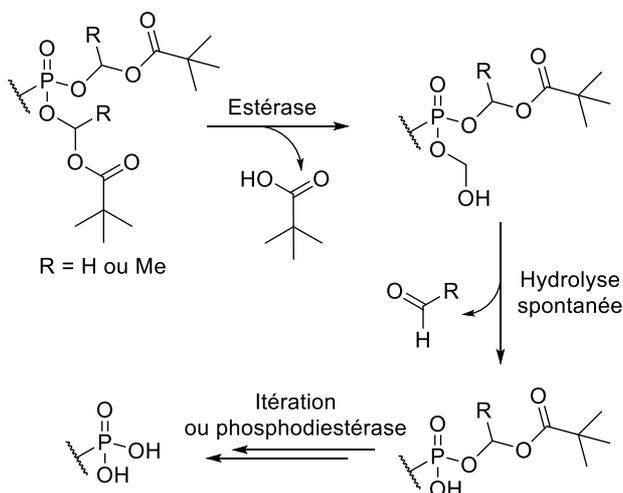


Schéma 10. Mécanisme de déprotection des prodrogues bis(POM).

La prodrogue bis(POM) de l'Adéfovir (PMEA), le nucléotide Adefovir dipivoxil bis(POM)-PMEA **44**, est un exemple de ce type de prodrogue qui a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2002 comme traitement contre le virus de l'hépatite B (Figure 17)<sup>196,197</sup>.

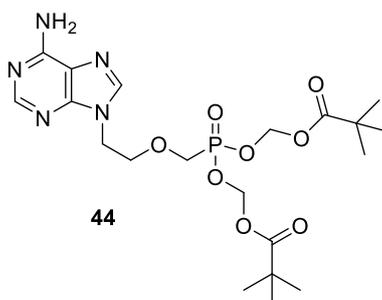


Figure 17. Exemple de prodrogue acyloxyalkyle : adefovir dipivoxil ou bis(POM)-PMEA **44**.

Les prodrogues bis(POM) possèdent néanmoins certains inconvénients, notamment au niveau de la toxicité des sous-produits générés lors de la libération de la molécule active. En effet, le formaldéhyde est un composé hautement toxique et carcinogène et l'acide pivalique induit un appauvrissement en carnitine dans les tissus<sup>198</sup>. Cependant, l'ajout d'un méthyle sur le carbone de l'acétal permettrait la formation d'acétaldéhyde comme sous-produit, bien moins toxique que le formaldéhyde. De plus, la génération d'acide pivalique pourrait être évitée par l'utilisation d'autres esters que le groupement pivaloyle.

### c) Les diesters d'alcoycarbonyloxyalkyle

Les diesters d'alcoycarbonyloxyalkyle sont proches des esters d'acyloxyalkyle, mais possèdent un ester de carbonate. Leur perméabilité est également très bonne et les sous-produits générés sont bien moins toxiques. Le groupement typiquement utilisé pour ce type de prodrogue est l'isopropylxycarbonyloxyméthyle (POC).

Le mécanisme d'hydrolyse est très similaire à celui des esters d'acyloxyalkyle (Schéma 11). Dans le cas d'un bis(POC), une hydrolyse enzymatique par des estérases libère cette fois-ci de l'isopropanol. La génération spontanée de CO<sub>2</sub>, suivie de l'hydrolyse de l'acétal, conduit à la formation de formaldéhyde et du monoester. De même que précédemment, soit le même mécanisme se répète pour libérer le diacide, soit l'hydrolyse est réalisée par une phosphodiesterase.

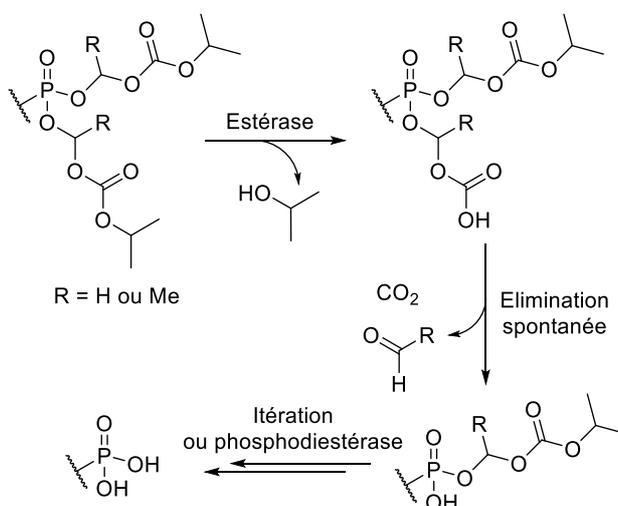


Schéma 11. Mécanisme de déprotection des prodrogues bis(POC).

De la même manière que les bis(POM), les prodrogues bis(POC) permettent d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs et certains composés ont également été approuvés par la FDA. C'est le cas du tenofovir disoproxil fumarate **45**, prodrogue du tenofovir (PMPA) (Figure 18), un antiviral utilisé comme traitement contre le virus de l'hépatite B et le VIH<sup>199,200</sup>.

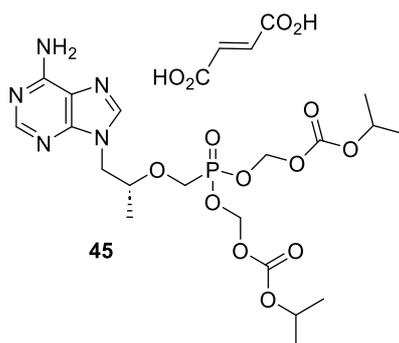


Figure 18. Exemple de prodrogue du type alcoycarbonyloxyalkyle : tenofovir disoproxil fumarate ou bis(POC)-PMPA **45**.

Ici encore, la formation de formaldéhyde comme sous-produit pourrait être évitée en ajoutant un groupement méthyle sur le carbone de l'acétal.

**d) Les diesters de S-acylthioéthanol (SATE) et de dithioéthanol (DTE)**

Les diesters de S-acylthioéthanol (SATE) et de dithioéthanol (DTE) ont été décrits la première fois par une équipe française dans les années 90 et dérivent du 2-mercapto-éthanol.

Ces prodrogues, tripartites elles aussi, sont activées en deux étapes, une enzymatique et une étape de dégradation spontanée (Schéma 12). Dans le cas des prodrogues SATE, c'est une estérase qui hydrolyse le thioester final pour former un thiol, tandis que pour les prodrogues DTE, une réductase réduit le pont disulfure, menant au même thiol intermédiaire. Instable, ce dernier se décompose pour donner le monoester, ainsi que du sulfure d'éthylène ou thiirane. Le monophosphate (ou l'acide phosphonique) est obtenu par la même suite réactionnelle ou par une réaction enzymatique avec une phosphodiesterase dans le cas des phosphates.

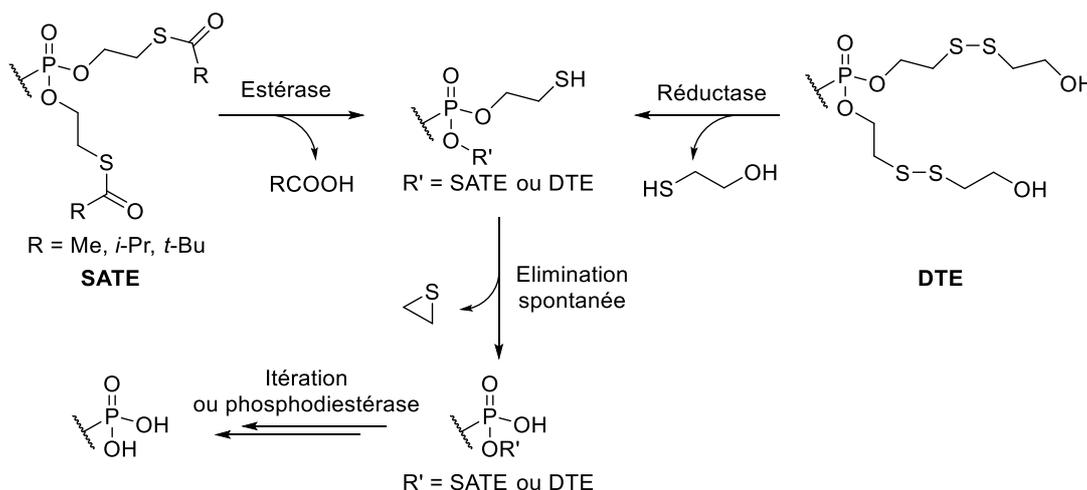


Schéma 12. Mécanisme de déprotection des prodrogues SATE et DTE.

Des prodrogues bis(SATE) et bis(DTE) de l'antiviral PMEAs ont été synthétisées (composés **46** et **47** respectivement, Figure 19). Elles possèdent une activité similaire à la prodrogue

bis(POM)-PMEA et ont un temps de demi-vie jusqu'à environ cinquante fois plus élevé dans le sérum humain, suggérant une meilleure efficacité *in vivo*<sup>201</sup>.

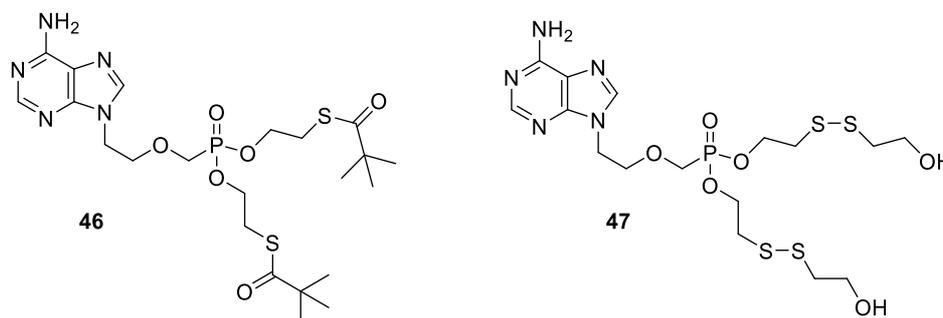


Figure 19. Exemples de prodrogues SATE et DTE : prodrogues bis(*t*-Bu-SATE) **46** et bis(DTE) du PMEAs **47**.

Toutefois, il est important de noter que si le thioester d'une prodrogue SATE comporte un *t*-Bu, il y aura formation d'acide pivalique comme sous-produit. De plus, le thiirane généré ayant une toxicité trop importante, les prodrogues SATE et DTE sont aujourd'hui quasiment uniquement utilisées pour des tests *in vitro*.

#### e) Les cycloSaligényles (ou cycloSal)

Les prodrogues *cycloSaligényles* (ou *cycloSal*) sont des diesters asymétriques élaborés par le groupe de Meier dans le but d'améliorer la perméabilité de nucléosides monophosphates pour le traitement du VIH<sup>202</sup>.

L'avantage de ce type de prodrogue est qu'elle ne nécessite aucune enzyme pour son hydrolyse (Schéma 13). La déprotection se base ici sur la différence de réactivité entre un phosphoester de phénol et un phosphoester benzylique. A pH supérieur à 7, il y a d'abord rupture sélective de la liaison P–O de l'ester de phénol, le phénolate généré étant stabilisé par mésomérie. L'ester benzylique est alors hydrolysé spontanément.

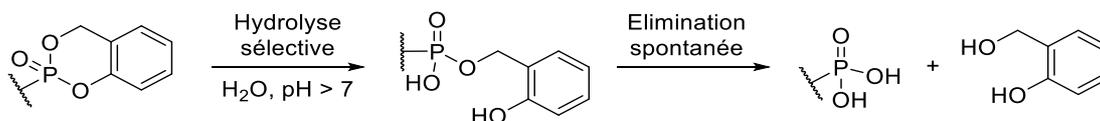
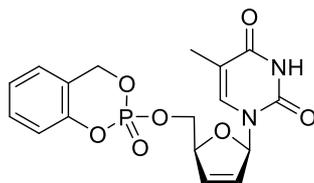


Schéma 13. Mécanisme de déprotection des prodrogues *cycloSal*.

La libération de la molécule parente étant dépendante d'une hydrolyse chimique, il est possible qu'une fois à l'intérieur la cellule, la prodrogue ressorte avant d'avoir pu être hydrolysée. Par conséquent, les *cycloSal* pourraient avoir une perméabilité limitée. Néanmoins, la cinétique de libération peut être modulée par substitution des positions ortho et para de l'ester phénolique.

Cette stratégie de prodrogue s'est montrée particulièrement efficace pour délivrer des antiviraux analogues de nucléosides monophosphates tel que le composé **48**, prodrogue du 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine (d4T) au sein des cellules<sup>203</sup> (Figure 20).



48

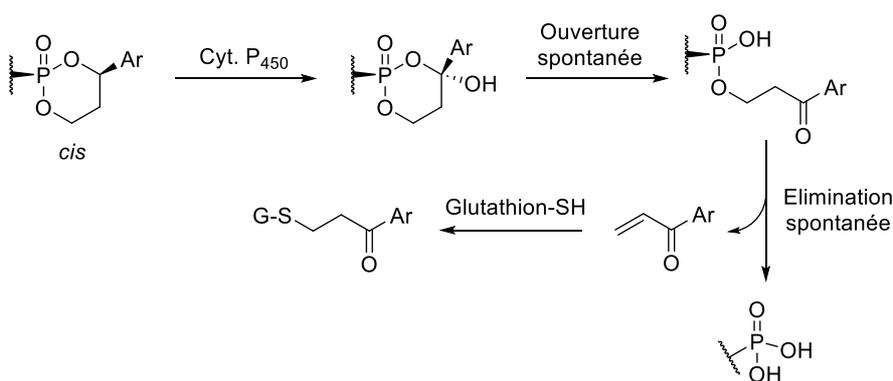
Figure 20. Prodrogue *cycloSal* du d4T **48**.

Les prodrogues du type *cycloSal* seront développées plus en détail dans la partie 2 du chapitre 1.

### f) Les 1-aryl-1,3-propanyl cycliques (ou *HepDirect*)

Les prodrogues cycliques 1-aryl-1,3-propanyl (ou *HepDirect*) ont été développées dans les années 2000 pour cibler le foie<sup>204</sup>. Ce sont des composés qui possèdent une très grande stabilité dans le plasma, les solutions aqueuses et les tissus non hépatiques et qui génèrent des sous-produits non-toxiques. Ces prodrogues ont été conçues pour que leur activation se fasse rapidement par une enzyme spécifique et prédominante dans le foie.

La déprotection de ce type de prodrogue se fait ainsi en quatre étapes dont seule la première nécessite une enzyme (Schéma 14). Lorsque la prodrogue atteint le foie, un cytochrome P<sub>450</sub> oxyde la position benzylique. Cette première étape est dépendante des stéréochimies de la position benzylique et du phosphore. En effet, l'oxydation n'a lieu que si le groupement aryle et la molécule d'intérêt sont en position *cis* l'une par rapport à l'autre. L'hémicétal ainsi formé s'hydrolyse spontanément, et une  $\beta$ -élimination, spontanée elle aussi, conduit à la molécule d'intérêt et à une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée. Cette dernière réagit avec les glutathions *S*-transférases présentes dans le foie en grande quantité pour former un composé bien moins réactif et par conséquent bien moins toxique.

Schéma 14. Mécanisme de déprotection des prodrogues *HepDirect*.

Cette stratégie de prodrogues a elle aussi été appliquée au PMEA pour donner le Pradefovir **49** (Figure 21), testé en essais cliniques. En effet, le Pradefovir a permis de délivrer presque dix fois plus de PMEA dans le foie par rapport à la prodrogue bis(POM)-PMEA, l'adefovir dipivoxil<sup>205</sup>.

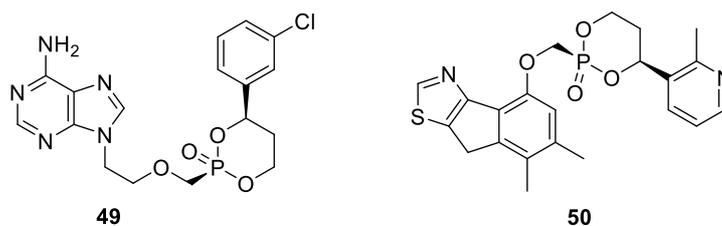
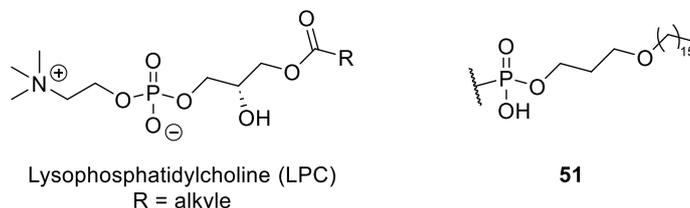


Figure 21. Exemples de prodrugs HepDirect.

Un autre exemple est apporté par Tsukada *et al* qui ont synthétisé des acides phosphoniques tricycliques comme inhibiteurs de la fructose-1,6-bisphosphatase pour lutter contre le diabète de type II. La synthèse de ces inhibiteurs sous forme de prodrugs HepDirect a permis de diminuer leur forte inhibition du cytochrome P<sub>450</sub> 3A4, leur effet secondaire majeur. La prodrug **50** (Figure 21) possède également une meilleure solubilité aqueuse et inhibe la production de glucose plus efficacement que l'acide phosphonique parent<sup>206</sup>.

### g) Les monoesters d'alcoxyalkyle

Les monoesters d'alcoxyalkyle possèdent une structure calquée sur celle de la lysophosphatidylcholine (LPC) (Figure 22), un phospholipide naturel, où la choline est remplacée par la molécule active. Ces prodrugs possèdent ainsi une bonne biodisponibilité orale puisqu'elles peuvent utiliser la voie d'absorption naturelle de la LPC par l'intestin grêle avant d'arriver jusqu'à leur cible. L'alcoxyalkyle le plus utilisé est le hexadécyloxypropyle (HDP) **51** (Figure 22).

Figure 22. Structures du LPC et d'une prodrug HDP **51**.

Ce sont des prodrugs bipartites avec un mécanisme de déprotection en une étape enzymatique : la liaison P–O est rompue par la lysophospholipase C (Schéma 15).

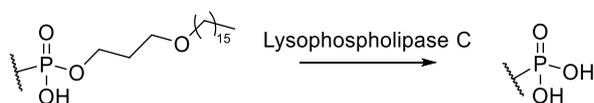
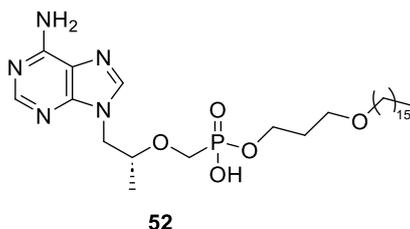


Schéma 15. Mécanisme de déprotection des prodrugs HDP.

Certaines prodrugs HDP sont même allées jusqu'en développement clinique, comme le CMX-157 **52** (Figure 16), prodrug HDP de l'adefovir<sup>207</sup>.

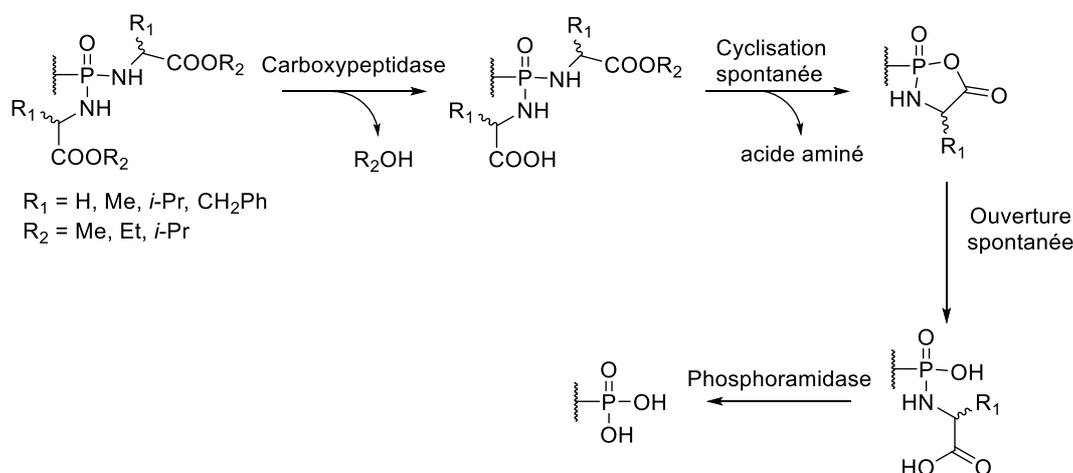
Figure 23. Exemple de prodrogue HDP : le CMX-157 **52**, prodrogue HDP de l'adefovir.

## 2. Les amides de phosphates et de phosphonates

### a) Les phosphorodiamidates et phosphonodiamidates

Les diamidates symétriques sont les plus simples et ne comportent pas de centre stéréogène au niveau du phosphore. Dans ces prodrogues tripartites, le phosphate ou le phosphonate est lié à deux acides aminés estérifiés.

La libération de la molécule active se fait ici en quatre étapes (Schéma 17). Tout d'abord, une carboxypeptidase vient rompre la liaison ester d'un des acides aminés. S'en suit une cyclisation spontanée sur le phosphore pour former un cycle à 5 chaînons. Puis une hydrolyse spontanée de la lactone obtenue permet l'ouverture du cycle. Enfin, la rupture de la liaison P–N du monoamidate est réalisée par une phosphoramidase.



Cette stratégie a été appliquée au PMEAs (composé **53**, Figure 24), cette fois-ci en tant qu'inhibiteur de la toxine adénylate cyclase, un facteur de virulence clé produit par *Bordetella pertussis*. Ces prodrogues possèdent une activité inhibitrice modérée. Mais si ces composés sont bien moins efficaces que leur dérivé bis(POM)-PMEAs, ils ont en revanche une cytotoxicité bien plus faible puisque les seuls sous-produits formés sont deux acides aminés<sup>208</sup>.

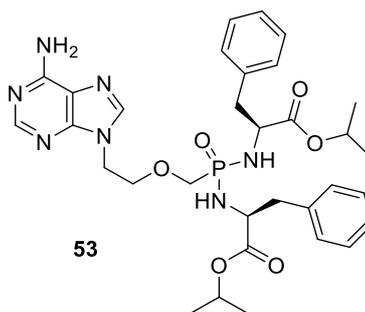


Figure 24. Exemple de prodrogue bis(amidate) : prodrogue phosphonodiamidate **53** du PMEa.

### b) Les monoamidates d'alcoxyalkyle

Les monoamidates ont été conçus comme une modification des aryloxyphosphoramidates (cf. partie 3. suivante) et sont constitués d'une unique liaison amide avec un acide aminé estérifié. Ils possèdent une bonne solubilité aqueuse et ne génèrent pas de sous-produits toxiques.

Le mécanisme de déprotection de ces prodrogues bipartites se fait en une étape enzymatique : la rupture de la liaison P–N est réalisée ici par une phosphoramidase (Schéma 18).

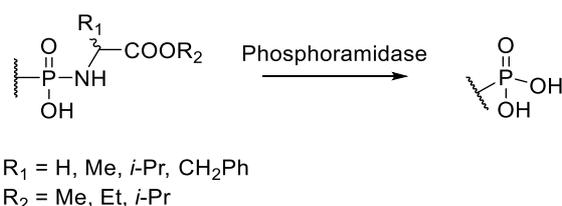


Schéma 17. Mécanisme de déprotection des prodrogues monoamidates.

Cette stratégie de prodrogues monoamidates a été appliquée au 2'-C-méthylcytidine, un nucléoside inhibiteur de la réplication du virus de l'hépatite C. Avec sa longue chaîne alkyle qui compense la perte de lipophilie de ce type de prodrogue, le composé **54** (Figure 25) a permis d'augmenter considérablement la quantité de nucléoside triphosphate dans les hépatocytes, même si son activité antivirale reste modérée<sup>209</sup>.

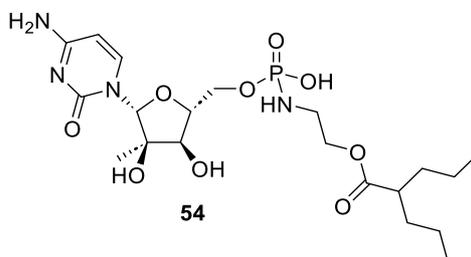


Figure 25. Exemple de prodrogue monoamidate.

### 3. Les phosphoramidates et phosphonamidates

Ces prodrogues sont un mélange entre un ester et un amide. Elles comportent le plus souvent un groupement aryloxy et un acide aminé estérifié, la L-alanine étant l'acide aminé le plus utilisé. Lorsqu'il s'agit de prodrogues de phosphates, on parle de phosphoramidates, et pour les phosphonates, de phosphonamidates. Développés dans les années 90 par le groupe de McGuignan comme prodrogues de nucléotides, les aryloxyphosphoramidates sont aussi appelés ProTides (Prodrogues de nucléoTides).

Le mécanisme de déprotection de ces ProTides est similaire à celui des bisamidates (Schéma 19). Une carboxypeptidase, ou la Cathepsine A, hydrolyse l'ester terminal porté par l'acide aminé. Une cyclisation spontanée conduit alors à un composé phénolique et un intermédiaire à 5 chaînons. Ce dernier subit une hydrolyse spontanée qui ouvre le cycle avant qu'une phosphoramidase ne libère le monophosphate ou l'acide phosphonique.

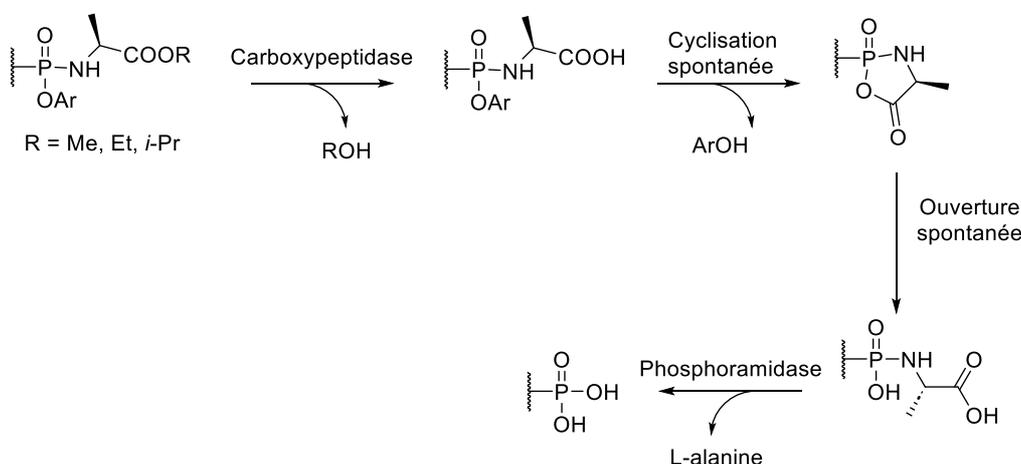


Schéma 18. Mécanisme de déprotection des prodrogues aryloxyphosphoramidates et aryloxyphosphonamidates.

Cette stratégie de prodrogue largement étudiée a conduit à deux molécules approuvées par la FDA. La première, le tenofovir alafenamide **55** (Figure 26), est une prodrogue phosphonamidate du PMPA utilisée contre le VIH. Comparativement au bis(POC)-PMPA, le tenofovir alafenamide est activé plus rapidement au sein des cellules, possède une meilleure biodisponibilité orale et nécessite des doses d'administration plus faibles pour une activité similaire. De plus, sa plus faible toxicité permet de l'envisager comme traitement sur le long terme<sup>210</sup>.

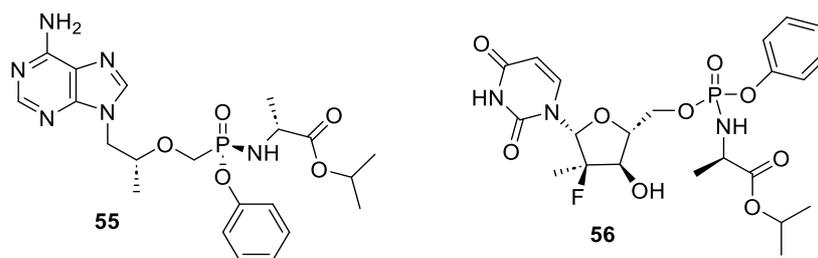


Figure 26. Exemples de prodrogues phosphoramidate, le tenofovir alafenamide **55**, et phosphoramidate, le sofosbuvir **56**.

La deuxième molécule approuvée par la FDA est le sofosbuvir **56** (Figure 26). Il s'agit d'une prodrogue phosphoramidate d'un nucléoside monophosphate qui est utilisée comme traitement contre l'hépatite C<sup>211</sup>.

Dans le cas des aryloxyphosphoramidates et aryloxyphosphonamidates, les composés phénoliques formés lors de la déprotection de la prodrogue peuvent être toxiques. L'utilisation d'un ester de phosphate ou de phosphonate non phénolique permettrait de diminuer cette toxicité. Malheureusement, les prodrogues les plus prometteuses sont celles comportant un groupement aryle. Cependant, la toxicité de ces prodrogues reste moindre par rapport à leur analogues bis(POM)<sup>208,210</sup>.

## Références

- (1) Bignold, L. P. 2nd edition.; Elsevier: London, United Kingdom ; San Diego, CA, 2020. doi:10.1016/B978-0-12-816920-9.00001-8.
- (2) National Cancer Institute. What is cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed Sep 1, 2023).
- (3) OMS. Cancer - Principaux repères <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Aug 31, 2023).
- (4) WHO. Christopher P. Wild, Elisabete Weiderpass, Bernard W. Stewart, Eds.; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2020.
- (5) Institut national du cancer. Panorama des cancers en France - Edition 2023 <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Panorama-des-cancers-en-France-edition-2023> (accessed Aug 31, 2023).
- (6) Egeblad, M.; Nakasone, E. S.; Werb, Z. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 884–901. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012.
- (7) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- (8) Anderson, N. M.; Simon, M. C. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R921–R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081.
- (9) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- (10) Gerweck, L. E. *Semin. Radiat. Oncol.* **1998**, *8*, 176–182. doi:10.1016/S1053-4296(98)80043-X.
- (11) Zhang, X.; Lin, Y.; Gillies, R. J. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1167–1170. doi:10.2967/jnumed.109.068981.
- (12) Ashby, B. S. *The Lancet* **1966**, *288*, 312–315. doi:10.1016/S0140-6736(66)92598-0.
- (13) Hanahan, D. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- (14) Cox, T. R.; Erler, J. T. *Tumor Microenviron. Ther.* **2012**, *1*, 14–18. doi:10.2478/tumor-2012-0002.
- (15) Pourquier, P. *Bull. Cancer (Paris)* **2011**, *98*, 1237–1251. doi:10.1684/bdc.2011.1471.
- (16) Lansiaux, A. *Bull. Cancer (Paris)* **2011**, *98*, 1263–1274. doi:10.1684/bdc.2011.1476.
- (17) Klemm, F.; Joyce, J. A. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 198–213. doi:10.1016/j.tcb.2014.11.006.
- (18) Ge, R.; Wang, Z.; Cheng, L. *Npj Precis. Oncol.* **2022**, *6*, 31. doi:10.1038/s41698-022-00272-w.
- (19) Weinmann, M.; Belka, C.; Plasswilm, L. *Oncol. Res. Treat.* **2004**, *27*, 83–90. doi:10.1159/000075611.
- (20) Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A. K. *Hypoxia* **2015**, *2015*, 83–92. doi:10.2147/HP.S93413.
- (21) Saxena, K.; Jolly, M. K. *Biomolecules* **2019**, *9*, 339. doi:10.3390/biom9080339.
- (22) Sharma, A.; Arambula, J. F.; Koo, S.; Kumar, R.; Singh, H.; Sessler, J. L.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 771–813. doi:10.1039/C8CS00304A.
- (23) Wilson, W. R.; Hay, M. P. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410. doi:10.1038/nrc3064.
- (24) Singleton, D. C.; Macann, A.; Wilson, W. R. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 751–772. doi:10.1038/s41571-021-00539-4.
- (25) Bai, R.; Li, Y.; Jian, L.; Yang, Y.; Zhao, L.; Wei, M. *Mol. Cancer* **2022**, *21*, 177. doi:10.1186/s12943-022-01645-2.

- (26) Wolfe, A. J.; Toh, E.; Shibata, N.; Rong, R.; Kenton, K.; FitzGerald, M.; Mueller, E. R.; Schreckenberger, P.; Dong, Q.; Nelson, D. E.; Brubaker, L. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1376–1383. doi:10.1128/JCM.05852-11.
- (27) Castillo, D. J.; Rifkin, R. F.; Cowan, D. A.; Potgieter, M. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 148. doi:10.3389/fcimb.2019.00148.
- (28) Berg, R. D.; Garlington, A. W. *Infect. Immun.* **1979**, *23*, 403–411. doi:10.1128/iai.23.2.403-411.1979.
- (29) Iida, N.; Dzutsev, A.; Stewart, C. A.; Smith, L.; Bouladoux, N.; Weingarten, R. A.; Molina, D. A.; Salcedo, R.; Back, T.; Cramer, S.; Dai, R.-M.; Kiu, H.; Cardone, M.; Naik, S.; Patri, A. K.; Wang, E.; Marincola, F. M.; Frank, K. M.; Belkaid, Y.; Trinchieri, G.; Goldszmid, R. S. *Science* **2013**, *342*, 967–970. doi:10.1126/science.1240527.
- (30) Vétizou, M.; Pitt, J. M.; Daillère, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M. P.; Duong, C. P. M.; Poirier-Colame, V.; Roux, A.; Becharef, S.; Formenti, S.; Golden, E.; Cording, S.; Eberl, G.; Schlitzer, A.; Ginhoux, F.; Mami, S.; Yamazaki, T.; Jacquelot, N.; Enot, D. P.; Bérard, M.; Nigou, J.; Opolon, P.; Eggermont, A.; Woerther, P.-L.; Chachaty, E.; Chaput, N.; Robert, C.; Mateus, C.; Kroemer, G.; Raoult, D.; Boneca, I. G.; Carbonnel, F.; Chamillard, M.; Zitvogel, L. *Science* **2015**, *350*, 1079–1084. doi:10.1126/science.aad1329.
- (31) Feng, Y.; Jaratlerdsiri, W.; Patrick, S. M.; Lyons, R. J.; Haynes, A.; Collins, C. C.; Stricker, P. D.; Bornman, M. S. R.; Hayes, V. M. *The Prostate* **2019**, *79*, 1731–1738. doi:10.1002/pros.23897.
- (32) Castellarin, M.; Warren, R. L.; Freeman, J. D.; Dreolini, L.; Krzywinski, M.; Strauss, J.; Barnes, R.; Watson, P.; Allen-Vercoe, E.; Moore, R. A.; Holt, R. A. *Genome Res.* **2012**, *22*, 299–306. doi:10.1101/gr.126516.111.
- (33) Shah, M. S.; DeSantis, T.; Yamal, J.-M.; Weir, T.; Ryan, E. P.; Cope, J. L.; Hollister, E. B. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0207002. doi:10.1371/journal.pone.0207002.
- (34) Nejman, D.; Livyatan, I.; Fuks, G.; Gavert, N.; Zwang, Y.; Geller, L. T.; Rotter-Maskowitz, A.; Weiser, R.; Mallel, G.; Gigi, E.; Meltser, A.; Douglas, G. M.; Kamer, I.; Gopalakrishnan, V.; Dadosh, T.; Levin-Zaidman, S.; Avnet, S.; Atlan, T.; Cooper, Z. A.; Arora, R.; Cogdill, A. P.; Khan, M. A. W.; Ologun, G.; Bussi, Y.; Weinberger, A.; Lotan-Pompan, M.; Golani, O.; Perry, G.; Rokah, M.; Bahar-Shany, K.; Rozeman, E. A.; Blank, C. U.; Ronai, A.; Shaoul, R.; Amit, A.; Dorfman, T.; Kremer, R.; Cohen, Z. R.; Harnof, S.; Siegal, T.; Yehuda-Shnaidman, E.; Gal-Yam, E. N.; Shapira, H.; Baldini, N.; Langille, M. G. I.; Ben-Nun, A.; Kaufman, B.; Nissan, A.; Golan, T.; Dadiani, M.; Levanon, K.; Bar, J.; Yust-Katz, S.; Barshack, I.; Peeper, D. S.; Raz, D. J.; Segal, E.; Wargo, J. A.; Sandbank, J.; Shental, N.; Straussman, R. *Science* **2020**, *368*, 973–980. doi:10.1126/science.aay9189.
- (35) Cummins, J.; Tangney, M. *Infect. Agent. Cancer* **2013**, *8*, 11. doi:10.1186/1750-9378-8-11.
- (36) Riquelme, E.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Montiel, M.; Zoltan, M.; Dong, W.; Quesada, P.; Sahin, I.; Chandra, V.; San Lucas, A.; Scheet, P.; Xu, H.; Hanash, S. M.; Feng, L.; Burks, J. K.; Do, K.-A.; Peterson, C. B.; Nejman, D.; Tzeng, C.-W. D.; Kim, M. P.; Sears, C. L.; Ajami, N.; Petrosino, J.; Wood, L. D.; Maitra, A.; Straussman, R.; Katz, M.; White, J. R.; Jenq, R.; Wargo, J.; McAllister, F. *Cell* **2019**, *178*, 795–806. doi:10.1016/j.cell.2019.07.008.
- (37) Bullman, S.; Peadarallu, C. S.; Sicinska, E.; Clancy, T. E.; Zhang, X.; Cai, D.; Neuberg, D.; Huang, K.; Guevara, F.; Nelson, T.; Chipashvili, O.; Hagan, T.; Walker, M.; Ramachandran, A.; Diosdado, B.; Serna, G.; Mulet, N.; Landolfi, S.; Ramon y Cajal, S.; Fasani, R.; Aguirre, A. J.; Ng, K.; Élez, E.; Ogino, S.; Tabernero, J.; Fuchs, C. S.; Hahn, W. C.; Nuciforo, P.; Meyerson, M. *Science* **2017**, *358*, 1443–1448. doi:10.1126/science.aal5240.

- (38) Yu, T.; Guo, F.; Yu, Y.; Sun, T.; Ma, D.; Han, J.; Qian, Y.; Kryczek, I.; Sun, D.; Nagarsheth, N.; Chen, Y.; Chen, H.; Hong, J.; Zou, W.; Fang, J.-Y. *Cell* **2017**, *170*, 548–563. doi:10.1016/j.cell.2017.07.008.
- (39) Vande Voorde, J.; Sabuncuoğlu, S.; Noppen, S.; Hofer, A.; Ranjbarian, F.; Fieuws, S.; Balzarini, J.; Liekens, S. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 13054–13065. doi:10.1074/jbc.M114.558924.
- (40) Geller, L. T.; Barzily-Rokni, M.; Danino, T.; Jonas, O. H.; Shental, N.; Nejman, D.; Gavert, N.; Zwang, Y.; Cooper, Z. A.; Shee, K.; Thaiss, C. A.; Reuben, A.; Livny, J.; Avraham, R.; Frederick, D. T.; Ligorio, M.; Chatman, K.; Johnston, S. E.; Mosher, C. M.; Brandis, A.; Fuks, G.; Gurbatri, C.; Gopalakrishnan, V.; Kim, M.; Hurd, M. W.; Katz, M.; Fleming, J.; Maitra, A.; Smith, D. A.; Skalak, M.; Bu, J.; Michaud, M.; Trauger, S. A.; Barshack, I.; Golan, T.; Sandbank, J.; Flaherty, K. T.; Mandinova, A.; Garrett, W. S.; Thayer, S. P.; Ferrone, C. R.; Huttenhower, C.; Bhatia, S. N.; Gevers, D.; Wargo, J. A.; Golub, T. R.; Straussman, R. *Science* **2017**, *357*, 1156–1160. doi:10.1126/science.aah5043.
- (41) Geller, L. T.; Straussman, R. *Mol. Cell. Oncol.* **2018**, *5*, e1405139. doi:10.1080/23723556.2017.1405139.
- (42) Lehouritis, P.; Cummins, J.; Stanton, M.; Murphy, C. T.; McCarthy, F. O.; Reid, G.; Urbaniak, C.; Byrne, W. L.; Tangney, M. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14554. doi:10.1038/srep14554.
- (43) Schaible, B.; Taylor, C. T.; Schaffer, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2114–2118. doi:10.1128/AAC.05574-11.
- (44) Wallach, O. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *239*, 1–54. doi:10.1002/jlac.18872390102.
- (45) Croteau, R. In *Discoveries in Plant Biology*; World Scientific, 1998; pp 329–343. doi:10.1142/9789812817563\_0020.
- (46) Ruzicka, L. *Experientia* **1953**, *9*, 357–367. doi:10.1007/BF02167631.
- (47) Ruzicka, L. *Proc. Chem. Soc.* **1959**, *1959*, 341–360. doi:10.1039/ps9590000341.
- (48) Ogura, K.; Koyama, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1263–1276. doi:10.1021/cr9600464.
- (49) Bloch, K. *Steroids* **1992**, *57*, 378–383. doi:10.1016/0039-128x(92)90081-j.
- (50) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517–524. doi:10.1042/bj2950517.
- (51) Bloch, K.; Rittenberg, D. *J. Biol. Chem.* **1942**, *143*, 297–298. doi:10.1016/S0021-9258(18)72689-6.
- (52) Folkers, K.; Shunk, C. H.; Linn, B. O.; Robinson, F. M.; Wittreich, P. E.; Huff, J. W.; Gilfillan, J. L.; Skeggs, H. R. In *Biosynthesis of terpenes and sterols*; Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M., Eds.; Novartis Foundation Symposia; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 1959; pp 20–45. doi:10.1002/9780470719121.ch3.
- (53) Bloch, K.; Chaykin, S.; Phillips, A. H.; De Waard, A. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2595–2604. doi:10.1016/S0021-9258(18)69744-3.
- (54) Bloch, K. Nobel lecture; 1964; pp 78–100.
- (55) Lynen, F. Nobel lecture; 1964; pp 103–138.
- (56) Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 326–332. doi:10.1016/S0021-9258(18)69523-7.
- (57) Henning, U.; Möslin, E. M.; Lynen, F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *83*, 259–267. doi:10.1016/0003-9861(59)90031-1.
- (58) Pandian, S.; Saengchjan, S.; Raman, T. S. *Biochem. J.* **1981**, *196*, 675–681. doi:10.1042/bj1960675.
- (59) Zhou, D.; White, R. H. *Biochem. J.* **1991**, *273*, 627–634. doi:10.1042/bj2730627.

- (60) Horbach, S.; Sahm, H.; Welle, R. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *111*, 135–140. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06375.x.
- (61) Bach, T. J. *Lipids* **1995**, *30*, 191–202. doi:10.1007/BF02537822.
- (62) Flesch, G.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 405–411. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14210.x.
- (63) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564–2566. doi:10.1021/ja9538344.
- (64) Rohmer, M. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574. doi:10.1039/a709175c.
- (65) Schwarz, M.; Arigoni, D. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier, 1999; pp 367–400. doi:10.1016/B978-0-08-091283-7.00043-6.
- (66) Cane, D. E.; Du, S.; Robinson, J. K.; Hsiung, Y.; Spenser, I. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7722–7723. doi:10.1021/ja9914947.
- (67) Fitzpatrick, T. B.; Moccand, C.; Roux, C. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1185–1193. doi:10.1002/cbic.201000084.
- (68) David, S.; Estramareix, B.; Fischer, J. C.; Therisod, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7341–7342. doi:10.1021/ja00414a053.
- (69) Park, J.-H.; Dorrestein, P. C.; Zhai, H.; Kinsland, C.; McLafferty, F. W.; Begley, T. P. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12430–12438. doi:10.1021/bi034902z.
- (70) Rosa Putra, S.; Disch, A.; Bravo, J.-M.; Rohmer, M. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *167*, 169–175. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13082.x.
- (71) Lange, B. M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13172–13177. doi:10.1073/pnas.240454797.
- (72) Boucher, Y.; Doolittle, W. F. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 703–716. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02004.x.
- (73) Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 375–388. doi:10.1351/pac200375020375.
- (74) Lombard, J.; Moreira, D. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 87–99. doi:10.1093/molbev/msq177.
- (75) Kuzuyama, T.; Seto, H. *Prod Jpn Acad Ser B* **2012**, *88*, 41–52. doi:10.2183/pjab.88.41.
- (76) Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Türbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. *Science* **1999**, *285*, 1573–1576. doi:10.1126/science.285.5433.1573.
- (77) Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 271–274. doi:10.1016/S0014-5793(96)01404-4.
- (78) Disch, A.; Hemmerlin, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 615–621. doi:10.1042/bj3310615.
- (79) Heuston, S.; Begley, M.; Gahan, C. G. M.; Hill, C. *Microbiology* **2012**, *158*, 1389–1401. doi:10.1099/mic.0.051599-0.
- (80) Seto, H.; Watanabe, H.; Furihata, K. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 797–7982. doi:10.1016/0040-4039(96)01787-X.
- (81) Seto, H.; Orihara, N.; Furihata, K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9497–9500. doi:10.1016/S0040-4039(98)02154-6.
- (82) Begley, M.; Gahan, C. G. M.; Kollas, A.-K.; Hintz, M.; Hill, C.; Jomaa, H.; Eberl, M. *FEBS Lett.* **2004**, *561*, 99–104. doi:10.1016/S0014-5793(04)00131-0.
- (83) Ershov, Yu. V. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 115–138. doi:10.1134/S0003683807020019.

- (84) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 9879–9884. doi:10.1073/pnas.95.17.9879.
- (85) Hoeffler, J.-F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446–4457. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03150.x.
- (86) Fox, D. T.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8360–8368. doi:10.1021/bi047312p.
- (87) Fox, D. T.; Poulter, C. D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1978–1985. doi:10.1021/jo048022h.
- (88) Wong, U.; Cox, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4926–4929. doi:10.1002/anie.200700647.
- (89) Munos, J. W.; Pu, X.; Mansoorabadi, S. O.; Kim, H. J.; Liu, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2048–2049. doi:10.1021/ja807987h.
- (90) Arigoni, D.; Giner, J.-L.; Sagner, S.; Wungsintaweeikul, J.; Zenk, M. H.; Kis, K.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Chem. Commun.* **1999**, 1127–1128. doi:10.1039/a902216c.
- (91) Proteau, P. J.; Woo, Y.-H.; Williamson, R. T.; Phaosiri, C. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 921–923. doi:10.1021/ol990839n.
- (92) Radykewicz, T.; Rohdich, F.; Wungsintaweeikul, J.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; Arigoni, D. *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157–160. doi:10.1016/S0014-5793(99)01743-3.
- (93) Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5378–5384. doi:10.1074/jbc.M109500200.
- (94) Yajima, S.; Nonaka, T.; Kuzuyama, T.; Seto, H.; Ohsawa, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **2002**, *131*, 313–317. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003105.
- (95) Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18401–18407. doi:10.1074/jbc.M300993200.
- (96) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 115–127. doi:10.1016/j.jmb.2004.10.030.
- (97) Henriksson, L. M.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 807–813. doi:10.1107/S0907444906019196.
- (98) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Åqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905–19916. doi:10.1074/jbc.M701935200.
- (99) Ricagno, S.; Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2004**, *1698*, 37–44. doi:10.1016/j.bbapap.2003.10.006.
- (100) Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S. J.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 236–243. doi:10.1021/bi0118207.
- (101) Björkelid, C.; Bergfors, T.; Unge, T.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 134–143. doi:10.1107/S0907444911052231.
- (102) Murkin, A. S.; Manning, K. A.; Kholodar, S. A. *Bioorg. Chem.* **2014**, *57*, 171–185. doi:10.1016/j.bioorg.2014.06.001.
- (103) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509–4512. doi:10.1016/S0040-4039(98)00802-8.
- (104) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Takagi, M.; Seto, H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19928–19932. doi:10.1074/jbc.M001820200.
- (105) Gustafson, C. E.; Kaul, S.; Ishiguro, E. E. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 1203–1205. doi:10.1128/jb.175.4.1203-1205.1993.
- (106) Wösten, M. M. S. M.; Ishiguro, E. E.; Zeijst, B. A. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *157*, 117–121. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12761.x.

- (107) Cunningham, F. X.; Lafond, T. P.; Gantt, E. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5841–5848. doi:10.1128/JB.182.20.5841-5848.2000.
- (108) Hintz, M.; Reichenberg, A.; Altincicek, B.; Bahr, U.; Gschwind, R. M.; Kollas, A.-K.; Beck, E.; Wiesner, J.; Eberl, M.; Jomaa, H. *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 317–322. doi:10.1016/S0014-5793(01)03191-X.
- (109) Altincicek, B.; Duin, E. C.; Reichenberg, A.; Hedderich, R.; Kollas, A.-K.; Hintz, M.; Wagner, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 437–440. doi:10.1016/S0014-5793(02)03726-2.
- (110) Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 1158–1163. doi:10.1073/pnas.032658999.
- (111) Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Gräwert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 1586–1591. doi:10.1073/pnas.0337742100.
- (112) Wolff, M.; Seemann, M.; Tse Sum Bui, B.; Frapart, Y.; Tritsch, D.; Estrabot, A. G.; Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A.; Marquet, A.; Rohmer, M. *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115–120. doi:10.1016/S0014-5793(03)00317-X.
- (113) Gräwert, T.; Kaiser, J.; Zepeck, F.; Laupitz, R.; Hecht, S.; Amslinger, S.; Schramek, N.; Schleicher, E.; Weber, S.; Haslbeck, M.; Buchner, J.; Rieder, C.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Rohdich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12847–12855. doi:10.1021/ja0471727.
- (114) Röhrich, R. C.; Englert, N.; Troschke, K.; Reichenberg, A.; Hintz, M.; Seeber, F.; Balconi, E.; Aliverti, A.; Zanetti, G.; Köhler, U.; Pfeiffer, M.; Beck, E.; Jomaa, H.; Wiesner, J. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6433–6438. doi:10.1016/j.febslet.2005.10.037.
- (115) Xiao, Y.; Liu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9722–9725. doi:10.1002/anie.200803452.
- (116) Xiao, Y.; Chang, W.; Liu, H.; Liu, P. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5912–5915. doi:10.1021/ol202559r.
- (117) Xu, W.; Lees, N. S.; Hall, D.; Welideniya, D.; Hoffman, B. M.; Duin, E. C. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4835–4849. doi:10.1021/bi3001215.
- (118) Li, J.; Wang, K.; Smirnova, T. I.; Khade, R. L.; Zhang, Y.; Oldfield, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6522–6525. doi:10.1002/anie.201302343.
- (119) Wang, W.; Wang, K.; Span, I.; Jauch, J.; Bacher, A.; Groll, M.; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11225–11234. doi:10.1021/ja303445z.
- (120) Span, I.; Gräwert, T.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Groll, M. *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 1–9. doi:10.1016/j.jmb.2011.11.033.
- (121) Masini, T.; Hirsch, A. K. H. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9740–9763. doi:10.1021/jm5010978.
- (122) Wang, W.; Oldfield, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4294–4310. doi:10.1002/anie.201306712.
- (123) Frank, A.; Groll, M. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5675–5703. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00537.
- (124) Rekitke, I.; Wiesner, J.; Röhrich, R.; Demmer, U.; Warkentin, E.; Xu, W.; Troschke, K.; Hintz, M.; No, J. H.; Duin, E. C.; Oldfield, E.; Jomaa, H.; Ermler, U. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17206–17207. doi:10.1021/ja806668q.
- (125) Gräwert, T.; Rohdich, F.; Span, I.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Eppinger, J.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756–5759. doi:10.1002/anie.200900548.
- (126) Rekitke, I.; Olkhova, E.; Wiesner, J.; Demmer, U.; Warkentin, E.; Jomaa, H.; Ermler, U. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3968–3972. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.029.
- (127) Gräwert, T.; Span, I.; Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Eppinger, J.; Bacher, A.; Groll, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1077–1081. doi:10.1073/pnas.0913045107.

- (128) Faus, I.; Reinhard, A.; Rackwitz, S.; Wolny, J. A.; Schlage, K.; Wille, H.; Chumakov, A.; Krasutsky, S.; Chaignon, P.; Poulter, C. D.; Seemann, M.; Schünemann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12584–12587. doi:10.1002/anie.201502494.
- (129) Adam, P.; Hecht, S.; Eisenreich, W.; Kaiser, J.; Gräwert, T.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Rohdich, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 12108–12113. doi:10.1073/pnas.182412599.
- (130) Van Hoof, S.; Lacey, C. J.; Röhrich, R. C.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1365–1370. doi:10.1021/jo701873t.
- (131) Jobelius, H.; Bianchino, G.; Borel, F.; Chaignon, P.; Seemann, M. *Molecules* **2022**, *27*, 708. doi:10.3390/molecules27030708.
- (132) Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. 6th edition.; Elsevier: Philadelphia, PA, 2020.
- (133) Brenner, M. B.; McLean, J.; Dialynas, D. P.; Strominger, J. L.; Smith, J. A.; Owen, F. L.; Seidman, J. G.; Ip, S.; Rosen, F.; Krangel, M. S. *Nature* **1986**, *322*, 145–149. doi:10.1038/322145a0.
- (134) Riganti, C.; Massaia, M.; Davey, M. S.; Eberl, M. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 1668–1676. doi:10.1002/eji.201242492.
- (135) Tanaka, Y.; Sano, S.; Nieves, E.; De Libero, G.; Rosa, D.; Modlin, R. L.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R.; Morita, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8175–8179. doi:10.1073/pnas.91.17.8175.
- (136) Su, C.; Jakobsen, I.; Gu, X.; Nei, M. *Immunogenetics* **1999**, *50*, 301–308. doi:10.1007/s002510050606.
- (137) Allison, T. J.; Garboczi, D. N. *Mol. Immunol.* **2001**, *38*, 1051–1061. doi:10.1016/S0161-5890(02)00034-2.
- (138) Imbert, C.; Olive, D. In *Tumor Microenvironment*; Birbrair, A., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; Vol. 1273, pp 91–104. doi:10.1007/978-3-030-49270-0\_5.
- (139) Morita, C. T.; Jin, C.; Sarikonda, G.; Wang, H. *Immunol. Rev.* **2007**, *215*, 59–76. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x.
- (140) Bonneville, M.; O'Brien, R. L.; Born, W. K. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 467–478. doi:10.1038/nri2781.
- (141) Harly, C.; Peigné, C.-M.; Scotet, E. *Front. Immunol.* **2015**, *5*, 657. doi:10.3389/fimmu.2014.00657.
- (142) Howard, J.; Loizon, S.; Tyler, C. J.; Duluc, D.; Moser, B.; Mechain, M.; Duvignaud, A.; Malvy, D.; Troye-Blomberg, M.; Moreau, J.-F.; Eberl, M.; Mercereau-Puijalon, O.; Déchanet-Merville, J.; Behr, C.; Mamani-Matsuda, M. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 1569–1579. doi:10.1093/infdis/jix149.
- (143) Constant, P.; Peyrat, M.-A.; Poquet, Y.; Puzo, G.; Bonneville, M.; Fournie, J.-J. *Science* **1994**, *264*, 267–270. doi:10.1126/science.8146660.
- (144) Bouet-Toussaint, F.; Cabillic, F.; Toutirais, O.; Le Gallo, M.; Thomas De La Pintièrre, C.; Daniel, P.; Genetet, N.; Meunier, B.; Dupont-Bierre, E.; Boudjema, K.; Catros, V. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 531–539. doi:10.1007/s00262-007-0391-3.
- (145) Ye, J.; Ma, C.; Wang, F.; Hsueh, E. C.; Toth, K.; Huang, Y.; Mo, W.; Liu, S.; Han, B.; Varvares, M. A.; Hoft, D. F.; Peng, G. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 6137–6148. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0348.
- (146) Bonneville, M.; Scotet, E. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 539–546. doi:10.1016/j.coi.2006.07.002.

- (147) Sandstrom, A.; Peigné, C.-M.; Léger, A.; Crooks, J. E.; Konczak, F.; Gesnel, M.-C.; Breathnach, R.; Bonneville, M.; Scotet, E.; Adams, E. J. *Immunity* **2014**, *40*, 490–500. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.003.
- (148) Hsiao, C.-H. C.; Lin, X.; Barney, R. J.; Shippy, R. R.; Li, J.; Vinogradova, O.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 945–954. doi:10.1016/j.chembiol.2014.06.006.
- (149) Wang, H.; Sarikonda, G.; Puan, K.-J.; Tanaka, Y.; Feng, J.; Giner, J.-L.; Cao, R.; Mönkkönen, J.; Oldfield, E.; Morita, C. T. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 5099–5113. doi:10.4049/jimmunol.1002697.
- (150) Gober, H.-J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 163–168. doi:10.1084/jem.20021500.
- (151) Thompson, K.; Rojas-Navea, J.; Rogers, M. J. *Blood* **2006**, *107*, 651–654. doi:10.1182/blood-200503-1025.
- (152) Wiemer, A. J. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1030–1039. doi:10.1002/cmdc.202000198.
- (153) Tanaka, Y.; Morita, C. T.; Tanaka, Y.; Nieves, E.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R. *Nature* **1995**, *375*, 155–158. doi:10.1038/375155a0.
- (154) Belmont, C.; Espinosa, E.; Halary, F.; Tang, Y.; Peyrat, M.-A.; Sicard, H.; Kozikowski, A.; Buelow, R.; Poupot, R.; Bonneville, M.; Fournié, J.-J. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1669–1670. doi:10.1096/fj.99-0909fje.
- (155) Espinosa, E. *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 645–654. doi:10.1016/S1286-4579(01)01420-4.
- (156) Reichenberg, A.; Hintz, M.; Kletschek, Y.; Kuhl, T.; Haug, C.; Engel, R.; Moll, J.; Ostrovsky, D. N.; Jomaa, H.; Eberl, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1257–1260. doi:10.1016/S0960-894X(03)00138-0.
- (157) Amslinger, S.; Hecht, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Adam, P.; Bacher, A.; Bauer, S. *Immunobiology* **2007**, *212*, 47–55. doi:10.1016/j.imbio.2006.08.003.
- (158) Tanaka, Y.; Kobayashi, H.; Terasaki, T.; Toma, H.; Aruga, A.; Uchiyama, T.; Mizutani, K.; Mikami, B.; Morita, C.; Minato, N. *Med. Chem.* **2007**, *3*, 85–99. doi:10.2174/157340607779317544.
- (159) Lentini, N. A.; Schroeder, C. M.; Harmon, N. M.; Huang, X.; Schladetsch, M. A.; Foust, B. J.; Poe, M. M.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 136–142. doi:10.1021/acsmchemlett.0c00586.
- (160) Behr, C.; Poupot, R.; Peyrat, M.-A.; Poquet, Y.; Constant, P.; Dubois, P.; Bonneville, M.; Fournie, J.-J. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 2892–2896. doi:10.1128/iai.64.8.2892-2896.1996.
- (161) Jomaa, H.; Feurle, J.; Lühs, K.; Kunzmann, V.; Tony, H.-P.; Herderich, M.; Wilhelm, M. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1999**, *25*, 371–378. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01362.x.
- (162) Eberl, M.; Altincicek, B.; Kollas, A.; Sanderbrand, S.; Bahr, U.; Reichenberg, A.; Beck, E.; Foster, D.; Wiesner, J.; Hintz, M.; Jomaa, H. *Immunology* **2002**, *106*, 200–211. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01414.x.
- (163) Belmont, C.; Espinosa, E.; Poupot, R.; Peyrat, M.-A.; Guiraud, M.; Poquet, Y.; Bonneville, M.; Fournié, J.-J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32079–32084. doi:10.1074/jbc.274.45.32079.
- (164) Boëdec, A.; Sicard, H.; Dessolin, J.; Herbette, G.; Ingoure, S.; Raymond, C.; Belmont, C.; Kraus, J.-L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1747–1754. doi:10.1021/jm701101g.
- (165) Berenson, J. R.; Lichtenstein, A.; Porter, L.; Dimopoulos, M. A.; Bordoni, R.; George, S.; Lipton, A.; Keller, A.; Ballester, O.; Kovacs, M.; Blacklock, H.; Bell, R.; Simeone, J. F.; Reitsma, D. J.; Heffernan, M.; Seaman, J.; Knight, R. D. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 593–602. doi:10.1200/JCO.1998.16.2.593.

- (166) Gallacher, S. J.; Ralston, S. H.; Patel, U.; Boyle, I. T. *The Lancet* **1989**, *334*, 42–43. doi:10.1016/S0140-6736(89)90277-8.
- (167) Dhodapkar, M. V.; Singh, J.; Mehta, J.; Fassas, A.; Desikan; Perlman, M.; Munshi, N. C.; Barlogie, B. *Br. J. Haematol.* **1998**, *103*, 530–532. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00976.x.
- (168) Wilhelm, M.; Kunzmann, V.; Eckstein, S.; Reimer, P.; Weissinger, F.; Ruediger, T.; Tony, H.-P. *Blood* **2003**, *102*, 200–206. doi:10.1182/blood-200212-3665.
- (169) Kunzmann, V.; Bauer, E.; Feurle, J.; Tony, F. W., Hans-Peter; Wilhelm, M. *Blood* **2000**, *96*, 384–392. doi:10.1182/blood.V96.2.384.
- (170) Bergstrom, J. D.; Bostedor, R. G.; Masarachia, P. J.; Reszka, A. A.; Rodan, G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 231–241. doi:10.1006/abbi.1999.1502.
- (171) Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 301–312. doi:10.1016/j.bcp.2014.03.009.
- (172) Eberl, M.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Kollas, A.-K.; Wiesner, J.; Jomaa, H. *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 4–10. doi:10.1016/S0014-5793(03)00483-6.
- (173) Espinosa, E.; Belmant, C.; Pont, F.; Luciani, B.; Poupot, R.; Romagné, F.; Brailly, H.; Bonneville, M.; Fournié, J.-J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18337–18344. doi:10.1074/jbc.M100495200.
- (174) Bennouna, J.; Levy, V.; Sicard, H.; Senellart, H.; Audrain, M.; Huret, S.; Rolland, F.; Bruzzoni-Giovanelli, H.; Rimbart, M.; Galéa, C.; Tiollier, J.; Calvo, F. *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1521–1530. doi:10.1007/s00262-010-0879-0.
- (175) Fournié, J.-J.; Sicard, H.; Poupot, M.; Bezombes, C.; Blanc, A.; Romagné, F.; Ysebaert, L.; Laurent, G. *Cell. Mol. Immunol.* **2013**, *10*, 35–41. doi:10.1038/cmi.2012.39.
- (176) Sicard, H.; Ingoure, S.; Luciani, B.; Serraz, C.; Fournié, J.-J.; Bonneville, M.; Tiollier, J.; Romagné, F. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5471–5480. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5471.
- (177) Shippy, R. R.; Lin, X.; Agabiti, S. S.; Li, J.; Zangari, B. M.; Foust, B. J.; Poe, M. M.; Hsiao, C.-H. C.; Vinogradova, O.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2373–2382. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00965.
- (178) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129–1143. doi:10.1351/pac199870051129.
- (179) Buckle, D. R.; Erhardt, P. W.; Ganellin, C. R.; Kobayashi, T.; Perun, T. J.; Proudfoot, J.; Senn-Bilfinger, J. *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1725–1758. doi:10.1351/PAC-REC-12-11-23.
- (180) Albert, A. *Nature* **1958**, *182*, 421–423. doi:10.1038/182421a0.
- (181) Albert, A. 1st edition.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1985. doi:10.1007/978-94-009-4846-4.
- (182) Harper, N. J. *J. Med. Pharm. Chem.* **1959**, *1*, 467–500. doi:10.1021/jm50006a005.
- (183) Stella, V. J.; Borchardt, R. T.; Hageman, M. J.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. W. 1st edition.; Springer: New York NY, 2007. doi:10.1007/978-0-387-49785-3.
- (184) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255–270. doi:10.1038/nrd2468.
- (185) Choi-Sledeski, Y. M.; Wermuth, C. G. In *The Practice of Medicinal Chemistry*; Elsevier, 2015; pp 657–696. doi:10.1016/B978-0-12-417205-0.00028-6.
- (186) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 559–587. doi:10.1038/nrd.2018.46.
- (187) Jornada, D.; Dos Santos Fernandes, G.; Chiba, D.; De Melo, T.; Dos Santos, J.; Chung, M. *Molecules* **2015**, *21*, 42. doi:10.3390/molecules21010042.

- (188) Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. In *Phosphorus Chemistry I*; Montchamp, J.-L., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2014; Vol. 360, pp 115–160. doi:10.1007/128\_2014\_561.
- (189) Rudge, E. S.; Chan, A. H. Y.; Leeper, F. J. *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 375–391. doi:10.1039/D1MD00297J.
- (190) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154–9218. doi:10.1021/cr5002035.
- (191) Heidel, K. M.; Dowd, C. S. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1625–1643. doi:10.4155/fmc-2018-0591.
- (192) Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1372–1379. doi:10.1021/jm00008a015.
- (193) Dang, Q.; Liu, Y.; Rydzewski, R. M.; Brown, B. S.; Robinson, E.; Van Poelje, P. D.; Colby, T. J.; Erion, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3412–3416. doi:10.1016/j.bmcl.2007.03.089.
- (194) Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A.; Loddo, R.; Sanna, G.; Collu, G.; Secci, B.; Colla, P. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3489–3498. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.033.
- (195) Srivastva, D. N.; Farquhar, D. *Bioorganic Chem.* **1984**, *12*, 118–129. doi:10.1016/0045-2068(84)90022-1.
- (196) Noble, S.; Goa, K. L. *Drugs* **1999**, *58*, 479–487. doi:10.2165/00003495-199958030-00010.
- (197) Dando, T. M.; Plosker, G. L. *Drugs* **2003**, *63*, 2215–2234. doi:10.2165/00003495-200363200-00007.
- (198) Brass, E. P. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 589–598. doi:10.1124/pr.54.4.589.
- (199) Chapman, T. M.; McGavin, J. K.; Noble, S. *Drugs* **2003**, *63*, 1597–1608. doi:10.2165/00003495-200363150-00006.
- (200) Gallant, J. E.; Deresinski, S. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *37*, 944–950. doi:10.1086/378068.
- (201) Benzaria, S.; Pélicano, H.; Johnson, R.; Maury, G.; Imbach, J.-L.; Aubertin, A.-M.; Obert, G.; Gosselin, G. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4958–4965. doi:10.1021/jm960289o.
- (202) Meier, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72. doi:10.1002/anie.199600701.
- (203) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99–104. doi:10.1016/S0960-894X(96)00597-5.
- (204) Erion, M. D.; Reddy, K. R.; Boyer, S. H.; Matelich, M. C.; Gomez-Galeno, J.; Lemus, R. H.; Ugarkar, B. G.; Colby, T. J.; Schanzer, J.; Van Poelje, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154–5163. doi:10.1021/ja031818y.
- (205) Reddy, K. R.; Matelich, M. C.; Ugarkar, B. G.; Gómez-Galeno, J. E.; DaRe, J.; Ollis, K.; Sun, Z.; Craigo, W.; Colby, T. J.; Fujitaki, J. M.; Boyer, S. H.; Van Poelje, P. D.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 666–676. doi:10.1021/jm7012216.
- (206) Tsukada, T.; Tamaki, K.; Tanaka, J.; Takagi, T.; Yoshida, T.; Okuno, A.; Shiiki, T.; Takahashi, M.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2938–2941. doi:10.1016/j.bmcl.2010.03.017.
- (207) Painter, G. R.; Almond, M. R.; Trost, L. C.; Lampert, B. M.; Neyts, J.; De Clercq, E.; Korba, B. E.; Aldern, K. A.; Beadle, J. R.; Hostetler, K. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3505–3509. doi:10.1128/AAC.00460-07.
- (208) Šmídková, M.; Dvořáková, A.; Tloušťová, E.; Česnek, M.; Janeba, Z.; Mertlíková-Kaiserová, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 664–671. doi:10.1128/AAC.01685-13.
- (209) Gardelli, C.; Attenni, B.; Donghi, M.; Meppen, M.; Pacini, B.; Harper, S.; Di Marco, A.; Fiore, F.; Giuliano, C.; Pucci, V.; Laufer, R.; Gennari, N.; Marcucci, I.; Leone, J. F.; Olsen, D. B.;

- MacCoss, M.; Rowley, M.; Narjes, F. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5394–5407. doi:10.1021/jm900447q.
- (210) Ray, A. S.; Fordyce, M. W.; Hitchcock, M. J. M. *Antiviral Res.* **2016**, *125*, 63–70. doi:10.1016/j.antiviral.2015.11.009.
- (211) Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H.-R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202–7218. doi:10.1021/jm100863x.

## **OBJECTIFS DU PROJET**



La présence de certaines bactéries inter- et intracellulaires au sein des tumeurs malignes diminue drastiquement l'efficacité des anticancéreux utilisés. Ainsi, cibler ces bactéries pourrait permettre d'éviter la métabolisation des agents anticancéreux. La voie du MEP étant présente chez la plupart des bactéries mais absente chez l'homme, toutes les enzymes de cette voie sont donc des cibles potentielles pour le développement d'antibactériens possédant de faibles effets secondaires. De plus, le dernier intermédiaire de cette voie de biosynthèse, le HMBPP, possède la particularité d'être un phosphoantigène particulièrement efficace, capable d'activer les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces cellules effectrices, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, jouent un rôle important dans la lutte contre les agents infectieux, mais également contre les cellules cancéreuses.

La stratégie globale de ce projet de thèse repose sur la dualité de la voie du MEP afin d'associer un inhibiteur de cette voie de biosynthèse et un phosphoantigène sur une seule et même molécule avec une libération sélective en milieu anoxique. Pour la conception d'antibactériens inédits, nous ciblons deux enzymes de la voie du MEP, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR) et la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase (IspH), respectivement la deuxième et la dernière enzyme. Afin de stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, nous utiliserons le HMBPP, phosphoantigène le plus efficace découvert à ce jour. Nous visons ainsi à (i) éviter la dégradation des antitumoraux par les bactéries et (ii) stimuler le système immunitaire afin d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux. A cet effet, nous envisageons la synthèse de prodrogues multimodales, c'est-à-dire des prodrogues permettant la libération *in vivo* de deux molécules actives avec des modes d'action différents : un inhibiteur de la voie du MEP et un phosphoantigène, le HMBPP. Ces deux composés pourraient être liés par une prodrogue *cycloSaligényle* (*cycloSal*) fonctionnalisée par un acide aminé (Figure 27). Ce type de prodrogue possède l'avantage d'une déprotection exclusivement dépendante du pH et d'être stable en milieu acide. Ces caractéristiques permettraient aux prodrogues de pouvoir atteindre les cellules cancéreuses et les bactéries intracellulaires sans risque d'hydrolyse dans la matrice extracellulaire acide du microenvironnement tumoral, tandis que le pH neutre, voire légèrement basique, à l'intérieur des cellules cancéreuses favoriserait la libération des composés actifs dans les bactéries ou à l'intérieur de leurs cellules hôtes.

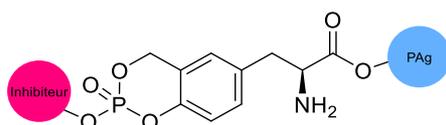


Figure 27. Structure générale des prodrogues multimodales envisagées. PAg : phosphoantigène.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la synthèse de prodrogues d'inhibiteurs des deux enzymes choisies, la DXR et IspH. La DXR, qui catalyse la transformation du DXP en MEP, est la plus étudiée des sept enzymes de cette voie. Malgré l'existence d'un inhibiteur

naturel, la fosmidomycine, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance vis-à-vis de cet antibiotique. Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur le développement d'inhibiteurs de cette enzyme. Au laboratoire, des inhibiteurs phosphonates bisubstrats ont été synthétisés. Il s'agit de molécules uniques qui ciblent à la fois la poche de fixation du substrat, le DXP, et une poche hydrophobe située entre celle du DXP et du NADPH. Certains de ces composés inhibent *in vitro* la DXR d'*E. coli* et *in vivo* la croissance de cette même bactérie avec une efficacité proche de celle de l'inhibiteur naturel. Afin d'augmenter la biodisponibilité de ces inhibiteurs, c'est-à-dire leur propension à traverser les parois bactériennes, nous avons choisi de les synthétiser sous forme de prodrogues de type acyloxyalkyle ester (Figure 28).

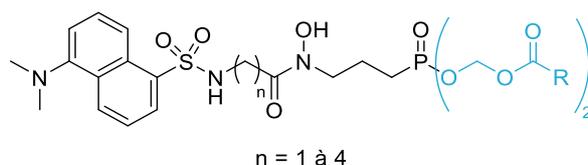


Figure 28. Structure des prodrogues acyloxyalkyle ester des inhibiteurs bisubstrats de la DXR.

IspH, quant à elle, catalyse la dernière étape de la voie du MEP et transforme le HMBPP en IPP et DMAPP. Inhiber cette enzyme générerait également une accumulation de HMBPP au sein des cellules cancéreuses, ce qui déclencherait l'activation des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 impliqués dans l'immunosurveillance des tumeurs. Ainsi, nous avons choisi de cibler quatre inhibiteurs diphosphate de IspH qui possèdent des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire sur l'enzyme de *E. coli* et *A. aeolicus*, mais qui n'ont jamais été testés *in vivo*. Nous avons alors choisi de synthétiser des prodrogues *cycloSal* de leurs précurseurs monophosphates (Figure 29). En effet, les prodrogues *cycloSal* libèrent un monophosphate qui pourra être phosphorylé *in vivo* pour conduire à l'inhibiteur désiré.

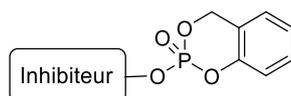


Figure 29. Exemple de prodrogue *cycloSal* envisagée avec les analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH.

L'activité antibactérienne des prodrogues bisubstrats de la DXR et des prodrogues des précurseurs monophosphates des inhibiteurs d'IspH sera évaluée *in vivo* sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* et *Mycobacterium smegmatis*.

Dans un deuxième temps, nous réaliserons également la synthèse de prodrogues *cycloSal* du précurseur monophosphate du HMBPP (Figure 30). Une fois ces prodrogues obtenues, des tests d'évaluation de l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont envisagés avec un laboratoire partenaire. De plus, afin de délivrer sélectivement les précurseurs monophosphate du HMBPP au sein du microenvironnement tumoral, nous avons considéré l'utilisation d'un groupement protecteur qui se libère en milieu anoxique tel qu'un *p*-nitrobenzyle par exemple.

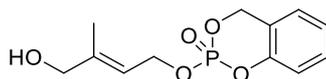


Figure 30. Exemple de prodrogue *cycloSal* envisagée avec l'analogue monophosphate du HMBPP, le HMBP.

Dans un troisième temps, nous mettrons au point la synthèse d'une prodrogue multimodale liant soit deux inhibiteurs, soit un inhibiteur et un immunostimulant. Afin d'obtenir de telles prodrogues, nous avons choisi d'utiliser le squelette de la tyrosine (Figure 27). Trois grandes étapes seront nécessaires pour valider ce concept de prodrogue multimodale : (i) l'évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées portant uniquement un inhibiteur, ou de l'activité immunostimulante de cette même prodrogue portant le HMBP, (ii) l'évaluation de l'activité antibactérienne ou immunostimulante d'une prodrogue *cycloSal* portant un second composé actif identique greffé sur l'acide aminé (soit deux inhibiteurs, soit deux phosphoantigènes) et (iii) l'évaluation de l'activité antibactérienne et immunostimulante d'une prodrogue multimodale portant un inhibiteur et un phosphoantigène.



**CHAPITRE 1 :**  
**SYNTHESE DE PRODRUGUES D'INHIBITEURS**  
**PHOSPHONATES DE LA DXR ET D'ANALOGUES**  
**MONOPHOSPHATES D'INHIBITEURS D'ISPH**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Partie 1 : Prodrogues d'inhibiteurs phosphonate de la DXR</b> .....  | 67  |
| I. Introduction .....   | 67  |
| A. Les inhibiteurs de la DXR.....   | 67  |
| B. Amélioration de la biodisponibilité : les prodrogues d'inhibiteurs de la DXR.....  | 79  |
| C. Vers des inhibiteurs plus spécifiques : la stratégie bisubstrat .....  | 81  |
| II. Synthèse de prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR.....  | 84  |
| A. Stratégie de synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR .....  | 85  |
| B. Synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR .....   | 87  |
| III. Evaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues protégées <b>148a-d</b> et des acides phosphoniques <b>145a-d</b> .....                                  | 93  |
| A. Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....  | 93  |
| B. Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....   | 97  |
| IV. Conclusion.....   | 98  |
| Références .....  | 100 |
| <b>Partie 2 : Prodrogues d'inhibiteurs phosphate de IspH/LytB</b> .....   | 105 |
| I. Introduction .....   | 105 |
| A. Les inhibiteurs d'IspH.....  | 105 |
| B. Les prodrogues de type <i>cycloSaligényle</i> ( <i>cycloSal</i> ).....   | 109 |
| II. Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> d'analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH.....   | 111 |
| A. Préparation des saligénols fonctionnalisés et des <i>cycloSal</i> phosphochloridates pour la synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>180</b> à <b>183</b> ..... | 112 |
| B. Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> de l'AMBPP monophosphate (AMBPP).....   | 113 |
| C. Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> du TMBPP monophosphate (TMBPP).....   | 120 |
| D. Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>182a-d</b> et <b>183a-d</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH.....                 | 123 |
| III. Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>193a</b> , <b>182a-d</b> et <b>183a-c</b> .....                                       | 124 |
| A. Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....  | 124 |
| B. Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....   | 127 |
| IV. Conclusion.....   | 128 |
| Références .....  | 131 |

## PARTIE 1 : PRODRUGUES D'INHIBITEURS PHOSPHONATE DE LA DXR

### I. Introduction

#### A. Les inhibiteurs de la DXR

##### 1. Les inhibiteurs naturels

La fosmidomycine (FR-31564) **57** et son analogue méthylé, le FR-900098 **58**, sont deux antibiotiques naturels isolés respectivement de *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces rubellomurinus* en 1980 (Figure 31). Ces deux phosphonates inhibent la croissance de la plupart des bactéries Gram négatives ainsi que celle de quelques Gram positives à l'exception de *Staphylococcus aureus*<sup>1-3</sup>. Ce n'est qu'une vingtaine d'années plus tard que la cible de la fosmidomycine **57** et du FR-900098 **58** a été identifiée : ce sont des inhibiteurs de la DXR, deuxième enzyme de la voie du MEP. Sur la DXR d'*E. coli*, la fosmidomycine **57** a été décrite comme un inhibiteur mixte, c'est-à-dire que l'inhibition est compétitive par rapport au substrat, mais pas par rapport au NADPH<sup>4</sup>, et qui se lie lentement à l'enzyme, mais avec une forte affinité pour cette dernière<sup>5</sup>.



Figure 31. Structures des inhibiteurs naturels : la fosmidomycine **57**, le FR-900098 **58** et la fosfoxacine **59**.

L'activité inhibitrice de ces deux antibiotiques a été évaluée *in vitro* sur la DXR de différentes bactéries. Ils inhibent notamment les enzymes de *P. falciparum*<sup>6</sup>, *M. tuberculosis*<sup>7</sup>, *A. baumannii*<sup>8</sup>, *E. coli*<sup>9</sup>, *P. aeruginosa*<sup>10</sup>, *K. pneumoniae*<sup>8</sup> et de *Yersina pestis*<sup>11</sup> avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire (Tableau 1). De manière générale, le FR-900098 **58** possède une meilleure affinité pour l'enzyme que la fosmidomycine. En effet, les structures cristallographiques des inhibiteurs avec la DXR suggèrent la présence d'interactions de Van der Waals entre le méthyle du FR-900098 **58** et l'indole d'un tryptophane conservé de la boucle (comme le Trp296 chez *P. falciparum*, le Trp212 chez *E. coli* ou le Trp203 chez *M. tuberculosis*). Ces interactions favorables supposent une fixation du FR-900098 **58** dans le site actif de manière identique à celle du DXP, le substrat naturel<sup>12</sup>.

Tableau 1. Valeurs d'IC<sub>50</sub> pour l'inhibition de la DXR de différents micro-organismes par la fosmidomycine **57** et le FR-900098 **58**.

|                         | DXR IC <sub>50</sub> (nM) |                        |                     |                |                      |                      |                  |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|
|                         | <i>P. falciparum</i> Dd2  | <i>M. tuberculosis</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Y. pestis</i> |
| Fosmidomycine <b>57</b> | 160                       | 510                    | 46,8                | 30             | 150                  | 20,2                 | 710              |
| FR-900098 <b>58</b>     | 15                        | 320                    | 23,9                | 30             | 150                  | 23,1                 | 231              |
| <b>Références</b>       | 6                         | 7                      | 8                   | 9              | 10                   | 8                    | 11               |

L'équipe de Jomaa a également étudié l'activité antipaludique de la fosmidomycine **57** et du FR-900098 **58** et a montré que ces deux composés (i) inhibent la DXR de différentes souches de *P. falciparum* avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire et (ii) inhibent *in vivo* la croissance de *Plasmodium* spp.<sup>6</sup>. Ces deux inhibiteurs naturels présentent une faible toxicité sur les animaux et ont été considérés comme des têtes de série pour la conception de nouveaux médicaments antipaludiques. Cependant, les essais cliniques réalisés avec la fosmidomycine **57** seule montrent que cette dernière est rapidement éliminée par les reins<sup>13</sup>. De plus, il est nécessaire d'utiliser un autre antibiotique aux propriétés antipaludiques en complément, la clindamycine, afin d'éviter une recrudescence de la maladie<sup>14,15</sup>.

Un dérivé phosphate de la fosmidomycine, la fosfoxacine **59**, a été isolé de *Pseudomonas fluorescens* PK-52 en 1990 et a lui aussi montré une activité antibactérienne vis-à-vis de quelques bactéries Gram négatives et Gram positives<sup>16</sup> (Figure 31). D'après une étude de Woo *et al.*, ce composé possède une meilleure activité inhibitrice que la fosmidomycine **57** (Ki = 58 nM) sur la DXR de *Synechocystis* sp. avec un Ki de 19 nM<sup>17</sup>. En revanche, lors de tests d'inhibition *in vitro* sur la DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis*, la fosfoxacine possède une valeur d'IC<sub>50</sub> quasiment dix fois supérieure à celle de la fosmidomycine et du FR-900098. Ces résultats suggèrent une moins bonne affinité du phosphate avec l'enzyme, ce qui est surprenant puisque le substrat de la DXR possède lui aussi un phosphate. La différence de propriétés physico-chimiques entre un phosphate et un phosphonate pourrait induire des modifications conformationnelles mineures, mais significatives, qui altèreraient l'affinité des inhibiteurs pour l'enzyme<sup>18</sup>.

En plus d'inhiber *in vivo* la croissance de *Plasmodium* spp.<sup>6</sup>, la fosmidomycine **57** et le FR-900098 **58** présentent une activité antibactérienne sur la plupart des bactéries Gram négatives et quelques Gram positives<sup>1,2,19</sup>. Toutefois, les charges négatives de leur groupement phosphonate bloquent leur pénétration cellulaire par diffusion passive. Ainsi, il a été montré chez *E. coli* que la fosmidomycine nécessite un transporteur du glycérol 3-phosphate (GlpT) pour entrer dans la cellule<sup>20,21</sup>. Certaines bactéries ont alors développé des mécanismes de

résistance vis-à-vis de la fosmidomycine. C'est le cas d'*E. coli* qui modifie son transporteur GltT pour bloquer la pénétration cellulaire de l'antibiotique<sup>22</sup> ou utilise des pompes à efflux situées dans sa membrane plasmique pour le rejeter activement dans le milieu extracellulaire<sup>23,24</sup>. Cependant, la fosmidomycine **57** est naturellement inefficace sur certaines bactéries. En effet, les bactéries qui ne possèdent pas ce transporteur, comme les mycobactéries par exemple, possèdent une résistance innée à la fosmidomycine **57**<sup>25,26</sup>.

Afin de pallier l'apparition de phénomènes de résistance, de nombreux groupes ont orienté leurs recherches vers le développement de nouveaux inhibiteurs de la DXR. Certains composés présentant une activité inhibitrice sur cette enzyme ont été découverts lors de l'étude de fixation du substrat au site actif et dérivent du DXP **17**, tandis que d'autres sont issus de modifications structurales de la fosmidomycine **57** et du FR-900098 **58**.

## 2. Les inhibiteurs synthétiques

### a) Les dérivés structuraux du DXP

Des dérivés structuraux du DXP avec des modifications au niveau des groupements hydroxyle ont été préparés dans le but d'étudier le mode de fixation du substrat à l'enzyme et d'élucider le mécanisme de la réaction catalysée par la DXR. Au laboratoire, l'activité des analogues **60** et **61**, où l'hydroxyle en C3 ou en C4 est substitué par un atome d'hydrogène, a été évaluée sur la DXR d'*E. coli* (Figure 32). Ces deux composés ne sont pas des substrats de l'enzyme et possèdent au contraire une activité inhibitrice, ce qui montre l'importance de la présence de ces deux hydroxyles pour que la réaction puisse avoir lieu. Les composés **60** et **61** sont donc des inhibiteurs réversibles mixtes avec des  $K_i$  de 800  $\mu\text{M}$  et 120  $\mu\text{M}$  respectivement<sup>27</sup>, ce qui reste une inhibition faible comparée à la fosmidomycine ( $K_i = 38 \text{ nM}$ )<sup>4</sup>. Lors de l'évaluation de ces mêmes composés sur la DXR de *Synechocystis* sp., une activité inhibitrice légèrement supérieure a été observée avec des  $K_i$  de 150  $\mu\text{M}$  et 30  $\mu\text{M}$  respectivement<sup>28</sup>. En effet, malgré le haut degré de conservation de l'enzyme chez divers micro-organismes, il existe tout de même quelques différences structurales qui peuvent influencer l'affinité d'un composé pour le site actif. Le groupe de Liu a quant à lui synthétisé des analogues où l'hydroxyle en C3 (composé **62**) ou en C4 (composé **63**) est substitué par un atome de fluor (Figure 32). Ces deux molécules ne sont pas non plus des substrats de l'enzyme, ce qui confirme le rôle crucial des deux hydroxyles en C3 et en C4. Les composés **62** et **63** ont alors été identifiés comme des inhibiteurs non compétitifs de la DXR d'*E. coli* avec des  $K_i$  respectifs de 444  $\mu\text{M}$  et 733  $\mu\text{M}$ <sup>29</sup>.

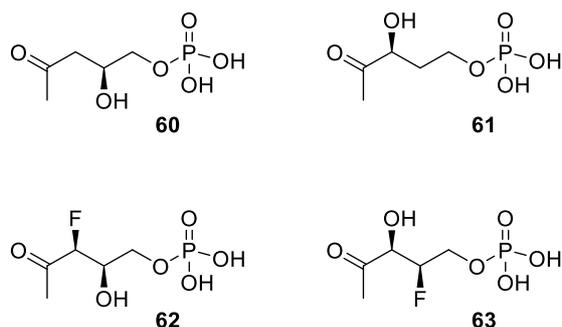


Figure 32. Structures des dérivés du DXR où un des hydroxyles est substitué soit par un atome d'hydrogène, soit par un atome de fluor.

Walker et Poulter ont préparé une série d'analogues du DXR où la fonction cétone est remplacée par différents groupements comme un acide carboxylique **64**, un ester de méthyle **65**, une hydroxylamine **66**, un amide **67**, un alcool **68** et une amine **69** afin d'étudier leur activité inhibitrice sur la DXR d'*E. coli* (Figure 33). L'hydroxylamine **66** n'est pas un inhibiteur de cette enzyme et son squelette, plus long d'un atome par rapport à celui de la fosmidomycine, pourrait rendre son insertion dans le site actif du DXR plus difficile. En outre, malgré une chélation possible de l'amine avec le cation  $Mg^{2+}$ , le composé **69** ne présente aucune activité inhibitrice sur l'enzyme, probablement parce que l'amine est sous forme protonée dans le site actif. En revanche, les composés **64**, **65**, **67** et **68** sont capables de chélater le cation métallique puisqu'ils ont été identifiés comme des inhibiteurs faibles à modérés avec des  $IC_{50}$  compris entre 0,25 et 1  $mM$ <sup>30</sup>. De plus, l'amide **67** possède une affinité plutôt faible pour la DXR de *Synechocystis* sp. avec un  $K_i$  de 90  $\mu M$ , ce qui est cohérent avec la faible activité inhibitrice observée précédemment<sup>28</sup>.

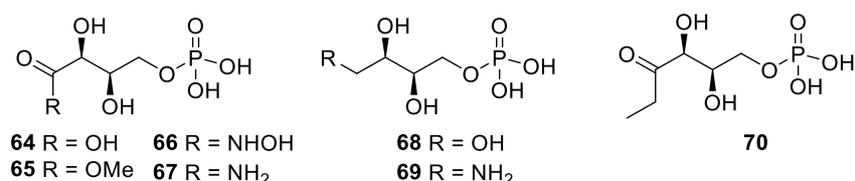


Figure 33. Structures des dérivés du DXR modifiés au niveau de la cétone et du méthyle en C1.

L'effet de la substitution du méthyle en position C1 a également été étudié par Fox et Poulter, notamment afin d'élucider le mécanisme du réarrangement intramoléculaire du DXP **17** en 2-C-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **23**. Ainsi, l'activité des analogues mono- **24**, di- **25**, trifluoré **26** (Figure 5, cf introduction générale, partie II.C.1) et de l'analogue **70** possédant un groupement éthyle (Figure 33) a été évaluée sur la DXR d'*E. coli*. Le composé monofluoré **24** s'est avéré être un substrat de l'enzyme, tandis que les composés difluoré **25**, trifluoré **26** et celui comportant un éthyle **70** sont de faibles inhibiteurs avec des  $IC_{50}$  de l'ordre du millimolaire. En effet, les effets électroniques dus à la substitution par deux ou trois atomes de fluor, ainsi que la gêne stérique imposée par ces derniers et par le groupement éthyle, pourraient influencer la fixation des inhibiteurs dans le site actif de l'enzyme<sup>31,32</sup>. La même observation est faite sur

la DXR de *Synechocystis* sp. avec le composé **70** puisqu'il possède ici encore une affinité avec l'enzyme ( $K_i = 630 \mu\text{M}$ ) bien plus faible que la fosmidomycine ( $K_i = 21 \text{ nM}$ )<sup>28</sup>.

*b) Les dérivés structuraux des inhibiteurs naturels*

La fosmidomycine **57** et le FR-900098 **58** sont des mimes du substrat naturel de la DXR. Ils comportent chacun : (i) un acide rétrohydroxamique qui se chélate au cation métallique divalent, (ii) un bras espaceur d'une longueur de trois carbones et (iii) un groupement phosphonate qui se fixe dans le site actif du DXP. Afin de faire face à l'apparition de phénomènes de résistance à la fosmidomycine et à son élimination rapide par les reins, le développement de nouveaux inhibiteurs est nécessaire et il s'appuie sur des variations au niveau de ces trois caractéristiques structurales.

*(1) Modifications de l'acide rétrohydroxamique*

Au laboratoire, l'activité inhibitrice des analogues *N*-H **71** et *N*-méthylé **72** des inhibiteurs naturels où l'acide rétrohydroxamique est remplacé par un acide hydroxamique a été évaluée sur la DXR d'*E. coli* (Figure 34). Avec des valeurs de  $K_i$  de l'ordre du nanomolaire, ces deux composés ont une très bonne affinité pour l'enzyme, **72** étant le meilleur inhibiteur des deux ( $IC_{50}$  de 48 nM contre 170 nM pour **71**) avec une activité comparable à celle de la fosmidomycine ( $IC_{50} = 32 \text{ nM}$ )<sup>33</sup>. Cette forte affinité peut s'expliquer par le fait que ces deux composés possèdent les mêmes caractéristiques structurales que les inhibiteurs naturels : un phosphonate, un espaceur comportant trois carbones et une pince chélatante très similaire. En outre, de la même manière que pour le FR-900098 et la fosmidomycine, une meilleure efficacité est observée pour le composé **72** comportant un groupement méthyle. En effet, l'acide phosphonohydroxamique **71** inhibe la DXR de *M. smegmatis* avec une  $IC_{50}$  de l'ordre du micromolaire, tandis que l'efficacité de l'acide phosphonohydroxamique *N*-méthylé **72** ( $IC_{50} = 410 \text{ nM}$ ) est équivalente à celle de la fosmidomycine **57** ( $IC_{50} = 510 \text{ nM}$ ) et du FR-900098 **58** ( $IC_{50} = 320 \text{ nM}$ )<sup>7</sup>. Il est possible qu'ici encore des interactions favorables entre le méthyle de l'inhibiteur et l'indole du tryptophane conservé de la boucle flexible de la DXR confère au composé **72** une meilleure affinité pour l'enzyme. En revanche, lorsque ce méthyle est substitué par un éthyle comme sur le composé **73**, une perte de l'activité inhibitrice est observée avec une  $IC_{50}$  de l'ordre du micromolaire. L'éthyle plus volumineux s'insérerait moins bien dans le site actif ce qui diminuerait les interactions favorables entre l'enzyme et l'inhibiteur<sup>34</sup>. Les composés **71** et **72** inhibent la croissance d'*E. coli*, même s'ils restent moins efficaces que la fosmidomycine. Toutefois, le composé **72** s'est montré actif sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine, ce qui laisse penser qu'il pénètre dans la cellule *via* un mode de transport différent<sup>33</sup>. En ce qui concerne *M. smegmatis*, aucun de ces acides phosphonohydroxamiques n'a été capable d'inhiber la croissance de cette mycobactérie, ce qui n'est pas surprenant compte tenu du fait qu'elle ne possède pas le transporteur GlpT et que sa paroi épaisse la rend naturellement résistante à de nombreux antibiotiques<sup>35,36</sup>.

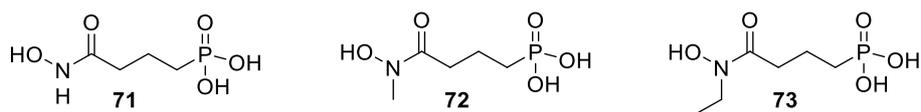


Figure 34. Structures des analogues phosphonohydroxamiques de la fosmidomycine.

La substitution de l'acide rétrohydroxamique par un autre groupement susceptible de chélater le cation métallique divalent dans le site actif de la DXR a également été envisagée. Deng *et al* ont ainsi testé sur la DXR d'*E. coli* une série de catéchols comportant un phosphonate. Bien que moins efficaces que la fosmidomycine ( $IC_{50} = 80$  nM), les composés **74** et **75** possèdent la meilleure activité inhibitrice avec des  $IC_{50}$  respectifs de 24,8 et 4,5  $\mu$ M (Figure 35). Leur étude de *docking* suggère également que le composé **75** pourrait se fixer à l'enzyme de manière très similaire à l'inhibiteur naturel avec le phosphonate qui viendrait se placer quasiment au même endroit et le catéchol qui se chélaterait au cation  $Mg^{2+}$ , ce qui expliquerait son affinité plus forte pour l'enzyme. Cependant, lors de tests d'inhibition de croissance sur un panel de quatre bactéries possédant la voie du MEP, le composé **75** n'a montré qu'une faible activité antibactérienne avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à 1 mM. Il est alors possible que sa perméabilité aux membranes cellulaires soit limitée par le groupement phosphonate qui se retrouve chargé négativement à pH physiologique<sup>37</sup>. Andaloussi *et al* ont également conçu des inhibiteurs en modifiant la pince chélatante et les ont testés sur la DXR de *M. tuberculosis*. Ainsi, le catéchol **74** possède une activité inhibitrice très intéressante de l'ordre du micromolaire ( $IC_{50} = 41$   $\mu$ M). Ils ont également observé une activité similaire lorsque la pince chélatante fait partie d'un cycle à 6 chaînons puisque le composé **76** possède une  $IC_{50}$  de 53  $\mu$ M. En revanche, aucune activité inhibitrice n'est obtenue avec des cycles à 5 chaînons. Bien que les composés **74** et **76** possèdent une activité inhibitrice prometteuse sur l'enzyme, seule une faible activité antibactérienne a été observée, probablement toujours limitée par la faible biodisponibilité du phosphonate<sup>38</sup>.

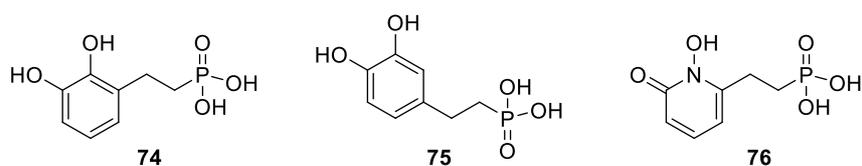


Figure 35. Structures des analogues de la fosmidomycine où la pince chélatante est remplacée par un catéchol ou fait partie d'un cycle à 6 chaînons.

L'influence d'autres groupements chélatants bidendates a également été étudiée. Des analogues où l'acide rétrohydroxamique est substitué par une hydrazide **77**, un dithiocarbamate **78** et **79**, ou un *O*-méthylhydroxamate dans le cas de **80** et **81** ont notamment été préparés au laboratoire (Figure 36). Ces cinq composés possèdent une activité inhibitrice faible de l'ordre du millimolaire sur la DXR d'*E. coli*, probablement due à une chélation plus faible avec ces groupements. Il est en effet possible que l'hydrazide soit sous forme protonée à pH physiologique, diminuant drastiquement sa faculté à se lier au cation divalent, tandis que la

gêne stérique induite par le méthyle du *O*-méthylhydroxamate pourrait empêcher la chélation des composés **80** et **81**. Concernant les dithiocarbamates, cette faible activité pourrait s'expliquer par la faible affinité de l'atome de soufre, considéré comme une base molle, pour un cation dur tel que  $Mg^{2+}$ <sup>39</sup>.

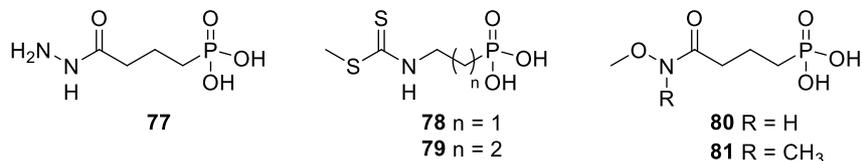


Figure 36. Structures des analogues de la fosmidomycine où la pince chélatante est substituée par d'autres groupements chélatants : une hydrazide, un dithiocarbamate ou un *O*-méthylhydroxamate.

En se basant sur l'analyse de structures cristallographiques et des études de *docking*, Deng *et al* ont développé des inhibiteurs de la DXR avec un caractère hydrophobe. Ils ont ainsi synthétisé une série de composés où l'acide rétrohydroxamique est remplacé par des groupements pyridine ou quinoléine (Figure 37). Outre une activité inhibitrice modérée sur la DXR d'*E. coli* avec des IC<sub>50</sub> compris entre 0,84 et 15,9  $\mu$ M, l'étude cristallographique des inhibiteurs **82**, **83** et **84** avec l'enzyme a révélé un nouveau mode de fixation. En effet, les inhibiteurs se fixaient dans le site actif de l'enzyme grâce à des interactions de  $\pi$ - $\pi$  *stacking* et de transfert de charge qui s'établiraient entre leur groupement pyridine/quinoléine d'une part, et l'indole du Trp211 d'autre part, ouvrant l'accès à une poche hydrophobe cryptique<sup>40</sup>. Une série d'inhibiteurs dérivés des composés **82**, **83** et **84** a également été testée sur la DXR de *M. tuberculosis*. Cependant, à l'exception de **82** et **84**, les autres composés préparés possèdent une activité inhibitrice plus faible sur la DXR de la mycobactérie comparée à celle d'*E. coli*. L'analyse de la structure cristallographique de la DXR de *M. tuberculosis* avec un des inhibiteurs suggère que l'absence d'interactions de  $\pi$ - $\pi$  *stacking* entre ce dernier et le Trp203 pourrait expliquer cette perte d'activité<sup>41</sup>. Toutefois, aucune évaluation de l'inhibition de la croissance des bactéries n'a été décrite pour ces inhibiteurs.

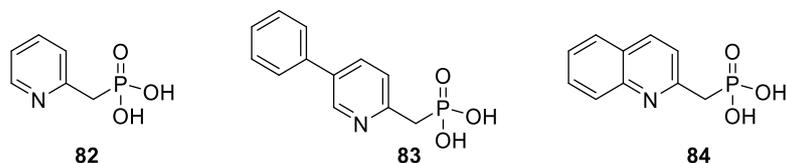


Figure 37. Structures des analogues de la fosmidomycine où la pince chélatante est substituée par un groupement plus hydrophobe.

La perte d'activité inhibitrice observée lorsque l'acide rétrohydroxamique ou l'acide hydroxamique est modifié souligne l'importance de ce groupement pour la chélation au cation divalent.

## (2) Modifications de l'espaceur

L'influence de la longueur de la chaîne carbonée du bras espaceur a d'abord été étudiée. Des analogues de la fosmidomycine et du FR-900098 avec un espaceur comportant deux, quatre ou cinq carbones n'ont montré aucune activité inhibitrice sur la DXR de *M. tuberculosis*<sup>42</sup>. Lorsque la longueur de la chaîne carbonée est modifiée sur les analogues acides hydroxamiques de la fosmidomycine et du FR-900098, une diminution significative de l'activité inhibitrice sur la DXR d'*E. coli* est également observée<sup>34</sup>. Ces résultats montrent que la longueur de chaîne optimale est de trois carbones.

L'équipe de Van Calenbergh, quant à elle, a étudié l'influence de l'insertion d'un hétéroatome dans la chaîne carbonée sur les interactions hydrophobes entre l'espaceur et le site actif. Ainsi, ils ont synthétisé les composés **85** à **90** où un atome d'oxygène a été inséré en position  $\beta$  ou  $\gamma$  par rapport au phosphonate de la fosmidomycine, du FR-900098 ou de leurs analogues acides hydroxamiques (Figure 38). Au contraire des composés **86** et **88** qui inhibent les DXR d'*E. coli* et de *P. falciparum* avec une efficacité similaire à celle des inhibiteurs naturels, les carbamates **89** et **90** avec l'oxygène en position  $\gamma$  ne possèdent aucune activité inhibitrice sur l'enzyme de ces deux micro-organismes. Il est possible que la liaison éther formée par l'oxygène en  $\beta$  reste suffisamment hydrophobe pour assurer une bonne affinité des inhibiteurs avec l'enzyme, tandis que la formation de carbamates abroge leurs propriétés inhibitrices<sup>43</sup>. De plus, seuls les composés méthylés ont une activité intéressante, suggérant ici encore des interactions favorables avec le tryptophane de la boucle flexible. En revanche, ces composés n'ont pas fait l'objet de tests d'inhibition de croissance.

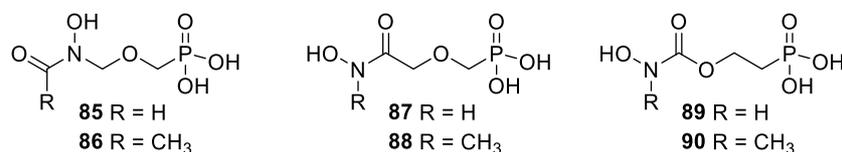


Figure 38. Structures des analogues de la fosmidomycine avec insertion d'un atome d'oxygène en position  $\beta$  ou  $\gamma$  au sein de l'espaceur.

En outre, plusieurs groupes ont étudié l'influence de l'insertion d'un groupement aromatique déficient en électrons en position  $\alpha$  par rapport au phosphonate sur la lipophilie et les propriétés électroniques des inhibiteurs. Les dérivés **91** et **92** n'ont pas montré d'amélioration de l'activité inhibitrice sur la DXR d'*E. coli*, en revanche, ils inhibent la DXR de deux souches de *P. falciparum* avec une meilleure efficacité que les inhibiteurs naturels<sup>9</sup>, et celle de *M. tuberculosis* avec une efficacité équivalente à celle du FR-900098<sup>44</sup> (Figure 39). Ces deux composés ont également fait l'objet de tests d'inhibition de croissance sur *P. falciparum* et *M. tuberculosis*. Si aucune activité n'a été détectée sur la mycobactérie<sup>44</sup>, **91** et **92** inhibent la croissance du parasite avec plus d'efficacité que les inhibiteurs naturels<sup>9</sup>. Ces différences d'activité pourraient venir du fait que la présence du phényle disubstitué (i) favorise les interactions de l'inhibiteur avec la DXR de *P. falciparum*, (ii) augmente la lipophilie de

l'inhibiteur, donc sa capacité à traverser les membranes du parasite et (iii) impacte la fermeture de la boucle flexible chez *M. tuberculosis*, conduisant à un complexe enzyme-inhibiteur plus ouvert qu'avec la fosmidomycine<sup>9,44</sup>. En se basant sur ces résultats prometteurs, des composés  $\alpha$ -arylés comportant cette fois-ci un acide hydroxamique ont été envisagés. Les dérivés **93** et **94** portant deux atomes de fluor en position C3 et C4 sur le groupement phényle possèdent une activité inhibitrice similaire à celle de la fosmidomycine sur la DXR d'*E. coli* et sont de bien meilleurs inhibiteurs de l'enzyme de *P. falciparum* avec des IC<sub>50</sub> de 3 nM contre 140 nM pour l'inhibiteur naturel. De même, l'analogue **95** portant deux atomes de chlore inhibe la DXR de ces deux mêmes micro-organismes avec une meilleure efficacité que la fosmidomycine. L'analyse de la structure cristallographique de **94** avec la DXR d'*E. coli* suggère qu'en présence de l'inhibiteur, la boucle flexible garde une conformation ouverte, ce qui n'est pas le cas avec la fosmidomycine. Toutefois, des interactions de Van der Waals intramoléculaires entre le méthyle de l'inhibiteur et son cycle aromatique pourraient favoriser une conformation thermodynamiquement stable au sein du site actif, renforçant ainsi son affinité pour l'enzyme. Le composé **93** s'est également avéré aussi efficace que la chloroquine pour inhiber *in vivo* la croissance de *P. berghei* chez des souris<sup>45</sup>.

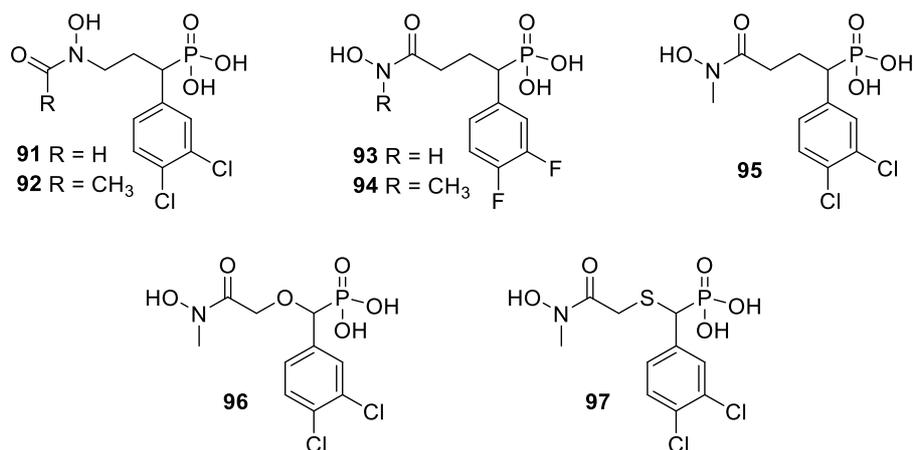


Figure 39. Structures des analogues de la fosmidomycine substitués en  $\alpha$  du phosphonate par un groupement aryle déficient en électrons.

Dans le but d'améliorer l'affinité des dérivés précédents pour l'enzyme, le groupe de Kurz a synthétisé les acides phosphonohydroxamiques **96** et **97** où le CH<sub>2</sub> en  $\beta$  du phosphonate a été substitué soit par un atome d'oxygène, soit par un atome de soufre (Figure 39). Des tests sur la DXR d'*E. coli*, de *M. tuberculosis*, de *P. falciparum*<sup>46,47</sup> et de *Y. pestis*<sup>48</sup> ont montré que l'analogue « thia » possède une meilleure activité inhibitrice que les analogues « carba » et « oxa » et que la fosmidomycine. En effet, l'étude cristallographique des différents complexes enzyme-inhibiteur-NADPH avec les DXR de différents micro-organismes suggère qu'une interaction hydrophobe favorable s'établirait entre l'atome de soufre et une méthionine conservée (la Met298 dans le cas de *P. falciparum*). Dans le cas des analogues « oxa », il y aurait un effet répulsif entre l'oxygène de l'inhibiteur et le soufre de cette méthionine, tandis

que le CH<sub>2</sub> des analogues « carba » n’interagirait tout simplement pas avec cet acide aminé<sup>47</sup>. Concernant les tests d’inhibition de croissance, ces composés n’ont été testés que sur *Y. pestis*. Les composés **95** et **96** ne possèdent pas d’activité antibactérienne, tandis que le *S*-(+)-**97** présente une inhibition modérée (CMI = 128 µg.mL<sup>-1</sup>) identique à celle de la fosmidomycine, ce qui est probablement dû au groupement phosphonate qui se retrouve chargé à pH physiologique<sup>48</sup>.

En se basant sur les différentes études de modification structurale précédentes, l’équipe de Song a décrit la synthèse des analogues **98** à **101** de la fosmidomycine et du FR-900098 portant une pyridine en position α, groupement déficient en électrons et susceptible d’augmenter le caractère lipophile des inhibiteurs (Figure 40). Sur l’enzyme d’*E. coli*, une activité inhibitrice similaire à celle de la fosmidomycine (K<sub>i</sub> = 34 nM) a été observée pour les composés **99** (K<sub>i</sub> = 42 nM) et **100** (K<sub>i</sub> = 35 nM), tandis que sur la DXR de *P. falciparum*, les quatre phosphonates sont plus efficaces que la fosmidomycine (K<sub>i</sub> = 21 nM) avec des valeurs de K<sub>i</sub> inférieures à 15 nM. La structure cristallographique de **101** avec la DXR de *P. falciparum* indique que le cycle pyridinique s’insérerait favorablement dans une autre poche hydrophobe et qu’une liaison hydrogène s’établirait entre son azote et le thiol de la Cys338. Ces deux types d’interactions pourraient expliquer la plus grande affinité pour l’enzyme des composés synthétisés par rapport à la fosmidomycine. Lors des tests d’inhibition de croissance du parasite, les quatre composés ont montré une efficacité proche, voire légèrement supérieure à celle de la fosmidomycine, y compris sur la souche multirésistante Dd2, sans toutefois surpasser la chloroquine, un antipaludique utilisé comme témoin. De manière surprenante, les composés formylés **98** et **100** ont montré une meilleure inhibition de la croissance de la souche Dd2 alors qu’ils possèdent une moins bonne affinité pour l’enzyme. Cette différence d’activité pourrait venir du fait que **99** et **101** posséderaient une moins bonne perméabilité à la membrane cellulaire du parasite<sup>49</sup>.

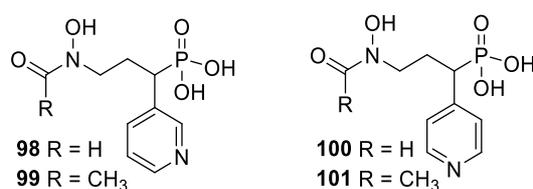


Figure 40. Structures des analogues de la fosmidomycine substitués en position α par une pyridine.

## (3) Modifications du phosphonate

Afin de concevoir des inhibiteurs qui miment davantage le substrat de la DXR, mais aussi la fosfoxacine **59**, inhibiteur phosphate naturel qui a montré une activité antibactérienne sur diverses bactéries<sup>16</sup>, certains groupes ont préparé des analogues phosphates de la fosmidomycine et du FR-900098. De la même manière que la fosfoxacine, l'activité inhibitrice de son dérivé méthylé synthétique **102** n'est pas identique pour toutes les DXR (Figure 41). Ainsi, ce composé est plus efficace que la fosmidomycine pour inhiber la DXR de *Synechocystis* sp. avec un  $K_i$  de 2 nM contre 57 nM<sup>17</sup>, mais possède des valeurs d' $IC_{50}$  plus faibles que l'inhibiteur naturel sur la DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis*<sup>18</sup>. Les analogues **103** et **104** de la fosfoxacine possédant un acide hydroxamique ont également été préparés (Figure 41). Le composé **104** possède une activité inhibitrice très proche de celle de la fosmidomycine sur la DXR d'*E. coli*, tandis que son affinité pour l'enzyme de *M. smegmatis* est légèrement supérieure à celle des inhibiteurs naturels. En effet, le groupement phosphate étant plus acide qu'un phosphonate, il se retrouve sous forme dianionique à pH physiologique, ce qui permettrait de meilleures interactions du phosphate avec la poche de fixation polaire du DXP<sup>18</sup>. De plus, la meilleure activité des composés méthylés **102** et **104** comparée à leurs analogues, la fosfoxacine **59** et le composé **103**, indique la présence des mêmes interactions hydrophobes favorables entre le méthyle de la pince chélatante et l'indole du tryptophane conservé de la boucle flexible qui ont été observées dans le cas de la fosmidomycine et du FR-900098. Ces interactions suggèrent un mode de fixation à l'enzyme proche de celui du DXP. La capacité de la fosfoxacine **59** et des trois composés **102**, **103** et **104** à inhiber la croissance d'*E. coli* et de *M. smegmatis* a aussi été évaluée. Sur *E. coli*, les dérivés phosphates, plus sensibles à l'hydrolyse par des phosphatases, sont moins efficaces que leurs analogues phosphonates et aucune activité n'a été observée sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine, suggérant que ces composés phosphates utilisent le même transporteur que la fosmidomycine pour entrer dans la cellule. Sans surprise, aucun des composés testés n'a montré d'activité inhibitrice sur la croissance de *M. smegmatis* puisque les mycobactéries ne possèdent pas le transporteur GlpT<sup>18</sup>.

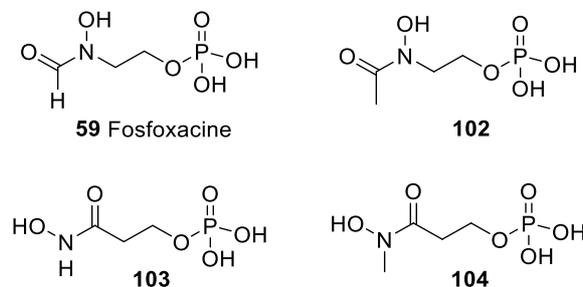


Figure 41. Structures des analogues phosphates de la fosmidomycine

Les inhibiteurs qui portent un phosphate étant susceptibles d'être inactivés *in cellulo* par des phosphatases, certaines équipes se sont intéressées à la synthèse de bioisostères de ce

groupement. Les phosphonates sont des isostères de phosphates très intéressants de par leur stabilité *in vivo*. Cependant, la plus faible acidité des phosphonates et la différence entre les angles dièdres des liaisons C-O-P ( $118,7^\circ$ ) et C-CH<sub>2</sub>-P ( $112,1^\circ$ ) peuvent influencer l'affinité de l'inhibiteur avec l'enzyme dont le site actif comporte une poche polaire conçue pour le phosphate dianionique du DXR. Dans le but de conserver la stabilité du phosphonate tout en se rapprochant des caractéristiques acido-basiques du phosphate, le groupe de Van Calenbergh a synthétisé des dérivés du FR-900098 portant un atome de chlore ou de fluor en position  $\alpha$  du phosphonate. Ainsi, les composés **105**, **106** et **107** qui possèdent un pK<sub>a2</sub> autour de 6 ont montré une meilleure activité inhibitrice sur la croissance de la souche de *P. falciparum* K1 que l'inhibiteur naturel<sup>50</sup> (Figure 42). Ces résultats suggèrent que l'introduction d'un atome de chlore ou de fluor en position  $\alpha$  permet effectivement d'obtenir une valeur de pK<sub>a2</sub> proche de celle d'un phosphate (pK<sub>a2</sub> = 6,4)<sup>51</sup>, ce qui renforcerait l'affinité des inhibiteurs pour l'enzyme. Toutefois, seul le mélange racémique a été testé et aucune étude d'inhibition de croissance sur des bactéries n'a été réalisée. Afin de mimer davantage un groupement phosphate, les analogues  $\alpha,\alpha$ -difluorés **108** et **109** ont été préparés au laboratoire<sup>52</sup> (Figure 42). En effet, l'introduction de deux atomes de fluor permet (i) de passer d'une valeur de pK<sub>a2</sub> de 7,6 pour un phosphonate à 5,4, (ii) d'obtenir une géométrie plus proche de celle d'un phosphate avec l'angle dièdre de la liaison C-CF<sub>2</sub>-P ( $116,1^\circ$ ) plus ouvert que celui de la liaison C-CH<sub>2</sub>-P ( $112,1^\circ$ )<sup>51</sup> et (iii) de rendre les inhibiteurs plus lipophiles<sup>53</sup>. Avec des IC<sub>50</sub> de 9 et 17 nM respectivement sur la DXR d'*E. coli*, les composés **108** et **109** présentent tous deux une activité inhibitrice similaire à celle du FR-900098 (IC<sub>50</sub> = 4 nM), supérieure à celle de la fosmidomycine (IC<sub>50</sub> = 42 nM) et même supérieure à celle des inhibiteurs phosphates décrits plus haut<sup>52</sup> (Figure 41). Ces résultats suggèrent la présence d'interactions électrostatiques et d'interactions de van der Waals plus favorables dans le cas des inhibiteurs difluorés qui possèderaient alors une bien meilleure affinité pour l'enzyme que les inhibiteurs phosphates et phosphonates. De plus, **108** et **109** inhibent la croissance d'*E. coli* avec une efficacité très proche de celle de la fosmidomycine, probablement grâce à l'exacerbation du caractère lipophile de ces inhibiteurs par l'ajout du CF<sub>2</sub>. Toutefois, aucune activité n'a été observée sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine, indiquant que ces deux composés entreraient dans la cellule *via* le même transporteur que l'inhibiteur naturel.

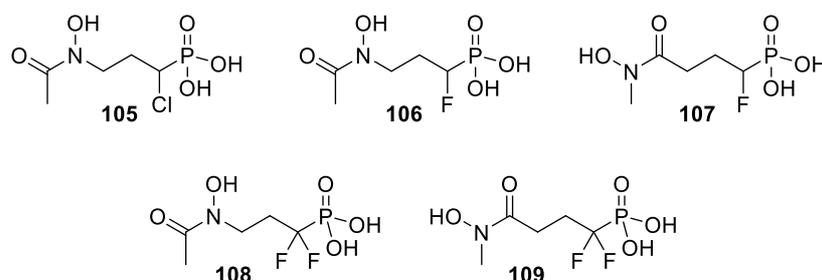


Figure 42. Structures des analogues de la fosmidomycine avec un bioisostère du phosphate

Le groupement phosphonate de la fosmidomycine et du FR-900098 a aussi été substitué par d'autres bioisostères tels que des groupements carboxylate<sup>17,34,38</sup>, sulfone<sup>54</sup>, sulfonate<sup>34,38,54</sup>, sulfamate<sup>17</sup>, sulfonamide<sup>38,54,55</sup> et tétrazole<sup>38,56</sup>. Des tests *in vitro* sur la DXR d'*E. coli*, de *M. tuberculosis* et de *Synechocystis* sp. ont montré une perte significative de l'activité inhibitrice pour tous ces composés. Ces résultats soulignent l'importance de la présence d'un groupement phosphate ou phosphonate pour la fixation de l'inhibiteur dans le site actif du DXP.

### B. Amélioration de la biodisponibilité : les prodrogues d'inhibiteurs de la DXR

Les nombreuses études sur la relation entre la structure et l'activité des inhibiteurs ont montré l'importance (i) de la présence d'un acide rétrohydroxamique ou d'un acide hydroxamique pour chélater le cation métallique divalent, (ii) de la longueur de la chaîne carbonée du bras espaceur qui doit être de trois carbones et (iii) de la présence d'un phosphonate ou d'un phosphate afin de garder une activité inhibitrice proche, voire meilleure que celle des inhibiteurs naturels. Toutefois, les groupements phosphate et phosphonate sont chargés à pH physiologique, ce qui empêche leur pénétration dans la cellule et diminue leur biodisponibilité. Ainsi, plusieurs groupes se sont intéressés à la synthèse de prodrogues de ces inhibiteurs. La majorité des prodrogues décrites dans la littérature libère l'inhibiteur par un mécanisme enzymatique.

Les prodrogues **110**, **111** et **112** du FR-900098, où le phosphonate est masqué sous forme d'esters phénoliques, ont montré une meilleure biodisponibilité que l'inhibiteur naturel lors de tests sur des souris infectées par *P. vinckei*<sup>57</sup> (Figure 43). Cependant, la libération de l'inhibiteur s'accompagne de celle du phénol, un composé cytotoxique. D'autres groupes masquant ont donc été étudiés.

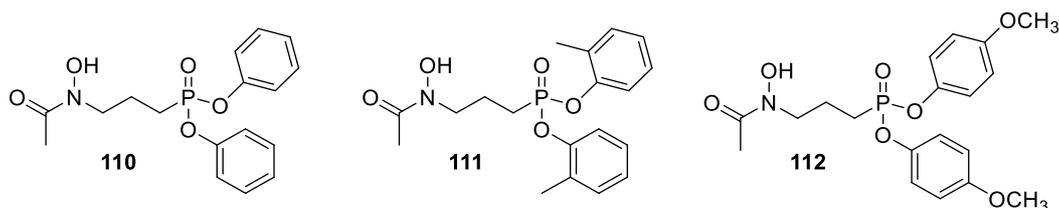


Figure 43. Structures des prodrogues du FR-900098 où le phosphonate est masqué par des esters phénoliques.

Ainsi, Ortmann *et al* ont synthétisé des prodrogues du type acyloxyalkyle et alkoxy-carbonyloxyéthyle ester du FR-900098. Des tests d'inhibition de croissance *in vivo* sur des souris infectées par *P. vinckei* ont montré que la prodrogue **113** est deux fois plus efficace que le FR-900098<sup>58</sup>, tandis que les deux alkoxy-carbonyloxyalkyle esters **114** et **115** retardent la croissance du parasite de deux jours par rapport à l'inhibiteur naturel<sup>59</sup> (Figure 44). Uh *et al* ont également décrit la synthèse de prodrogues du type acyloxyalkyle ester du FR-900098 qu'ils ont testé sur différentes bactéries. Le composé **116** s'est avéré plus efficace que la

fosmidomycine et le FR-900098 pour inhiber la croissance de *M. tuberculosis* avec une CMI comprise entre 25 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>60</sup> (Figure 44). Suite à ces résultats prometteurs, une série de prodrogues acyloxyalkyle ester de la fosmidomycine, du FR-900098 et de leurs analogues phosphonohydroxamiques ont été synthétisés au laboratoire (Figure 44). A l'image des inhibiteurs naturels, les prodrogues **117** et **118** n'ont pas permis d'inhiber la croissance de *M. smegmatis*. En revanche, les prodrogues **119**, **120** et **121** de l'acide *N*-méthyle phosphonohydroxamique inhibent la croissance de cette mycobactérie, le composé **119** présentant la meilleure inhibition avec une CMI comprise entre 250 et 500  $\mu\text{M}$ <sup>7</sup>. La capacité de certains composés à inhiber la croissance de mycobactéries prouve l'efficacité de la stratégie prodrogue afin d'augmenter la biodisponibilité des inhibiteurs précédemment étudiés.

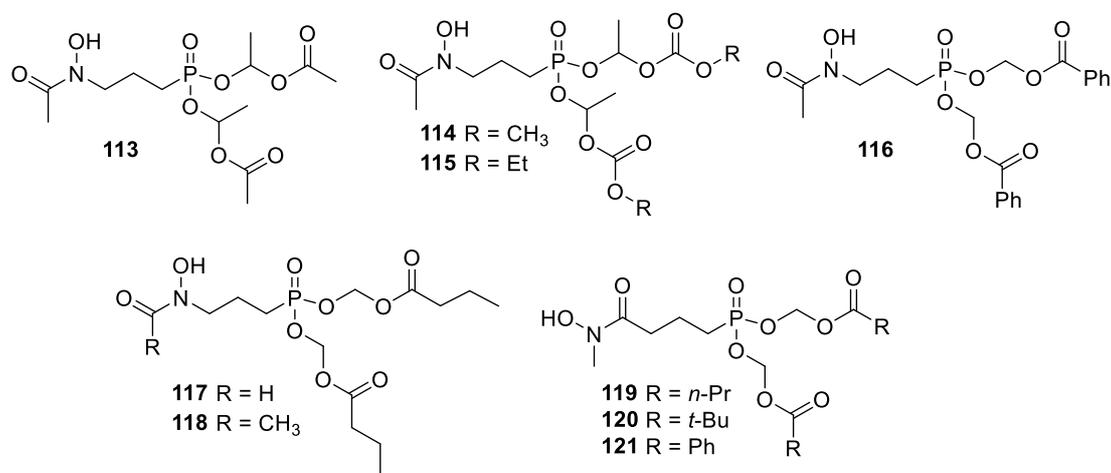


Figure 44. Structures des prodrogues acyloxyalkyle et alkoxy-carbonyloxyéthyle ester de la fosmidomycine (composé **117**), du FR-900098, (composés **113** à **116** et **118**) et du dérivé phosphonohydroxamique du FR-900098 (composés **119** à **121**).

En se basant sur des approches qui se sont révélées performantes pour délivrer des nucléosides, le groupe de Van Calenbergh a, quant à lui, étudié deux autres stratégies de prodrogues où le phosphonate est masqué soit par un diamidate utilisant différents acides aminés, soit par des esters phénoliques dérivés de la tyrosine. Ainsi, une série de prodrogues de l'acide *N*-méthylphosphonohydroxamique **72** a été synthétisée (Figure 45). L'utilisation d'un diamidate de phosphonate apparaît comme une approche prometteuse puisque les composés **122** et **123** inhibent la croissance de *M. tuberculosis* avec des CMI respectives de 20 et 50  $\mu\text{M}$ <sup>61</sup>.

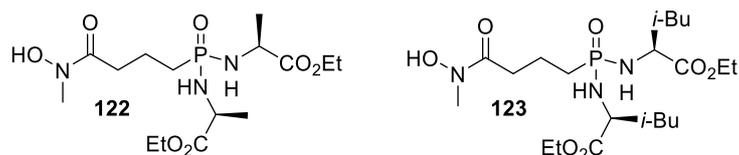


Figure 45. Structures des prodrogues diamidates **122** et **123** de l'analogue acide hydroxamique du FR-900098.

Afin d'augmenter encore la perméabilité des inhibiteurs aux membranes cellulaires, quelques équipes se sont également intéressées à la synthèse de doubles prodrogues où, outre le phosphonate, l'hydroxylamine porte elle aussi un groupe protecteur. Ainsi, Brucher *et al* ont synthétisé et testé des prodrogues bis(POM) de l'acide phosphonohydroxamique  $\alpha$ -arylé **94** où l'oxygène de l'hydroxylamine est protégé par un carbonate ou un carbamate (Figure 46). La double prodrogue **124** est la plus efficace de la série et inhibe la croissance de la souche multirésistante *P. falciparum* Dd2 avec un  $IC_{50}$  de 4 nM, soit une activité dix fois supérieure à celle de la molécule parente **94** ( $IC_{50} = 40$  nM)<sup>62</sup>. Une série de composés où l'hydroxylamine porte différents groupements (ester, éther, carbamate ou hétéro-aromatique) ont également été synthétisés par le groupe de Van Calenbergh. Des tests d'inhibition de croissance sur *M. tuberculosis* H37Rv, une souche non virulente, ont montré que les composés **125** et **126** sont les plus efficaces avec une CMI de 12,5  $\mu$ M<sup>61</sup>.

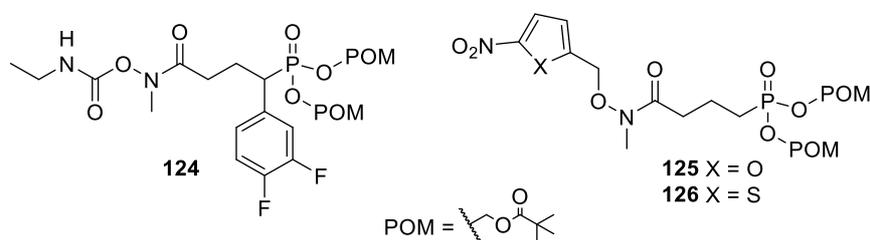


Figure 46. Structures des doubles prodrogues **124** à **126** de l'analogue acide hydroxamique du FR-900098.

### C. Vers des inhibiteurs plus spécifiques : la stratégie bisubstrat

Afin d'obtenir des inhibiteurs plus spécifiques de la DXR tout en augmentant leur caractère lipophile, certains groupes se sont tournés vers la stratégie bisubstrat : une molécule unique qui pourrait cibler différents sites actifs de l'enzyme. En effet, au sein de la DXR, les poches de fixation du DXP et du NADPH sont très proches (3,5 Å)<sup>63</sup>, ce qui pourrait permettre de les cibler toutes les deux. L'équipe de Dowd a donc développé des composés *N*-acylés et *O*-alkylés en ce but. Les inhibiteurs *O*-alkylés ont été testés sur la DXR de *M. tuberculosis* et de *Y. pestis* et le composé **127** comportant un groupement naphthyle possède une activité inhibitrice similaire à celle des deux inhibiteurs naturels sur les DXR de ces deux bactéries (Figure 47). Son mécanisme d'inhibition compétitif par rapport au DXP et au NADPH montre qu'il ciblerait conjointement les poches du substrat et du cofacteur. L'hypothèse d'un mécanisme du type « *flip and lock* » a alors été émise. La partie naphthyle de l'inhibiteur se positionnerait dans le site actif du NADPH ce qui induirait un changement conformationnel de l'enzyme et ouvrirait ainsi l'accès au site actif du DXP (« *flip* »). L'autre partie de l'inhibiteur pourrait alors s'insérer dans la poche de fixation du DXP, ce qui bloquerait l'enzyme dans cette conformation inhibée (« *lock* »). Afin d'augmenter le caractère lipophile de ces inhibiteurs, leurs prodrogues bis(POM) ont ensuite été préparées et des tests d'inhibition de croissance ont été réalisés sur *E. coli*, *M. tuberculosis* et *Y. pestis*. Aucune inhibition de la croissance d'*E. coli* ou de *Y. pestis* n'a été observée. Cependant, les prodrogues **128** à **131** inhibent celle de *M. tuberculosis* avec

des CMI très intéressantes de l'ordre du micromolaire alors que les inhibiteurs naturels ne possèdent aucune activité inhibitrice sur cette mycobactérie. Ces valeurs de CMI ont été déterminées sur deux milieux différents : le milieu 7H9, riche en nutriments, et le milieu GAST-Fe appauvri en fer. Avec le milieu 7H9, les prodrogues **129**, **130** et **131** possèdent une CMI de  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre  $18,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour **128**. Sur le milieu GAST-Fe, **129** et **131** possèdent une CMI comprise entre  $6,25$  et  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , tandis que **128** inhibe la croissance de *M. tuberculosis* avec une CMI de  $4,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et **130** avec une CMI comprise entre  $3,13$  et  $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ces différences de valeurs pourraient s'expliquer par le fait que contrairement au milieu 7H9, le milieu GAST-Fe contient une faible teneur en fer et en protéines, ce qui permet d'éviter aux composés très lipophiles de se lier à ces dernières. Ainsi, les inhibiteurs sont plus disponibles pour se lier à l'enzyme, ce qui contribuerait probablement à la meilleure inhibition observée avec ce milieu. Ainsi, ces quatre prodrogues d'inhibiteurs bisubstrats sont des candidats prometteurs pour le développement de nouveaux antituberculeux<sup>64</sup>.

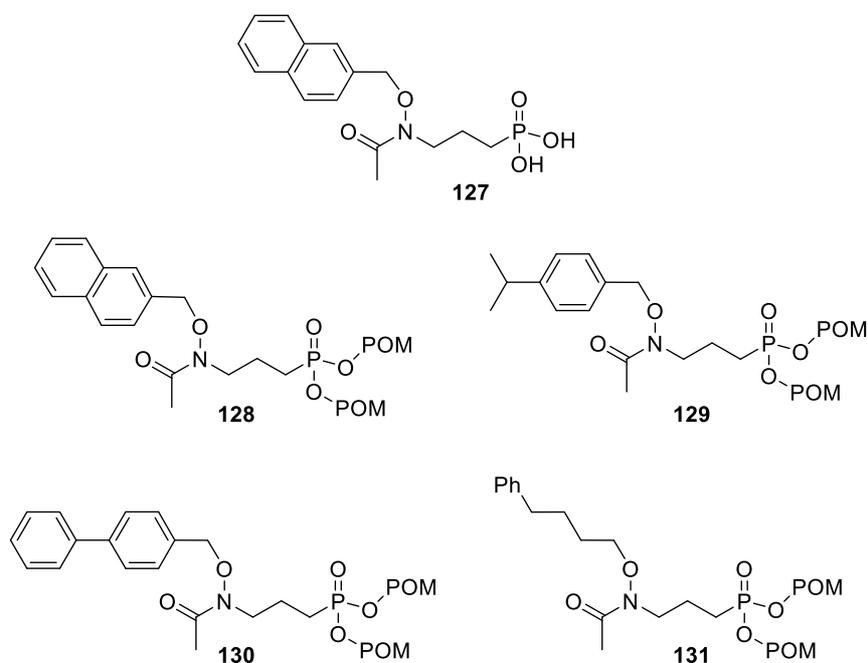


Figure 47. Structures de l'inhibiteur bisubstrat *O*-alkylé **127** et des prodrogues **128** à **131** associées.

En comparant l'activité des composés *N*-acylés et *O*-alkylés sur la DXR de *M. tuberculosis*, la meilleure inhibition est obtenue pour le composé *N*-acylé **132** ( $\text{IC}_{50} = 17,8 \mu\text{M}$ ), mais il reste néanmoins un inhibiteur plus faible que la fosmidomycine ( $\text{IC}_{50} = 0,31 \mu\text{M}$ ) et le FR-900098 ( $\text{IC}_{50} = 2,39 \mu\text{M}$ ) (Figure 48). Afin de mieux comprendre l'activité de ce composé, son mode de fixation dans le site actif a été étudié. Bien que son mécanisme d'inhibition soit compétitif par rapport au DXP et non compétitif par rapport au NADPH, il s'insérerait dans le site actif du DXP avant que le cofacteur ne se soit fixé dans l'enzyme. Cette observation suggère que le groupement phénylpropyle se positionnerait dans une autre poche que celle du NADPH, conduisant tout de même au changement conformationnel qui permet l'accès de l'inhibiteur à la poche du DXP<sup>65</sup>. Au laboratoire, des résultats similaires ont été observés avec des composés

bisubstrats possédant un catéchol pouvant chélater le cation métallique divalent d'une part, et un groupement susceptible de se fixer dans la poche du NADPH d'autre part. Bien que l'activité inhibitrice du composé **133** soit inférieure à celle de la fosmidomycine, ce dernier s'est montré être un inhibiteur spécifique de la DXR d'*E. coli*<sup>66</sup> (Figure 48). Toutefois, l'étude de son mécanisme d'inhibition suggère qu'il ne s'insérerait pas dans le site actif du NADPH, mais se fixerait probablement dans une poche hydrophobe comme celle décrite par Deng *et al*<sup>37,40</sup>. Les groupes de Mowbray et Karlén se sont eux aussi intéressés à la conception d'inhibiteurs bisubstrats *N*-acylé. Ainsi, ils ont synthétisé des analogues de l'inhibiteur  $\alpha$ -arylé **92** où le méthyle de l'acide rétrohydroxamique a été remplacé par un phényle substitué en position ortho, méta ou para. Bien que moins efficace que la fosmidomycine ( $IC_{50} = 0,08 \mu M$ ) pour inhiber la DXR de *M. tuberculosis*, le composé **134** non substitué possède une  $IC_{50}$  intéressante de  $0,32 \mu M$ . Toutefois, aucune amélioration notable par rapport au composé parent **92** ou aux inhibiteurs naturels n'a été observée par l'ajout de substituants sur le phényle. Seul le composé **135** portant un triazole en position méta ( $IC_{50} = 0,14 \mu M$ ) possède une activité proche de celle du FR-900098 ( $IC_{50} = 0,16 \mu M$ ). L'analyse des structures cristallographiques de certains des inhibiteurs synthétisés avec la DXR de *M. tuberculosis* indiquent que les substituants en position ortho- entreraient dans la poche de fixation du NADPH, alors que le composé **134** sans substituants s'insérerait dans un autre espace hydrophobe. Toutefois, aucune conclusion n'a pu être tirée pour les substituants situés en para ou en méta. Sans surprise, la souche non virulente *M. tuberculosis* H37Rv est insensible à ces composés puisqu'ils contiennent un phosphonate chargé à pH physiologique. Le composé **135** inhibe toutefois la croissance de *P. falciparum* avec une efficacité similaire à celle du FR-900098, tandis que **134** possède une activité antiparasitaire supérieure à celle de son composé parent, de la fosmidomycine et du FR-900098<sup>67</sup>.

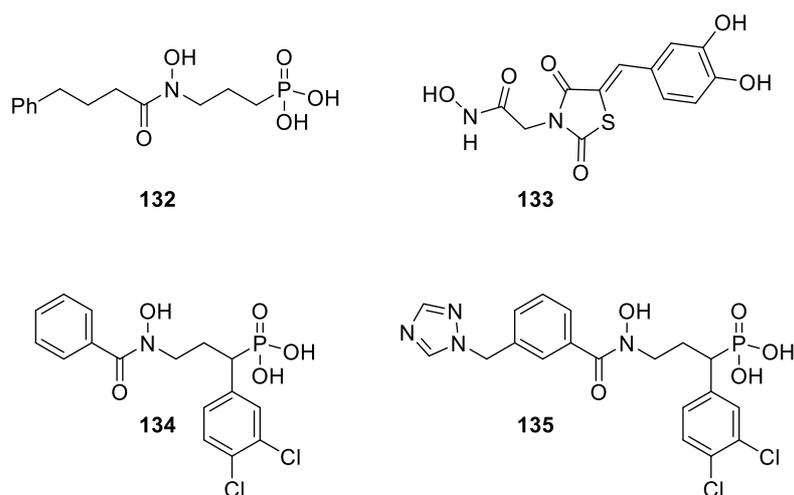


Figure 48. Structures des inhibiteurs bisubstrats *N*-acylés **132** à **135**.

## II. Synthèse de prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR

Nous nous sommes intéressés à la synthèse d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR qui comportent d'une part, un mime de la fosmidomycine et, d'autre part, un groupement qui pourrait s'insérer soit dans la poche du NADPH, soit la poche hydrophobe cryptique située entre les sites actifs du DXP et du NADPH. Pour ce faire, nous avons choisi un groupement dansyle qui, en plus d'augmenter la lipophilie des inhibiteurs, offre l'avantage de pouvoir être détecté par spectroscopie à fluorescence. En effet, le groupement dansyle est un fluorophore très utilisé pour l'étude de systèmes qui ont une absorbance faible et notamment pour la détection de protéines et amines (primaires et secondaires)<sup>68</sup>. Sa longueur d'onde d'absorption maximale se situe dans l'UV autour de 335 nm tandis que le maximum de son spectre d'émission se situe dans le visible autour de 530 nm. La longueur d'onde maximale d'émission et l'intensité de la fluorescence de ce groupement sont toutes deux fortement dépendantes de la polarité du solvant. Lorsque la polarité de ce dernier augmente, on observe un solvatochromisme positif avec un effet bathochrome (décalage vers les grandes longueurs d'onde)<sup>69</sup> tandis que le rendement quantique (pour une absorption à 335 nm) diminue drastiquement<sup>70</sup>.

Ainsi, les inhibiteurs bisubstrats **136a-d**, où la pince chélatante et le groupement dansyle sont reliés par une chaîne carbonée, ont été préparés au laboratoire (Figure 49). Afin de modifier la flexibilité de ces inhibiteurs et permettre au dansyle d'atteindre soit la poche hydrophobe soit celle du NADPH, nous avons utilisé des espaceurs dont la longueur varie entre un et quatre carbones.

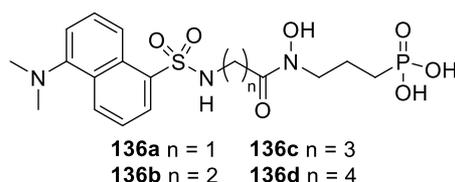


Figure 49. Structure des inhibiteurs bisubstrats **136a-d**.

Ces inhibiteurs ont fait l'objet de tests *in vitro* sur la DXR d'*E. coli* et **136a** possède une  $IC_{50}$  de 76 nM proche de celle de la fosmidomycine **57** ( $IC_{50} = 32$  nM). De plus, **136a** et **136d** inhibent la croissance d'*E. coli* avec une efficacité proche de celle de l'inhibiteur naturel. Toutefois, aucun de ces inhibiteurs ne présente d'activité antibactérienne sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine, suggérant qu'ils entrent dans la cellule *via* le même transporteur GlpT que l'inhibiteur naturel (résultats non publiés)<sup>71</sup>.

Afin d'augmenter la biodisponibilité de ces inhibiteurs bisubstrats **136a-d**, nous avons choisi d'adopter une stratégie de prodrogue où les acides phosphoniques sont masqués par un ester d'acyloxyalkyle, et plus particulièrement un ester de pivaloyloxyméthyle (POM) (composés **137a-d**, Figure 50).

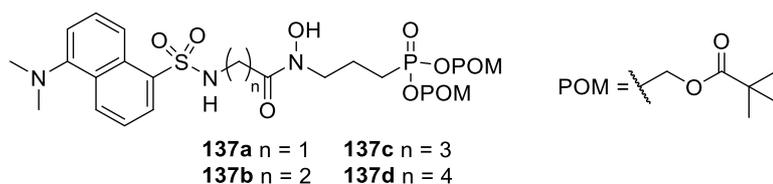


Figure 50. Structure des prodrogues **137a-d** des inhibiteurs bisubstrats précédemment synthétisés au laboratoire.

### A. Stratégie de synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR

Les inhibiteurs bisubstrats **136a-d** ont été obtenus à partir des phosphonates **143a-d**, intermédiaires clés de cette synthèse (Schéma 19 – voie fuschia). Une réaction de couplage entre les différents acides **140a-d**, sur lesquels l'espaceur aura préalablement été greffé, et l'hydroxylamine **142**, préparée à partir de l'hydrochlorure de *O*-benzylhydroxylamine commercial, a conduit à ces intermédiaires phosphonates. La déprotection de l'éther de benzyle par une hydrogénation catalytique suivie d'une réaction de McKenna a finalement permis d'accéder aux acides phosphoniques **136a-d** désirés<sup>71</sup>.

Concernant la synthèse des prodrogues bis(POM) **137a-d**, molécules cibles de ce projet, elles pourraient être obtenues à partir des mêmes intermédiaires phosphonates **143a-d** que précédemment. Toutefois, nous avons choisi de passer d'abord par la formation des acides phosphoniques **145a-d**, puis d'ajouter les groupements POM avant de réaliser l'étape de déprotection du groupement benzyle en dernier (Schéma 19 – voie bleue). En effet, si nous déprotégeons l'éther de benzyle avant l'introduction des groupements POM, nous risquons d'avoir des difficultés à purifier l'acide rétrohydroxamique très polaire résultant, tandis qu'avec la présence des bis(POM) et du OBn, la purification des prodrogues devrait être plus aisée. De plus, la déprotection de l'éther de benzyle par une hydrogénation catalytique devrait permettre d'obtenir les prodrogues **137a-d** finales sans étape de purification.

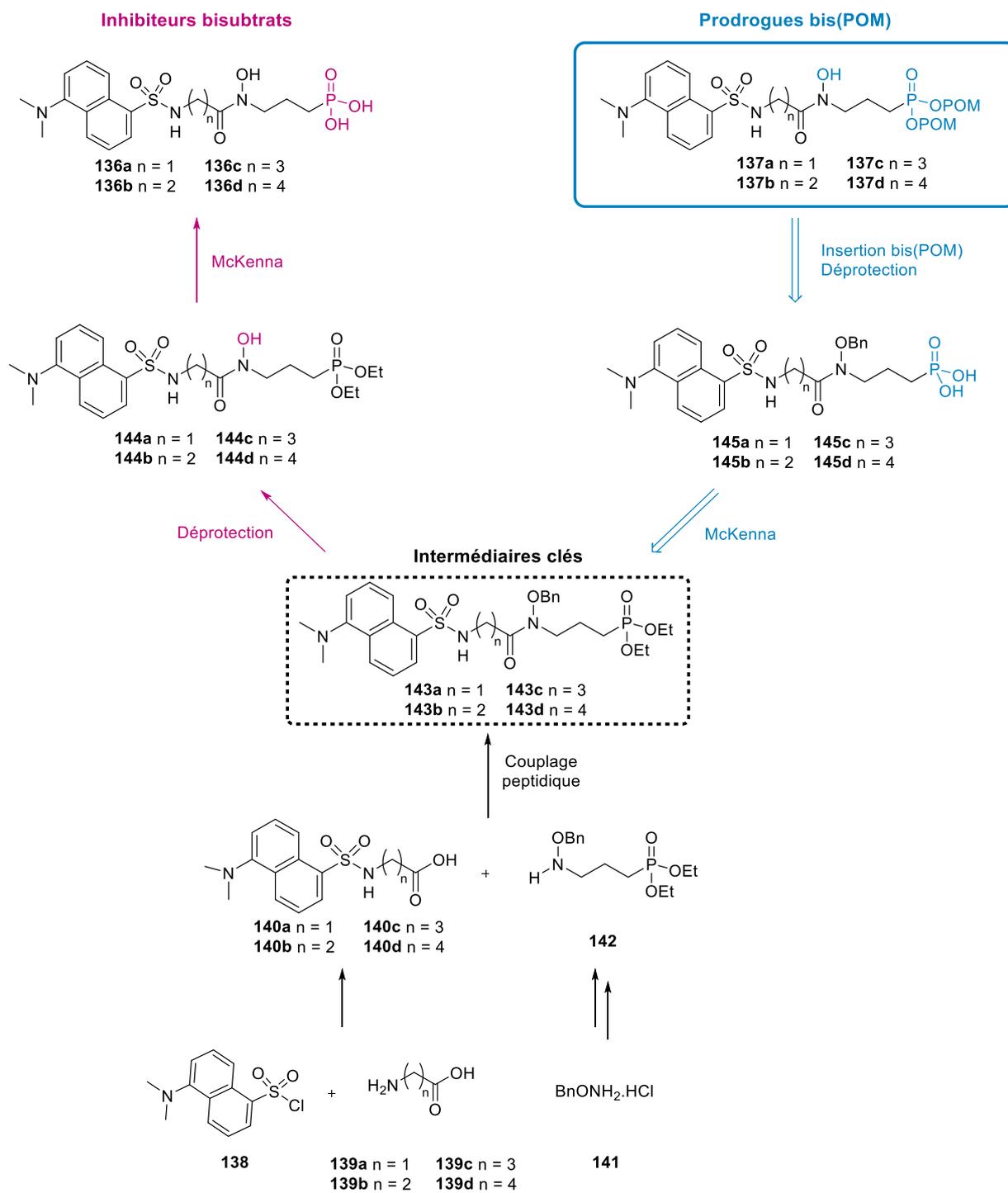


Schéma 19. Synthèse des inhibiteurs bisubstrats **136a-d** (voie fuschia) et stratégie de synthèse pour l'obtention de leur prodrogues bis(POM) **137a-d** (voie bleue).

## B. Synthèse des prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs bisubstrats de la DXR

### 1. Synthèse des phosphonates intermédiaires 143a-d

Afin de synthétiser les prodrogues bis(POM) **137a-d**, nous avons d'abord préparé les phosphonates intermédiaires **143a-d** qui sont obtenus par couplage entre l'hydroxylamine **142** et les acides carboxyliques **140a-d**.

#### a) Synthèse de l'hydroxylamine **142** et des acides carboxyliques **140a-d**

L'hydroxylamine **142** est préparée en trois étapes selon la méthode décrite dans la littérature<sup>72</sup> (Schéma 20) : après la protection de l'hydrochlorure de *O*-benzylhydroxylamine **141** commercial par un groupement Boc (96%), une réaction de substitution nucléophile sur le 3-bromopropylphosphonate de diéthyle commercial permet d'obtenir le phosphonate **147** sans purification. Ce dernier est alors engagé dans la réaction de déprotection du groupement Boc et une purification par colonne chromatographique éclair permet d'isoler l'hydroxylamine **142** désirée (91 %).

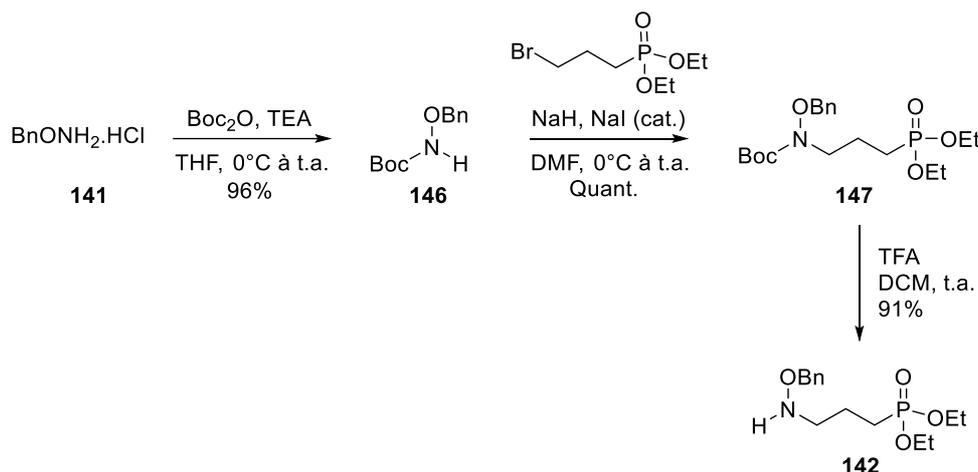


Schéma 20. Synthèse du phosphonate **142**.

En parallèle, différents acides aminés de longueur de chaîne variable (la glycine **139a**, la  $\beta$ -alanine **139b**, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique **139c** et l'acide 5-aminovalérique **139d**) sont additionnés sur le chlorure de dansyle **138** commercial en milieu aqueux basique pour donner les acides **140a-d** qui sont isolés avec des bons rendements compris entre 72 % et 92 % (Schéma 21).

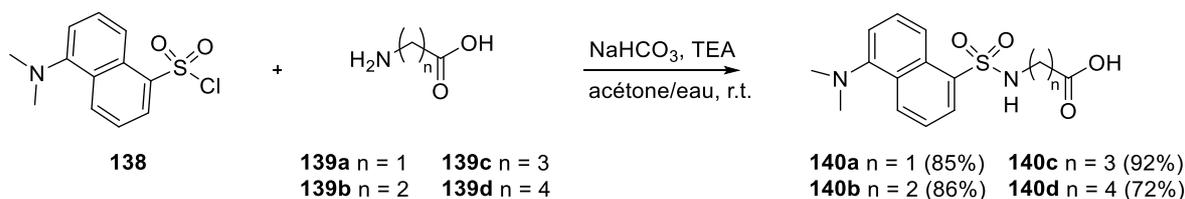


Schéma 21. Synthèse des acides carboxyliques **140a-d**

**b) Synthèse des phosphonates 143a-d par une réaction de couplage peptidique**

Les phosphonates **143a-d** ont précédemment été obtenus par une réaction de couplage peptidique entre l'hydroxylamine **142** et les acides **140a-d** en présence de DCC et de HOBT. Ils ont été isolés avec des rendements moyens compris entre 24 et 40 %<sup>71</sup>. Afin de nous affranchir de l'utilisation d'agents de couplage, souvent toxiques et à l'origine de plusieurs réactions secondaires parasites, nous avons choisi d'ajouter l'hydroxylamine **142** sur l'acide **140a** activé par la formation *in situ* de chlorures d'acyle. Les essais précédemment réalisés au laboratoire avec du chlorure d'oxalyle n'ayant pas été concluants, nous avons choisi de réaliser la réaction en présence de chlorure de thionyle. Dans les conditions classiques, cette réaction se fait en deux étapes, avec la formation du chlorure d'acyle puis l'addition de l'amine sur ce dernier, et nécessite de chauffer le milieu réactionnel entre 50°C et 70°C. Afin d'éviter ces conditions plutôt dures, nous avons choisi de réaliser la réaction en une étape à température ambiante selon la méthode décrite par Leggio *et al*<sup>73</sup> (Schéma 22).

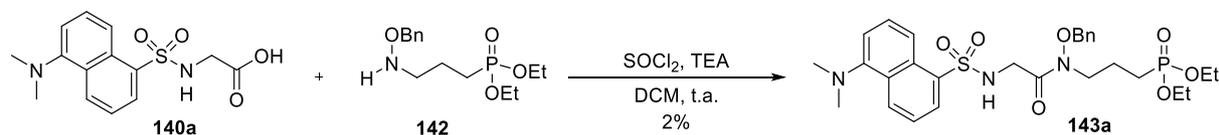


Schéma 22. Réaction de couplage entre l'acide **140a** et l'hydroxylamine **142** par activation de l'acide avec du chlorure de thionyle.

Sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel, nous observons un mélange complexe de produits, mais également un doublet minoritaire (<sup>3</sup>J = 4,5 Hz) vers 3,8 ppm qui pourrait correspondre au CH<sub>2</sub> du motif glycine, en α de la liaison amide formée. Malgré le fait que le produit soit minoritaire, nous avons décidé de l'isoler par colonne chromatographique. Après purification, le produit de couplage **143a** est obtenu en très petite quantité avec un très faible rendement de 2 %.

Afin d'essayer d'améliorer le rendement de cette réaction et d'obtenir une plus grande quantité de produit, nous avons décidé de chauffer le milieu réactionnel. A cet effet, le DCM, dont le point d'ébullition est faible, a été substitué par de l'acétonitrile permettant de conserver une bonne solubilisation des substrats et de chauffer le milieu réactionnel à reflux. Ici encore la RMN-<sup>1</sup>H montre qu'un mélange complexe de produits est obtenu avec le phosphonate **143a** minoritaire, cependant il n'a cette fois-ci pas pu être isolé.

L'approche précédente est surtout utilisée pour la condensation d'amines sur des acides carboxyliques. Or dans notre cas, nous essayons de réaliser cette condensation avec une hydroxylamine dont la réactivité peut être différente de celle d'une amine. Ainsi, nous avons envisagé une méthode permettant la formation d'une liaison amide entre un acide carboxylique et une hydroxylamine *N*-méthylée<sup>74</sup>. L'acide **140a** est alors traité avec de la DMF et du chlorure

d'oxalyle en présence de *N*-méthylmorpholine avant l'ajout de l'hydroxylamine **142** (Schéma 23).

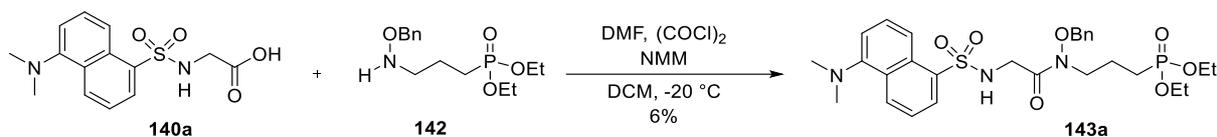
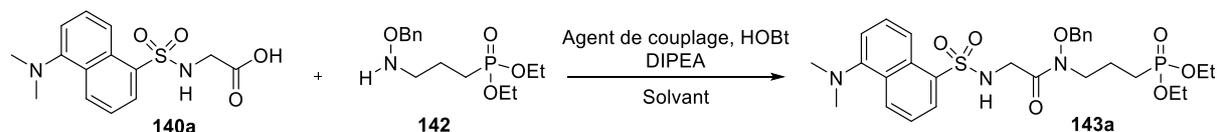


Schéma 23. Réaction de couplage entre l'acide **140a** et l'hydroxylamine **142** par activation *in situ* de l'acide en présence de DMF, de chlorure d'oxalyle et de *N*-méthylmorpholine.

Encore une fois, le produit de couplage **143a** est observé comme minoritaire sur la RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel. Malgré la quantité de produits formés, nous avons réussi à isoler le produit désiré avec un faible rendement de 6 %.

Les rendements obtenus par les deux méthodes précédentes étant vraiment très faibles (2 et 6%), nous avons décidé de reprendre des conditions de réaction mettant en jeu des agents de couplage tels que les systèmes classiques DCC/HOBt et EDC/HOBt. Nous avons comparé ces deux carbodiimides avec un sel d'uronium, le HBTU, plus abordable que son analogue azo (HATU) qui est utilisé pour la synthèse d'acides hydroxamiques (Tableau 2).

Tableau 2. Différentes conditions utilisées pour la réaction de couplage entre l'acide **140a** et l'hydroxylamine **142**.



| Entrée | Agent de couplage | HOBt | DIPEA | Solvant | Rendement | Observations                  |
|--------|-------------------|------|-------|---------|-----------|-------------------------------|
| 1      | DCC               | Oui  | Non   | THF     | 41        | <b>143a</b> + peu d'impuretés |
| 2      | EDC.HCl           | Oui  | Oui   | DCM     | –         | <b>143a</b> + impuretés       |
| 3      | HBTU              | Non  | Oui   | DMF     | –         | Pas le produit désiré         |

Avec le DCC (Tableau 2 – entrée 1), la RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel montre un signal largement majoritaire à 31,2 ppm caractéristique des phosphonates tandis que la RMN-<sup>1</sup>H confirme que nous avons formé majoritairement le produit **143a** désiré avec notamment la présence du doublet (<sup>3</sup>*J* = 4,5 Hz) à 3,75 ppm correspondant au CH<sub>2</sub> du motif glycine. Lorsque la réaction est effectuée avec l'EDC (Tableau 2 – entrée 2), le phosphonate **143a** est également obtenu en tant que produit majoritaire dans le brut réactionnel, mais avec la présence d'un plus grand nombre d'impuretés. C'est pourquoi nous n'avons pas purifié le brut lors de cet essai. Concernant le HBTU (Tableau 2 – entrée 3), à part les protons dansyliques et les éthyles du phosphonate, nous n'observons aucun signal correspondant au phosphonate **143a** sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de garder le système DCC/HOBt pour cette réaction de couplage. Par ailleurs, l'optimisation des conditions de purification a permis d'obtenir les produits phosphonates **143a-d** avec de bien meilleurs rendements que précédemment, compris entre 69 et 97% (Schéma 24).

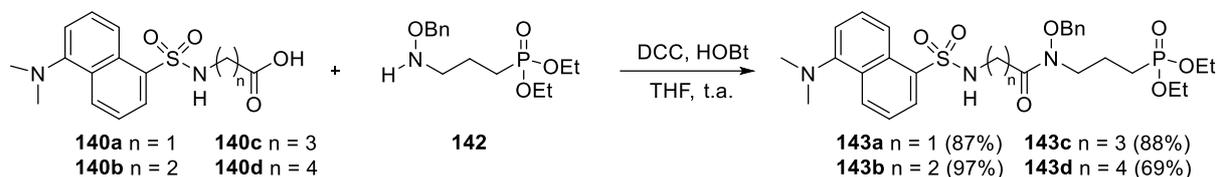


Schéma 24. Réaction de couplage peptidique entre l'hydroxylamine **142** et les acides carboxyliques **140a-d**

## 2. Synthèse des prodrogues finales **137a-d**

Les phosphonates **143a-d** sont engagés dans la suite de la synthèse afin d'accéder aux prodrogues **137a-d** finales. Pour ce faire, les phosphonates de diéthyle sont d'abord convertis en acides phosphoniques **145a-d** en présence de TMSBr et de méthanol. Puis, une réaction de substitution nucléophile sur le chlorure de pivaloyle conduit aux prodrogues **148a-d** avec des rendements moyens compris entre 26 et 35 % (Schéma 25).

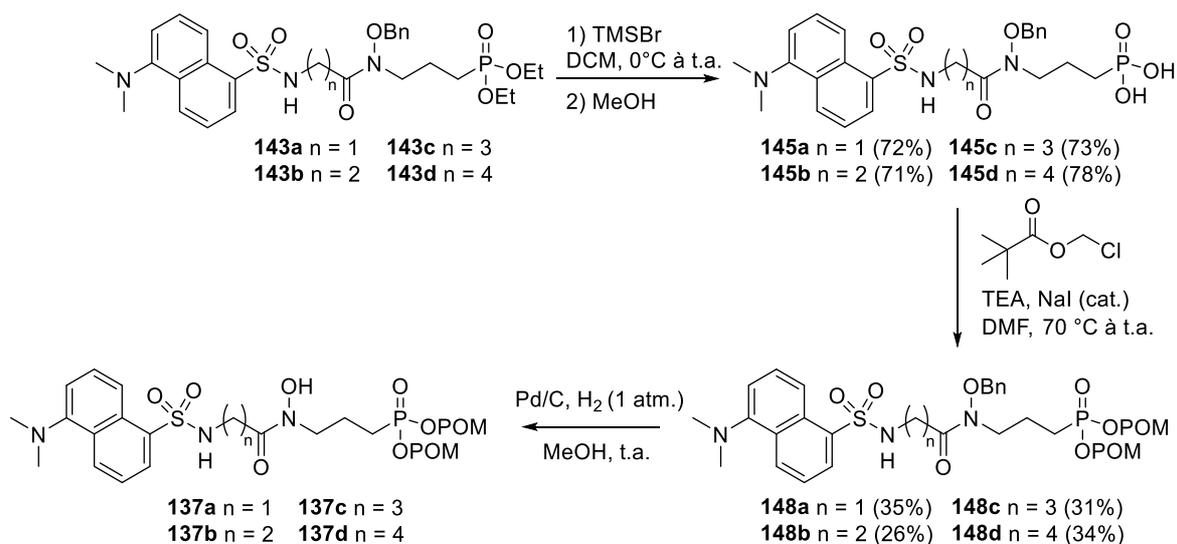


Schéma 25. Dernières étapes de la synthèse des prodrogues **137a-d**.

De façon surprenante, la dernière étape de déprotection du groupement benzyle a été la plus difficile à réaliser (Schéma 25). Nous avons d'abord utilisé les conditions de déprotection classiques et réalisé une hydrogénation catalytique en présence de Pd/C dans le méthanol sous atmosphère de H<sub>2</sub>. Le suivi CCM de la réaction montre qu'elle n'évolue plus après 1h ou 2h. Sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel, nous observons la présence du produit désiré, avec notamment l'apparition d'un deuxième signal à 34,8 ppm. Cependant, l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>31</sup>P indique qu'il n'y a que 50 % de produit qui se forme au maximum, même après plusieurs jours. De plus, des produits de décomposition apparaissent, rendant la purification difficile. Nous avons également réalisé cette étape de déprotection sur les

phosphonates d'éthyle **143a-d** et ici encore, la réaction n'est pas totale et l'apparition de plusieurs produits de décomposition ne permet pas d'isoler les produits désirés.

Afin de pallier ces problèmes de conversion, nous avons cherché à optimiser les conditions de réaction et notamment à modifier le solvant. En effet, dans les conditions classiques, cette réaction est généralement réalisée dans le méthanol, mais l'utilisation d'un autre solvant peut parfois influencer la cinétique de la réaction<sup>75</sup>. Nous avons donc testé un autre solvant polaire protique, l'éthanol, et un solvant polaire aprotique, l'acétate d'éthyle (Schéma 26). De la même manière, la proportion de produit formé est estimée par l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel.

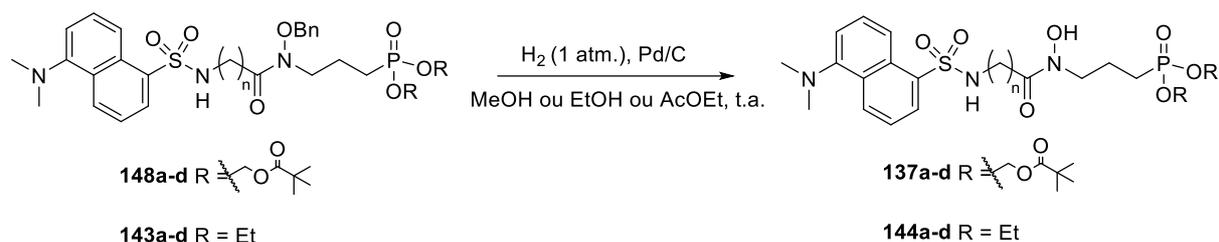


Schéma 26. Réaction d'hydrogénation catalytique des prodrogues **148a-d** ou des phosphonates de diéthyle **143a-d** en présence de Pd/C.

Lorsque l'hydrogénation catalytique est réalisée dans l'éthanol, nous n'observons pas d'évolution de la proportion de produit formé par rapport au méthanol. En revanche, dans l'acétate d'éthyle, le suivi CCM de la réaction montre que la formation du produit est plus lente et la proportion de produit formé, estimée par RMN, est plus faible (seulement 9 %). Afin d'évaluer si les difficultés rencontrées lors de cette réaction viennent des substrats ou des réactifs utilisés, un test de déprotection de l'hydroxylamine benzylée **146** a été réalisé avec du Pd/C dans le méthanol et sous atmosphère de H<sub>2</sub>. Dans ce cas, la réaction est totale après une nuit et le seul produit formé est l'hydroxylamine déprotégée, ce qui suggère que ce sont les substrats qui rendent cette réaction difficile. Ainsi, les prodrogues **148a-d** qui comportent un sulfonamide au niveau de leur groupement dansyle pourraient empoisonner le catalyseur. En effet, les catalyseurs au palladium sont susceptibles d'être empoisonnés par des composés soufrés<sup>76-79</sup>.

Quelques exemples de déprotection d'éthers de benzyle par hydrogénation catalytique en présence d'un groupement sulfone<sup>80,81</sup> ou sulfonamide<sup>81</sup> sont décrits dans la littérature. Cependant, dans ces deux cas, ce sont les conditions classiques (Pd/C et H<sub>2</sub> dans le méthanol) qui sont utilisées. Un autre catalyseur, le catalyseur de Pearlman (hydroxyde de palladium sur charbon)<sup>82</sup>, est parfois décrit comme une bonne alternative au Pd/C pour les déprotection de groupement benzyle<sup>83</sup>. Ainsi, nous avons réalisé un essai de déprotection sur le phosphonate d'éthyle **143c** soit avec du Pd/C et du méthanol, soit avec du Pd(OH)<sub>2</sub>/C et un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle en proportions 8/2 selon la méthode décrite par Notz *et al*<sup>84</sup> (Schéma 27). De la même manière que précédemment, la proportion de produit formé dans le

brut réactionnel a été estimée par RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>31</sup>P. Dans les conditions classiques, nous observons un ratio substrat/produit de 91/9, tandis qu'avec le catalyseur de Pearlman, et pour le même temps de réaction, ce ratio passe à 84/16. Ainsi, le catalyseur de Pearlman donne de meilleurs résultats puisqu'avec ces nouvelles conditions, nous avons observé la formation d'environ deux fois plus de produit.

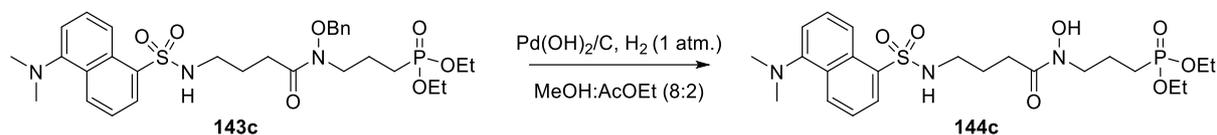


Schéma 27. Déprotection de l'éther de benzyle de **143c** en présence du catalyseur de Pearlman.

Nous avons alors réalisé l'hydrogénation catalytique sur les prodrogues **148a-d** avec le catalyseur de Pearlman (Schéma 28). Cependant, la réaction n'est toujours pas totale et les proportions de produit formé oscillent entre 35 % pour **137d** et 88 % pour **137a**. Malgré plusieurs tentatives de purification, les prodrogues finales **137a-d** n'ont pas pu être obtenues.

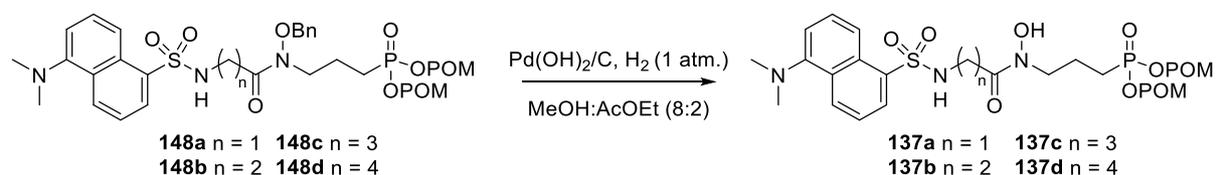


Schéma 28. Réaction d'hydrogénation catalytique en présence d'hydroxyde de palladium sur charbon ( $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ).

Afin de nous affranchir de l'utilisation d'un catalyseur, nous avons essayé de déprotéger le groupement benzyle du phosphonate **143b** en présence de trichlorure de bore selon la méthode décrite par Verbruggen *et al*<sup>85</sup> (Schéma 29). Après deux jours, la réaction n'est pas complète et des produits de décomposition apparaissent sur la CCM, mais l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel montre qu'au moins 80 % du produit désiré s'est formé. Toutefois, contrairement à une hydrogénation catalytique, cette méthode nécessite un traitement du brut réactionnel plus long. De plus, la purification reste difficile et la prodrogue finale désirée n'a pas pu être obtenue.



Schéma 29. Réaction de déprotection du groupement benzyle en présence de trichlorure de bore ( $\text{BCl}_3$ ).

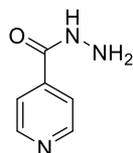
Malgré les différents essais pour l'obtention des prodrogues **137a-d**, aucun ne nous a permis de les isoler. Néanmoins, nous avons décidé d'évaluer l'activité antibactérienne des prodrogues **148a-d** et des acides phosphoniques **145a-d** où l'acide rétrohydroxamique est protégé par un éther de benzyle. Ainsi, les prodrogues **148a-d** sont en fait des doubles prodrogues et seront dénommées comme tel dans la suite de cette partie.

### III. Evaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues protégées 148a-d et des acides phosphoniques 145a-d

Les acides phosphoniques protégés **145a-d** et les doubles prodrogues **148a-d** ont été testées sur des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis*. La capacité de ces composés à inhiber la croissance de ces bactéries a été évaluée suivant deux méthodes complémentaires : par la méthode de diffusion en milieu gélosé et par celle de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide.

#### A. Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé

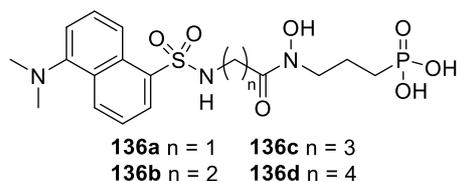
Le test par diffusion en milieu gélosé est basé sur le principe de la diffusion de particules. Il consiste à déposer une quantité définie des composés à tester sur un disque de cellulose placé sur un milieu gélosé dans une boîte de Petri préalablementensemencée d'une culture de bactéries. L'inhibition de la croissance bactérienne se manifeste par l'apparition d'une zone circulaire dépourvue de bactéries autour du disque et le diamètre de cette zone détermine l'activité inhibitrice des composés testés. Plus le diamètre est grand, plus l'efficacité du composé est élevée. L'activité antibactérienne de nos composés est comparée à celle d'une molécule de référence servant de témoin. Pour les cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, nos composés sont comparés à la fosmidomycine (fos) et la lecture des résultats est réalisée après 24h d'incubation à 37°C, tandis que pour *M. smegmatis*, la molécule de référence est l'isoniazide (INH) **149** et les résultats sont lus après 48h d'incubation à 37°C.



**149** Isoniazide

Figure 51. Structure de l'isoniazide **149**, antituberculeux servant de référence lors de nos tests d'inhibition de croissance chez *M. smegmatis*.

L'activité inhibitrice des acides phosphoniques **145a-d** et des doubles prodrogues **148a-d** est également comparée à celle des inhibiteurs bisubstrats **136a-d** précédemment préparés au laboratoire. Ces derniers ont été testés par cette méthode de diffusion sur *E. coli*. Entre 30 et 35 nmol d'inhibiteur ont été déposées sur les disques contre 2 nmol de fosmidomycine. Les inhibiteurs **136a-d** ont inhibé la croissance de la bactérie avec des diamètres d'inhibition compris entre 12 et 21 mm, tandis que la fosmidomycine induit une zone d'inhibition de 35 mm<sup>71</sup> (Tableau 3). Ainsi, les inhibiteurs bisubstrats sont moins efficaces que l'inhibiteur naturel pour inhiber la croissance de la bactérie puisqu'ils possèdent des diamètres d'inhibition plus faibles pour une quantité 15 fois plus importante déposée sur le disque.

Tableau 3. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne d'une souche d'*E. coli* observés pour les inhibiteurs bisubstrats **136a-d**<sup>71</sup>.

| Entrée | Composé       | Quantité déposée (nmol) | Diamètre zone inhibition (mm) |
|--------|---------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1      | <b>57 Fos</b> | 2                       | 35                            |
| 2      | <b>136a</b>   | 30-35                   | 21                            |
| 3      | <b>136b</b>   | 30-35                   | 12                            |
| 4      | <b>136c</b>   | 30-35                   | 14                            |
| 5      | <b>136d</b>   | 30-35                   | 20                            |

Lorsque l'on compare les quatre longueurs de chaîne carbonée, on observe que les inhibiteurs **136a** et **136d** portant une chaîne d'un et quatre carbones respectivement sont les plus efficaces. La meilleure zone d'inhibition observée pour le composé **136a** est en accord avec les tests d'inhibition enzymatique *in vitro* puisque ce composé possède la meilleure affinité pour la DXR d'*E. coli*<sup>71</sup>. Toutefois, le composé **136d** montre une efficacité similaire à **136a** lors du test d'inhibition de croissance, ce qui pourrait être dû à une meilleure pénétration cellulaire grâce à la chaîne carbonée plus longue de ce composé qui augmenterait sa lipophilie. De plus, la meilleure inhibition observée pour ces deux composés pourrait s'expliquer par leurs longueurs de chaînes respectives qui pourrait induire des différences de flexibilité et influencer leur mode de fixation à l'enzyme. En effet, lors de l'étude d'analogues de la fosmidomycine *O*-alkylés ou *N*-acylés, San Jose *et al* ont montré que les composés portant des chaînes carbonées plus longues, donc plus flexibles, ont un mode d'inhibition non compétitif par rapport au NADPH et possèderaient un mode de fixation particulier à l'enzyme, tandis que ceux qui portent une chaîne plus courte sont compétitifs vis-à-vis du cofacteur et se fixeraient dans son site actif<sup>65</sup>. Ainsi, le composé **136a** portant une chaîne carbonée plus courte pourrait se fixer dans la poche du NADPH tandis que l'inhibiteur **136d** s'insérerait dans une poche hydrophobe cryptique située entre celle du cofacteur et du substrat. Afin de confirmer cette hypothèse, des études cristallographiques de l'enzyme en présence des différents inhibiteurs bisubstrats **136a-d** devront être réalisées.

Concernant les acides phosphoniques **145a-d** et les doubles prodrogues **148a-d**, des tests ont été effectués sur *E. coli* avec 32 ou 800 nmol déposées sur les disques et, dans les deux cas, aucune inhibition de croissance n'est observée, peu importe la longueur de la chaîne carbonée (données non présentées). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats. Tout d'abord,

contrairement aux inhibiteurs **136a-d**, les acides phosphoniques **145a-d** comportent un éther de benzyle sur le motif acide rétrohydroxamique et les bactéries pourraient ne pas posséder les enzymes nécessaires à la déprotection d'un tel groupement. Bien que la présence de cet éther de benzyle augmente la lipophilie des composés, ce qui pourrait favoriser leur diffusion passive au travers des membranes, elle pourrait également diminuer l'affinité de l'acide rétrohydroxamique pour le cation métallique divalent présent au sein du site actif. De plus, ces composés bisubstrats étant volumineux, l'ajout d'une gêne stérique supplémentaire pourrait bloquer l'accès du composé au site actif ou diminuer son affinité pour l'enzyme. Ensuite, si les prodrogues bis(POM) **148a-d** rentrent effectivement dans la cellule par diffusion passive, ce sont les acides phosphoniques **145a-d** qui seront libérés *in cellulo*. Or nous venons de voir que ces derniers ne possèdent pas d'activité antibactérienne, ce qui est cohérent avec l'absence d'activité observée pour les prodrogues. Enfin, il n'est pas exclu que l'absence d'inhibition proviennent d'une « absence » de diffusion des composés dans la gélose. En effet, les tests précédemment réalisés sur les inhibiteurs bisubstrats **136a-d** ont été effectués avec des disques cellulotiques de 6 mm de diamètre, tandis que les prodrogues et les acides phosphoniques protégés par un groupement OBn ont été déposés sur des disques de 9 mm de diamètre. Or, lorsque nous avons déposé 800 nmol des prodrogues **148a-d** sur les disques, nous avons observé un dépôt fluorescent intense au centre de ces derniers, mais aucune fluorescence n'est présente sur les bords des disques ou dans la gélose, ce qui laisse supposer qu'aucune diffusion n'a eu lieu. Cette absence de diffusion pourrait être due au fait que l'on dépose le même volume de solution (8 µL) sur les disques, peu importe leur diamètre, mais également à la viscosité élevée des composés en solution dans le DMSO, ce qui limiterait leur diffusion du centre du disque vers la gélose.

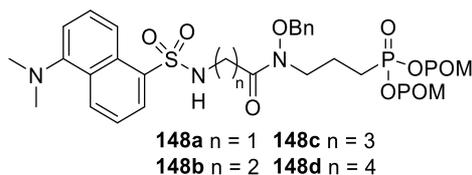
Lorsque les doubles prodrogues et acides phosphoniques protégés par l'éther benzylique sont testés sur *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, ici encore, aucune inhibition de croissance n'est observée, peu importe la quantité déposée (32 ou 800 nmol). Ces résultats pourraient être expliqués de la même manière que pour *E. coli*.

En ce qui concerne l'évaluation de l'activité antibactérienne chez *M. smegmatis*, elle a été réalisée en déposant 800 nmol de produit sur des disques papier de 6 mm de diamètre afin de conserver les conditions expérimentales précédemment utilisées pour les tests avec cette mycobactérie<sup>86</sup>. Les composés **145c** et **145d** ne possèdent pas d'activité inhibitrice. Pour les acides phosphoniques **145a** et **145b**, nous n'observons pas de zone d'inhibition, mais une zone circulaire où la charge bactérienne est plus faible, indiquant une inhibition de la croissance d'une partie des bactéries seulement. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que les acides phosphoniques sont sous forme anionique à pH physiologique, ce qui bloque leur pénétration cellulaire. De plus, les mycobactéries possèdent une paroi particulièrement épaisse et lipophile qui les rend naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques<sup>35,36</sup>. Malgré tout,

il est possible que la protection de l'acide rétrohydroxamique par l'éther de benzyle augmente légèrement la lipophilie de ces composés et qu'une partie puisse rentrer dans la cellule.

Dans le cas des doubles prodrogues **148a-d**, en revanche, une zone d'inhibition de croissance est observée sans aucune résistance, c'est-à-dire avec une absence totale de colonies bactériennes dans cette zone (Tableau 4).

Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne d'une souche de *M. smegmatis* observés pour les prodrogues **148a-d**.



| Entrée | Composé        | Quantité déposée (nmol) | Diamètre zone inhibition (mm) |
|--------|----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1      | <b>149</b> INH | 30                      | 21                            |
| 2      | <b>148a</b>    | 800                     | 8                             |
| 3      | <b>148b</b>    | 800                     | 8                             |
| 4      | <b>148c</b>    | 800                     | 8                             |
| 5      | <b>148d</b>    | 800                     | 9                             |

Ainsi, comparées aux acides phosphoniques **145a-d** correspondants, les prodrogues possèdent une bien meilleure efficacité antibactérienne, ce qui suggère que l'approche prodrogue permet effectivement une meilleure pénétration cellulaire suivie d'une libération des acides phosphoniques *in cellulo*. L'inhibition observée peut être due à plusieurs facteurs. Premièrement, les acides phosphoniques protégés par un OBn pourraient effectivement être des inhibiteurs de la DXR de *M. smegmatis*. La réalisation de tests d'inhibition enzymatique sur la DXR de *M. smegmatis* avec ces acides phosphoniques permettraient de confirmer cette hypothèse. Ensuite, il n'est pas exclu que ces acides phosphoniques **145a-d** inhibent une autre voie métabolique essentielle à la mycobactérie. Enfin, lors de l'hydrolyse des groupements POM, deux molécules de formaldéhyde sont générées. Malgré la mise en place de mécanismes de détoxification du formaldéhyde par les bactéries<sup>87</sup>, ce composé possède un caractère toxique et mutagène pour ces dernières<sup>88</sup>. Ainsi, nous pourrions penser que l'activité inhibitrice des prodrogues provient, du moins en partie, de la libération du formaldéhyde. Or, il a récemment été montré que *M. smegmatis* est capable de méthylotrophie, c'est-à-dire d'utiliser des composés en C1 comme seule source de carbone et d'énergie<sup>89</sup>. Ainsi, il est peu probable que le formaldéhyde généré lors de la libération des acides phosphoniques *in cellulo* participe à l'inhibition de la croissance bactérienne. Nous pouvons également noter que si une activité antibactérienne est observée avec les prodrogues, les diamètres d'inhibition restent faibles (entre 8 et 9 mm), comparés à l'antibiotique de référence, l'isoniazide (21 mm), ce qui pourrait

être dû à une moins bonne diffusion des prodrogues dans la gélose. En effet, l'isoniazide est en solution dans l'eau, tandis que les prodrogues sont solubilisées dans le DMSO et ces solutions possèdent une viscosité plus élevée.

Par ailleurs, la différence d'activité observée sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* d'une part, et *M. smegmatis*, d'autre part, pourrait s'expliquer par des modifications dans la séquence des acides aminés de la protéine DXR chez ces différentes bactéries. Ainsi, l'affinité de liaison des inhibiteurs pour ces enzymes pourrait varier. En effet, c'est le cas de la fosmidomycine et du FR-900098 qui possèdent des IC<sub>50</sub> respectifs de 42 et 4 nM sur la DXR d'*E. coli* et 510 et 320 nM sur la DXR de *M. smegmatis*, soit des affinités 12 fois et 80 fois plus importantes pour l'enzyme d'*E. coli*<sup>18</sup>.

Afin d'approfondir l'évaluation des activités inhibitrices des composés synthétisés dans cette partie, deux études complémentaires pourraient être réalisées :

- ◆ Des tests d'inhibition de croissance sur des souches de *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* et *M. smegmatis* avec les inhibiteurs bisubstrats **136a-d** permettraient de comparer leur efficacité avec celle des acides phosphoniques et des prodrogues portant un groupement OBn.
- ◆ Des tests d'inhibition enzymatique *in vitro* sur la DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis* avec les acides phosphoniques **145a-d** protégés permettraient de confirmer que ces derniers sont bien des inhibiteurs de l'enzyme.

## B. Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide

La détermination des CMI par microdilution en milieu liquide consiste à cultiver des bactéries en présence des différents composés à tester dans les puits d'une microplaque. L'inhibition de croissance se manifeste par l'absence de trouble dans les micropuits et est observée à l'œil nu après 24h d'incubation à 37°C<sup>90</sup>. Les acides phosphoniques **145a-d** et les prodrogues bis(POM) **148a-d** sont testées sur des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Les tests ont été réalisés avec des concentrations finales de 100 µM ou 2,5 mM de produit dans les micropuits. Pour chacune des cultures bactériennes, la fosmidomycine **57** est utilisée comme témoin avec une concentration de 25 µM. Pour chaque composé, nous observons une croissance bactérienne aux deux concentrations testées. Ainsi, ces résultats viennent confirmer l'absence d'inhibition de croissance observée lors des tests par diffusion en milieu gélosé. Toutefois, nous pouvons noter qu'à 2,5 mM, la croissance bactérienne est difficile à évaluer avec les prodrogues **148a-d** puisque dès l'ajout des composés dans le puits, nous observons l'apparition d'une opacité du milieu. Cette opacité pourrait être due à une solubilisation difficile des prodrogues en milieu aqueux à cette concentration (milieu Mueller-Hinton).

Afin de compléter les résultats obtenus avec *M. smegmatis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé, des tests d'inhibition de croissance de cette mycobactérie en milieu liquide sont en cours.

#### IV. Conclusion

La combinaison de la stratégie bisubstrat, afin d'obtenir des inhibiteurs possédant une plus grande spécificité vis-à-vis de la DXR, et de la stratégie prodroge afin d'augmenter leur biodisponibilité, nous a conduit à synthétiser des prodrogues bis(POM) des inhibiteurs bisubstrats **136a-d**.

Malgré nos diverses tentatives, la dernière étape de déprotection de l'éther benzylique n'a pas permis d'isoler les prodrogues finales désirées. Ainsi, l'utilisation d'un autre groupement protecteur dès le début de la synthèse, tel qu'un groupement diméthoxybenzyle qui se déprotège en milieu acide, pourrait permettre de faciliter cette dernière étape. En effet, un exemple de synthèse de prodrogues bis(POM) comportant un acide hydroxamique protégé par un éther benzylique a été décrit dans la littérature<sup>91</sup>. De la même manière, la déprotection de ce groupement s'est avérée très difficile. Ruda *et al* ont alors protégé l'hydroxylamine par un groupement diméthoxybenzyle selon la méthode décrite par Barlaam<sup>92</sup>, et la déprotection finale a permis l'obtention des composés désirés. Une autre possibilité serait de protéger l'hydroxylamine par un éther silylé dont les conditions classiques de déprotection permettraient d'éviter l'utilisation d'un catalyseur. De plus, il pourrait aussi être intéressant de considérer un groupement protecteur de l'hydroxylamine qui se déprotègerait en milieu anoxique afin que la déprotection puisse avoir lieu spécifiquement au niveau de l'environnement anoxique des cellules cancéreuses. Un tel groupement pourrait être un 4-nitrobenzyle ou un 2-nitro-*N*-méthyl-imidazolyle par exemple<sup>93,94</sup>.

Bien que les prodrogues finales désirées n'aient pas pu être obtenues, nous avons évalué l'activité antibactérienne des doubles prodrogues **148a-d** et des acides phosphoniques **145a-d** protégés par un éther de benzyle. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests d'inhibition de croissance par diffusion sur milieu gélosé et en milieu liquide en microplaques sur des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis*. Ces deux méthodes montrent qu'aucun de nos composés n'inhibent la croissance d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Chez *M. smegmatis*, la méthode de diffusion en milieu gélosé démontre que les prodrogues **148a-d** possèdent une meilleure activité inhibitrice comparée aux acides phosphoniques **145a-d** avec un diamètre d'inhibition très net et l'absence de résistance. Cette observation suggère (i) que l'approche prodroge permet effectivement d'augmenter la pénétration cellulaire des composés, (ii) que les acides phosphoniques **145a-d** sont bien libérés dans la cellule et (iii) que ces derniers sont soit des inhibiteurs de la DXR de *M. smegmatis*, soit des inhibiteurs d'une autre voie métabolique essentielle à la bactérie. Concernant les tests

d'inhibition de croissance de *M. smegmatis* en milieu liquide, ces derniers sont en train d'être réalisés.

Afin de pouvoir compléter ces résultats, il serait intéressant de (i) tester les inhibiteurs bisubstrats **136a-d** par ces deux mêmes méthodes sur les souches de *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis* et (ii) réaliser des tests d'inhibition enzymatique *in vitro* sur la DXR d'*E. coli* et celle de *M. smegmatis* avec les acides phosphoniques **145a-d**.

Par ailleurs, afin d'augmenter la biodisponibilité des inhibiteurs bisubstrats **136a-d**, nous pourrions les synthétiser sous la forme d'un acyloxyprényle ester (Figure 52).

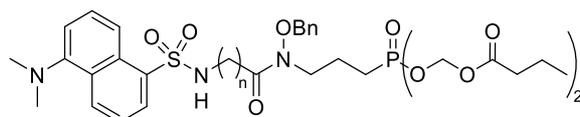


Figure 52. Prodrogues acyloxyprényle ester des inhibiteurs bisubstrats **136a-d**.

En effet, nous avons vu dans l'introduction de ce chapitre que le composé **119** s'est montré particulièrement efficace pour délivrer des analogues phosphonohydroxamiques du FR-900098 chez *M. smegmatis* (Figure 44).

## Références

- (1) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 13–17. doi:10.7164/antibiotics.33.13.
- (2) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 24–28. doi:10.7164/antibiotics.33.24.
- (3) Kuroda, Y.; Okuhara, M.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 29–35. doi:10.7164/antibiotics.33.29.
- (4) Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913–7916. doi:10.1016/S0040-4039(98)01755-9.
- (5) Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S. J.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 236–243. doi:10.1021/bi0118207.
- (6) Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Türbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. *Science* **1999**, *285*, 1573–1576. doi:10.1126/science.285.5433.1573.
- (7) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285. doi:10.1016/j.ejmech.2012.02.031.
- (8) Ball, H. S.; Girma, M. B.; Zainab, M.; Soojhawon, I.; Couch, R. D.; Noble, S. M. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 2987–2998. doi:10.1021/acsinfectdis.1c00132.
- (9) Haemers, T.; Wiesner, J.; Poecke, S. V.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Calenbergh, S. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1888–1891. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.082.
- (10) Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 329–333. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09307.x.
- (11) Haymond, A.; Johnny, C.; Dowdy, T.; Schweibenz, B.; Villarroel, K.; Young, R.; Mantooth, C. J.; Patel, T.; Bases, J.; Jose, G. S.; Jackson, E. R.; Dowd, C. S.; Couch, R. D. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106243. doi:10.1371/journal.pone.0106243.
- (12) Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K. T. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 9. doi:10.1038/srep00009.
- (13) Na-Bangchang, K.; Ruengweerayut, R.; Karbwang, J.; Chauemung, A.; Hutchinson, D. *Malar. J.* **2007**, *6*, 70. doi:10.1186/1475-2875-6-70.
- (14) Missinou, M. A.; Borrmann, S.; Schindler, A.; Issifou, S.; Adegnika, A. A.; Matsiegui, P.-B.; Binder, R.; Lell, B.; Wiesner, J.; Baranek, T.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. *The Lancet* **2002**, *360*, 1941–1942. doi:10.1016/S0140-6736(02)11860-5.
- (15) Borrmann, S.; Issifou, S.; Esser, G.; Adegnika, A. A.; Ramharter, M.; Matsiegui, P.; Oyakhrome, S.; Mawili-Mboumba, D. P.; Missinou, M. A.; Kun, J. F. J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1534–1540. doi:10.1086/424603.
- (16) Katayama, N.; Nozaki, Y.; Harada, S.; Ono, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1990**, *1990*, 238–246. doi:10.7164/antibiotics.43.238.
- (17) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375–2385. doi:10.1016/j.bmc.2005.11.012.
- (18) Munier, M.; Tritsch, D.; Krebs, F.; Esque, J.; Hemmerlin, A.; Rohmer, M.; Stote, R. H.; Grosdemange-Billiard, C. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 684–689. doi:10.1016/j.bmc.2016.11.040.
- (19) Knak, T.; Abdullaziz, M. A.; Höfmann, S.; Alves Avelar, L. A.; Klein, S.; Martin, M.; Fischer, M.; Tanaka, N.; Kurz, T. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1553. doi:10.3390/ph15121553.

- (20) Kojo, H.; Shigi, Y.; Nishida, M. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 44–48. doi:10.7164/antibiotics.33.44.
- (21) Sakamoto, Y.; Furukawa, S.; Ogihara, H.; Yamasaki, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2030–2033. doi:10.1271/bbb.67.2030.
- (22) Hemmerlin, A.; Tritsch, D.; Hammann, P.; Rohmer, M.; Bach, T. J. *Biochimie* **2014**, *99*, 54–62. doi:10.1016/j.biochi.2013.11.008.
- (23) Fujisaki, S.; Ohnuma, S.; Horiuchi, T.; Takahashi, I.; Tsukui, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Kitabatake, M.; Inokuchi, H. *Gene* **1996**, *175*, 83–87. doi:10.1016/0378-1119(96)00128-X.
- (24) Messiaen, A.-S.; Verbruggen, T.; Declerck, C.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Nelis, H.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 261–264. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.04.020.
- (25) Dhiman, R. K.; Schaeffer, M. L.; Bailey, A. M.; Testa, C. A.; Scherman, H.; Crick, D. C. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 8395–8402. doi:10.1128/JB.187.24.8395–8402.2005.
- (26) Brown, A. C.; Parish, T. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 78. doi:10.1186/1471-2180-8-78.
- (27) Hoeffler, J.-F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446–4457. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03150.x.
- (28) Phaosiri, C.; Proteau, P. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5309–5312. doi:10.1016/j.bmcl.2004.08.023.
- (29) Wong, A.; Munos, J. W.; Devasthali, V.; Johnson, K. A.; Liu, H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3625–3628. doi:10.1021/ol048459b.
- (30) Walker, J. R.; Poulter, C. D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9955–9959. doi:10.1021/jo0516786.
- (31) Fox, D. T.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8360–8368. doi:10.1021/bi047312p.
- (32) Fox, D. T.; Poulter, C. D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1978–1985. doi:10.1021/jo048022h.
- (33) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135. doi:10.1042/BJ20041378.
- (34) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3203–3207. doi:10.1021/jo9024732.
- (35) Brennan, P. J.; Nikaido, H. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 29–63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
- (36) Jarlier, V.; Nikaido, H. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *123*, 11–18. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x.
- (37) Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6539–6542. doi:10.1021/jm9012592.
- (38) Andaloussi, M.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Suresh, S.; Wieckowska, A.; Iyer, H.; Karlén, A.; Larhed, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5403–5407. doi:10.1016/j.bmcl.2011.07.005.
- (39) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6563–6567. doi:10.1016/j.bmcl.2012.09.021.
- (40) Deng, L.; Endo, K.; Kato, M.; Cheng, G.; Yajima, S.; Song, Y. *ACS Med Chem Lett* **2010**, *2*, 165–170. doi:10.1021/ml100243r.
- (41) Deng, L.; Diao, J.; Chen, P.; Pujari, V.; Yao, Y.; Cheng, G.; Crick, D. C.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4721–4734. doi:10.1021/jm200363d.
- (42) Jackson, E. R.; San Jose, G.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Sheldon, Z.; Haymond, A.; Johnny, C.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; Dowd, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 649–653. doi:10.1016/j.bmcl.2013.11.067.

- (43) Haemers, T.; Wiesner, J.; Gießmann, D.; Verbrugghen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3361–3371. doi:10.1016/j.bmc.2007.12.001.
- (44) Andaloussi, M.; Henriksson, L. M.; Więckowska, A.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Larsson, A. M.; Suresh, S.; Iyer, H.; Srinivasa, B. R.; Bergfors, T.; Unge, T.; Mowbray, S. L.; Larhed, M.; Jones, T. A.; Karlén, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4964–4976. doi:10.1021/jm2000085.
- (45) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeußen, A.; Pein, M. K.; Gräwert, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Maes, L.; Groll, M.; Kurz, T. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6796–6802. doi:10.1021/jm200694q.
- (46) Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566–6575. doi:10.1021/jm300652f.
- (47) Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C. T.; Werner, P.; Hähn, S.; Eisenreich, W.; Riederer, U.; Mordmüller, B.; Bacher, A.; Fischer, M.; Groll, M.; Kurz, T. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8151–8162. doi:10.1021/jm4012559.
- (48) Ball, H. S.; Girma, M.; Zainab, M.; Riley, H.; Behrendt, C. T.; Lienau, C.; Konzuch, S.; Avelar, L. A. A.; Lungerich, B.; Soojhawon, I.; Noble, S. M.; Kurz, T.; Couch, R. D. *ACS Omega* **2020**, *5*, 5170–5175. doi:10.1021/acsomega.9b04171.
- (49) Xue, J.; Diao, J.; Cai, G.; Deng, L.; Zheng, B.; Yao, Y.; Song, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 278–282. doi:10.1021/ml300419r.
- (50) Verbrugghen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5342–5346. doi:10.1021/jm100211e.
- (51) Nieschalk, J.; Batsanov, A. S.; O’Hagan, D.; Howard, J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 165–176. doi:10.1016/0040-4020(95)00890-K.
- (52) Dreneau, A.; Krebs, F. S.; Munier, M.; Ngov, C.; Tritsch, D.; Lièvremon, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Molecules* **2021**, *26*, 5111. doi:10.3390/molecules 26165111.
- (53) Blackburn, G. M.; England, D. A.; Kolkman, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, *1981*, 930–932. doi:10.1039/c39810000930.
- (54) Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkämper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1232–1241. doi:10.1002/cmdc.200800083.
- (55) Gadakh, B.; Pouyez, J.; Wouters, J.; Venkatesham, A.; Cos, P.; Van Aerschot, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1577–1579. doi:10.1016/j.bmcl.2015.02.006.
- (56) Nguyen-Trung, A. T.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1643–1647. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.080.
- (57) Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833–835. doi:10.1016/S0960-894X(01)00075-0.
- (58) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2163–2166. doi:10.1016/S0960-894X(03)00354-8.
- (59) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2005**, *338*, 305–314. doi:10.1002/ardp.200500976.
- (60) Uh, E.; Jackson, E. R.; San Jose, G.; Maddox, M.; Lee, R. E.; Lee, R. E.; Boshoff, H. I.; Dowd, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6973–6976. doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.123.
- (61) Courtens, C.; Risseuw, M.; Caljon, G.; Maes, L.; Cos, P.; Martin, A.; Van Calenbergh, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1232–1235. doi:10.1016/j.bmcl.2019.03.009.

- (62) Brücher, K.; Gräwert, T.; Konzuch, S.; Held, J.; Lienau, C.; Behrendt, C.; Illarionov, B.; Maes, L.; Bacher, A.; Wittlin, S.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2025–2035. doi:10.1021/jm5019719.
- (63) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Åqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905–19916. doi:10.1074/jbc.M701935200.
- (64) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Haymond, A.; Johny, C.; Edwards, R. L.; Wang, X.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Odom, A. R.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; Dowd, C. S. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 923–935. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00125.
- (65) San Jose, G.; Jackson, E. R.; Uh, E.; Johny, C.; Haymond, A.; Lundberg, L.; Pinkham, C.; Kehn-Hall, K.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; Dowd, C. S. *MedChemComm* **2013**, *4*, 1099–1104. doi:10.1039/c3md00085k.
- (66) Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3713–3719. doi:10.1016/j.bmc.2014.05.004.
- (67) Jansson, A. M.; Więckowska, A.; Björkelid, C.; Yahiaoui, S.; Sooriyaarachchi, S.; Lindh, M.; Bergfors, T.; Dharavath, S.; Desroses, M.; Suresh, S.; Andaloussi, M.; Nikhil, R.; Sreevalli, S.; Srinivasa, B. R.; Larhed, M.; Jones, T. A.; Karlén, A.; Mowbray, S. L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6190–6199. doi:10.1021/jm4006498.
- (68) Bartzatt, R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488*, 203–209. doi:10.1016/S0003-2670(03)00704-9.
- (69) Li, Y.-H.; Chan, L.-M.; Tyer, L.; Moody, R. T.; Himel, C. M.; Hercules, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3118–3126. doi:10.1021/ja00844a033.
- (70) Chen, R. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *120*, 609–620. doi:10.1016/0003-9861(67)90526-7.
- (71) Dreneau, A. Thèse de l'Université de Strasbourg, Université de Strasbourg, 2017.
- (72) Suresh, S.; Shyamraj, D.; Larhed, M. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1183–1188. doi:10.1016/j.tet.2012.11.049.
- (73) Leggio, A.; Belsito, E. L.; De Luca, G.; Di Gioia, M. L.; Leotta, V.; Romio, E.; Siciliano, C.; Liguori, A. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 34468–34475. doi:10.1039/C5RA24527C.
- (74) Nakonieczna, Ł.; Milewska, M.; Kolasa, T.; Chimiak, A. *Synthesis* **1985**, *1985*, 929–931. doi:10.1055/s-1985-31387.
- (75) Llàcer, E.; Romea, P.; Urpí, F. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5815–5818. doi:10.1016/j.tetlet.2006.05.109.
- (76) Wilke, S.; Scheffler, M. *Surf. Sci.* **1995**, *329*, L605–L610. doi:10.1016/0039-6028(95)00355-X.
- (77) Albers, P.; Pietsch, J.; Parker, S. F. *J. Mol. Catal. Chem.* **2001**, *173*, 275–286. doi:10.1016/S1381-1169(01)00154-6.
- (78) Bartholomew, C. H. *Appl. Catal. Gen.* **2001**, *212*, 17–60. doi:10.1016/S0926-860X(00)00843-7.
- (79) Castro, F. J.; Meyer, G.; Zampieri, G. *J. Alloys Compd.* **2002**, *330–332*, 612–616. doi:10.1016/S0925-8388(01)01626-7.
- (80) Apfel, C.; Banner, D. W.; Bur, D.; Dietz, M.; Hirata, T.; Hubschwerlen, C.; Locher, H.; Page, M. G. P.; Pirson, W.; Rossé, G.; Specklin, J.-L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2324–2331. doi:10.1021/jm000018k.
- (81) Perruchon, J.; Ortmann, R.; Schlitzer, M. *Synthesis* **2007**, *2007*, 3553–3557. doi:10.1055/s-2007-990811.
- (82) Pearlman, W. M. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1663–1664. doi:10.1016/S0040-4039(00)70335-2.
- (83) Wang, Z. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; Wiley, 2010; pp 2143–2146. doi:10.1002/9780470638859.conrr483.

- (84) Notz, W.; Hartel, C.; Waldscheck, B.; Schmidt, R. R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4250–4260. doi:10.1021/jo015543l.
- (85) Verbrugghen, T.; Vandurm, P.; Pouyez, J.; Maes, L.; Wouters, J.; Van Calenbergh, S. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 376–380. doi:10.1021/jm301577q.
- (86) Munier, M.; Tritsch, D.; Lièvreumont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Molecules* **2023**, *28*, 7713. doi:10.3390/molecules28237713.
- (87) Yurimoto, H.; Kato, N.; Sakai, Y. *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 367–375. doi:10.1002/tcr.20056.
- (88) Takahashi, K.; Morita, T.; Kawazoe, Y. *Mutat. Res. Toxicol.* **1985**, *156*, 153–161. doi:10.1016/0165-1218(85)90058-8.
- (89) Dubey, A. A.; Wani, S. R.; Jain, V. *J. Bacteriol.* **2018**, *200*, e00288-18. doi:10.1128/JB.00288-18.
- (90) Weinstein, M. P.; Patel, J. B. 11. edition.; Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute; Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, 2018.
- (91) Ruda, G. F.; Alibu, V. P.; Mitsos, C.; Bidet, O.; Kaiser, M.; Brun, R.; Barrett, M. P.; Gilbert, I. H. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1169–1180. doi:10.1002/cmdc.200700040.
- (92) Barlaam, B.; Hamon, A.; Maudet, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7865–7868. doi:10.1016/S0040-4039(98)01760-2.
- (93) Sharma, A.; Arambula, J. F.; Koo, S.; Kumar, R.; Singh, H.; Sessler, J. L.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 771–813. doi:10.1039/C8CS00304A.
- (94) Wang, S.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zhang, D.; Xie, B.; Pan, Z.; Ouyang, K.; Peng, T. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 3469–3478. doi:10.1039/D1OB00356A.

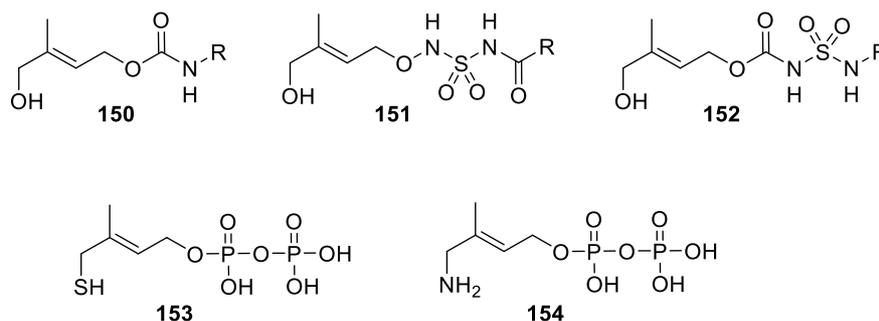
## PARTIE 2 : PRODRUGUES D'INHIBITEURS PHOSPHATE DE IspH/LYTb

### I. Introduction

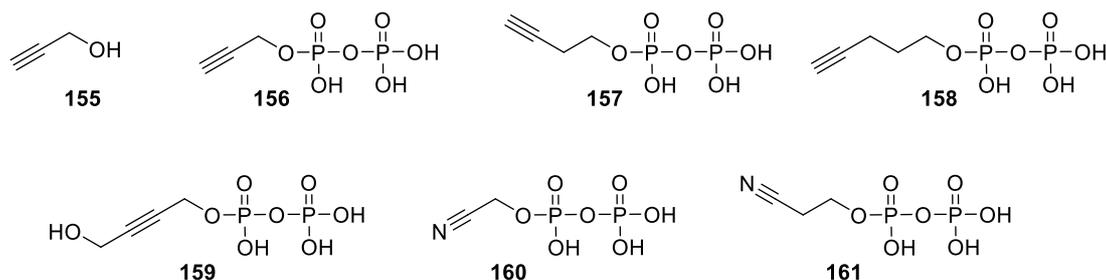
#### A. Les inhibiteurs d'IspH

Contrairement à la DXR, aucun inhibiteur naturel n'a été identifié pour IspH. Toutefois, l'étude du mécanisme de la transformation du HMBPP en IPP et en DMAPP a permis l'identification de quelques composés aux propriétés inhibitrices dont la plupart ciblent le cluster [4Fe-4S] de l'enzyme. On peut distinguer quatre catégories d'inhibiteurs : les analogues du substrat, les dérivés d'alcyne, les diphosphates de pyridine et ceux qui ne contiennent pas de groupement diphosphate.

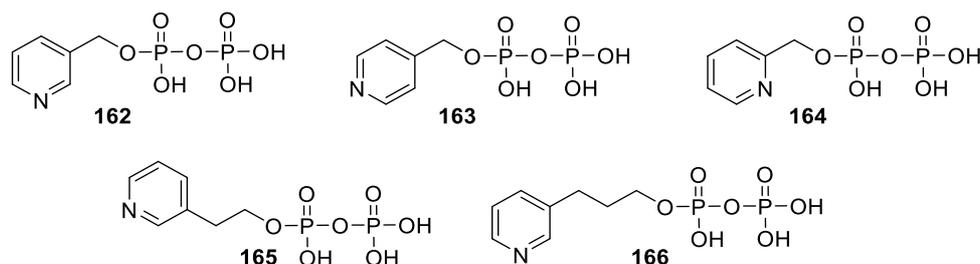
Les analogues du HMBPP s'appuient sur des modifications au niveau soit du diphosphate soit de l'hydroxyle. Puisque le HMBPP contient un groupement diphosphate sensible aux phosphatases, donc peu stable *in vivo*, Van Hoof *et al* ont synthétisé des analogues où le diphosphate est substitué par un carbamate **150**, un *N*-acyl-*N'*-oxy sulfamate **151** ou un carbamate d'aminosulfonyle **152** (Figure 53). Aucune activité inhibitrice sur l'IspH d'*A. aeolicus* n'a été observée pour les composés testés, suggérant que le groupement diphosphate est nécessaire pour la fixation des composés au site actif<sup>1</sup>. L'autre approche consiste à substituer l'hydroxyle par d'autres groupements capables de se chélater au fer du cluster. Ainsi, l'activité des analogues **153** et **154** où l'hydroxyle est remplacé respectivement par un thiol, (*E*)-4-thio-2-méthylbut-2-én-1-yl diphosphate (TMBPP), et une amine, (*E*)-4-amino-2-méthylbut-2-én-1-yl diphosphate (AMBPP), deux groupements qui sont également de moins bons groupes partants, a été évaluée sur l'enzyme d'*E. coli* (Figure 53). Ces deux composés, qui se fixeraient au cluster par le thiol et l'amine de la même manière que le HMBPP avec son hydroxyle, possèdent tous deux une activité inhibitrice très intéressante avec des IC<sub>50</sub> respectives de 0,21 et 0,15 μM<sup>2,3</sup>. Ils ont également été décrits comme des inhibiteurs compétitifs et réversibles de l'enzyme avec des K<sub>i</sub> de 24 nM pour le TMBPP et 54 nM à pH 8 pour le AMBPP. En effet, la valeur du K<sub>i</sub> du AMBPP et sa vitesse de fixation dans le site actif sont dépendants du pH. La faible affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme observée à un pH plus acide pourrait alors provenir du fait que l'amine se lie moins bien au cluster lorsqu'elle est sous sa forme protonée. Ainsi, la nécessité d'une étape supplémentaire de déprotonation expliquerait sa fixation plus lente au site actif<sup>4</sup>.


 Figure 53. Inhibiteurs d'IspH : analogues du substrat **150** à **154**.

Après avoir étudié le mécanisme catalytique d'IspH, l'équipe d'Oldfield a identifié la formation de complexes organométalliques  $\pi$  ou  $\sigma/\pi$  entre le cluster et la double liaison du HMBPP après rotation de l'hydroxyle d'une part, et avec l'anion allylique formé après la seconde réduction du cluster d'autre part. Ainsi, des composés qui se lieraient *via* ce type de complexe organométallique au cluster pourraient empêcher le HMBPP de s'y chélater. Ce pourrait être le cas des alcynes qui ont été suggérés comme potentiels inhibiteurs d'IspH<sup>5</sup>. En effet, McMillan *et al* ont étudié la réduction de l'acétylène par un cluster [4Fe-4S], notamment un cluster [4Fe-4S-4SPh]<sup>3-</sup>, et ont proposé la formation d'un complexe organométallique  $\sigma/\pi$  entre le cluster et la triple liaison avant réduction<sup>6</sup>. De plus, la formation de ce complexe a été confirmée par spectroscopie Raman avec l'observation de décalages significatifs dans le spectre vibrationnel de l'acétylène lorsque celui-ci est lié au cluster<sup>7</sup>. Wang *et al* ont alors préparé une série d'alcynes diphosphates dérivés de l'alcool propargylique **155** qui ont été testés sur l'IspH d'*A. aeolicus* (Figure 54). Si les analyses des spectres de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) montrent que l'alcool propargylique **155** se lie effectivement au cluster *via* un complexe  $\pi$ , ce composé est un très mauvais inhibiteur de l'enzyme avec un  $K_i > 10$  mM. En revanche, la présence d'un groupement diphosphate permet d'augmenter fortement l'activité inhibitrice puisque l'alcyne **156** possède un  $K_i$  de 0,97  $\mu$ M et une  $IC_{50}$  de 6,7  $\mu$ M. En effet, des études de *docking* suggèrent que le groupement diphosphate se positionnerait dans le site du diphosphate inorganique observé aux rayons X lors des premières études cristallographiques d'IspH<sup>8</sup>, ce qui renforcerait l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. La meilleure inhibition est observée pour l'alcyne **157** avec un  $K_i$  de 60 nM environ et une  $IC_{50}$  de 0,45  $\mu$ M. L'ajout d'un carbone supplémentaire conduit à l'alcyne **158** avec une activité inhibitrice similaire à celle de **156** ( $IC_{50} = 6,5$   $\mu$ M). Les deux carbones du composé **157** seraient alors la longueur optimale afin de permettre de meilleures interactions entre le cluster et la triple liaison d'une part, et le diphosphate et les acides aminés de la poche du diphosphate inorganique d'autre part. De plus, le composé **159** avec l'alcyne substitué par un CH<sub>2</sub>OH, ainsi que les dérivés nitriles **160** et **161**, inhibent l'enzyme avec une moins bonne efficacité que **157** ce qui suggère que la substitution d'un alcyne diminue l'affinité de la triple liaison pour le cluster<sup>9</sup>.

Figure 54. Inhibiteurs d'IspH : dérivés d'alcyne **155** à **161**.

Une série de diphosphates et de bisphosphonates, inhibiteurs de la prényle synthase, ont également été testés sur l'IspH d'*A. aeolicus* et certains diphosphates de pyridine se sont révélés posséder des activités inhibitrices faibles à modérées<sup>9</sup>. Dans le cas du diphosphate de *m*-pyridine **162**, qui possède une IC<sub>50</sub> modeste de 38 μM, des études de *docking* montrent que le diphosphate s'insérerait dans une poche polaire non loin du cluster, tandis que l'azote de la pyridine interagirait fortement avec le Glu126 et se lierait au cluster [4Fe-4S]<sup>9,10</sup> (Figure 55). Concernant les diphosphates de *p*- **163** et *o*-pyridine **164**, une distance plus élevée entre l'azote et le Glu126 est observée, ce qui conduirait à une perte d'activité inhibitrice. De plus, bien que les cycles pyridiniques de ces trois inhibiteurs se trouvent à proximité du cluster, et contrairement à ce qui était attendu, aucune interaction de type complexe π n'a été détectée par spectroscopie RPE. La meilleure inhibition est ici encore observée pour le composé **165** possédant une longueur de chaîne de deux carbones (IC<sub>50</sub> = 9,1 μM), tandis que l'ajout d'un carbone supplémentaire (composé **166**) diminue drastiquement l'activité inhibitrice. Ainsi, une longueur de chaîne de deux carbones serait la longueur optimale afin d'assurer les interactions entre (i) le diphosphate et la poche polaire et (ii) l'azote de la pyridine et le Glu126<sup>9</sup>.

Figure 55. Inhibiteurs d'IspH : diphosphates de pyridine **162** à **166**.

Des études de criblage *in silico* ont mis en évidence les deux inhibiteurs **167** et **168**, dérivés de l'acide barbiturique et ne comportant pas de groupement diphosphate (Figure 56). Leur activité inhibitrice est comparable à celle des alcynes diphosphates décrits plus haut puisque **167** inhibe l'IspH de *P. aeruginosa* avec un Ki de 500 nM et **168** est un inhibiteur de l'enzyme d'*E. coli* avec un Ki de 3 μM. Ces deux composés pourraient se fixer dans le large site actif d'IspH avec des interactions entre le Fe du cluster et la forme énolate du motif barbiturique similaires à celles observées avec un cation Zn<sup>2+</sup> au sein d'autres metalloprotéines. Cette nouvelle catégorie d'inhibiteurs est très intéressante puisque ces dérivés de l'acide barbiturique,

en plus d'être plus stables et plus lipophiles que des composés possédant un diphosphate, respectent les règles de Lipinski pour la conception de nouveaux composés d'intérêt biologique<sup>11</sup>.

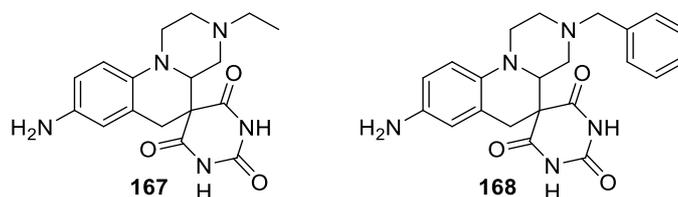


Figure 56. Inhibiteurs non-diphosphates d'IspH **167** à **168**.

Les inhibiteurs décrits dans cette partie ont été en majorité testés *in vitro* sur l'IspH d'*E. coli* et d'*A. aeolicus* qui est une bactérie particulière puisqu'elle est hyperthermophile et microaérophile<sup>12</sup>. De plus, aucun de ces inhibiteurs n'a fait l'objet de tests d'inhibition de croissance sur des bactéries. Pour ce faire, il serait nécessaire de masquer les charges de leurs groupements phosphates, chargés à pH physiologique, afin de pouvoir optimiser leur pénétration cellulaire. Toutefois, aucune prodroge de ces inhibiteurs n'a été décrite dans la littérature.

Afin de réaliser des tests d'inhibition de croissance sur des bactéries modèles, nous avons considéré la synthèse de prodrogues de certains inhibiteurs d'IspH. Nous avons alors choisi de travailler avec les inhibiteurs diphosphates les plus efficaces, c'est-à-dire les analogues thio **153** et amino **154** du HMBPP, le diphosphate d'alcyne **157** et le diphosphate de pyridine **165**. Toutefois, la majorité des stratégies de prodrogues étant appliquée à des monophosphates ou monophosphonates, nous envisageons d'appliquer la stratégie prodroge à des dérivés monophosphates de ces inhibiteurs. Une fois ces dérivés monophosphates libérés *in cellulo*, ils pourraient alors être phosphorylés pour conduire aux inhibiteurs biologiquement actifs.

Parmi les stratégies de prodrogues classiquement utilisées et qui ont fait leurs preuves sur des inhibiteurs de la DXR ou sur des nucléotides, on retrouve les prodrogues du type acyloxyalkyle ester ou phosphoramidate. Ainsi, le groupement phosphate des dérivés monophosphates des inhibiteurs d'IspH pourrait être masqué par un groupement bis(POM) ou un diester d'acyloxyprényle par exemple. En effet, nous avons vu précédemment que les prodrogues du type acyloxyalkyle ester se sont montrées efficaces pour augmenter la biodisponibilité des inhibiteurs de la DXR (cf Chapitre 1, partie 1, I. B.). Cependant, une étude réalisée au laboratoire sur des prodrogues du type phosphoramidate d'inhibiteurs de la DXR a montré que ce type de composé est inefficace pour inhiber la croissance de bactéries telles que *E. coli* ou *M. smegmatis*<sup>13</sup>. L'inconvénient majeur de ces deux approches est la nécessité d'une ou plusieurs enzymes (estérases, carboxypeptidases et phosphoramidases) pour libérer l'inhibiteur au sein de la cellule. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une autre stratégie en préparant des prodrogues du type *cyclo*Saligényle qui ne nécessitent pas d'enzymes pour la libération du composé actif et qui ont fait leurs preuves sur des antiviraux.

## B. Les prodrogues de type *cycloSaligényle* (*cycloSal*)

### 1. Le principe des prodrogues *cycloSal*

Les agents antiviraux et anticancéreux biologiquement actifs sont en majorité des dérivés de nucléosides, notamment des nucléosides 5'-triphosphate<sup>14</sup>. Ainsi, lorsque les nucléosides administrés entrent dans la cellule, trois phosphorylations successives sont nécessaires pour former les antiviraux actifs et la première phosphorylation, réalisée par une kinase spécifique, constitue l'étape limitante. L'introduction dans la cellule d'un nucléoside préalablement monophosphorylé permettrait donc en théorie d'éviter cette première phosphorylation problématique. Toutefois, le phosphate étant un groupement très polaire et très peu perméable aux membranes cellulaires, il est nécessaire d'avoir recours à une stratégie de prodrogue afin de délivrer le nucléotide dans la cellule. Cette approche est alors appelée pronucléotide (prodrogue de nucléotide)<sup>15</sup>.

La stratégie *cycloSal* a été développée par Chris Meier afin d'améliorer la perméabilité de nucléosides monophosphates utilisés pour le traitement du VIH<sup>16</sup> et s'est montrée efficace sur des antiviraux tels que la 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T)<sup>17</sup> et la 2',3'-dideoxyadenosine (ddA)<sup>18</sup>. Les prodrogues *cycloSal* permettent de masquer un groupement phosphate grâce à l'alcool salicylique (ou saligénol) **173** et possèdent l'avantage d'une hydrolyse exclusivement dépendante du pH (Schéma 30). En effet, le mécanisme de libération des prodrogues *cycloSal* se base sur la différence de réactivité entre un phosphoester de phénol et un phosphoester benzylique. Dans le premier cas, l'hydrolyse est favorisée en présence d'un groupement accepteur tandis que pour le second, c'est un groupement donneur qui favorise la rupture de la liaison P-O.

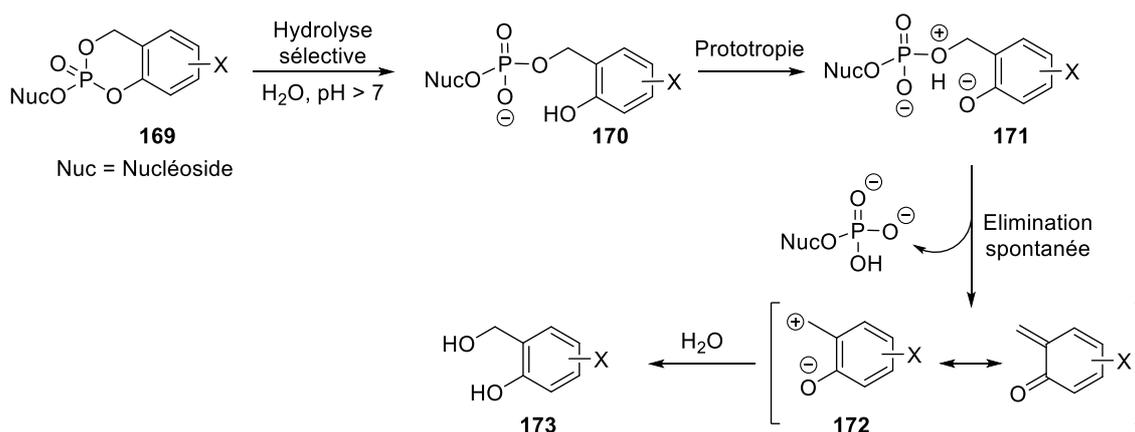


Schéma 30. Mécanisme d'hydrolyse d'une prodrogue *cycloSal* d'un nucléoside (Nuc).

Ainsi, à pH > 7, on observe en premier lieu la rupture de la liaison ester de phénol avec formation du phénol **170** stabilisé par mésomérie (Schéma 30). Le groupement en *ortho* de la liaison phosphoester de benzyle passe alors d'un phosphoester légèrement attracteur à un hydroxyle fortement donneur. Cet *umpolung* entraîne la rupture spontanée de la liaison C-O du

groupe masquant restant *via* la formation du carbocation **172** stabilisé par mésomérie, ce qui libère le nucléotide d'une part, et le saligénol **173** d'autre part<sup>16,17</sup>.

La cinétique de libération du nucléotide peut être modulée aisément par l'ajout d'un groupement électroattracteur ou électrodonneur en *ortho* et/ou en *para* de l'ester phénolique. Un groupement électroattracteur tel qu'un nitro ou un chlore aura pour effet d'accélérer la première hydrolyse, tandis qu'un groupement donneur comme un méthyle par exemple aura l'effet inverse<sup>16,17</sup>.

Par ailleurs, contrairement à la majorité des stratégies de prodrogues, la déprotection d'une prodrogue *cycloSal* ne génère qu'un seul sous-produit qui correspond au saligénol **173** utilisé pour masquer le phosphate. L'activité antivirale et la cytotoxicité de divers saligénols substitués ont été évaluées. Aucune activité biologique n'a été détectée et aucune cytotoxicité n'a été observée pour ces composés<sup>19</sup>.

## 2. Synthèse des prodrogues *cycloSal* de nucléotide

### a) Préparation des saligénols fonctionnalisés **173**

Les prodrogues *cycloSal* de nucléotides sont synthétisées à partir des dérivés du saligénol **173**. Les saligénols fonctionnalisés non commerciaux peuvent être obtenus de trois manières différentes : (i) par réduction d'aldéhydes, d'acides ou d'esters par NaBH<sub>4</sub> ou LiAlH<sub>4</sub>, (ii) par *ortho*-formylation sélective<sup>20</sup> ce qui conduit à un aldéhyde qui est ensuite réduit en alcool, ou (iii) par hydroxyméthylation d'un phénol en milieu aqueux basique<sup>21</sup> ou selon la méthode décrite par Nagata *et al*<sup>22</sup> (Schéma 31).

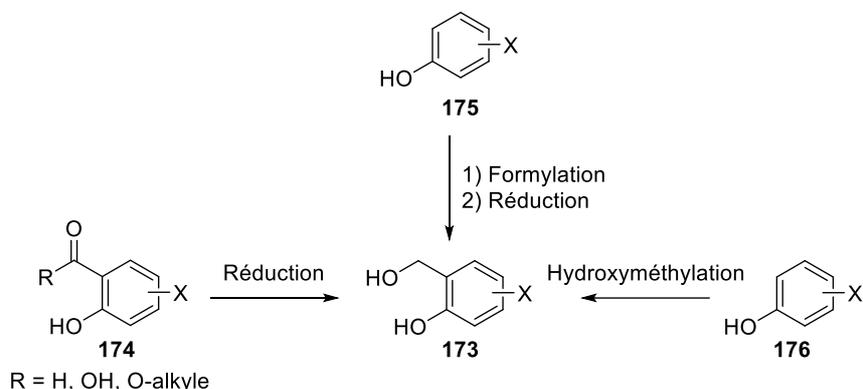


Schéma 31. Différentes méthodes de synthèse des dérivés **173** de l'alcool salicylique.

### b) Synthèse des prodrogues *cycloSal* de nucléotides

L'introduction du groupement phosphate sur le saligénol **173**, puis l'introduction du motif *cycloSal* sur l'hydroxyle en 5' d'un nucléoside, peut se faire en utilisant la chimie du phosphore (III) (Schéma 32 – voie rose) ou la chimie du phosphore (V) (Schéma 32 – voie bleue). Dans le premier cas, le saligénol **173** réagit avec du trichlorure de phosphore (PCl<sub>3</sub>) pour donner le chlorophosphite **177** qui est immédiatement mis en réaction avec un nucléoside en présence d'une base. L'oxydation du phosphore (III) en phosphore (V) par de l'hydroperoxyde de *t*-

butyle (TBHP) permet ensuite d'accéder à la prodrogue *cycloSal* **169** désirée<sup>17</sup>. Afin de diminuer la réactivité du chlorophosphite **177**, une voie alternative a été développée en faisant réagir ce dernier sur la diisopropylamine pour former le phosphoramidite **178**. Le couplage avec le nucléoside se fait cette fois-ci en présence de chlorure de pyridinium ou de triflate d'imidazolium, tandis que l'étape d'oxydation reste identique à la précédente<sup>23,24</sup>. Dans le second cas, la formation du *cycloSal* phosphochloridate **179** par réaction entre le saligénol **173** et du trichlorure de phosphoryle (POCl<sub>3</sub>) permet de s'affranchir de cette dernière étape d'oxydation. Le *cycloSal* phosphochloridate **179** ainsi obtenu est directement mis en réaction avec un nucléoside en présence d'une base pour former la prodrogue finale **169**<sup>25</sup>.

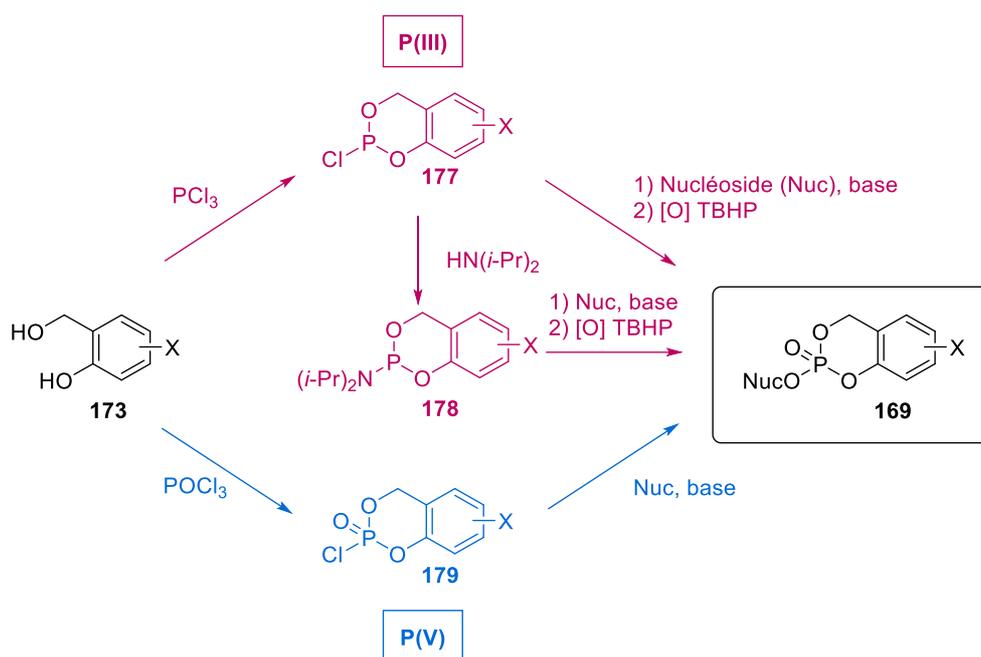


Schéma 32. Différentes méthodes de synthèse des prodrogues *cycloSal* de nucléotide via la chimie du phosphore (III) (voie rose) ou du phosphore (V) (voie bleue).

## II. Synthèse de prodrogues *cycloSal* d'analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH

Comme nous l'avons vu précédemment (cf Introduction de cette partie), aucun des inhibiteurs d'IspH n'a fait l'objet de tests d'inhibition de croissance sur des bactéries. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec les composés **153**, **154**, **157** et **165** qui sont les meilleurs inhibiteurs diphosphates d'IspH avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire sur les enzymes d'*E. coli* et d'*A. aeolicus* (Figure 57). Afin de tester ces composés sur quelques bactéries modèles, nous avons envisagé la synthèse des prodrogues *cycloSal* **180** à **183** de ces inhibiteurs en version monophosphate (Figure 57). En effet, une fois les inhibiteurs monophosphates libérés *in cellulo*, une phosphorylation par une kinase non spécifique pourrait conduire aux inhibiteurs diphosphates biologiquement actifs.

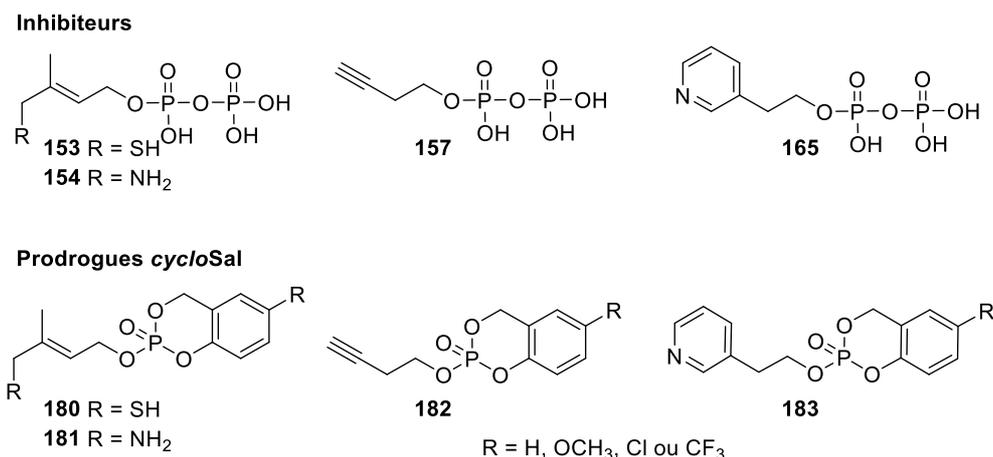


Figure 57. Structures des inhibiteurs diphosphates d'IspH les plus efficaces (**153**, **154**, **157**, **165**) et structures des prodrogues *cycloSal* **180** à **183** de leurs analogues monophosphates que nous avons choisi de synthétiser.

Afin d'étudier l'influence de groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur l'activité antibactérienne des prodrogues *cycloSal* envisagées, nous avons utilisé différents saligénols pour les synthétiser. Il s'agit soit de l'alcool salicylique **173a** commercial, soit des dérivés **173b-d** portant un groupement méthoxy électrodonneur ou un groupement électroattracteur tel qu'un chlore ou un trifluorométhyle. De plus, nous avons choisi de synthétiser ces différentes prodrogues en utilisant la chimie du phosphore (V) *via* des *cycloSal* phosphochloridates, ce qui nous permet d'éviter une étape supplémentaire d'oxydation.

## A. Préparation des saligénols fonctionnalisés et des *cycloSal* phosphochloridates pour la synthèse des prodrogues *cycloSal* **180** à **183**

### 1. Préparation des saligénols fonctionnalisés

L'alcool salicylique **173a** étant le seul substrat commercial, les autres dérivés **173b-d** ont été synthétisés par réduction des acides carboxyliques correspondants (Schéma 33). Toutefois, afin d'obtenir l'alcool **173d** substitué par un trifluorométhyle, deux étapes de synthèse sont nécessaires puisque nous sommes partis de l'acide 2-méthoxy-5-(trifluorométhyl)benzoïque **184** commercial. Une première étape de déméthylation du phénol en présence d'iodocyclohexane dans le DMF à reflux conduit à l'acide salicylique **185** (91 %)<sup>26</sup>. Ce dernier est directement réduit avec du LiAlH<sub>4</sub> sans purification préalable pour donner le dérivé **173d** avec un rendement global de 62 %. L'alcool **173b** avec le groupement méthoxy a précédemment été préparé au laboratoire par réduction de l'acide **186** selon la méthode décrite dans la littérature avec du borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>) en présence de trifluorure de bore complexé à l'éther (BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>) dans le THF<sup>27</sup>. Concernant l'alcool salicylique **173c** substitué par un chlore, il est lui aussi obtenu après réduction de l'acide salicylique **187** commercial avec du LiAlH<sub>4</sub> (85 %).

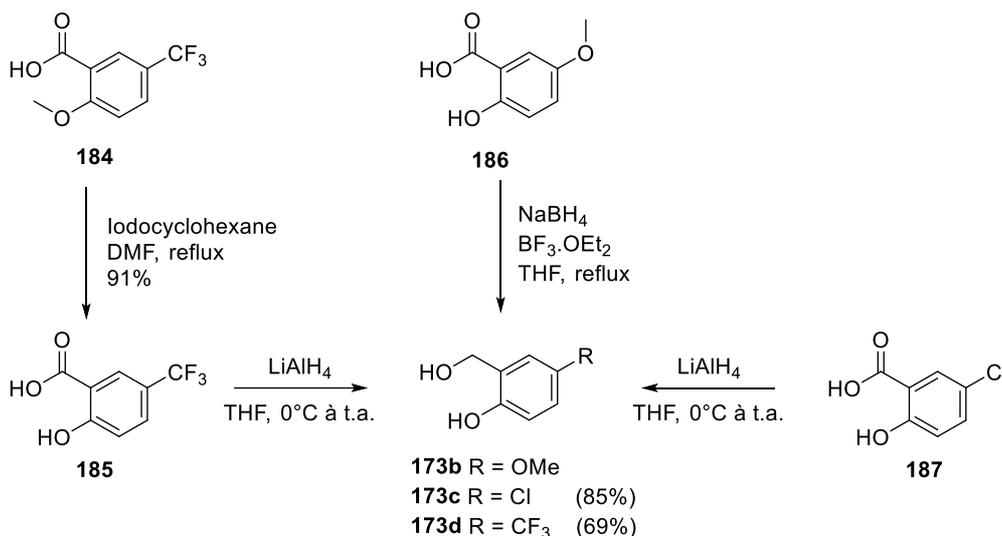


Schéma 33. Synthèse des dérivés de l'alcool salicylique **173b-c** (**173a** correspondant à l'alcool salicylique commercial).

## 2. Préparation des *cycloSal* phosphochloridates **179a-d**

Les *cycloSal* phosphochloridates **179a-d** sont obtenus par une réaction d'addition-élimination entre du POCl<sub>3</sub> et le saligénol **173a** ou les dérivés **173b-d** précédemment préparés et en présence de TEA (Schéma 34). Ces *cycloSal* phosphochloridates **179a-d** étant particulièrement réactifs, ils sont directement engagés dans l'étape de couplage pour former les prodrogues désirées sans purification préalable. Une analyse RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel permet d'estimer la quantité de *cycloSal* phosphochloridate formée grâce au signal caractéristique présent autour de -6 ppm.

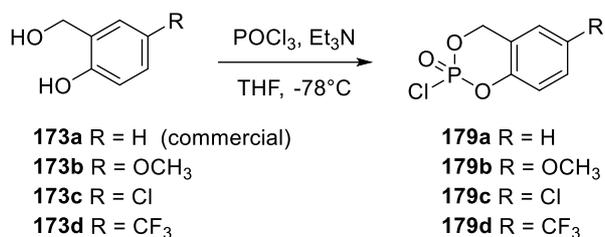


Schéma 34. Synthèse des *cycloSal* phosphochloridates **179a-d**.

## B. Synthèse de prodrogues *cycloSal* de l'AMBPP monophosphate (AMBPP)

### 1. Stratégie de synthèse des prodrogues *cycloSal* de l'AMBPP

Dans la littérature, la synthèse du dérivé azoté du HMBPP, le AMBPP, est décrite en onze étapes à partir du L-tartrate de diéthyle avec de nombreuses étapes de protection et déprotection<sup>4</sup>. Afin de diminuer le nombre d'étapes lors de la préparation des prodrogues **181a-d** de l'AMBPP, l'analogue monophosphate de l'AMBPP, nous avons choisi d'adopter une stratégie de synthèse plus efficace dont l'étape clé est le couplage entre les *cycloSal*

phosphochloridates **179a-d** et l'alcool **188** qui pourrait être synthétisé à partir de l'aminopropan-2-ol **190** commercial (Schéma 35).

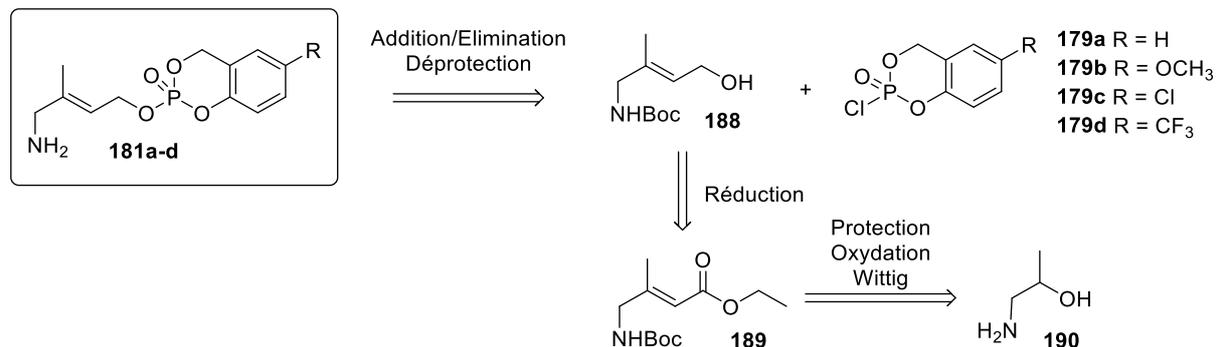


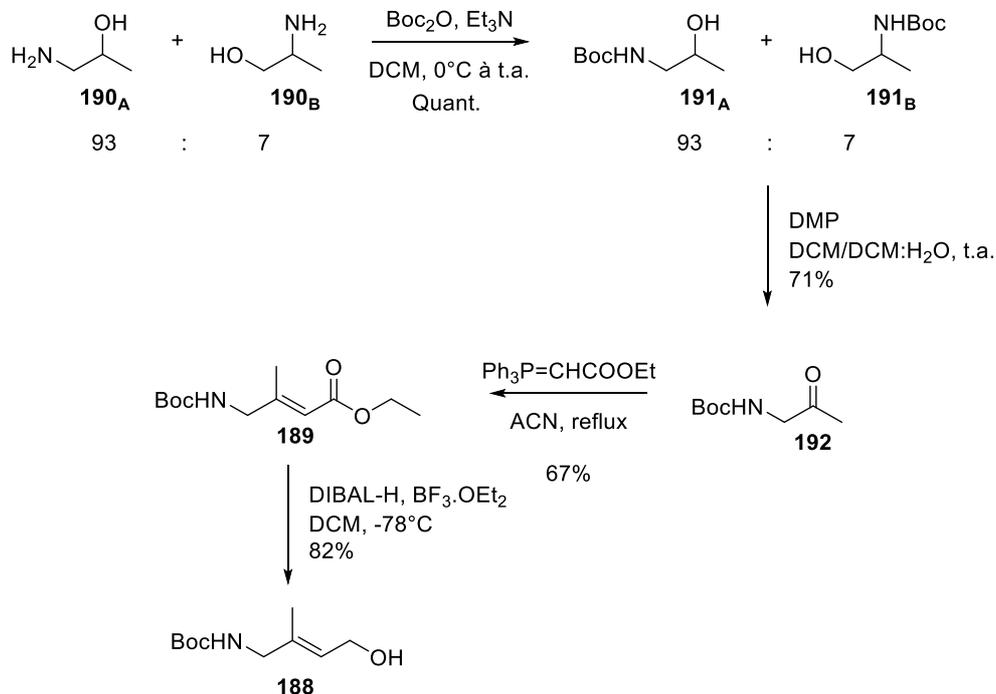
Schéma 35. Stratégie de synthèse pour l'obtention des prodrogues **181a-d** du AMBP.

Deux paramètres ont été pris en compte pour la synthèse de l'alcool **188**. Le premier concerne la stéréochimie (*E*) de la double liaison qui pourrait être obtenue par une réaction de Wittig avec un ylure stabilisé. Le second porte sur le choix du groupement protecteur de l'amine. En effet, en présence du motif *cycloSal*, sa déprotection doit pouvoir se faire en milieu acide afin de ne pas provoquer la libération de l'inhibiteur monophosphate. De plus, la présence d'un ester de phosphate benzylique ne permet pas l'utilisation d'un groupement benzylique qui nécessiterait une déprotection par hydrogénation catalytique. Après avoir judicieusement protégé l'amine et oxydé l'hydroxyle de l'aminopropan-2-ol **190** commercial en cétone, une réaction de Wittig avec un ylure stabilisé pourrait permettre d'accéder à l'alcène (*E*) majoritairement. Enfin, une dernière étape de réduction sélective de l'ester **189** conduirait à l'alcool **188**.

## 2. Synthèse des prodrogues *cycloSal* de l'AMBP

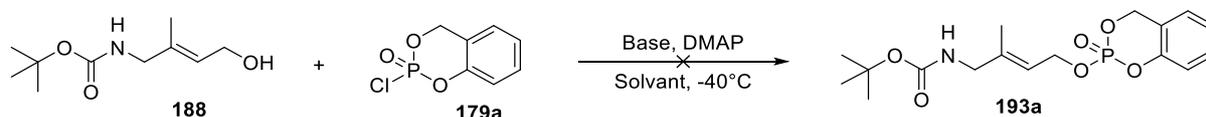
L'alcool allylique **188** est synthétisé à partir de l'aminopropan-2-ol **190** commercial, vendu sous la forme d'un mélange de régioisomères en proportions 93/7 qui correspondent d'une part, à l'aminopropan-2-ol, noté **190A**, et, d'autre part, au 2-aminopropanol **190B** (Schéma 36). Nous avons choisi de protéger l'amine par un groupement Boc qui se déprotège dans des conditions acides et qui permet de diminuer la nucléophilie de l'amine. L'alcool résultant est obtenu sous la forme de deux régioisomères **191A** et **191B** qui possèdent un R<sub>F</sub> identique et ne sont pas séparables. Ce mélange est ensuite oxydé avec le réactif de Dess-Martin. Ainsi, l'alcool **191A** est oxydé en cétone et l'alcool **191B** en aldéhyde et nous avons pu isoler la cétone **192** avec un rendement de 71 %. Une réaction de Wittig entre la cétone **192** et l'acétate d'éthyl(triphenylphosphoranylidène) commercial conduit à un mélange de diastéréoisomères de l'ester **189** dans un ratio *E/Z* de 88/12 déterminé par RMN-<sup>1</sup>H. Après purification, l'alcène de configuration (*E*) est isolé avec un rendement de 67 %. Enfin, une réduction au DIBAL-H permet de réduire sélectivement l'ester activé en alcool **188** (82 %). Cette réaction est effectuée en présence de

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  afin d'éviter une réduction de la double liaison. En effet, Moriwake *et al* ont proposé un état de transition où le DIBAL-H sous forme de trimère se complexe au niveau de l'azote et induit la réduction de l'alcène. En présence de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , ce dernier viendrait se complexer à l'azote du carbamate, ce qui permettrait la réduction sélective de l'ester<sup>28</sup>.



L'alcool **188** est ensuite engagé dans la réaction d'addition-élimination sur le *cycloSal* phosphochloridate **179a** fraîchement synthétisé. Plusieurs essais ont été réalisés avec différentes conditions réactionnelles suivant les méthodes précédemment décrites par Munier *et al*<sup>29</sup> (Tableau 5).

Tableau 5. Différentes conditions réactionnelles utilisées pour l'introduction du motif *cycloSal* sur l'alcool **188**. Les déplacements chimiques correspondent aux signaux majoritaires observés en RMN-<sup>31</sup>P des bruts réactionnels.

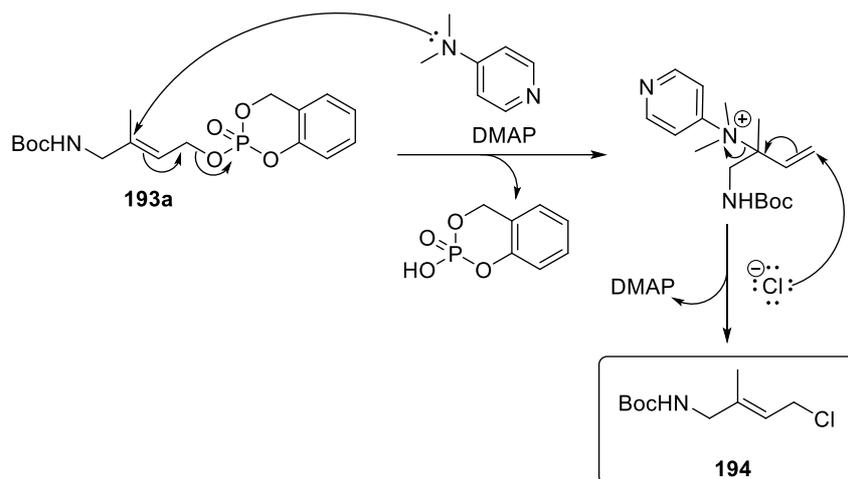


| Entrée | Base     | DMAP | Solvant | RMN- <sup>31</sup> P (δ ppm) |
|--------|----------|------|---------|------------------------------|
| 1      | Pyridine | Non  | DCM     | -7,1                         |
| 2      | Pyridine | Non  | Toluène | -6,9                         |
| 3      | TEA      | Oui  | DCM     | -9,3                         |

Nous avons d'abord réalisé la réaction en présence de pyridine dans le DCM et nous observons un seul signal à environ -7 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel qui ne correspond pas au produit désiré (Tableau 5 – entrée 1). En effet, en RMN-<sup>31</sup>P, le phosphore

des prodrogues *cycloSal* présentent un signal caractéristique vers -9 ppm, tandis qu'en RMN-<sup>1</sup>H, les deux protons benzyliques diastéréotopes des prodrogues *cycloSal* présentent un multiplet caractéristique vers 5 ppm. Dans notre cas, sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel, nous pouvons noter quatre protons aromatiques et deux protons benzyliques qui apparaissent sous la forme de deux singulets à 5,26 et 5,3 ppm qui pourraient correspondre au motif *cycloSal*. Nous retrouvons également les signaux du substrat de départ, avec notamment le proton éthylénique à 5,52 ppm, ce qui suggère que nous n'avons pas formé le produit désiré. Lorsque la réaction est effectuée dans le toluène (Tableau 5 – entrée 2), nous obtenons un unique signal à -6,9 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel et le spectre RMN-<sup>1</sup>H est très similaire à celui observé précédemment indiquant que nous n'avons pas formé la prodroge **193a**.

Nous avons ensuite réalisé la réaction avec une base différente. En présence de TEA et de diméthylaminopyridine (DMAP) en quantité catalytique (Tableau 5 – entrée 3), nous observons un signal à -9,3 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel, caractéristique des prodrogues *cycloSal*. Après purification, cependant, aucune fraction ne présente de signal autour de -9 ppm, suggérant que la prodroge **193a** s'est décomposée sur la silice, mais deux fractions majoritaires sont obtenues. La fraction la moins polaire ( $R_F = 0,86$  ; AcOEt/éther de pétrole 50/50) ne possède aucun atome de phosphore et présente un spectre RMN-<sup>1</sup>H identique à celui du substrat **188** avec une légère différence dans les déplacements chimiques des différents signaux et l'absence du proton correspondant à l'hydroxyle. Toutefois, le substrat possède un  $R_F$  de 0,27 avec le même éluant, ce qui suggère qu'il s'agit de deux composés différents. Sur le spectre RMN-<sup>13</sup>C, le signal du CH<sub>2</sub>OH du substrat qui se situait à 59,0 ppm se retrouve à 40,3 ppm. Nous avons d'abord supposé que le groupement Boc aurait pu être transféré du côté de l'oxygène, mais cette hypothèse n'est pas cohérente avec ces valeurs de déplacements chimiques puisqu'un CH<sub>2</sub> en alpha d'un carbonate résonnerait plutôt autour de 60 ppm. De plus, aucune bande caractéristique d'un NH<sub>2</sub> n'est observée sur le spectre IR de la molécule, mais la présence d'une fine bande d'intensité moyenne autour de 3300 cm<sup>-1</sup> correspondant au NH du carbamate indique que le Boc est toujours attaché à l'azote. Ce déplacement chimique autour de 40 ppm observé en RMN-<sup>13</sup>C est en fait caractéristique d'un CH<sub>2</sub> en  $\alpha$  d'un chlore. Ainsi, le composé obtenu pourrait correspondre à un analogue du substrat de structure **194** où l'hydroxyle a été substitué par un atome de chlore (Schéma 37). Cette structure est confirmée par le spectre de masse de la molécule, ainsi que par la présence d'une forte bande à 667 cm<sup>-1</sup> sur son spectre IR, caractéristique de la liaison C-Cl. Ce produit chloré acyclique, obtenu avec un rendement de 39 %, pourrait être issu (i) d'une réaction de S<sub>N</sub>2 d'un ion chlorure avec élimination du phosphate ou (ii) d'une succession de deux réactions de S<sub>N</sub>2' sur la prodroge **193a** : une première faisant intervenir la DMAP et une élimination du phosphate, et une seconde où un ion chlorure présent dans le milieu pourrait jouer le rôle de nucléophile et éliminer la DMAP (Schéma 37).

Schéma 37 : Proposition de mécanisme pour l'obtention du composé acyclique chloré **194** isolé.

La seconde fraction, plus polaire ( $R_F = 0,20$  ; AcOEt/éther de pétrole 50/50), ne possède pas non plus d'atome de phosphore comme en témoigne l'absence de signal en RMN- $^{31}\text{P}$ . Sur le spectre RMN- $^1\text{H}$ , nous pouvons noter la présence de trois doublets de doublet correspondant à trois protons éthyléniques : un premier ( $^3J_{\text{trans}} = 17,3$  Hz et  $^3J_{\text{cis}} = 10,8$  Hz) à 5,94 ppm, un deuxième ( $^3J_{\text{trans}} = 17,3$  Hz et  $^2J_{\text{gem}} = 0,65$  Hz) à 5,37 ppm et le troisième ( $^3J_{\text{cis}} = 10,8$  Hz et  $^2J_{\text{gem}} = 0,65$  Hz) à 5,20 ppm. Les constantes de couplage, caractéristiques de protons en positions *trans*, *cis* et *géminal*, indiquent que nous avons formé un composé possédant un alcène monosubstitué. En outre, nous observons la présence d'un proton correspondant à un NH et un singulet à 1,54 ppm correspondant à un  $\text{CH}_3$ . La présence de deux doublets de doublet (constantes de couplage similaires :  $^2J = 8,6$  Hz et  $^3J = 0,70$  Hz) avec un effet de toit autour de 3,4 ppm qui intègrent pour 2H suggère que le composé formé possède un  $\text{CH}_2$  portant deux protons non équivalents qui couplent avec un proton voisin, possiblement le NH. Le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  montre la présence de six carbones, dont deux quaternaires : un carbone  $\text{sp}^2$  caractéristique d'un carbamate à 159,6 ppm et un carbone  $\text{sp}^3$  à 82,0 ppm. Nous observons également les carbones d'un  $\text{CH}_2$  et d'un CH éthyléniques, ainsi qu'un carbone de  $\text{CH}_2$   $\text{sp}^3$  et un  $\text{CH}_3$ . Ces analyses spectrales suggèrent que nous avons formé un composé correspondant à la structure **195** cyclique (Schéma 38) et sont en accord avec la littérature<sup>30</sup>. Ce produit cyclisé a été obtenu avec un rendement de 31 % et sa structure a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Cette cyclisation pourrait résulter d'une attaque d'un des oxygènes du groupement Boc sur la double liaison de la prodrogue **193a** suivant une réaction de  $\text{S}_{\text{N}}2'$  avec élimination du phosphate (Schéma 38).

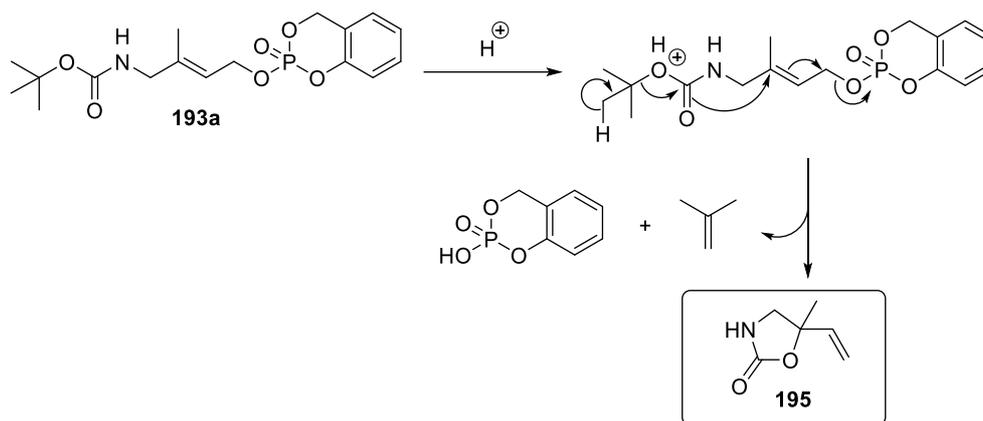


Schéma 38. Proposition de mécanisme pour l'obtention du composé cyclique **195** isolé.

La formation de ces deux sous-produits **194** et **195** suggère qu'il y a bien eu formation de la prodrogue **193a** dont le groupement phosphate constitue un bon groupe partant. De plus, la dégradation de **193a** semble avoir lieu pendant le traitement du brut réactionnel et/ou la purification. Un membre de l'équipe a alors proposé de substituer la TEA par de l'oxyde d'argent ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) et, en l'absence de traitement du milieu réactionnel avant purification, la prodrogue **193a** a pu être obtenue avec un rendement de 43 % (Schéma 39). Les deux produits de décomposition **194** et **195** ont également été isolés après purification, mais ont cette fois-ci été formés en minorité. Cependant, lors d'un essai préliminaire de déprotection du Boc, le produit s'est dégradé et le composé cyclisé **195** a été formé en majorité, indiquant que la cyclisation par le groupement Boc serait favorisée en milieu acide. Malheureusement, la prodrogue finale **181a** n'a finalement pas pu être obtenue.

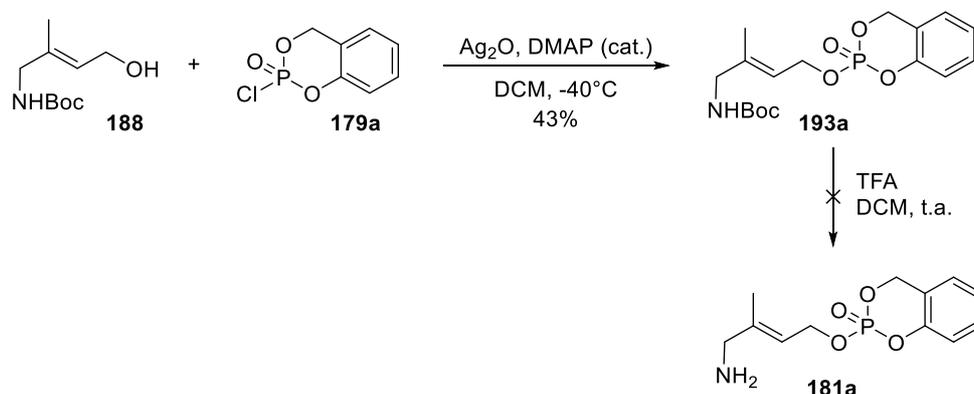


Schéma 39. Synthèse de la prodrogue **193a** avec  $\text{Ag}_2\text{O}$  et tentative de déprotection du Boc.

Avec la formation d'un sous-produit cyclique et des conditions de déprotection qui dégradent la prodrogue, le groupement Boc ne semble pas être un groupement protecteur adapté à cette stratégie de synthèse. Nous avons donc envisagé d'utiliser un groupement diméthoxybenzyle (DMB) qui se déprotège en milieu acide également. La protection de l'amine de l'aminopropan-2-ol **190** commercial par le groupement DMB est réalisée par une réaction d'amination réductrice avec le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde **196** commercial en présence du

triacétoxyborohydrure de sodium (Schéma 40). Le mélange de régioisomères **197A** et **197B** obtenus en proportions 93/7 est alors engagé dans l'étape d'oxydation en présence de perruthénate de tétrapropylammonium (TPAP) et de *N*-oxyde de *N*-méthylmorpholine (NMO). Bien que spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel soit difficilement interprétable, nous pouvons noter l'absence des protons du méthyle de la cétone, attendus vers 2,15 ppm. Sur la RMN-<sup>13</sup>C, nous observons un signal à 188 ppm caractéristique des cétones, mais la superposition avec le spectre DEPT montre qu'il s'agit en fait d'un carbone tertiaire d'aldéhyde qui pourrait correspondre à l'aldéhyde formé après oxydation de l'alcool primaire du régioisomère **190B**. Néanmoins, nous avons purifié le mélange et nous avons obtenu une fraction dont le spectre RMN-<sup>1</sup>H montre les protons aromatiques ainsi que les deux singulets à 3,90 et 3,88 ppm des CH<sub>3</sub> correspondant au groupement DMB. La présence d'un proton supplémentaire d'aldéhyde à 10,29 ppm indique que nous avons formé le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde **196** de départ.

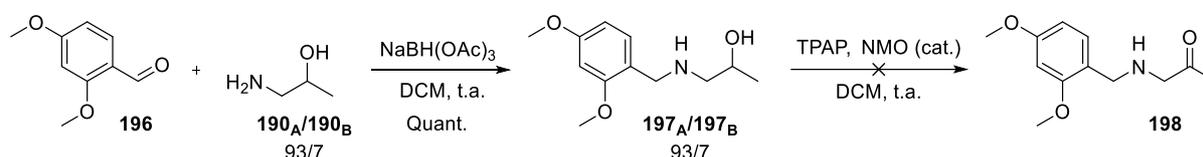


Schéma 40. Protection de l'amine de l'aminopropan-2-ol **190** commercial avec un DMB et tentative d'oxydation de l'alcool secondaire en cétone.

Dans le but d'obtenir la cétone **198**, nous avons effectué plusieurs autres essais d'oxydation avec différents oxydants (DMP, PCC, NaOCl). Les bruts réactionnels présentent à chaque fois un mélange complexe de produits avec des spectres RMN-<sup>1</sup>H difficilement interprétables. Toutefois, nous notons pour chaque essai l'absence des signaux caractéristiques attendus pour la cétone (méthyle vers 2,15 ppm en RMN-<sup>1</sup>H et carbone du carbonyle vers 190 ppm en RMN-<sup>13</sup>C). Ainsi, les différents bruts réactionnels n'ont pas été purifiés.

Ces résultats suggèrent que le groupement DMB ne protège pas efficacement l'amine qui reste suffisamment nucléophile pour être oxydée avant le groupement hydroxyle. De ce fait, si on envisage l'introduction du motif *cycloSal* en présence du groupement DMB, il risquerait d'y avoir une phosphorylation de l'amine. En effet, la formation de bis(*cycloSal*) par une double phosphorylation sur l'amine secondaire d'inhibiteurs de la DXR a précédemment été observée au laboratoire<sup>29</sup>. Les conditions de réaction pour l'étape de couplage avec des *cycloSal* phosphochloridates avaient alors été adaptées en conséquence et l'utilisation de la pyridine dans le toluène, une base plus faible que la TEA, avait permis d'éviter cette double phosphorylation. Or, dans notre cas, les essais de couplage sur l'alcool **188** en présence de pyridine dans le toluène n'ont pas permis d'accéder au produit. Ainsi, l'utilisation d'un groupement protecteur encombré tel qu'un trityle par exemple, pourrait permettre de diminuer la nucléophilie de l'amine tout en évitant la formation du produit cyclisé **195** observé en présence d'un groupement Boc.

Finalement, la capacité de la prodrogue protégée **193a** à inhiber la croissance bactérienne sera évaluée sur un panel de bactéries modèles.

### C. Synthèse de prodrogues *cycloSal* du TMBPP monophosphate (TMBP)

#### 1. Stratégie de synthèse des prodrogues *cycloSal* du TMBP

Dans le cas de l'analogue monophosphate du TMBPP, le TMBP, nous avons choisi une stratégie de synthèse qui s'appuie sur la protection du thiol sous forme d'un pont disulfure entre deux molécules identiques (Schéma 41). Le dimère **199** ainsi formé à partir de deux thiols **200** pourrait être phosphorylé sur les deux hydroxyles à chaque extrémité et la réduction du pont disulfure libérerait ainsi deux molécules de prodrogues **180a-d** désirées. Le thiol **200**, quant à lui, pourrait être obtenu à partir de l'hydroxyacétone **202** commerciale. Une réaction de Wittig dans les mêmes conditions que pour l'AMBP, c'est-à-dire en présence de l'acétate d'éthyl(triphenyl-phosphoranylidène) commercial, permettrait de former majoritairement l'alcène **201** de stéréochimie (*E*). De plus, la fonction ester ainsi formée pourrait permettre la différenciation des deux groupements hydroxyles afin d'introduire régiosélectivement l'atome de soufre par la formation d'un thioacétate. Enfin, une réduction du thioacétate et de l'ester activé en présence de DIBAL-H conduirait au thiol **200** désiré.

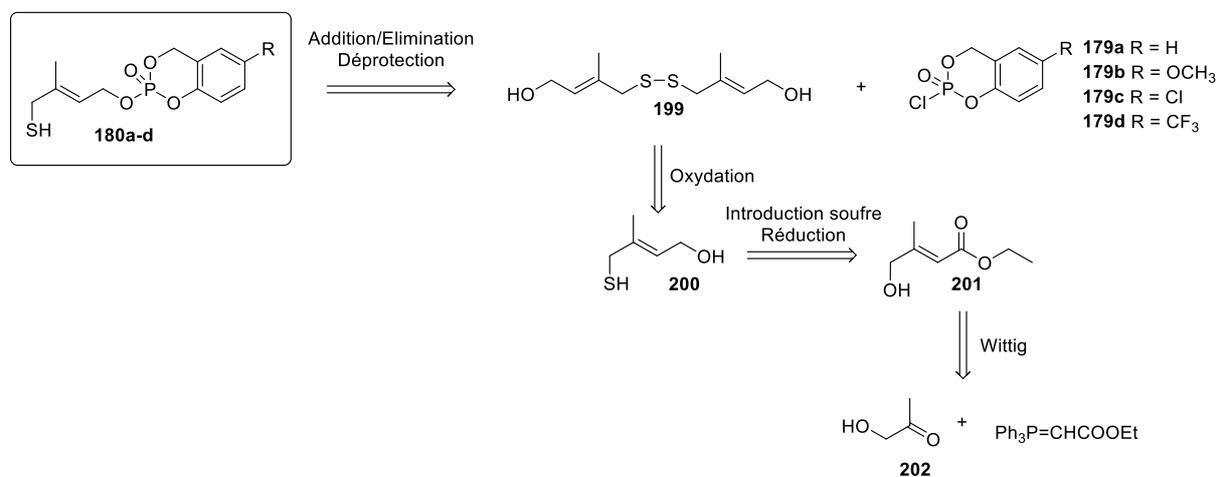
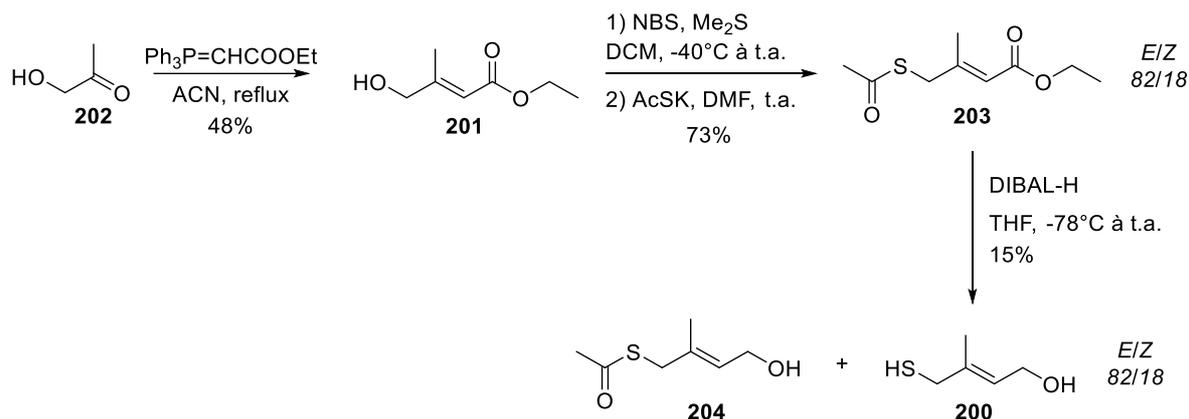


Schéma 41. Stratégie de synthèse pour l'obtention des prodrogues **180a-d** du TMBP.

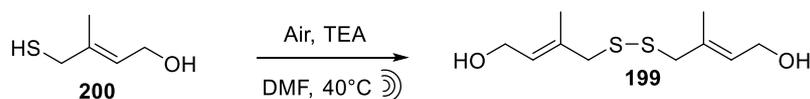
#### 2. Synthèse des prodrogues *cycloSal* du TMBP

La synthèse de l'alcool dimérique **199** a été entièrement réalisée lors de l'encadrement de stagiaires de M1. La première étape est une réaction de Wittig entre l'hydroxyacétone **202** commerciale et le même ylure stabilisé que pour l'AMBP, conduisant majoritairement à l'ester **201** de stéréochimie (*E*) (ratio *E/Z* de 94/6) qui est isolé avec un rendement de 48 % (Schéma 42). L'introduction d'un atome de soufre se fait ensuite en deux étapes : l'hydroxyle est d'abord substitué par un atome de brome en présence de sulfure de diméthyle (Me<sub>2</sub>S) et de *N*-bromosuccinimide (NBS) dans le DCM<sup>31</sup>, puis après traitement du brut réactionnel, une substitution nucléophile par le thioacétate de potassium conduit au thioester **203**. Il a été

surprenant de constater la présence de deux protons éthyléniques sur la RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel dont un majoritaire à 5,87 ppm qui pourrait appartenir au produit et un minoritaire à 5,72 ppm qui pourrait correspondre à son diastéréoisomère *Z*. Les ratios *E/Z* obtenus varient entre 82/18 et 95/5 suivant les essais. Les tentatives de purification se sont avérées non concluantes puisque les deux diastéréoisomères n'ont pas pu être séparés. Ainsi, nous avons traité le composé **203** avec du DIBAL-H sans purification préalable afin de réduire l'ester issu de la réaction de Wittig d'une part, et le thioester d'autre part. Après purification par colonne chromatographique, une faible quantité d'un composé de  $R_F = 0,72$  (éther de pétrole/AcOEt 70/30) est obtenu. Toutefois, le spectre RMN-<sup>1</sup>H indique la présence de trois produits distincts dans cette fraction puisque trois protons éthyléniques sont observés. Le signal majoritaire à 5,59 ppm correspond au proton éthylénique du produit **200** désiré. Il est accompagné d'un proton à 5,65 ppm qui correspond à l'alcène de configuration *Z* et les deux diastéréoisomères ont été obtenus dans les mêmes proportions qu'avant la réduction avec un ratio *E/Z* de 82/18. Concernant le troisième proton éthylénique à 5,46 ppm, il pourrait appartenir au thioester **204** où seul l'ester issu de la réaction de Wittig a été réduit. En effet, nous observons un singulet à 2,34 ppm qui pourrait correspondre au CH<sub>3</sub> du thioacétate.

Schéma 42. Synthèse du thiol **200**.

Au laboratoire, divers essais de couplage pour former le pont disulfure symétrique avaient été précédemment réalisés en présence de diiode et de TEA dans le THF, sous atmosphère inerte ou sous air. Cependant, aucun n'a été concluant. Ainsi, nous avons réalisé un essai de couplage sur la fraction obtenue précédemment et avons oxydé le mélange de **200** (*E/Z*) et **204** à l'air en présence de TEA et d'ultrasons selon la méthode décrite par García Ruano *et al*<sup>32</sup> (Schéma 43). L'analyse du spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel est difficilement interprétable et montre un mélange complexe de produits. L'alcool **199** n'a malheureusement pas pu être obtenu avec cette méthode.

Schéma 43. Tentative d'oxydation du thiol **200** en disulfure **199** par ultrasons.

Afin d'éviter l'isomérisation lors de l'introduction de l'atome de soufre, deux autres approches ont été envisagées. La première met en jeu une réaction de Mitsunobu avec l'acide thioacétique en présence de triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>) et d'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD)<sup>33,34</sup> (Schéma 44). Pour les deux essais réalisés, la réaction n'est pas totale. Cependant, nous observons la présence du produit **203** désiré sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel avec un proton éthylénique minoritaire à 5,87 ppm. Le proton éthylénique majoritaire observé à 5,98 ppm correspond au substrat **201** et la proportion de produit formé par rapport au substrat varie entre 7 et 35 %. De plus, un signal à 5,73 ppm semble indiquer la formation du diastéréoisomère (*Z*) dans un ratio *E/Z* de 87/13. Au vu de ces résultats, la suite de la synthèse n'a pas été poursuivie avec cette méthode puisqu'elle ne permet pas d'obtenir le diastéréoisomère (*E*) majoritairement.

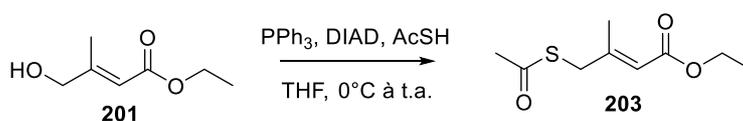


Schéma 44. Synthèse du thioester **203** par une réaction de Mitsunobu.

La seconde approche consiste à introduire le thioacétate avant de réaliser la réaction de Wittig. Pour ce faire, nous avons d'abord thioacétylé l'acétone selon la méthode décrite par Zhdanko *et al*<sup>35</sup>. Cette réaction s'effectue en deux temps (Schéma 45) : la première étape est une bromation en  $\alpha$  de la cétone, tandis que la seconde consiste en une substitution nucléophile du thioacétate sur l' $\alpha$ -bromoacétone pour conduire au thioester **205** que nous avons obtenu avec un rendement de 25 %. Une réaction de Wittig a été réalisée sur ce dernier en utilisant les mêmes conditions que précédemment. Sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel, nous observons la présence des deux protons éthyléniques à 5,87 ppm et 5,73 ppm qui pourraient correspondre à l'alcène **203** et à son diastéréoisomère (*Z*) respectivement avec un ratio *E/Z* de 65/35. Avec cette méthode, une sélectivité bien plus faible est observée pour la réaction de Wittig. Ainsi, réaliser la réaction de Wittig avant l'introduction du thioester reste plus intéressant afin de limiter l'isomérisation de la double liaison.

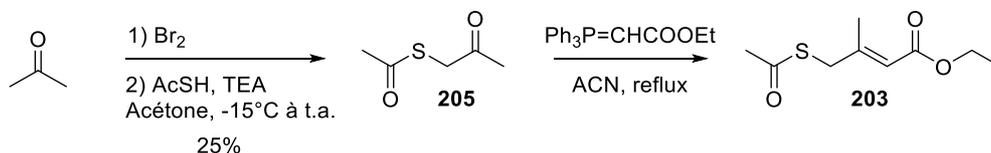


Schéma 45. Synthèse du thioester **205** par introduction de l'atome de soufre sur l'acétone suivie d'une réaction de Wittig pour former l'ester activé **203**.

Au vu de ces résultats, l'introduction de l'atome de soufre sur l'ester **201** apparaît comme l'étape limitante de cette synthèse. Nous pourrions alors envisager (i) la formation du thioester par une autre méthode telle que celle décrite par Olivito *et al*<sup>36</sup> où l'alcool est préalablement

activé par un groupement mésylate, ou (ii) l'optimisation des conditions de purification afin de séparer les deux diastéréoisomères.

#### D. Synthèse des prodrogues *cycloSal* **182a-d** et **183a-d** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH

La synthèse de ces prodrogues s'appuie sur la même étape de couplage entre un alcool et les *cycloSal* phosphochloridates **179a-d** décrite précédemment. Les prodrogues **182a-d** de l'inhibiteur alcyne monophosphate sont alors obtenues par couplage avec le 3-butyn-1-ol **206** commercial et sont isolées avec des rendements compris entre 22 et 90 % (Schéma 46).

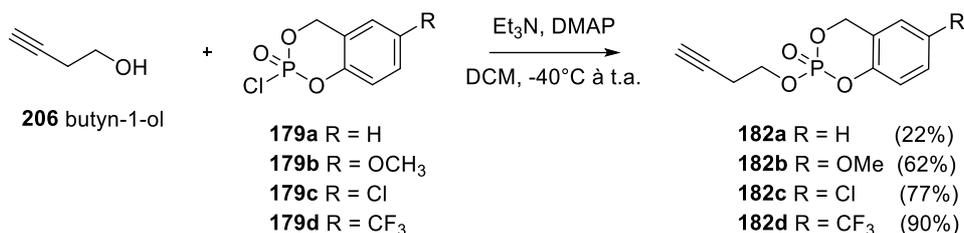


Schéma 46. Synthèse des prodrogues **182a-d** de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne d'IspH.

Concernant les prodrogues de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur pyridine, une étape préalable de réduction de l'ester **207** commercial en alcool **208** est nécessaire. Ce dernier a été obtenu avec un rendement de 88 % avant d'être couplé avec les différents *cycloSal* phosphochloridates **179a-d** (Schéma 47). A l'exception du composé **183d** qui s'est dégradé lors de l'étape de purification, les prodrogues **183a-c** ont pu être obtenues avec des rendements compris entre 15 et 26 % pour cette étape de couplage. Ces rendements plus faibles que pour l'inhibiteur alcyne peuvent s'expliquer par le traitement du brut réactionnel. En effet, le pH du milieu réactionnel étant très acide (autour de 1-2), les prodrogues **183a-d** se retrouvent sous la forme d'un pyridinium et passent en majorité en phase aqueuse lors du lavage de la phase organique. La phase aqueuse doit alors être suffisamment basifiée (au moins à pH 6) pour pouvoir extraire le produit, mais ne pas dépasser un pH de 7 afin de ne pas déprotéger la prodrogue. Même ainsi, il est possible que les prodrogues n'aient pas pu être extraites en totalité de la phase aqueuse ou qu'une partie se soit déprotégée. Dans le cas de la prodrogue **183d** substituée par un CF<sub>3</sub>, ce groupement fortement électroattracteur pourrait induire un temps de demi-vie très court pour cette prodrogue, ce qui pourrait expliquer une éventuelle dégradation durant le traitement et/ou la purification. Afin de vérifier cette hypothèse, il pourrait être intéressant de réaliser un suivi de la décomposition de cette prodrogue par RMN-<sup>31</sup>P et/ou RMN-<sup>19</sup>F à différents pH.

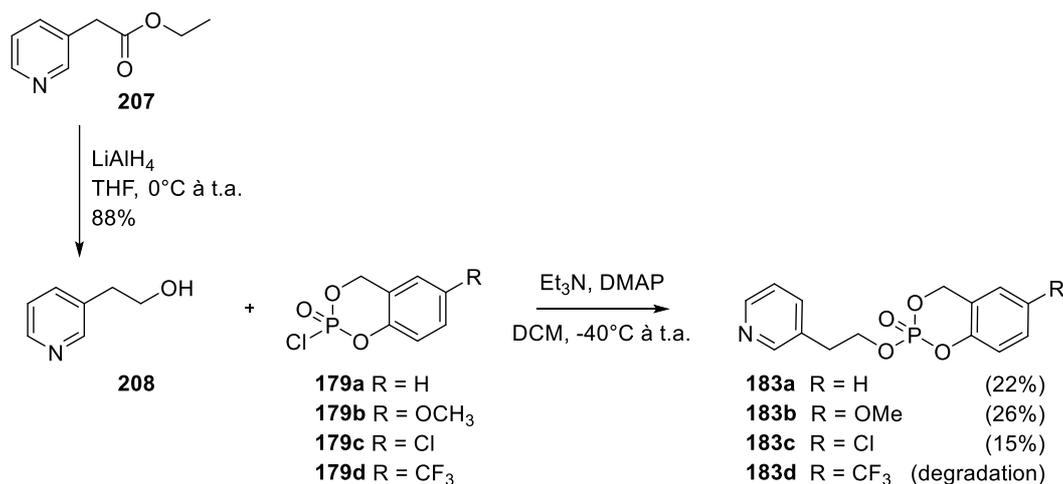


Schéma 47. Synthèse des prodrogues **183a-d** de l'inhibiteur pyridine d'IspH.

Les séries de prodrogues **182a-d** et **183a-c** seront testées afin d'évaluer leur capacité à inhiber la croissance des bactéries modèles que nous possédons au laboratoire.

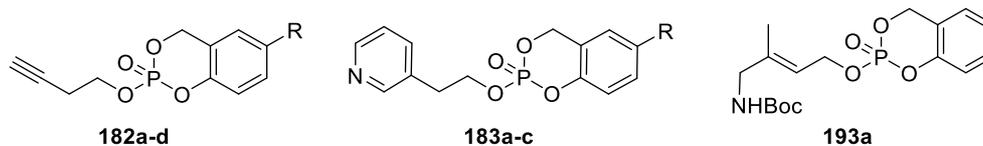
### III. Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues *cycloSal* **193a**, **182a-d** et **183a-c**

La capacité des prodrogues *cycloSal* **193a**, **182a-d** et **183a-c** à inhiber la croissance d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis* a été évaluée par diffusion en milieu gélosé sur boîtes de Petri (méthode dite de Kirby-Bauer) et en milieu liquide en microplaques (cf Chapitre 1, partie 1, III.).

#### A. Évaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Nous avons d'abord testé les prodrogues *cycloSal* **182a-d** et **183a-c** par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur des cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* en déposant soit 32 nmol, soit 800 nmol de produit sur les disques. Pour les deux quantités déposées, aucune inhibition de croissance n'est observée. Ces résultats sont cohérents avec les observations faites lors de tests de prodrogues *cycloSal* d'inhibiteurs de la DXR qui n'ont pas non plus été capables d'inhiber la croissance d'*E. coli*<sup>29</sup>. De plus, les tests ont ici encore été réalisés avec des disques de cellulose de 9 mm de diamètre, ce qui pourrait influencer la diffusion des composés dans la gélose (cf Chapitre 1, partie 1, III. A.).

Nous avons ensuite testé les prodrogues *cycloSal* **182a-d**, **183a-c** et **193a** sur une culture de *M. smegmatis* avec 800 nmol de produit déposé sur les disques de cellulose de 6 mm et comparé leur activité inhibitrice avec celle de l'isoniazide (Tableau 6).

Tableau 6. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne d'une souche de *M. smegmatis* observés pour les prodrogues *cycloSal* **182a-d**, **183a-c** et **193a**.

| Entrée | Composé        | R               | Quantité déposée (nmol) | Diamètre zone inhibition (mm) |
|--------|----------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1      | <b>149 INH</b> | n.a.            | 30                      | 21                            |
| 2      | <b>182a</b>    | H               | 800                     | 24*                           |
| 3      | <b>182b</b>    | OMe             | 800                     | 8*                            |
| 4      | <b>182c</b>    | Cl              | 800                     | 34                            |
| 5      | <b>182d</b>    | CF <sub>3</sub> | 800                     | 24                            |
| 6      | <b>183a</b>    | H               | 800                     | 24*                           |
| 7      | <b>183b</b>    | OMe             | 800                     | –                             |
| 8      | <b>183c</b>    | Cl              | 800                     | 24                            |
| 9      | <b>193a</b>    | H               | 800                     | –                             |

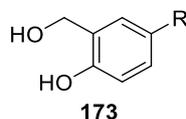
n.a. : non applicable.

\*Zone de ralentissement de croissance

Nous observons une inhibition de croissance avec les prodrogues *cycloSal* **182c**, **182d** et **183c** substituées par un groupement électroattracteur (Cl ou CF<sub>3</sub>), ce qui laisse supposer que la prodrogue entre dans la cellule par diffusion passive et libère le monophosphate. La phosphorylation de ce dernier conduirait à la formation des inhibiteurs diphosphates d'IspH correspondants qui pourraient être à l'origine de l'inhibition observée. En effet, au sein du site actif, le diphosphate s'insère dans une poche polaire éloignée du cluster et dans laquelle un diphosphate inorganique a été identifié lors des premières cristallisations de l'enzyme<sup>8</sup> (cf Introduction de cette partie). Dès lors, les monophosphates possèderaient une moins bonne affinité pour le site actif d'IspH et possèderaient peu ou pas d'activité inhibitrice enzymatique. En outre, dans la littérature, aucun de ces inhibiteurs n'a été testé sur IspH sous forme de monophosphate, ce qui serait cohérent avec une phosphorylation *in cellulo* pour former les inhibiteurs diphosphates. Des tests d'inhibition enzymatique avec les analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH, complétés par des études cristallographiques, permettraient de s'assurer que l'activité inhibitrice est entièrement due aux diphosphates après une étape de phosphorylation dans la cellule bactérienne. Toutefois, il n'est pas exclu que les composés monophosphates puissent inhiber une autre voie métabolique essentielle à la bactérie. Il est également possible que les saligénols substitués par un chlore et un trifluorométhyle contribuent à l'inhibition observée avec les prodrogues correspondantes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests d'inhibition de croissance dans les mêmes conditions

avec le saligénol **173a** et les saligénols **173c** et **173d** substitués par un atome de chlore et un trifluorométhyle respectivement (Tableau 7).

Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne d'une souche de *M. smegmatis* observés pour les saligénols **173a**, **173c** et **173d**.



| Entrée | Composé        | R               | Quantité déposée (nmol) | Diamètre zone inhibition (mm) |
|--------|----------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1      | <b>149</b> INH | n.a.            | 30                      | 17                            |
| 2      | <b>173a</b>    | H               | 800                     | 10                            |
| 3      | <b>173c</b>    | Cl              | 800                     | –                             |
| 4      | <b>173d</b>    | CF <sub>3</sub> | 800                     | 12                            |

n.a. : non applicable.

Contrairement au dérivé chloré **173c**, l'acide salicylique **173a** et son dérivé **173d** portant un CF<sub>3</sub> inhibent la croissance de la mycobactérie. Ce résultat suggère que la libération *in cellulose* de ces saligénols pourrait être à l'origine de l'inhibition des prodrogues *cycloSal* **182a** et **183a** non substituées, et **182d** substituée par un CF<sub>3</sub>. Néanmoins, l'inhibition observée pour les prodrogues 5-Cl serait uniquement due aux inhibiteurs diphosphates, ou éventuellement à leurs analogues monophosphates.

Par ailleurs, la meilleure activité inhibitrice des prodrogues est observée avec les *cycloSal* **182c** et **183c** substitués par un atome de Cl, tandis que les *cycloSal* non substitués ou substitués par un groupement méthoxy électrodonneur sont les moins efficaces. Ces résultats suggèrent que l'efficacité des prodrogues serait corrélée à la cinétique de libération du composé actif. En effet, la cinétique de déprotection des prodrogues *cycloSal* d'antiviraux est fortement dépendante des substituants en para de l'ester de phénol : la substitution par un groupement électroattracteur (Cl ou NO<sub>2</sub>) augmente la vitesse d'hydrolyse, tandis qu'un groupement électrodonneur aura l'effet inverse<sup>17</sup>. De plus, l'électronégativité du groupement CF<sub>3</sub> légèrement inférieure à celle d'un atome de chlore<sup>37</sup> laisse supposer qu'une prodrogue *cycloSal* substituée avec un CF<sub>3</sub> sera hydrolysée moins rapidement qu'avec un Cl et libèrera ainsi une plus faible quantité d'inhibiteur au sein de la bactérie. L'efficacité plus faible observée pour le composé **182d** par rapport à **182c** est effectivement en accord avec cette hypothèse. Concernant les prodrogues **182a** et **183a** non substituées, nous n'observons pas de zone d'inhibition tel que nous l'avons défini, mais plutôt une zone circulaire où la densité de croissance est plus faible, tandis que les prodrogues **182b** et **183b** portant un groupement méthoxy sont inefficaces (Tableau 6). Cette absence d'inhibition pourrait s'expliquer par la faible cinétique d'hydrolyse de ces composés, ce qui induirait une plus faible concentration d'inhibiteur dans la cellule. En effet, si la libération de la molécule active est trop lente, la prodrogue pourrait (i) traverser à

nouveau la paroi bactérienne, soit par diffusion, soit par des pompes à efflux, ou (ii) être dégradée par des phosphatases par exemple. Par ailleurs, nous observons une meilleure efficacité de la série des prodrogues alcyne **182** par rapport aux prodrogues pyridine **183**, ce qui est cohérent avec la meilleure affinité de l'inhibiteur alcyne diphosphate pour l'enzyme. De plus, l'azote du motif pyridine pourrait être sous forme protonée dans le milieu extracellulaire, ce qui diminuerait la capacité des prodrogues correspondantes à entrer dans la cellule.

En revanche, la prodrogue *cycloSal* **193a** de l'analogue AMBP du substrat de l'enzyme, le HBMPP, est inefficace pour inhiber la croissance de *M. smegmatis*. Après être rentrée dans la cellule, la prodrogue pourrait être rejetée dans le milieu extracellulaire, être dégradée par des phosphatases ou bien libérer le monophosphate. Dans ce dernier cas, même si la phosphorylation a lieu, la bactérie pourrait ne pas posséder le pool enzymatique nécessaire pour déprotéger le groupement Boc porté par l'amine. Ce groupement masque la nucléophilie de l'azote ce qui bloquerait sa complexation au cluster [4Fe-4S], interaction qui permet l'inhibition de l'enzyme par ce composé<sup>2,3</sup>. De plus, le monophosphate ou diphosphate pourraient également être dégradés par des phosphatases ou rejetés dans le milieu extracellulaire par des pompes à efflux. En outre, il n'est pas exclu que la prodrogue se cyclise avant d'entrer dans la cellule pour former le produit de décomposition **195** observé pendant la synthèse (cf Schéma 38, p130).

## B. Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide

Nous avons également évalué l'activité inhibitrice des prodrogues *cycloSal* **182a-d** et **183a-c** en milieu liquide en microplaques 96 puits sur des cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, avec une concentration de 100 µM ou 2,5 mM de prodrogue dans les puits. Comme précédemment, la fosmidomycine a été utilisée comme antibiotique de référence lors de ces tests avec une concentration de 25 µM.

Pour une concentration de 100 µM, aucune prodrogue ne possède d'activité antibactérienne. En revanche, à 2,5 mM, la prodrogue **182a** non substituée inhibe la croissance d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis* puisqu'aucun trouble n'est observé à l'œil après 24h. En outre, en présence des prodrogues **182c-d**, **183a** et **183c**, un trouble d'intensité variable est observé, mais d'une densité plus faible que pour le témoin de croissance où ces trois souches bactériennes sont cultivées sans aucun antibiotique. Ces résultats suggèrent que, malgré la présence d'un trouble, les prodrogues **182c-d**, **183a** et **183c** induisent un ralentissement de la croissance bactérienne. En effet, les prodrogues étant en solution dans le milieu extracellulaire, les *cycloSal* substitués par un groupement électroattracteur pourraient s'hydrolyser avant d'atteindre la cellule, tandis qu'en présence du groupement méthoxy, la libération du composé actif pourrait être trop lente, ce qui empêcherait l'accumulation de l'inhibiteur dans la cellule. De plus, la différence d'activité observée entre les prodrogues non substituées **182a** et **183a** des séries alcyne et pyridine respectivement pourrait s'expliquer d'une part, par la meilleure affinité

de l'inhibiteur alcyne diphosphate avec l'enzyme et, d'autre part, avec l'azote du motif pyridine qui pourrait se trouver sous forme protonée dans le milieu, ce qui limiterait sa biodisponibilité.

Puisque le composé **182a** possède une activité inhibitrice à 2,5 mM, mais pas à 100 µM, nous avons alors déterminé sa CMI sur des cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis*. Nous avons réalisé le même test d'inhibition sur microplaque que précédemment avec cinq concentrations de **182a** comprises entre 2,5 mM et 156 µM (dilutions en cascade d'un facteur 2). Nous observons une inhibition de croissance de ces trois bactéries pour la concentration la plus élevée (2,5 mM), ce qui confirme les résultats obtenus précédemment. Toutefois, seul un ralentissement de croissance est observé pour des concentrations comprises entre 1,25 et 0,312 mM avec un trouble de densité croissante qui reste inférieur à celui du témoin de croissance. Aucune inhibition n'est obtenue à 156 µM. Ainsi, la prodrogue **182a** est un inhibiteur « faible » puisqu'elle possède une CMI de 2,5 mM sur les trois souches bactériennes testées.

Concernant *P. aeruginosa*, aucune prodrogue ne montre d'activité inhibitrice sur cette bactérie. Toutefois, *P. aeruginosa* sécrète de la pyocyanine, un facteur de virulence qui est aussi une phénazine, un pigment redox-actif<sup>38</sup> donnant une couleur bleu-verte caractéristique au milieu. En présence du composé **182a**, nous avons observé l'absence de cette couleur verte, suggérant que cette prodrogue inhiberait la synthèse de la pyocyanine. Il est cependant difficile de tirer des conclusions définitives avec ces seuls tests, l'observation à l'œil nu des puits de la microplaque rendant l'interprétation des résultats difficile.

Afin de pouvoir évaluer plus précisément et éventuellement quantifier les ralentissements de croissance observés pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis*, nous envisageons de réaliser un suivi cinétique de la croissance bactérienne par mesure de la densité optique. Par ailleurs, afin de compléter les résultats obtenus avec *M. smegmatis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé, des tests d'inhibition de croissance en milieu liquide sont en cours de réalisation.

#### IV. Conclusion

Dans cette partie, nous avons choisi de masquer les groupements phosphates des analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH par des prodrogues du type *cycloSal*. Ainsi, les sept prodrogues **182a-d** et **183a-c** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine respectivement ont pu être obtenues et leur activité antibactérienne a été évaluée sur un panel de bactéries modèles. Aucune prodrogue n'inhibe la croissance d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Toutefois, en milieu liquide, la prodrogue non substituée **182a** est un faible inhibiteur d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis* avec une CMI de 2,5 mM. De plus, trois composés inhibent la croissance de *M. smegmatis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La meilleure inhibition est observée pour les prodrogues *cycloSal* substituées par un chlore qui s'hydrolysent plus rapidement, suggérant la libération de l'analogue monophosphate dans la cellule, suivie d'une

phosphorylation qui conduirait à l'inhibiteur diphosphate. Ainsi, la stratégie de prodrogues *cycloSal* apparaît comme prometteuse pour délivrer des antibactériens *in vivo*. Des tests complémentaires d'inhibition de croissance chez *M. smegmatis* en milieu liquide sont en cours de réalisation.

Dans le cas de l'analogie amino du substrat, des difficultés ont été rencontrées lors de la synthèse. En effet, à l'issue de l'étape d'introduction du motif *cycloSal*, nous avons observé la formation de deux produits de décomposition majoritaires qui ont pu être isolés et caractérisés, ce qui a permis l'optimisation des conditions de réaction et l'obtention du composé protégé **193a**. Il est clair que le groupement Boc joue un rôle important dans la décomposition de la prodrogue et l'étape de déprotection finale dégrade le produit désiré. Ainsi, il pourrait être judicieux de changer de groupement protecteur dès le début de la synthèse. Pour ce faire, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Il faut d'abord s'assurer que la déprotection se fasse dans des conditions acides ou neutres, comme c'est le cas pour le DMB ou le silyle. En effet, des conditions de déprotection basiques libèreraient l'inhibiteur monophosphate et une hydrogénation catalytique induirait la rupture du phosphoester de benzyle du *cycloSal*. Le groupe protecteur utilisé doit également permettre la diminution de la nucléophilie de l'amine qui risque d'être phosphorylée. Ainsi, il pourrait être intéressant d'utiliser un groupement encombré tel qu'un trityle qui se déprotège en condition acides (TFA à 1 % dans le DCM) par exemple. Enfin, nous pourrions envisager un groupe protecteur qui se déprotège en milieu anoxique tel que le 4-nitrobenzyle ou le 2-nitro-*N*-méthyl-imidazolyle<sup>39</sup>. De plus, les effets électroattracteurs de ces groupements pourraient permettre de diminuer la densité électronique autour de l'azote et ainsi atténuer son caractère nucléophile.

La double prodrogue **193a** où l'amine est également protégée par un Boc a été testée sur une souche de *M. smegmatis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Aucune inhibition de croissance n'a été observée, probablement à cause de la présence du groupement Boc qui (i) diminuerait drastiquement l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme ou (ii) participerait à la dégradation de la prodrogue avant son entrée dans la cellule ou de l'inhibiteur après sa libération *in cellulo*.

Concernant le TMBP, aucune prodrogue *cycloSal* n'a pu être obtenue. En effet, l'isomérisation lors de l'introduction de l'atome de soufre sur l'alcool **201** rend les étapes suivantes de réduction du thioester et d'oxydation en pont disulfure difficiles. Afin de pallier ces difficultés, deux approches pourraient être envisagées :

- ◆ La formation du thioester pourrait être réalisée selon la méthode décrite par Olivito *et al* avec activation préalable de l'alcool par un mésylate suivie de l'addition de thioacétate de potassium en milieu aqueux basique<sup>36</sup>. Cette méthode présente des conditions douces et a permis l'obtention de thioacétates à partir des alcools allyliques correspondants avec d'excellents rendements.

- ◆ L'optimisation des paramètres de purification du thioester pourrait permettre de séparer l'alcène (*E*) et (*Z*), ce qui faciliterait l'étape suivante de réduction.

En outre, afin de différencier le thiol et l'alcool et faciliter l'étape d'oxydation en pont disulfure, il serait intéressant de déprotéger sélectivement le thiol en conservant l'ester. Pour ce faire, nous pourrions réaliser une transestérification du thioacétate par du méthanol en milieu acide. Toutefois, au vu de la difficulté à phosphoryler l'alcool allylique en présence d'une amine protégée par un Boc et de la plus grande polarisabilité du soufre vis-à-vis de l'amine, l'introduction du motif *cycloSal* sur le composé soufré pourrait s'avérer complexe à mettre en œuvre.

## Références

- (1) Van Hoof, S.; Lacey, C. J.; Röhrich, R. C.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1365–1370. doi:10.1021/jo701873t.
- (2) Ahrens-Botzong, A.; Janthawornpong, K.; Wolny, J. A.; Tambou, E. N.; Rohmer, M.; Krasutsky, S.; Poulter, C. D.; Schünemann, V.; Seemann, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11976–11979. doi:10.1002/anie.201104562.
- (3) Span, I.; Wang, K.; Wang, W.; Jauch, J.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Oldfield, E.; Groll, M. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 2118–2121. doi:10.1002/anie.201208469.
- (4) Janthawornpong, K.; Krasutsky, S.; Chaignon, P.; Rohmer, M.; Poulter, C. D.; Seemann, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1816–1822. doi:10.1021/ja309557s.
- (5) Wang, W.; Wang, K.; Liu, Y.-L.; No, J.-H.; Li, J.; Nilges, M. J.; Oldfield, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4522–4527. doi:10.1073/pnas.0911087107.
- (6) McMillan, R. S.; Renaud, J.; Reynolds, J. G.; Holm, R. H. *J. Inorg. Biochem.* **1979**, *11*, 213–227. doi:10.1016/S0162-0134(00)80019-7.
- (7) Tanaka, K.; Nakamoto, M.; Tsunomori, M.; Tanaka, T. *Chem. Lett.* **1987**, *16*, 613–616. doi:10.1246/cl.1987.613.
- (8) Gräwert, T.; Rohdich, F.; Span, I.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Eppinger, J.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756–5759. doi:10.1002/anie.200900548.
- (9) Wang, K.; Wang, W.; No, J.-H.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719–6727. doi:10.1021/ja909664j.
- (10) Wang, W.; Li, J.; Wang, K.; Smirnova, T. I.; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6525–6528. doi:10.1021/ja2008455.
- (11) O’Dowd, B.; Williams, S.; Wang, H.; No, J. H.; Rao, G.; Wang, W.; McCammon, J. A.; Cramer, S. P.; Oldfield, E. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 914–920. doi:10.1002/cbic.201700052.
- (12) Deckert, G.; Warren, P. V.; Gaasterland, T.; Young, W. G.; Lenox, A. L.; Graham, D. E.; Overbeek, R.; Snead, M. A.; Keller, M.; Aujay, M.; Huber, R.; Feldman, R. A.; Short, J. M.; Olsen, G. J.; Swanson, R. V. *Nature* **1998**, *392*, 353–358. doi:10.1038/32831.
- (13) Munier, M.; Tritsch, D.; Lièvreumont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Bioorg. Chem.* **2019**, *89*, 103012–103021. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103012.
- (14) De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13–25. doi:10.1038/nrd703.
- (15) Meier, C. *Synlett* **1998**, *1998*, 233–242. doi:10.1055/s-1998-1637.
- (16) Meier, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72. doi:10.1002/anie.199600701.
- (17) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99–104. doi:10.1016/S0960-894X(96)00597-5.
- (18) Meier, C.; Knispel, T.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1577–1582. doi:10.1016/S0960-894X(97)00265-5.
- (19) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417–1427. doi:10.1021/jm970664s.
- (20) Casiraghi, G.; Casnati, G.; Puglia, G.; Sartori, G.; Terenghi, G. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1980**, *1980*, 1862–1865. doi:10.1039/p19800001862.
- (21) Kwang, H. N.; Gutsche, C. D. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2713–2719. doi:10.1021/jo00135a006.
- (22) Nagata, W.; Okada, K.; Aoki, T. *Synthesis* **1979**, *1979*, 365–368. doi:10.1055/s-1979-28683.

- (23) Mugnier, F.; Meier, C. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 941–942. doi:10.1080/15257779908041605.
- (24) Kortylewicz, Z. P.; Kimura, Y.; Inoue, K.; Mack, E.; Baranowska-Kortylewicz, J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2649–2671. doi:10.1021/jm201482p.
- (25) Rios Morales, E. H.; Balzarini, J.; Meier, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649–1659. doi:10.1002/chem.201002657.
- (26) Zuo, L.; Yao, S.; Wang, W.; Duan, W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4054–4056. doi:10.1016/j.tetlet.2008.04.070.
- (27) Wang, P.; Hu, H.; Wang, Y. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2831–2833. doi:10.1021/ol071085c.
- (28) Moriwake, T.; Hamano, S.; Miki, D.; Saito, S.; Torii, S. *Chem. Lett.* **1986**, *15*, 815–818. doi:10.1246/cl.1986.815.
- (29) Munier, M.; Tritsch, D.; Lièvreumont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Molecules* **2023**, *28*, 7713. doi:10.3390/molecules28237713.
- (30) Zheng, J.; Tang, N.; Xie, H.; Breit, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202200105. doi:10.1002/anie.202200105.
- (31) Corey, E. J.; Kim, C. U.; Takeda, M. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4339–4342. doi:10.1016/S0040-4039(01)94310-2.
- (32) García Ruano, J. L.; Parra, A.; Alemán, J. *Green Chem.* **2008**, *10*, 706. doi:10.1039/b800705e.
- (33) Volante, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3119–3122. doi:10.1016/S0040-4039(01)81842-6.
- (34) Galaka, T.; Ferrer Casal, M.; Storey, M.; Li, C.; Chao, M.; Szajnman, S.; Docampo, R.; Moreno, S.; Rodriguez, J. *Molecules* **2017**, *22*, 82. doi:10.3390/molecules22010082.
- (35) Zhdanko, A. G.; Gulevich, A. V.; Nenajdenko, V. G. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4692–4702. doi:10.1016/j.tet.2009.04.030.
- (36) Olivito, F.; Costanzo, P.; Di Gioia, M. L.; Nardi, M.; M., O.; Procopio, A. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7753–7759. doi:10.1039/C8OB01896K.
- (37) True, J. E.; Thomas, T. D.; Winter, R. W.; Gard, G. L. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4437–4441. doi:10.1021/ic0343298.
- (38) Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A.; Forbes, A.; Perkins, A.; Davey, A.; Chess-Williams, R.; Kiefel, M.; Arora, D.; Grant, G. *Toxins* **2016**, *8*, 236. doi:10.3390/toxins8080236.
- (39) Wang, S.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zhang, D.; Xie, B.; Pan, Z.; Ouyang, K.; Peng, T. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 3469–3478. doi:10.1039/D1OB00356A.

**CHAPITRE 2 :**  
**SYNTHESE DE PRODROGUES *CYCLO*SALIGENYLE**  
**D'UN PRECURSEUR MONOPHOSPHATE DE**  
**PHOSPHOANTIGENE**

|   |     |
|---|-----|
| I. Introduction .....   | 135 |
| II. Synthèse de prodrogues <i>cycloSal</i> du HMBPP monophosphate (HMBP).....               | 139 |
| A. Synthèse de la prodrogue <i>cycloSal</i> <b>232a</b> du HMBP .....                       | 141 |
| B. Synthèse de la double prodrogue <b>233a</b> du HMBP avec un <i>p</i> -nitrobenzyle ..... | 149 |
| III. Conclusion.....  | 153 |
| Références .....  | 154 |

## I. Introduction

Les phosphoantigènes (PAGs) sont des petites molécules non peptidiques phosphorylées capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, le sous-ensemble majoritaire des cellules T  $\gamma\delta$  présentes dans le sang périphérique humain. Ces cellules effectrices jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire et contribuent, entre autres, à l'élimination de pathogènes ou à la lyse des cellules cancéreuses. Le HMBPP **22**, dernier intermédiaire de la voie du MEP, est le PAG le plus efficace découvert à ce jour. Ainsi, il possède un rôle double puisqu'il est à la fois nécessaire à la croissance bactérienne et stimule le système immunitaire à des concentrations de l'ordre du picomolaire ( $EC_{50}$  comprise entre 0,070 et 0,51 nM) (Figure 58). Cependant, le groupement diphosphate du HMBPP est rapidement métabolisé dans le plasma. C'est pourquoi des analogues phosphonates ont été synthétisés, avec notamment le C-HMBPP **37** possédant une efficacité similaire à celle du PAG naturel ( $EC_{50}$  = 0,91 nM) tout en étant bien plus stable (cf Introduction générale, partie III.).

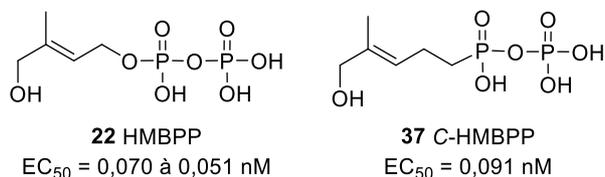


Figure 58. Le PAG naturel le plus efficace, le HMBPP **22**, et son analogue synthétique, le C-HMBPP **37**.

Toutefois, l'utilisation des PAGs dans le cadre d'immunothérapies anticancéreuses est limitée par la présence des groupements diphosphate ou phosphonate qui diminuent considérablement leur perméabilité aux membranes cellulaires. Afin d'améliorer la biodisponibilité des PAGs, plusieurs groupes se sont intéressés à la synthèse de ces derniers sous forme de prodrogues.

Ainsi, le groupe de Wiemer a préparé des prodrogues bis(POM) du monophosphonate C-HMBP **38**<sup>1</sup> et tris(POM) du diphosphonate CC-HMBPP **35**<sup>2</sup> qui sont plus stables qu'un phosphate (Figure 59). Cette approche prodrogue leur a également permis d'étudier l'influence de l'augmentation de la biodisponibilité des PAG sur leur activité immunostimulante puisque les prodrogues bis- ou tris(POM) favorisent la pénétration cellulaire par diffusion passive. Parmi les composés testés, la prodrogue bis(POM) **209** permet de stimuler la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ( $EC_{50}$  = 0.0054  $\mu$ M) avec une efficacité 700 fois supérieure à celle de son composé parent, le C-HMBP **38** ( $EC_{50}$  = 4  $\mu$ M)<sup>1</sup>. Avec une  $EC_{50}$  de 0,041  $\mu$ M, la prodrogue tris(POM) **210** s'est elle aussi révélée être 600 fois plus efficace que le CC-HMBPP **35** ( $EC_{50}$  = 26  $\mu$ M) pour activer la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>2</sup>. Bien que les deux prodrogues **209** et **210** restent moins efficaces que le HMBPP **22** ( $EC_{50}$  = 0,51 nM), l'amélioration de leur activité immunostimulante par rapport aux composés parents **38** et **35** suggère que ces derniers sont bien libérés au sein de la cellule. De plus, la meilleure efficacité

de la prodrogue bis(POM) **209** par rapport au tris(POM) de diphosphonate **210** pourrait s'expliquer par une phosphorylation intracellulaire du monophosphonate C-HMBP **38** libéré dans le cas de la prodrogue bis(POM) **209**. En effet, l'ajout d'un groupement phosphate conduirait à la formation du C-HMBPP **37**, PAg plus stable que le HMBPP et à l'activité proche de ce dernier. Finalement, ces résultats montrent que les charges des phosphonates peuvent freiner aussi bien l'entrée des PAg dans la cellule que leur sortie, ce qui est en faveur d'un mécanisme de reconnaissance des PAg par une fixation intracellulaire au récepteur de la protéine transmembranaire BTN3A1<sup>1,2</sup>.

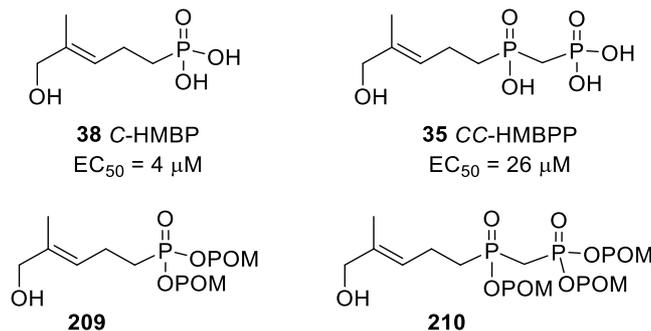


Figure 59. Les PAg synthétiques C-HMBP **38** et CC-HMBPP **35** et leurs prodrogues bis(POM) **209** et tris(POM) **210** respectives.

Malgré l'efficacité de la stratégie de prodrogues bis(POM) pour délivrer les PAg dans les cellules, ces composés possèdent des temps de demi-vie plutôt courts dans le plasma<sup>3,4</sup> à l'image du composé bis(POM)-C-HMBP **209** qui possède un temps de demi-vie d'environ 8 min dans le plasma humain<sup>5</sup>. Afin d'augmenter la stabilité de ces composés, des prodrogues dissymétriques où le phosphonate est masqué par un groupement POM et un groupement aryloxy ont été synthétisées (Figure 60). Le composé **211** portant un phényle s'avère aussi peu stable dans le plasma humain que la prodrogue bis(POM) **209** puisqu'elle est presque entièrement métabolisée après 2h. Seules les prodrogues **212** et **213** comportant un groupement 1-naphtyle et 2-naphtyle respectivement possèdent une grande stabilité dans le plasma<sup>6</sup>. De plus, ces deux prodrogues stimulent la prolifération des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec des  $EC_{50}$  de 2,1 nM pour **213**<sup>6</sup> et 0,79 nM pour **212**<sup>7</sup>. Cette dernière est même 570 fois plus efficace que le HMBPP pour stimuler la production d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) par les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2<sup>7</sup>. Le composé **211** portant un groupement phényle s'est avéré être un moins bon PAg que **212** et **213**, probablement parce que le naphtyle est plus hydrophobe que le phényle d'une part, et que le naphтол est un meilleur groupe partant que le phénol d'autre part<sup>7</sup>.

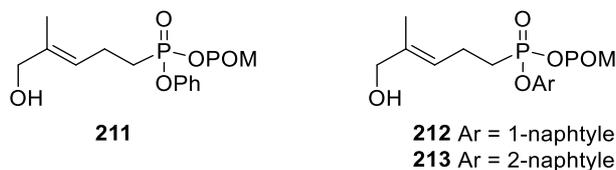


Figure 60. Prodrogues mixtes aryloxy et POM **211** à **213** du C-HMBP **38**.

Afin d'obtenir des prodrogues monophosphate qui possèdent une efficacité proche de celle du HMBPP, l'équipe de Mehellou a utilisé la stratégie ProTide (Prodrogue de nucléoTide) et préparé des prodrogues phosphoramidates du HMBP portant un phényloxy et une L-alanine estérifiée (Figure 61). Cependant, après la dernière étape de déprotection des éthers silylés en position C4, une décomposition des phosphoramidates **218** à **221** a été observée. Ainsi, la liaison P-O étant instable, seuls les phosphoramidates **214** à **217** protégés par un éther silylé ont pu être testés. Ces quatre prodrogues possèdent tout de même une activité immunostimulante très intéressante de l'ordre du nanomolaire, le composé **215** avec un ester de benzyle possédant la meilleure efficacité ( $EC_{50} = 0,45$  nM), proche de celle du HMBPP **22** ( $EC_{50} = 0,06$  nM)<sup>8</sup>.

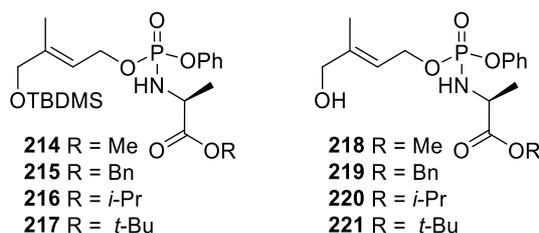


Figure 61. Prodrogues phosphoramidates **214** à **221** du HMBP.

Pour pallier cette instabilité de la liaison P-O, la même stratégie a été appliquée au monophosphonate C-HMBP **38** avec une glycine estérifiée et en faisant varier le groupement aryloxy (phényle, 1-naphtyle ou 2-naphtyle) (Figure 62). Les phosphoramidates ainsi préparés se sont avérés beaucoup plus stables que les prodrogues bis(POM) et les phosphoramidates précédents dans le plasma humain. Les trois composés **222**, **223** et **224** de la série 1-naphtyle sont les plus efficaces puisqu'ils induisent la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec des  $EC_{50}$  compris entre 0,34 et 0,44 nM, du même ordre de grandeur que le HMBPP **22** ( $EC_{50} = 0,51$  nM)<sup>5</sup>. Une autre série de phosphoramidates portant un phényloxy et une L-alanine estérifiée a été étudiée par Kadri *et al.* De plus, dans le but d'obtenir des composés qui possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques similaires à celles d'un phosphate tout en conservant la stabilité du phosphonate<sup>9</sup>, ils ont également préparé des analogues où la liaison CH<sub>2</sub>-P est substituée par une liaison CF<sub>2</sub>-P. Tous ces phosphoramidates sont bien plus stables dans le plasma humain que les phosphoramidates précédents. Toutefois, les composés **225** et **226** portant un ester de benzyle surpassent largement l'activité immunostimulante du PAg naturel puisqu'ils induisent la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec des  $EC_{50}$  de 4,97 et 9,15 fM respectivement contre 0,145 nM pour le HMBPP<sup>10</sup>.

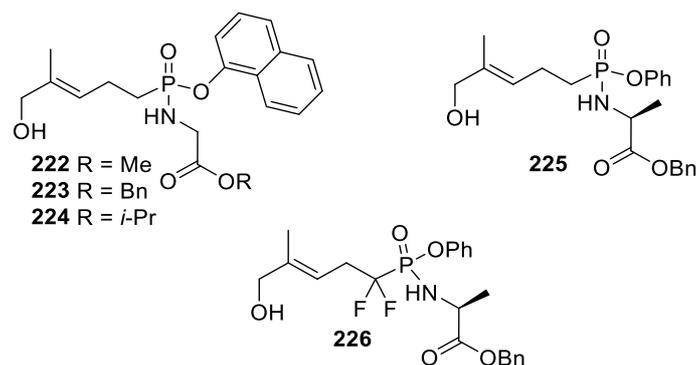


Figure 62. Prodrogues phosphoramidates **222** à **226** du C-HMBP **38**.

Plus récemment, le groupe de Wiemer a étudié l'activité immunostimulante de dérivés des prodrogues du C-HMBP qui ont été modifiées au niveau de la fonction alcool en C4. Cette dernière a été substituée soit par un CH<sub>3</sub> (prodrogues du DMAPP monophosphonate), soit par un aldoxime, soit par un aldéhyde. Les résultats obtenus montrent que l'absence d'hydroxyle en position C4 abroge l'activité immunostimulante de ces prodrogues tandis que la présence d'un aldoxime diminue drastiquement leur efficacité. En revanche, la fonctionnalisation par un aldéhyde est plutôt bien tolérée puisque les composés qui portent cette fonction stimulent la prolifération des lymphocytes à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, la meilleure efficacité étant observée pour la prodrogue **227** avec un 2-naphtyle (EC<sub>50</sub> = 4,6 nM) (Figure 63). En effet, une réduction intracellulaire de l'aldéhyde pourrait permettre de retrouver l'alcool, ce qui expliquerait cette faible perte d'activité par rapport à la prodrogue **212**<sup>11</sup>. Par ailleurs, la substitution du motif isoprénique par un diène diminue l'efficacité des prodrogues, bien que le composé **228** qui ne porte pas d'hydroxyle en C4 possède la meilleure activité immunostimulante avec un EC<sub>50</sub> de 0,13 μM<sup>12</sup>. De manière générale, ces résultats suggèrent que la présence du motif isoprénique et de l'alcool allylique est nécessaire pour une activité immunostimulante optimale.

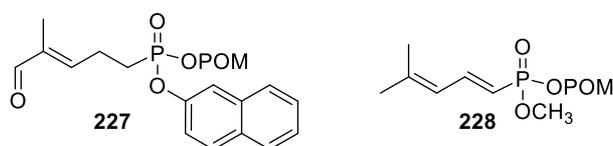


Figure 63. Prodrogues du C-HMBP **38** avec modification du groupement hydroxyle en C4 (composé **227**) et du motif isoprénique (composé **228**).

Afin d'augmenter la biodisponibilité des diverses prodrogues décrites plus haut, Harmon *et al* ont préparé les doubles prodrogues **229** à **231** où l'hydroxyle en C4 est protégé par un acétate (Figure 64). Pour ces trois composés, la fonction acétate introduite est rapidement métabolisée dans le plasma humain. Toutefois, à l'exception de **229** pour lequel l'acétate est métabolisé plus lentement que les bis(POM) du phosphonate, les motifs phosphoramidates de **230** et **231** restent stables dans le plasma. Lors des tests de prolifération des cellules T Vγ9Vδ2, ces trois composés se sont avérés plus efficaces que leurs dérivés alcool avec une activité proche, voire meilleure,

que celle du HMBPP<sup>13</sup>. Ces résultats indiquent que cette stratégie de double prodrogue permet effectivement d'augmenter la lipophilie et la biodisponibilité des prodrogues de PAg.

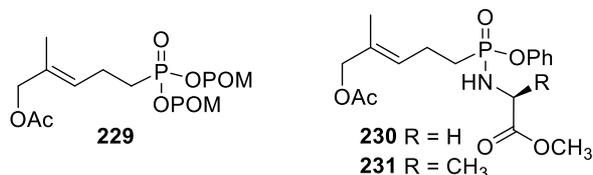


Figure 64. Doubles prodrogues **229** à **231** du C-HMBP **38**.

Toutes les prodrogues décrites précédemment activent spécifiquement la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Les stratégies de prodrogue mixte aryloxy/POM et phosphoramidate apparaissent comme les deux stratégies les plus efficaces et les plus prometteuses pour le développement de nouvelles immunothérapies ciblant les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Toutefois, dans les deux cas, la libération du PAg est dépendante d'une ou plusieurs enzymes : estérases pour les prodrogues mixtes et carboxypeptidase et phosphoramidase dans le cas des prodrogues phosphoramidates.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons à la synthèse de prodrogue du HMBPP monophosphate (HMBP) en suivant deux axes de travail :

- ◆ Afin de s'affranchir d'une libération enzymatique des PAg, nous synthétiserons les prodrogues *cycloSal* du HMBP **232a-d** avec différents substituants en para de l'ester de phénol. En outre, cette approche permettra d'étudier la cinétique de libération du PAg (Figure 65).
- ◆ Afin de délivrer sélectivement le PAg au sein de l'environnement anoxique des tumeurs, nous synthétiserons également les doubles prodrogues **233a-d** où la fonction alcool est protégée par un groupement capable de se déprotéger en milieu réducteur (Figure 65).

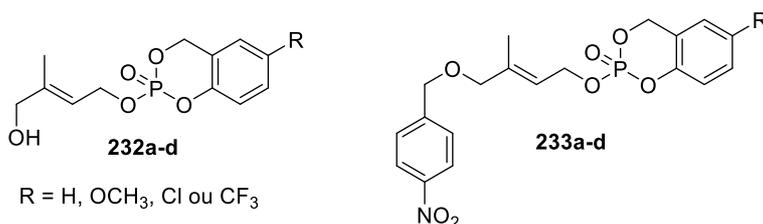


Figure 65. Structures des prodrogues *cycloSal* **232a-d** du HMBP et **233a-d** du HMBP protégé par un groupement *p*-nitrobenzyle que nous avons choisi de synthétiser.

## II. Synthèse de prodrogues *cycloSal* du HMBPP monophosphate (HMBP)

Afin de préparer les prodrogues *cycloSal* **232a-d** et **233a-d** du HMBP, nous avons choisi une stratégie de synthèse qui s'appuie sur la même étape clé d'addition-élimination que celle décrite pour les inhibiteurs d'IspH (cf chapitre 1 – partie 2) en introduisant le motif *cycloSal*

sur les alcools **234** et **235** à partir des *cycloSal* phosphochloridate **179a-d** (Schéma 48). Un paramètre important à prendre en compte lors de cette synthèse est la différenciation des deux groupements hydroxyles grâce à des groupements protecteurs judicieusement choisis et dont les conditions de déprotection sont compatibles avec le motif *cycloSal*. La première étape pourrait être une réaction de Wittig entre l'hydroxyacétone **202** et l'acétate d'éthyl(triphenylphosphoranylidène) commerciaux, ce qui permettrait d'accéder à l'ester conjugué **201** possédant un motif isoprénique. Par ailleurs, la fonction ester ainsi formée pourrait permettre de masquer un des deux groupements hydroxyles. La seconde fonction alcool pourrait alors être protégée à son tour avant une dernière étape de réduction sélective de l'ester qui conduirait aux alcools **234** et **235**.

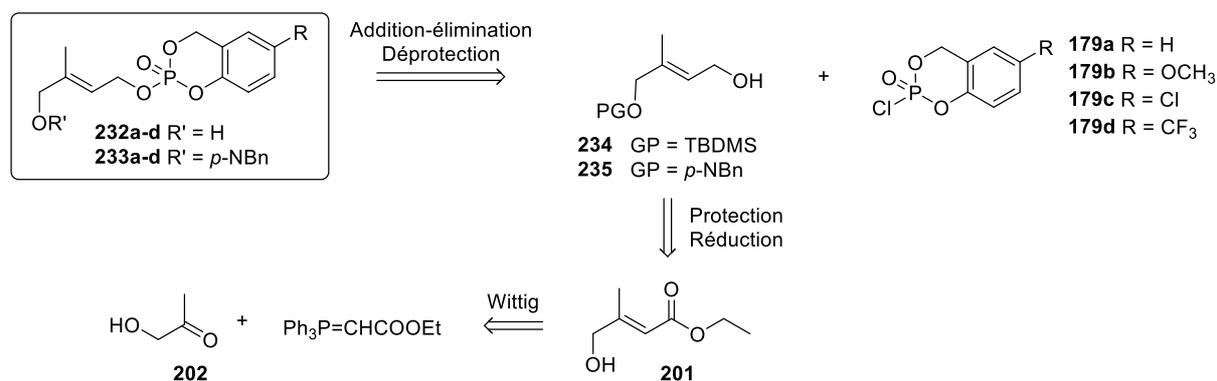


Schéma 48: Stratégie de synthèse des prodrogues *cycloSal* **232a-d** du HMBP et **233a-d** du HMBP protégé par un *p*-nitrobenzyle.

Dans un premier temps, nous synthétiserons les prodrogues *cycloSal* **232a-d** du HMBP et testerons leur activité immunostimulante. Pour ce faire, nous avons adopté une stratégie de synthèse qui s'appuie sur l'utilisation d'un groupement protecteur qui sera déprotégé après l'étape de phosphorylation pour conduire aux prodrogues désirées. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser un éther silylé tel que le *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) qui possède l'avantage de résister aux conditions envisagées pour la réduction de l'ester (DIBAL-H). De plus, ce groupement se déprotège en conditions acides<sup>14</sup> ce qui permettrait d'éviter la déprotection de la prodrogue *cycloSal* qui a lieu à pH > 7.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à la synthèse des doubles prodrogues **233a-d** où le second hydroxyle est masqué par un *p*-nitrobenzyle qui pourrait se déprotéger spécifiquement en milieu anoxique au sein des tumeurs. En effet, les composés nitro-aromatiques sont souvent utilisés pour la conception de sondes pour l'imagerie de l'hypoxie au sein des tumeurs où des réductases intracellulaires telles que les nitroréductases sont surexprimées<sup>15,16</sup>. Ces dernières réduisent les composés nitro-aromatiques en amines correspondantes avant élimination du groupement protecteur et activation de la sonde *in vivo*. Cette approche est également utilisée pour délivrer des composés actifs spécifiquement au sein des tumeurs<sup>17</sup>. Ainsi, nous avons choisi d'appliquer cette stratégie pour synthétiser la double

prodrogue du HMBP. La déprotection du *p*-nitrobenzyle pourrait avoir lieu soit avant la déprotection du *cycloSal*, soit après libération du HMBP, mais avant sa phosphorylation en HMBPP, soit après ces deux étapes. Dans tous les cas, le mécanisme de déprotection par une nitroréductase serait le suivant : une première réduction à un électron du groupement nitro permettrait de former un radical qui est transformé en nitrosyle après ajout d'un électron supplémentaire (Schéma 49). Une série de réductions successives conduirait ensuite à une hydroxylamine ou à une amine. Enfin, le groupement protecteur serait éliminé par délocalisation du doublet de l'azote.

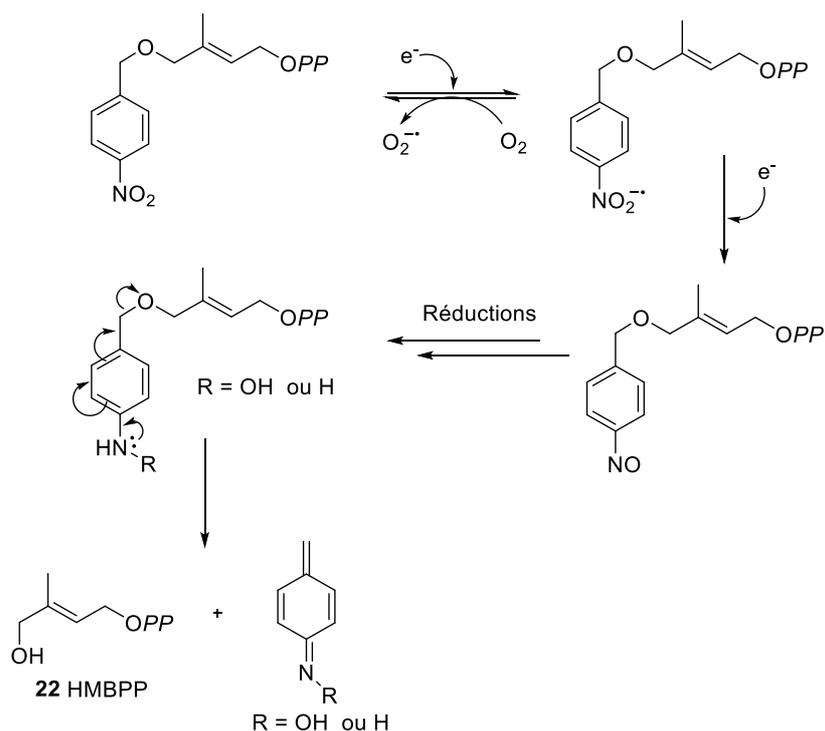


Schéma 49. Mécanisme de déprotection du groupement *p*-nitrobenzyle en milieu anoxique en présence de nitroréductases.

La synthèse de ces deux prodrogues a été entreprise avec l'aide des stagiaires de M1 que j'ai encadrés.

### A. Synthèse de la prodrogue *cycloSal* 232a du HMBP

Afin de préparer la prodrogue **232a** du HMBP, nous avons d'abord synthétisé l'alcool **234** protégé par un groupement TBDMS. Nous sommes partis de l'ester **201**, issu de la réaction de Wittig réalisée précédemment entre l'hydroxyacétone **202** et l'acétate d'éthyl(triphenylphosphoranylidène), tous deux commerciaux (cf Chapitre 1, Partie 2, II. B.) (Schéma 50). L'alcool primaire est ensuite protégé par l'éther silylé dans les conditions classiques (TBDMSCl, TEA, DMAP)<sup>14</sup> et le composé **236** est obtenu avec un rendement de 70 %. Enfin, une étape de réduction sélective de l'ester par du DIBAL-H nous a permis d'obtenir l'alcool **234** (62%) qui est engagé dans l'étape de couplage.

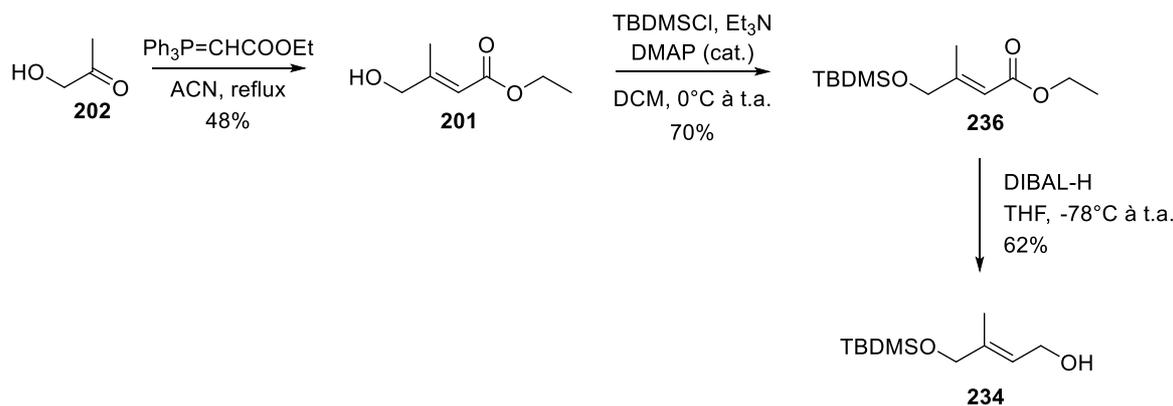


Schéma 50. Synthèse de l'alcool **234** protégé par un groupement *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMS).

Après avoir traité une solution d'alcool **234** dans le  $\text{DCM}$  par le *cycloSal* phosphochloridate **179a** en présence de  $\text{TEA}$  et de  $\text{DMAP}$  en quantité catalytique (Schéma 51), nous observons sur le spectre  $\text{RMN}^{-31}\text{P}$  du brut réactionnel la présence de deux signaux majoritaires à  $-9,2$  et  $-9,3$  ppm, caractéristiques des prodrogues *cycloSal*.

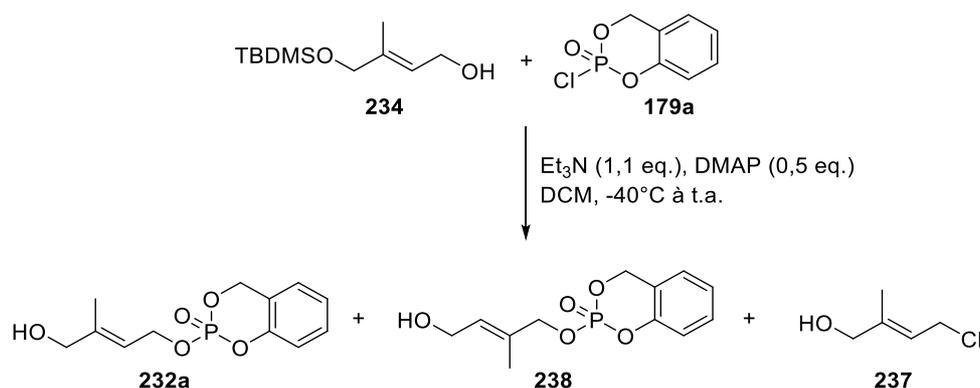


Schéma 51. Réaction de couplage entre l'alcool **234** et le *cycloSal* phosphochloridate **179a**.

Après purification, deux fractions sont obtenues. Le composé le plus polaire ( $R_F = 0,26$  ;  $\text{DCM}/\text{AcOEt}$  95/5) ne possède pas d'atome de phosphore puisqu'aucun signal n'est présent sur son spectre  $\text{RMN}^{-31}\text{P}$ . L'analyse du spectre  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  montre la présence d'un proton éthylénique à  $5,73$  ppm, de deux multiplets correspondant à deux  $\text{CH}_2$  ( $4,14$  et  $4,07$  ppm) et un  $\text{CH}_3$  à  $1,75$  ppm. L'absence des protons des méthyles du TBDMS suggère que nous avons formé un analogue de l'alcool **234** où le TBDMS a été déprotégé. Nous avons ensuite réalisé le spectre  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  afin de confirmer cette hypothèse. En effet, si nous avons obtenu le diol, les signaux des deux  $\text{CH}_2$  devraient se situer aux alentours de  $70$  et  $60$  ppm. Or, nous observons un  $\text{CH}_2$  à  $67,6$  ppm et un autre à  $40,2$  ppm, déplacement chimique caractéristique d'un  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  d'un chlore (Figure 66). Ainsi, le composé formé correspond à la structure **237** où le TBDMS a été déprotégé et où l'autre groupement hydroxyle a été substitué par un atome de chlore (Figure 66). De la même manière que précédemment pour la prodroge de l'AMBP, précurseur monophosphate de l'inhibiteur amino d'IspH, la double liaison pourrait ici encore induire la

formation de ce produit par une succession de réactions de S<sub>N</sub>2' (cf Schéma 38 dans le Chapitre 1, partie 2, II. A.).

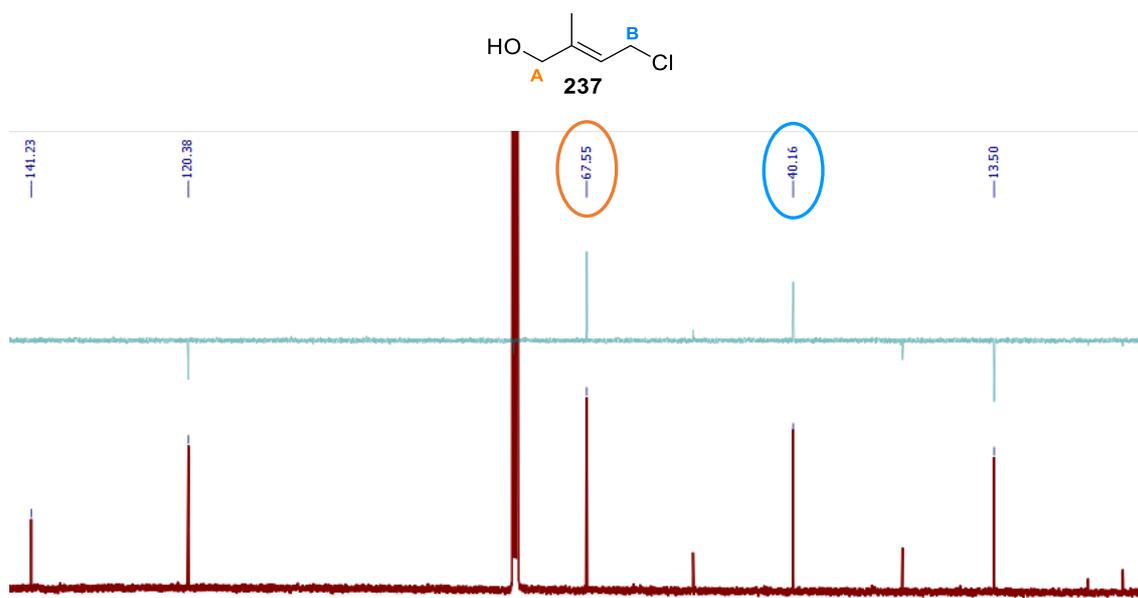


Figure 66. Superposition des spectres RMN-<sup>13</sup>C (en rouge) et DEPT (en vert) du composé obtenu dans la fraction la plus polaire correspondant à la structure **237** proposée ci-dessus.

La seconde fraction, qui possède un R<sub>F</sub> de 0,60 dans le même éluant, est un mélange de deux prodrogues *cycloSal*, comme en témoignent les deux signaux observés à -9,2 et -9,5 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P, en proportions 75/25 respectivement. En RMN-<sup>1</sup>H, nous observons la présence de signaux qui correspondent au motif *cycloSal* avec quatre protons aromatiques et un multiplet caractéristique des deux protons benzyliques non équivalents entre 5,30 et 5,40 ppm. Toutefois, nous pouvons noter (i) l'absence des protons du groupe protecteur, et (ii) la présence d'un proton éthylénique à 5,73 ppm ainsi que trois signaux supplémentaires qui intègrent pour ¾ protons : un doublet de doublet de *pseudo*-triplet ( $J = 9,7$  Hz ;  $J = 6,9$  Hz ;  $J = 0,68$  Hz) à 4,74 ppm qui pourrait correspondre au CH<sub>2</sub> en α du CH, un singulet large à 3,99 ppm qui pourrait appartenir au CH<sub>2</sub> en α du carbone quaternaire éthylénique et trois protons d'un CH<sub>3</sub> qui sortent à 1,81 ppm sous la forme d'un *pseudo*-triplet ( $J = 0,67$  Hz). Ces trois signaux sont accompagnés respectivement de deux doublets larges à 4,59 ppm ( $J = 8,5$  Hz) et 4,06 ppm ( $J = 7,8$  Hz) et d'un singulet large à 1,73 ppm intégrant chacun pour ¼ protons. Ces résultats indiquent que les deux composés formés sont très proches structurellement et pourraient correspondre à des régioisomères obtenus en proportions 75/25 (Figure 67).

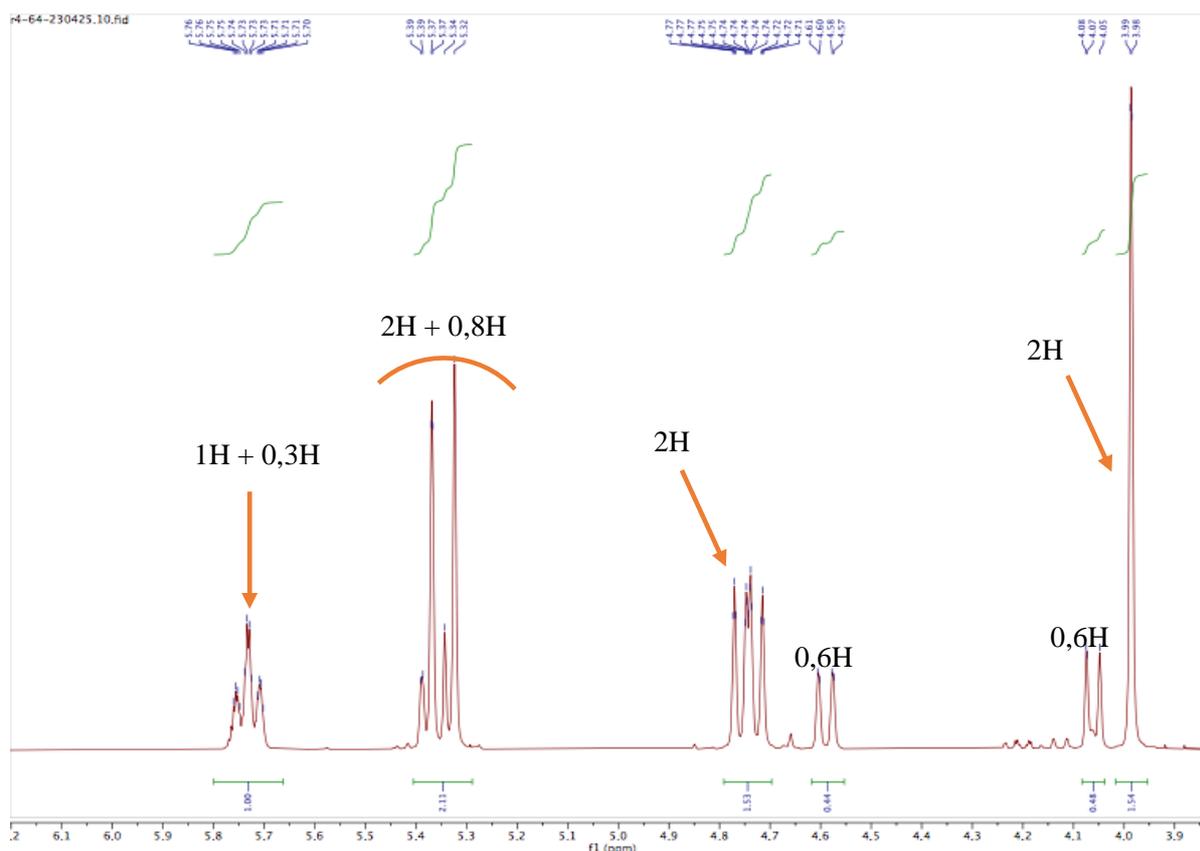


Figure 67. Zoom du spectre RMN- $^1\text{H}$  (entre 3,9 et 6,0 ppm) de la fraction la moins polaire correspondant à un mélange de régioisomères en proportions 75/25.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse HMBC qui montre pour le composé majoritaire une corrélation en  $^3J$  entre le singulet à 137,4 ppm du carbone quaternaire éthylénique et le  $\text{CH}_2$  à 4,74 ppm, ainsi qu'une corrélation en  $^2J$  avec le  $\text{CH}_2$  à 3,99 ppm. Le carbone quaternaire éthylénique de l'autre régioisomère apparaît sous la forme d'un doublet ( $^3J_{\text{C-P}} = 6,4 \text{ Hz}$ ) à 134,7 ppm correspondant au couplage avec l'atome de phosphore à -9,5 ppm. De plus, une tache de corrélation est observée entre ce carbone à 134,7 ppm et les deux  $\text{CH}_2$  à 4,59 et 4,06 ppm. Au vu de ces résultats, le composé majoritaire obtenu correspondrait au *cycloSal* HMBP final **232a**, et serait accompagné du composé **238** portant le groupement *cycloSal* sur l'autre hydroxyle (Schéma 51).

La formation de ces trois produits déprotégés est d'autant plus surprenante qu'aucune étape de déprotection n'a été réalisée. Le pH du milieu réactionnel étant très acide (autour de 1-2), la rupture de la liaison O-Si pourrait avoir eu lieu soit au cours de la réaction, soit durant le traitement du brut réactionnel. Afin d'éviter cette déprotection, nous avons mis en place deux stratégies qui visent à modifier les conditions réactionnelles d'une part et changer le groupement protecteur d'autre part.

Nous avons d'abord réalisé l'étape de couplage avec l'alcool **234** portant un TBDMS en augmentant la quantité de TEA pour atteindre un mélange équimolaire de base (TEA + DMAP) par rapport au *cycloSal* phosphochloridate (3 eq.) et ainsi neutraliser le milieu. Dans ces

conditions, le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut indique la présence des deux mêmes signaux majoritaires que précédemment autour de -9 ppm (-9,2 et -9,3 ppm), ce qui suggère ici encore la déprotection du TBDMS et la formation des deux régioisomères. Nous avons alors choisi de protéger l'hydroxyle par le triisopropylsilyle (TIPS), un autre éther silylé qui résiste mieux aux conditions acides que le TBDMS<sup>14</sup>.

L'étape de protection a été réalisée comme précédemment sur l'ester **201** avec du TIPSCI pour donner l'éther silylé **239** (60 %) (Schéma 52). Après réduction de l'ester, l'alcool **240** obtenu (66 %) a été engagé dans l'étape de couplage.

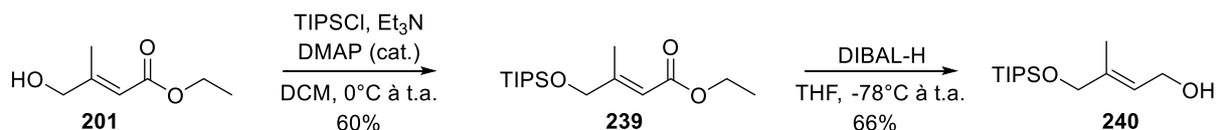


Schéma 52. Synthèse de l'alcool **240** protégé par un groupement triisopropylsilyle (TIPS).

L'introduction du motif *cycloSal* a été réalisée soit dans les conditions « classiques » avec 1,1 eq. de TEA, soit avec une quantité équimolaire de base (2,5 eq. de TEA et 0,5 eq. de DMAP) par rapport au *cycloSal* phosphochloridate (3 eq.) (Schéma 53). De plus, afin de déterminer si la formation du produit et de son régioisomère a lieu lors de la réaction ou lors du traitement, un spectre RMN-<sup>31</sup>P a été effectué sur le milieu réactionnel avant traitement et sur le brut réactionnel après traitement. Dans les conditions « classiques », un signal majoritaire est observé à -9,1 ppm dans le milieu réactionnel avant traitement, mais un second pic minoritaire apparaît à -9,3 ppm dans le spectre du brut après traitement qui pourrait correspondre au régioisomère. Toutefois, seule une petite partie du TIPS a dû être déprotégée puisque les protons du groupement protecteur sont encore présents en RMN-<sup>1</sup>H. En présence d'une quantité équimolaire de base, un seul signal caractéristique des prodrogues *cycloSal* est observé à -9,1 ppm, que ce soit avant ou après le traitement de la réaction. Cependant, après purification par colonne chromatographique, aucune des fractions ne présente ce signal caractéristique autour de -9 ppm indiquant que la prodroge **241** s'est dégradée.

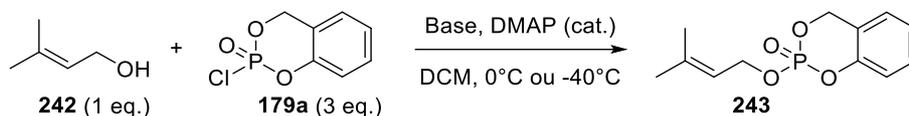


Schéma 53. Réaction de couplage entre l'alcool **240** et le *cycloSal* phosphochloridate **179a**.

Ces résultats suggèrent que le régioisomère se formerait pendant la phase de traitement du milieu réactionnel qui possède un pH acide. De plus, la combinaison de l'utilisation d'un groupement TIPS plus robuste et d'une quantité équimolaire de base nous a permis d'observer la formation du produit, mais ce dernier s'est dégradé lors de la purification, ce qui laisse penser que le groupement protecteur n'est pas le seul facteur limitant. En effet, la dégradation de cette prodroge pourrait être due à la position allylique de la double liaison.

Ainsi, nous avons réalisé l'étape de couplage entre un alcool allylique non fonctionnalisé, le 3-méthyl-2-buten-1-ol **242** commercial, et le *cycloSal* phosphochloridate **179a** (Tableau 8).

Tableau 8 : Conditions réactionnelles pour l'étape de couplage entre l'alcool **242** commercial et le *cycloSal* phosphochloridate **179a**. Les spectres RMN-<sup>31</sup>P ont été réalisés sur les bruts réactionnels. Les signaux de RMN-<sup>31</sup>P donnés sont ceux observés autour de -9 ppm et qui pourraient correspondre à la prodrogue **243**.



| Entrée | Base     | Equiv. base | Equiv. DMAP | T (°C) | RMN- <sup>31</sup> P (ppm) |
|--------|----------|-------------|-------------|--------|----------------------------|
| 1      | TEA      | 1,1         | 0,5         | -40    | -8,3                       |
| 2      | Pyridine | 1,1         | 0,1         | 0      | -8,4                       |
| 3      | TEA      | 1,5         | 0,25        | 0      | -9,2                       |

Dans les conditions « classiques », nous obtenons un signal majoritaire vers -8 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut qui pourrait appartenir au produit **243** désiré (Tableau 8 – entrée 1). Bien que le spectre RMN-<sup>1</sup>H soit difficilement interprétable, un multiplet entre 4,49 et 4,61 ppm pourrait correspondre aux protons benzyliques du groupement *cycloSal*. Cependant, après purification par colonne chromatographique, aucune fraction ne contient de signal autour de -8 ou -9 ppm en RMN-<sup>31</sup>P, suggérant que le produit s'est décomposé sur la colonne.

Dans la littérature, deux exemples de phosphorylation sur l'alcool **242** et ses analogues **244** et **245** permettent la formation des phosphates acycliques **246**, **247**<sup>18</sup> et **248**<sup>19</sup> en utilisant différentes bases (Tableau 8 – entrées 2 et 3). Ces conditions pourraient alors être utilisées pour l'introduction du *cycloSal* sur le 3-méthyl-2-buten-1-ol **242** commercial.

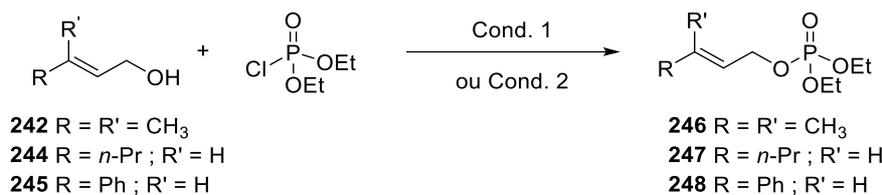


Schéma 54. Synthèse de phosphates allyliques acycliques, **246-248**. Conditions 1 : pyridine, DMAP (10 mol%), DCM, 0°C<sup>18</sup>. Conditions 2 : TEA, DMAP (25 mol%), DCM, 0°C<sup>19</sup>.

Ainsi, en utilisant la pyridine comme base avec 10 mol% de DMAP<sup>18</sup>, nous observons dans le brut réactionnel cinq signaux en RMN-<sup>31</sup>P dont deux majoritaires à -17,1 ppm et -8,4 ppm (Tableau 8 – entrée 2). Ce dernier pourrait correspondre à la prodrogue **243** désirée, mais de la même manière que précédemment, la purification par colonne chromatographique n'a pas permis d'isoler le produit.

En présence de TEA (1,5 eq.) et de DMAP (0,25 eq.)<sup>19</sup>, nous observons la présence d'un pic autour de -9 ppm qui pourrait indiquer la formation du produit désiré (Tableau 8 – entrée 3). La

différence de déplacement chimique observée en RMN-<sup>31</sup>P (-8 vs -9 ppm) pourrait être due au pH du milieu réactionnel. En effet, pour les entrées 1 et 2 du Tableau 8, respectivement 1,6 et 1,2 équivalents de base (TEA et DMAP) sont utilisés contre 1,75 équivalents pour les dernières conditions testées (Tableau 8 – entrée 3). Toutefois, le suivi CCM montre que la prodroge se dégrade au cours du temps et, ici encore, le produit n'est présent dans aucune des fractions après purification par colonne sur gel de silice.

Afin de préparer cette prodroge **243** de l'analogue monophosphate du DMAPP, nous avons testé la méthode utilisant la chimie du phosphore (III). En effet, dans ce cas, le couplage est réalisé avec un chlorophosphite qui est beaucoup plus réactif que le *cycloSal* phosphochloridate, ce qui pourrait permettre de faciliter la formation de la prodroge **243** désirée. De plus, cette méthode nous permettrait d'éviter l'étape de traitement du milieu réactionnel puisqu'après l'étape d'oxydation, seule une évaporation du solvant est nécessaire avant purification<sup>20</sup>. De la même manière qu'avec le *cycloSal* phosphochloridate, la quantité de chlorophosphite formé est estimée par RMN-<sup>31</sup>P avec un signal attendu autour de 140 ppm. Ainsi, en présence de PCl<sub>3</sub>, le saligénol **173a** est converti en chlorophosphite **177** (Schéma 55) dont la formation est confirmée par la présence d'un pic à 139,9 ppm. Le brut réactionnel est directement engagé dans le couplage avec le même alcool commercial que précédemment. Il est difficile de dire par suivi CCM si tout l'alcool **242** est consommé, en revanche, l'absence de signal autour de 140 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du milieu réactionnel montre que tout le chlorophosphite a réagi. Nous avons alors ajouté du TBHP afin d'oxyder sélectivement le phosphore (III) en phosphore (V). Sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel, nous observons un signal largement majoritaire à -8,7 ppm qui pourrait correspondre au produit. Malheureusement, nous observons la dégradation de la prodroge sur la silice pendant la purification.

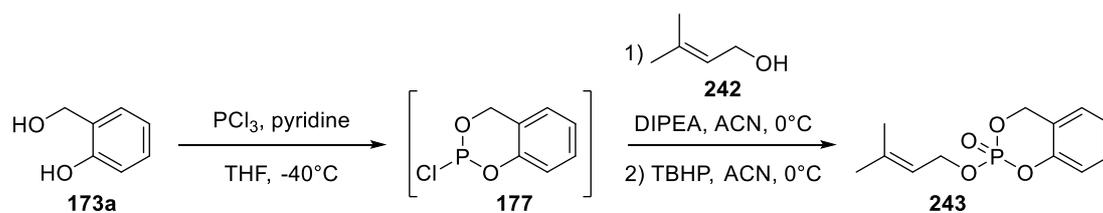


Schéma 55. Synthèse du chlorophosphite **177** et réaction de couplage avec le 3-méthyl-2-buten-1-ol **242**.

Une décomposition similaire a été observée par l'équipe de Mehellou lors de la purification de prodrogues phosphoramidates du DMAPP monophosphate, probablement à cause du caractère légèrement acide de la silice. En effet, ces prodrogues se sont ensuite avérées instables en milieu acide contrairement aux prodrogues de l'IPP monophosphate. L'étude mécanistique de la décomposition de cette prodroge phosphoramidate du DMAPP monophosphate suggère que la double liaison en position allylique par rapport à un bon groupe partant est sensible aux attaques nucléophiles selon une réaction de S<sub>N</sub>2' (Schéma 56)<sup>21</sup>. Un tel groupe partant peut être un phosphoramidate ou un phosphate.

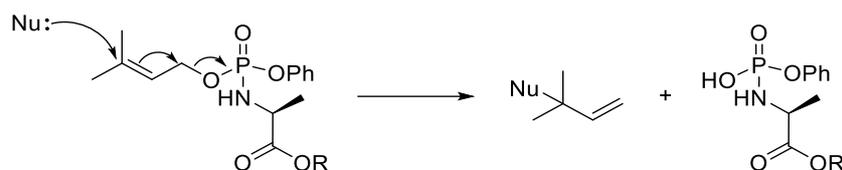


Schéma 56. Proposition de mécanisme pour la dégradation des prodrogues phosphoramidates du DMAPP monophosphate<sup>21</sup>.

Puisque l'introduction du motif *cycloSal* sur l'alcool allylique **242** non fonctionnalisé est rendue difficile par la décomposition rapide de la prodrogue lors de la purification, nous avons opté pour une approche différente. Cette dernière consiste à (i) synthétiser la prodrogue *cycloSal* **250** de l'IPP monophosphate qui possède une double liaison en position homoallylique plus stable et (ii) isomériser la double liaison en présence de chlorure de palladium ( $\text{PdCl}_2$ ) pour former l'alcène le plus substitué en suivant la méthode décrite par Jing *et al*<sup>22</sup> ce qui permettrait d'obtenir la prodrogue du DMAPP monophosphate désirée. Avec cette seconde étape, nous pourrions nous affranchir de la purification de la prodrogue finale puisqu'une filtration sur une couche de célite est suffisante pour éliminer le catalyseur.

Ainsi, nous avons tout d'abord inséré le motif *cycloSal* sur le 3-méthyl-3-buten-1-ol **242** commercial par couplage avec le *cycloSal* phosphochloridate **179a** dans les conditions classiques (Schéma 57). Sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel, nous pouvons noter un signal largement majoritaire à -9,6 ppm qui pourrait appartenir à la prodrogue **250**. Après purification, deux fractions sont obtenues. La première fraction contient un mélange de deux produits avec des  $R_F$  de 0,36 et 0,28. Sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P, la présence de cinq pics dont un majoritaire à -9,6 ppm indique que nous avons isolé le produit désiré avec d'autres impuretés. Dans la seconde fraction, seul le composé de  $R_F = 0,28$  est présent et un unique pic à -9,6 ppm est observé en RMN-<sup>31</sup>P. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H confirme la formation de la prodrogue avec notamment la présence des protons benzyliques caractéristiques du *cycloSal* et des deux protons éthyléniques.

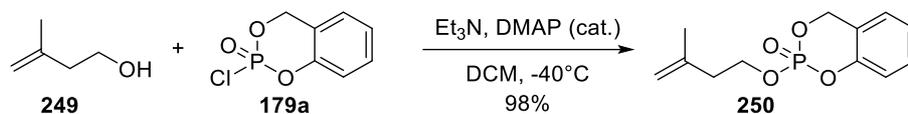


Schéma 57. Synthèse de la prodrogue *cycloSal* **250** de l'IPP monophosphate.

L'isomérisation de la double liaison est ensuite réalisée dans le méthanol en présence de  $\text{PdCl}_2$  (Schéma 58). Après 40h, nous avons observé l'apparition d'un composé moins polaire que le substrat sur la CCM, cependant ce dernier a été très peu consommé. Après traitement, la RMN-<sup>31</sup>P du brut montre un signal très largement majoritaire à -9,6 ppm correspondant au substrat, accompagné d'un signal minoritaire à -9,8 ppm qui pourrait indiquer la formation du produit désiré dans un ratio substrat/produit de 99/1. Sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H, nous retrouvons

tous les signaux du substrat. Toutefois, l'absence de signal correspondant au proton éthylénique de la prodrogue **243** indique que nous ne l'avons finalement pas formée.

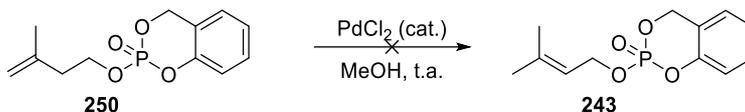


Schéma 58. Tentative d'isomérisation de la prodrogue **250** pour former la prodrogue *cycloSal* **243** du DMAPP monophosphate.

Au vu de ces résultats, il est clair que la double liaison joue un rôle majeur dans l'instabilité des prodrogues *cycloSal* envisagées. Toutefois, la présence d'un groupement hydroxyle protégé par un éther silylé en position C4 permet de former la prodrogue désirée. De plus, nous avons vu que la substitution de la TEA par de l'Ag<sub>2</sub>O lors de la réaction de couplage a permis l'obtention de la prodrogue du AMBP, précurseur d'un des inhibiteurs d'IspH (cf Chapitre 1, partie 2, II. A.). Ainsi, il serait intéressant de réaliser l'étape de couplage avec les alcools **234** et **240** portant respectivement un TBDMS et un TIPS dans ces conditions.

### B. Synthèse de la double prodrogue **233a** du HMBP avec un *p*-nitrobenzyle

Nous avons considéré la synthèse de la double prodrogue **233a** où l'hydroxyle en position C4 est protégé par un groupement *p*-nitrobenzyle. L'insertion de ce groupement protecteur pourrait se faire soit sur l'hydroxyacétone **202** commerciale, soit sur l'ester **201** formé à l'issue de la réaction de Wittig avec l'hydroxyacétone (Schéma 59). Dans les deux cas, une réaction de substitution nucléophile de l'hydroxyle sur le chlorure de 4-nitrobenzyle commercial en présence d'une base devrait permettre d'obtenir l'alcool protégé désiré.

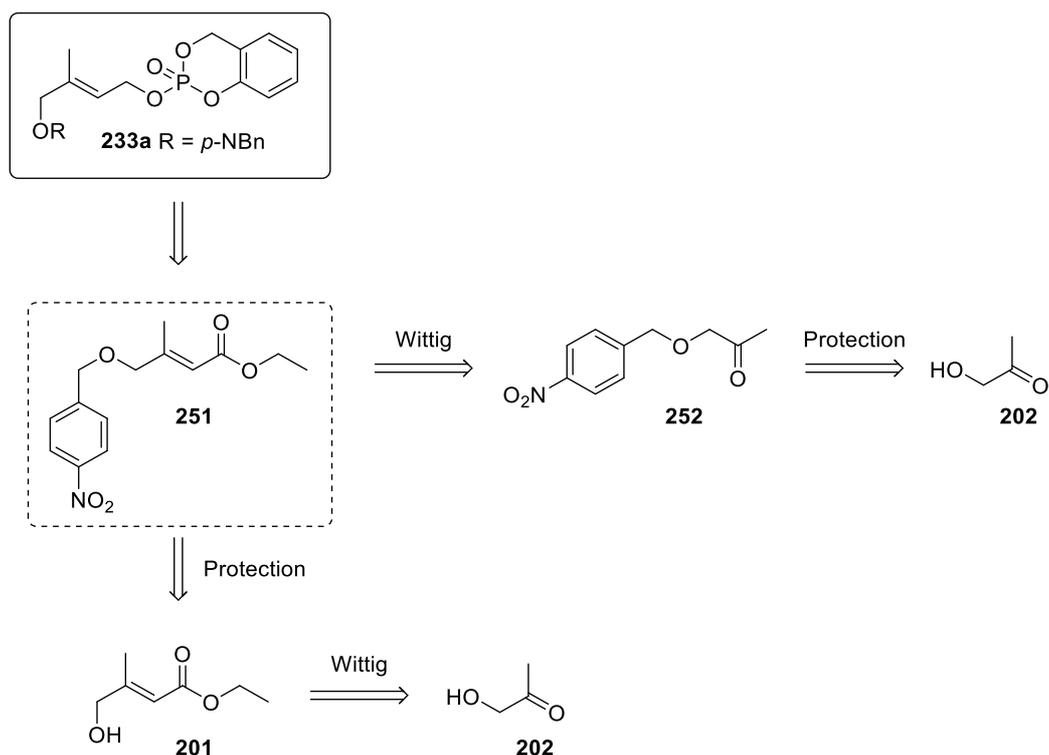


Schéma 59. Stratégie de synthèse de l'ester **251** protégé par un groupement *p*-nitrobenzyle pour la synthèse de la double prodrogue **233a**.

L'introduction du *p*-nitrobenzyle est d'abord réalisée sur l'hydroxyacétone **202** commerciale à partir du chlorure de 4-nitrobenzyle **253** commercial en présence de TEA (Schéma 60). Après deux jours à température ambiante, aucun produit ne s'est formé. Afin d'obtenir un meilleur nucléofuge, cette réaction est réalisée en présence d'iodure de sodium en quantité stœchiométrique. De la même manière que précédemment, aucun produit ne s'est formé, même après deux jours. Il se pourrait que la substitution du chlore par l'iode ne se fasse pas ou que l'hydroxyle ne soit pas assez nucléophile pour réaliser la réaction de substitution.

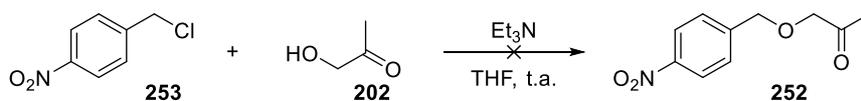


Schéma 60. Tentative d'introduction du groupement *p*-nitrobenzyle sur l'hydroxyacétone **202** commerciale.

Ainsi, nous avons envisagé l'introduction du *p*-nitrobenzyle sur l'ester **201** issu de la réaction de Wittig. Après la formation de l'alcoolate dans les conditions classiques, ce dernier devrait réagir sur le chlorure de 4-nitrobenzyle **253** commercial selon une réaction de substitution nucléophile (Schéma 61). Sur la RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel, nous observons entre autres les protons du groupement *p*-nitrobenzyle, (un singulet à 4,64 ppm correspondant aux deux protons benzyliques), ainsi que les protons de l'ester conjugué de départ (un proton éthylénique à 5,98 ppm). Ainsi, ces conditions n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré. Nous avons alors réalisé la réaction avec le bromure de 4-nitrobenzyle commercial **254**. Toutefois, nous observons des produits de décompositions et, ici encore, le produit désiré ne s'est pas formé.

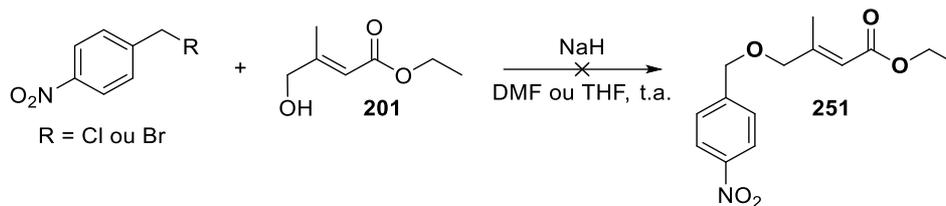


Schéma 61. Tentatives d'introduction du groupement *p*-nitrobenzyle sur l'ester **201** issu de la réaction de Wittig.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une décomposition du réactif halogéné, comme l'ont observé Fukase *et al* lorsqu'ils ont réalisé la protection de divers alcools par du bromure de 4-nitrobenzyle en présence d'une base forte telle que du NaH ou de l'hydroxyde de sodium<sup>23</sup>. Ils ont alors développé une nouvelle méthode pour l'insertion de ce groupement et ont obtenu les alcools protégés en présence d'Ag<sub>2</sub>O dans le DCM, le benzène ou le cyclohexane<sup>23</sup>. Nous avons choisi de réaliser la réaction dans le solvant le moins toxique parmi les trois précédents, à savoir le DCM, en suivant la méthode décrite par Chuang *et al*<sup>24</sup> (Schéma 62). Sur la CCM de suivi de réaction, nous observons l'apparition d'une nouvelle tâche moins polaire que l'ester **201** qui pourrait correspondre au produit désiré. Après purification, l'analyse de la RMN-<sup>1</sup>H montre la présence des signaux correspondant au *p*-nitrobenzyle avec le singulet des protons benzyliques à 4,63 ppm, mais également le signal d'un proton éthylénique à 6,00 ppm, deux CH<sub>2</sub> à 4,18 et 4,05 ppm et deux CH<sub>3</sub> à 2,13 et 1,29 ppm qui correspondent aux protons issus du squelette de l'ester **201**. Une analyse RMN-<sup>13</sup>C a permis de confirmer la structure du produit obtenu puisque nous observons trois carbones de CH<sub>2</sub> à 59,9, 71,3 et 74,7 ppm correspondant au CH<sub>2</sub> de l'ester et aux deux CH<sub>2</sub> en α de l'hydroxyle respectivement. Ainsi, le produit **251** a été obtenu avec un rendement de 63 % dans ces conditions. L'ester est ensuite réduit en présence de DIBAL-H permettant d'obtenir l'alcool **235** avec un rendement de 61%.

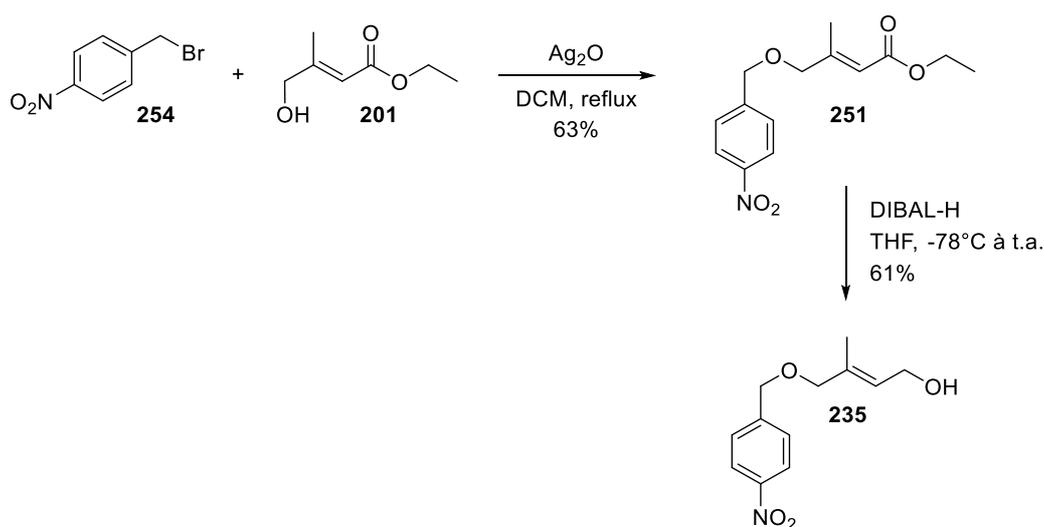


Schéma 62. Synthèse de l'ester **251** protégé par un groupement *p*-nitrobenzyle et de l'alcool **235** correspondant.

L'alcool **235** est alors engagé dans l'étape de couplage en utilisant la méthode « classique » en présence de TEA (1,1 eq.) et DMAP (0,5 eq.) dans le DCM (Schéma 63).

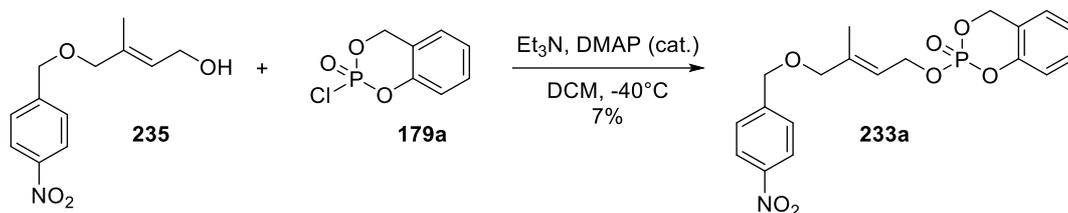


Schéma 63. Réaction de couplage entre l'alcool **235** protégé par un groupement *p*-nitrobenzyle et le *cycloSal* phosphochloridate **179a** pour synthétiser la prodrogue **233a**.

La RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel montre la présence d'un signal à -9,2 ppm correspondant à la prodrogue **233a** désirée, accompagné d'un signal majoritaire à -6,0 ppm. Afin d'éviter la dégradation de la prodrogue lors du traitement réactionnel (cf Chapitre 1, partie 2, B.), le mélange est simplement évaporé. Après purification, deux fractions sont obtenues. Le composé de la fraction la moins polaire ( $R_F = 0,91$  dans DCM/AcOEt 95/5) ne contient pas d'atome de phosphore et sa RMN-<sup>1</sup>H indique la présence de signaux similaires au substrat qui pourraient correspondre à son analogue chloré. Comme précédemment, nous observons sur le spectre RMN-<sup>13</sup>C la présence d'un CH<sub>2</sub> à 39,9 ppm qui confirme la formation de ce composé **255** chloré. Ce dernier correspond au produit majoritaire et a été isolé avec un rendement de 59 % (Figure 68).

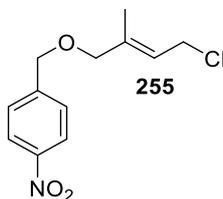


Figure 68. Structure du sous-produit chloré **255** isolé lors de la purification de la prodrogue **233a**.

La RMN-<sup>31</sup>P de la seconde fraction montre un signal majoritaire à -9,2 ppm qui pourrait appartenir à la prodrogue **233a**. En RMN-<sup>1</sup>H, nous observons des signaux qui pourraient correspondre aux protons de la prodrogue : les protons aromatiques du *p*-nitrobenzyle et du *cycloSal*, les protons benzyliques du *p*-nitrobenzyle à 4,57 ppm, un proton aromatique à 5,72 ppm, le CH<sub>2</sub> en α de l'oxygène qui porte le *p*-nitrobenzyle à 3,97 ppm et le CH<sub>3</sub> à 1,74 ppm. Nous observons également la présence des protons benzyliques du *cycloSal* à 5,32 et 5,37 ppm sous la forme de deux singulets larges. Enfin, nous pouvons noter le multiplet à 4,78 ppm des protons du CH<sub>2</sub> en α de l'oxygène qui couplent avec le phosphore. Une analyse RMN-<sup>13</sup>C nous a permis de confirmer que nous avons bien isolé la prodrogue **233a**. Toutefois, la très faible quantité obtenue avec cette méthode (11 mg) n'est pas suffisante pour, d'une part, réaliser des tests de déprotection en milieu réducteur, notamment en présence d'une nitroréductase, et, d'autre part, évaluer la capacité de la prodrogue **233a** à stimuler les cellules

T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ainsi, il serait intéressant d'essayer de synthétiser davantage de cette prodrogue en utilisant Ag<sub>2</sub>O à la place de la TEA.

### III. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse de prodrogues *cycloSal* du HMBP, précurseur monophosphate du dernier intermédiaire de la voie du MEP.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'insertion du motif *cycloSal* sur l'alcool **234** portant un éther silylé TBDMS. L'acidité du milieu réactionnel induit la déprotection de cet éther lors du traitement, ce qui conduit à la formation de la prodrogue finale **232a** déprotégée et de son régioisomère où le *cycloSal* a été introduit sur l'autre hydroxyle. La combinaison de l'utilisation d'un TIPS, groupement protecteur plus robuste, et de conditions réactionnelles neutres a permis la formation de la prodrogue comportant l'éther silylé. Cependant, cette dernière s'est dégradée durant la purification. En effet, de la même manière que pour les inhibiteurs amino d'IspH (cf Chapitre 1, partie 2, II. A.), la présence de la double liaison en position allylique favorise l'élimination du phosphate en milieu acide. Nous avons alors étudié une autre approche consistant à synthétiser par la méthode classique une prodrogue *cycloSal* où la double liaison est en position homoallylique par rapport au phosphate et à isomériser cette dernière pour former l'alcène le plus substitué. Cette méthode ne permet pas d'obtenir la prodrogue *cycloSal* du DMAPP monophosphate, mais elle nous a permis d'isoler celle de l'IPP monophosphate. L'IPP étant lui aussi un PAg, nous pourrions synthétiser d'autres prodrogues *cycloSal* de l'IPP monophosphate avec les différents *cycloSal* phosphochloridates **179b-d** et évaluer leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Dans un second temps, nous avons réalisé la synthèse de la double prodrogue **233a** où la fonction alcool est protégée par un *p*-nitrobenzyle. La protection de l'hydroxyle par cet éther benzylique n'a pas été possible avec les conditions classiques, mais l'alcool protégé a pu être synthétisé en présence d'Ag<sub>2</sub>O. Après la réduction de l'ester, une faible quantité de la prodrogue **233a** désirée a été obtenue par la méthode classique de couplage en présence de TEA et de DMAP.

Afin de pallier les difficultés évoquées précédemment et obtenir les prodrogues finales en quantité suffisante, l'étape de couplage avec les alcools portant un éther silylé (TBDMS et TIPS) ou un *p*-nitrobenzyle pourrait être réalisée avec Ag<sub>2</sub>O sans traitement du milieu réactionnel. Ainsi, nous pourrions réaliser la déprotection des éthers silylés d'une part, et des tests de déprotection du *p*-nitrobenzyle en milieu réducteur d'autre part. Par la suite, nous pourrions synthétiser les prodrogues **233b-d** avec les différents dérivés substitués du saligénol et étudier l'influence de cette substitution sur la cinétique de libération des dérivés de PAg correspondant. Enfin, avec cette série de prodrogues en main, nous pourrions envisager l'évaluation de leur capacité à stimuler les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avec un laboratoire partenaire.

## Références

- (1) Hsiao, C.-H. C.; Lin, X.; Barney, R. J.; Shippy, R. R.; Li, J.; Vinogradova, O.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 945–954. doi:10.1016/j.chembiol.2014.06.006.
- (2) Shippy, R. R.; Lin, X.; Agabiti, S. S.; Li, J.; Zangari, B. M.; Foust, B. J.; Poe, M. M.; Hsiao, C.-H. C.; Vinogradova, O.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2373–2382. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00965.
- (3) Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3902–3909. doi:10.1021/jm00049a009.
- (4) Arimilli, M.; Kim, C.; Dougherty, J.; Mulato, A.; Oliyai, R.; Shaw, J.; Cundy, K.; Bischofberger, N. *Antivir. Chem. Chemother.* **1997**, *8*, 557–564. doi:10.1177/095632029700800610.
- (5) Lentini, N. A.; Foust, B. J.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8658–8669. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00655.
- (6) Foust, B. J.; Li, J.; Hsiao, C. C.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 1597–1603. doi:10.1002/cmdc.201900344.
- (7) Foust, B. J.; Poe, M. M.; Lentini, N. A.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 914–918. doi:10.1021/acsmedchemlett.7b00245.
- (8) Davey, M. S.; Malde, R.; Mykura, R. C.; Baker, A. T.; Taher, T. E.; Le Duff, C. S.; Willcox, B. E.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2111–2117. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01824.
- (9) Nieschalk, J.; Batsanov, A. S.; O’Hagan, D.; Howard, J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 165–176. doi:10.1016/0040-4020(95)00890-K.
- (10) Kadri, H.; Taher, T. E.; Xu, Q.; Sharif, M.; Ashby, E.; Bryan, R. T.; Willcox, B. E.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11258–11270. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01232.
- (11) Lentini, N. A.; Schroeder, C. M.; Harmon, N. M.; Huang, X.; Schladetsch, M. A.; Foust, B. J.; Poe, M. M.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 136–142. doi:10.1021/acsmedchemlett.0c00586.
- (12) Harmon, N. M.; Poe, M. M.; Huang, X.; Singh, R.; Foust, B. J.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, D. F.; Wiemer, A. J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 164–170. doi:10.1021/acsmedchemlett.1c00408.
- (13) Harmon, N. M.; Huang, X.; Schladetsch, M. A.; Hsiao, C.-H. C.; Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115666. doi:10.1016/j.bmc.2020.115666.
- (14) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W.; Greene, T. W. Fifth edition.; Wiley: Hoboken, New Jersey, 2014.
- (15) Xu, K.; Wang, F.; Pan, X.; Liu, R.; Ma, J.; Kong, F.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2554. doi:10.1039/c3cc38980d.
- (16) Wang, S.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zhang, D.; Xie, B.; Pan, Z.; Ouyang, K.; Peng, T. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 3469–3478. doi:10.1039/D1OB00356A.
- (17) Sharma, A.; Arambula, J. F.; Koo, S.; Kumar, R.; Singh, H.; Sessler, J. L.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 771–813. doi:10.1039/C8CS00304A.
- (18) Zhang, Z.-Q.; Zhang, B.; Lu, X.; Liu, J.-H.; Lu, X.-Y.; Xiao, B.; Fu, Y. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 952–955. doi:10.1021/acs.orglett.5b03692.
- (19) Spoehrle, S. S. M.; West, T. H.; Taylor, J. E.; Slawin, A. M. Z.; Smith, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11895–11902. doi:10.1021/jacs.7b05619.
- (20) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417–1427. doi:10.1021/jm970664s.
- (21) Xu, Q.; Taher, T. E.; Ashby, E.; Sharif, M.; Willcox, B. E.; Mehellou, Y. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 2375–2380. doi:10.1002/cmdc.202100198.

- (22) Jing, X.; Gu, W.; Bie, P.; Ren, X.; Pan, X. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 861–867. doi:10.1081/SCC-100103321.
- (23) Fukase, K.; Tanaka, H.; Toriib, S.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 389–392. doi:10.1016/S0040-4039(00)94562-3.
- (24) Chuang, C.; Vassar, V. C.; Ma, Z.; Geney, R.; Ojima, I. *Chirality* **2002**, *14*, 151–162. doi:10.1002/chir.10050.



**CHAPITRE 3 :**  
**VERS LA SYNTHÈSE DE PRODRUGUES**  
**MULTIMODALES**

|      |   |     |
|------|---|-----|
| I.   | Introduction .....  | 159 |
| A.   | Les co-drogues ou <i>mutual prodrugs</i> : définition de la stratégie et avantages .....  | 159 |
| B.   | Exemples d'application des co-drogues.....  | 161 |
| C.   | Limites et inconvénients de la stratégie co-drogue.....   | 162 |
| II.  | La stratégie de prodrogue multimodale .....   | 163 |
| III. | Synthèse d'une prodrogue <i>cycloSal</i> fonctionnalisée par un acide aminé avec un inhibiteur de la DXR ou d'IspH.....           | 164 |
| A.   | Stratégie de synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>261</b> , <b>262</b> et <b>263</b> .....                                  | 165 |
| 1.   | Rétrosynthèse de la prodrogue <b>261</b> de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR .  | 165 |
| 2.   | Rétrosynthèse des prodrogues <b>262</b> et <b>263</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH..... | 166 |
| B.   | Synthèse du <i>cycloSal</i> phosphochloridate <b>267</b> .....  | 166 |
| C.   | Synthèse des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>261</b> , <b>262</b> et <b>263</b> .....   | 167 |
| 1.   | Synthèse de la prodrogue <b>261</b> de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR.....  | 167 |
| 2.   | Synthèse des prodrogues <b>262</b> et <b>263</b> des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH.....      | 168 |
| IV.  | Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues <i>cycloSal</i> <b>271</b> et <b>262</b> .....                            | 169 |
| A.   | Evaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....                                       | 169 |
| B.   | Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide .....  | 170 |
| V.   | Conclusion.....   | 171 |
|      | Références .....  | 173 |

## I. Introduction

La découverte de la voie du MEP, une voie alternative pour la biosynthèse des isoprénoïdes utilisée par la majorité des bactéries pathogènes mais absente chez l'homme, a permis d'envisager la conception d'antibactériens originaux aux effets secondaires minimes. Mais, de façon paradoxale, cette voie de biosynthèse possède un second rôle d'intérêt majeur puisque son dernier intermédiaire, le HMBPP **22**, est un PAg capable de stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, cellules effectrices capables de lyser les cellules tumorales et réduire la charge bactérienne. Par ailleurs, les bactéries intracellulaires présentes au sein des tumeurs malignes peuvent métaboliser et transformer les anticancéreux administrés lors des chimiothérapies ou favoriser l'apparition de mécanismes de résistance à ces derniers. Ainsi, développer des thérapies ciblant ces bactéries endotumorales pourrait améliorer l'efficacité des chimiothérapies actuelles (cf Introduction générale).

Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons d'utiliser cette dualité de fonction de la voie du MEP afin (i) d'inhiber la croissance des bactéries endotumorales et (ii) stimuler le système immunitaire. A cet effet, il est envisagé de lier un inhibiteur de la voie du MEP et un PAg sur une même molécule et les délivrer sélectivement au sein des tumeurs. Cette association pourrait être réalisée grâce à l'approche co-droque (ou *mutual prodrug*), une molécule unique qui permet de libérer simultanément deux molécules actives *in vivo*.

### A. Les co-drogues ou *mutual prodrugs* : définition de la stratégie et avantages

Nous avons vu précédemment que l'approche prodrogue permet d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques d'un composé biologiquement actif, permettant notamment d'améliorer sa perméabilité aux membranes cellulaires. Parmi les différents types de prodrogues existants, on distingue deux familles, les bioprécurseurs et les prodrogues dites transporteuses. Ces dernières peuvent elles-mêmes être subdivisées en plusieurs sous-catégories, dont les co-drogues font partie (cf Introduction générale, IV. A. 1.).

Les co-drogues désignent l'association d'au moins deux composés bioactifs pour former une molécule unique. Ils sont liés de manière covalente soit directement ensemble, jouant ainsi le rôle de transporteur pour l'autre, soit *via* un espaceur hydrolysable, le plus souvent une fonction ester, amide ou carbamate<sup>1,2</sup>. La molécule résultante peut être inactive, comme c'est le cas des prodrogues en général, ou posséder une activité biologique propre. Une fois la barrière biologique passée, les composés actifs sont libérés *in vivo* soit par hydrolyse chimique, soit par l'action d'enzymes telles que des estérases ou des amidases (Figure 69). En général, les deux molécules actives libérées ont un mode d'action similaire (deux anticancéreux par exemple) ce qui permet un effet synergique. Il se peut également que le deuxième composé possède un effet

biologique différent qui soit complémentaire de celui du premier, afin d'éviter sa dégradation par exemple ou pour permettre sa libération dans un tissu spécifique<sup>3</sup>.

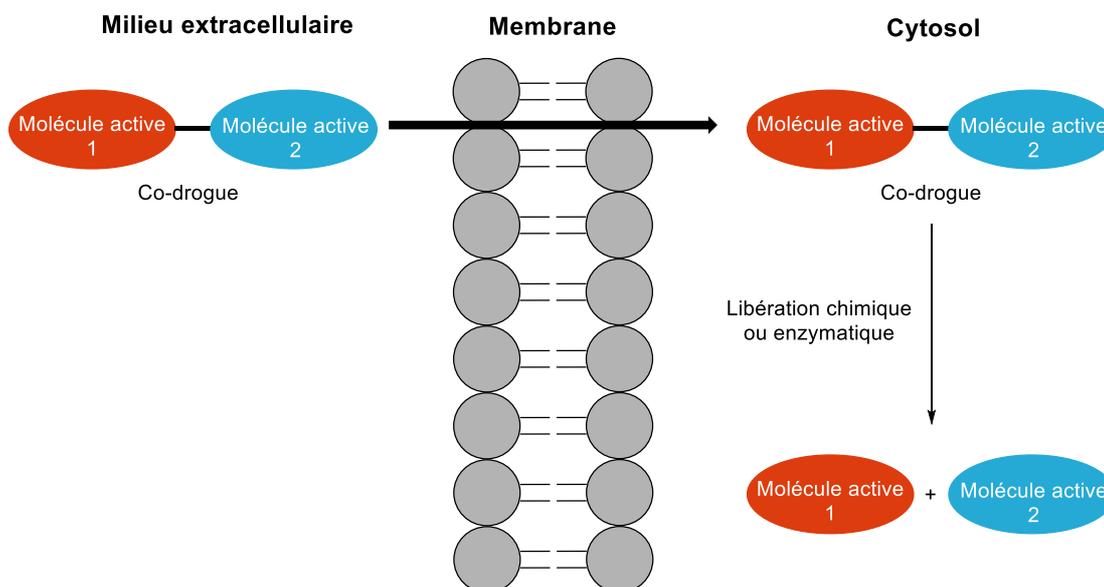


Figure 69. Principe général de l'approche co-droque.

Cette stratégie co-droque peut être envisagée lorsqu'une monothérapie n'est pas suffisamment efficace et qu'il est nécessaire d'administrer deux composés actifs simultanément. En effet, les composés administrés séparément possèdent des propriétés pharmacocinétiques et des biodisponibilités différentes. Ainsi, ils risquent de ne pas atteindre le tissu cible en même temps, voire ne pas l'atteindre du tout. Un des composés peut également être dégradé en partie, ce qui limite l'effet synergique de cette approche combinatoire lorsqu'un ratio 1/1 est nécessaire. L'association des deux composés actifs sous forme de co-droque assure ainsi leur libération concomitante au sein du même tissu avec une molécule unique qui possède sa propre biodisponibilité. L'approche co-droque possède également divers avantages<sup>3,4</sup> et permet notamment :

- ◆ d'augmenter la lipophilie des composés actifs et ainsi améliorer leur perméabilité cellulaire.
- ◆ d'augmenter la stabilité des composés actifs en masquant les fonctions susceptibles d'être dégradées *in vivo*. Toutefois, la co-droque doit être suffisamment stable pour pouvoir atteindre le tissu cible, mais elle doit également pouvoir libérer les deux molécules d'intérêt dans le tissu désiré.
- ◆ de diminuer la toxicité des composés actifs puisque si un effet synergique est attendu, la co-droque sera administrée avec des doses plus faibles que les composés parents afin d'éviter des effets secondaires importants.
- ◆ d'observer un effet synergique par la libération simultanée des deux composés actifs avec un ratio 1/1.

## B. Exemples d'application des co-drogues

La stratégie de co-drogue a été appliquée dans divers domaines tels que les maladies gastro-intestinales, neurodégénératives, cardiovasculaires, les antibactériens ou encore les agents anticancéreux<sup>1,3</sup>. Ce sont ces deux derniers domaines d'applications qui nous intéressent tout particulièrement dans le cadre de ce projet. Dans ces deux cas, l'approche co-drogue permet de limiter l'apparition de phénomènes de résistance.

Dans le cas de la résistance aux antibactériens, plusieurs approches sont utilisées pour lutter contre l'apparition de tels phénomènes : (i) le développement de nouveaux antibactériens, (ii) des thérapies combinant plusieurs antibactériens et (iii) la modification chimique des agents existants sur le marché, c'est-à-dire la conception d'analogues, de prodrogues ou bien de co-drogues<sup>1</sup>. Un exemple de co-drogue combinant deux antituberculeux, l'isoniazide **149** et l'acide *p*-aminosalicylique (PAS) **256**, est décrit par Rawat *et al* (composé **257**, Figure 70). En effet, ces deux composés sont inactivés par *N*-acétylation dans le foie ou l'intestin grêle. De plus, le PAS peut être inactivé par condensation de la glycine au niveau de son acide carboxylique et il possède également une toxicité non négligeable puisque son acidité induit des irritations gastro-intestinales. Afin de pallier la forte dégradation *in vivo* de ces deux antituberculeux et diminuer la toxicité du PAS, ces deux composés ont été liés entre eux par une fonction amide entre l'amine de l'isoniazide et l'acide carboxylique du PAS (Figure 70). Cette liaison permet d'une part d'empêcher la *N*-acétylation de l'isoniazide, et, d'autre part, de masquer l'acidité du PAS. La libération des deux antituberculeux pourrait ainsi se faire grâce à une amidase. Des études d'hydrolyse *in vitro* de cette co-drogue et de son administration *in vivo* chez des rats ont montré que cette stratégie permet effectivement d'éviter le catabolisme des deux antituberculeux et d'augmenter leur concentration dans le plasma<sup>5</sup>.

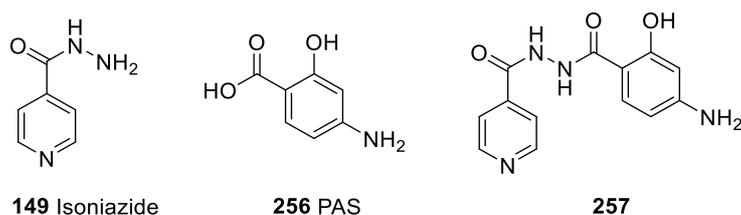


Figure 70. Structures de l'isoniazide **149**, de l'acide *p*-aminosalicylique (PAS) **256** et de leur co-drogue **257**.

Concernant les traitements anticancéreux, l'approche co-drogue permet de délivrer deux agents cytotoxiques au sein de la tumeur, ce qui contribue à diminuer l'apparition d'une résistance à chacun des composés. En effet, les cellules cancéreuses font face aux deux anticancéreux en même temps, ce qui augmente la cytotoxicité globale de la co-drogue par rapport à celle des composés parents administrés seuls ou en thérapie combinée. Ainsi, l'apparition d'une double résistance est peu probable<sup>4</sup>. Le fuplatine **260** est un exemple de co-drogue qui combine le 5-fluorouracile (5-FU) **258**, un des agents anticancéreux les plus utilisés en chimiothérapie, et l'oxaliplatine **259**, un agent alkylant à base de platine (Figure 71). Ces

deux anticancéreux sont déjà administrés en thérapie combinée chez des patients atteints du cancer colorectal et présentant des métastases. Cependant, le 5-FU est inactivé par conversion en dihydrofluorouracile dans le foie et présente une cytotoxicité non spécifique des cellules cancéreuses. En outre, ces dernières peuvent posséder une résistance innée ou développer une résistance acquise à l'oxaliplatine<sup>2</sup>. Zhang *et al* ont alors conçu le fuplatine **260**, dans lequel un des oxygènes coordonné au platine de l'oxaliplatine est relié par un espaceur succinyle à un dérivé du 5-FU. Le second oxygène coordonné au métal porte une chaîne hydrophobe afin de faciliter la pénétration cellulaire du fuplatine **260**. Les deux anticancéreux sont ainsi reliés par des fonctions ester qui pourront être hydrolysées par des estérases. Les résultats de l'étude montrent que la co-drogue possède une meilleure efficacité que les anticancéreux administrés en monothérapie ou en thérapie combinée, avec l'observation d'un effet synergique. En outre, le fuplatine **260** possède une meilleure sélectivité pour les cellules cancéreuses. Ainsi, l'approche co-drogue serait une stratégie prometteuse pour réduire la toxicité des agents anticancéreux déjà existants<sup>6</sup>.

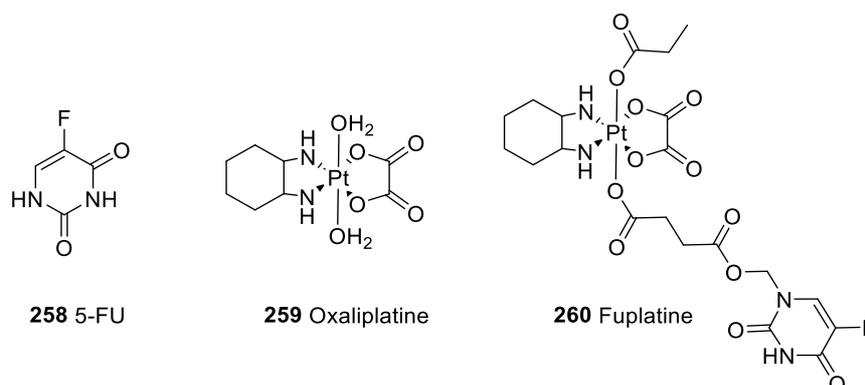


Figure 71. Structures du 5-fluorouracile (5-FU) **258**, de l'oxaliplatine **259** et de leur co-drogue, le fuplatine **260**.

### C. Limites et inconvénients de la stratégie co-drogue

Toutefois, la stratégie co-drogue présente certains inconvénients. Tout d'abord, cette approche étant basée sur l'association de deux molécules existantes, il est nécessaire d'étudier la compatibilité des fonctions chimiques présentes afin de pouvoir les lier entre elles en une nouvelle fonction facilement hydrolysable<sup>1,2</sup>. Ensuite, si les deux molécules bioactives ne sont pas directement liées entre elles, le choix de l'espaceur est essentiel. Il ne doit pas être toxique, ni antigénique ou immunogénique, être chimiquement stable et ne pas s'accumuler dans les tissus après libération des molécules d'intérêt<sup>2,3</sup>. De plus, l'association d'au moins deux composés actifs résulte en une molécule de poids moléculaire élevé qui risque de ne pas respecter les règles de Lipinski. Enfin, lors de la libération des deux molécules parentes au sein du même tissu, leurs effets secondaires risquent de s'additionner. Ainsi, il est nécessaire d'effectuer des tests de cytotoxicité préalables<sup>1</sup>.

## II. La stratégie de prodrogue multimodale

L'objectif de ce projet étant d'associer un inhibiteur (de la DXR ou d'IspH) et un PAg, nous pourrions utiliser cette stratégie co-drogue pour lier ces deux types de molécules. Toutefois nous devons légèrement adapter cette stratégie. En effet, les inhibiteurs de la DXR ou les analogues monophosphates des inhibiteurs d'IspH et les PAg possèdent tous soit un phosphonate, soit un phosphate très polaire et chargé à pH physiologique qui bloque la pénétration de ces composés dans la cellule. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser un groupe masquant afin d'augmenter leur biodisponibilité. Pour ce faire, nous proposons alors d'utiliser une prodrogue *cycloSal* fonctionnalisée qui permettra (i) de masquer les charges du phosphonate/phosphate d'un des deux composés et (ii) de s'affranchir d'une libération exclusivement enzymatique des composés actifs. Il sera également essentiel de masquer les charges du phosphonate/phosphate du second composé greffé sur la chaîne fonctionnalisée à l'aide d'un autre groupe masquant (prodrogue bis(POM), *cycloSal*, etc.).

Ainsi, en se basant sur le concept de la stratégie co-drogue, nous avons développé une approche de prodrogues multimodales similaire qui s'appuie notamment sur les deux paramètres suivants :

- ◆ Les deux composés actifs associés possèdent des activités biologiques et des modes d'action distincts (un inhibiteur d'enzyme de la voie du MEP et un PAg), d'où le terme « multimodal ».
- ◆ Une prodrogue *cycloSal* fonctionnalisée fait office d'espaceur. Afin de relier l'inhibiteur et le PAg, nous avons choisi le squelette de la tyrosine. Ainsi, le monophosphate d'un des composés pourrait être masqué par la partie *cycloSal*, tandis le second composé pourrait être greffé *via* une fonction ester ou amide sur la partie de l'acide aminé (Figure 72).



Figure 72. Structures des prodrogues multimodales envisagées.

Afin de pouvoir valider le concept de cette approche de prodrogues multimodales, trois grandes étapes sont envisagées. Dans un premier temps, il s'agira de vérifier que ce type de prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé délivre efficacement un unique composé actif, inhibiteur ou PAg. Pour cela, des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées, soit avec un inhibiteur (DXR et/ou IspH), soit avec un PAg (HMBP) seront préparées et leur activité biologique (antibactérienne ou immunostimulante) sera évaluée. Afin d'améliorer la pénétration cellulaire de ces prodrogues, l'acide carboxylique sera protégé par un ester de méthyle et l'amine par un Boc (Figure 73).



Figure 73. Structures des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées avec soit un inhibiteur (de la DXR ou d’IspH) soit un PAg.

Dans un deuxième temps, il sera nécessaire de vérifier qu’il y a bien libération des deux composés liés à la prodrogue soit par le *cycloSal*, soit par une liaison ester. Pour ce faire, des prodrogues transportant deux fois la même molécule active (soit deux inhibiteurs de la DXR, soit deux inhibiteurs d’IspH, soit deux PAg) pourront être synthétisées (Figure 74). Des tests d’hydrolyse et l’évaluation de leurs activités biologiques pourront permettre de vérifier que lors de la libération des deux composés d’intérêt, nous avons bien un ratio composé actif (inhibiteur ou PAg) *versus* groupe masquant de 2/1 avec l’observation d’un effet synergique.



Figure 74. Structures des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées portant deux inhibiteurs ou deux PAg.

Enfin, dans un troisième temps, nous pourrions considérer la synthèse et l’évaluation biologique (antibactérienne et immunostimulante) des prodrogues multimodales finales portant à la fois un inhibiteur et un immunostimulant.

### III. Synthèse d’une prodrogue *cycloSal* fonctionnalisée par un acide aminé avec un inhibiteur de la DXR ou d’IspH

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé soit avec un inhibiteur phosphate de la DXR (composé **261**), soit avec les précurseurs monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d’IspH (composés **262** et **263** respectivement) (Figure 75). Afin de pouvoir s’assurer que ces prodrogues entreront bien dans la cellule, l’acide carboxylique pourra être protégé par un ester de méthyle et l’amine par un Boc.

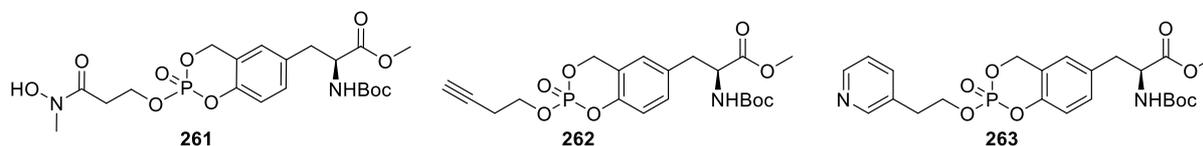


Figure 75. Structures des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé avec un inhibiteur phosphate de la DXR (composé **261**) ou les précurseurs monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d’IspH (composés **262** et **263**).

Dans le cas de la DXR, nous avons choisi de préparer la prodrogue de l’inhibiteur **104**, analogue phosphonohydroxamique de la fosmidomycine (Figure 76). En effet, ce composé inhibe les DXR d’*E. coli* et de *M. smegmatis* avec une efficacité similaire à celle des inhibiteurs

naturels, la fosmidomycine et le FR-900098 (cf Chapitre 1, partie 1, I. B.). En revanche, il est moins efficace que les inhibiteurs naturels pour inhiber la croissance d'*E. coli*. C'est pourquoi des prodrogues *cycloSal* de cet inhibiteur ont précédemment été préparées au laboratoire et des tests d'inhibition de croissance ont été réalisés. Bien que la prodrogue **264** ne présente aucune activité sur *E. coli*, elle inhibe la croissance de *M. smegmatis*. De plus, les prodrogues **265** où l'acide hydroxamique est protégé par un groupement diméthoxybenzyle (DMB) se sont elles aussi montrées efficaces sur une souche de *M. smegmatis*<sup>7</sup>.

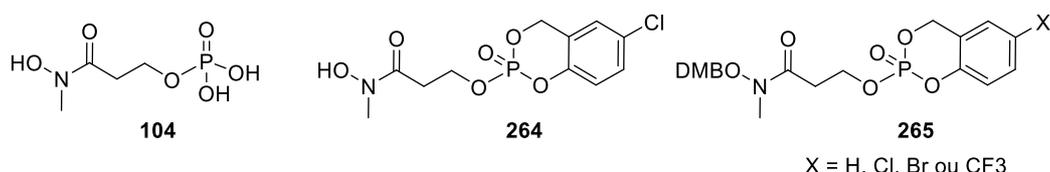


Figure 76. Structures de l'inhibiteur phosphonohydroxamique **104**, de sa prodrogue *cycloSal* **264** et de ses prodrogues *cycloSal* **265** protégées par un DMB.

Ainsi, nous avons choisi de synthétiser la prodrogue **261** de l'inhibiteur **104** où le *cycloSal* est substitué par un acide aminé afin de pouvoir comparer son activité antibactérienne avec celle des prodrogues qui ont déjà été testées au laboratoire.

## A. Stratégie de synthèse des prodrogues *cycloSal* **261**, **262** et **263**

### 1. Rétrosynthèse de la prodrogue **261** de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR

L'étape clé pour l'obtention de la prodrogue **261** est le couplage entre le *cycloSal* phosphochloridate **267** et l'acide hydroxamique **266** protégé par un DMB précédemment préparé au laboratoire (Schéma 64). Une dernière étape de déprotection du groupement DMB de l'acide hydroxamique sera nécessaire afin d'accéder à la prodrogue finale. Le *cycloSal* phosphochloridate **267**, quant à lui, pourrait être obtenu par une hydroxyméthylation de la tyrosine protégée **268** commerciale, suivie d'une phosphorylation en présence de POCl<sub>3</sub>.

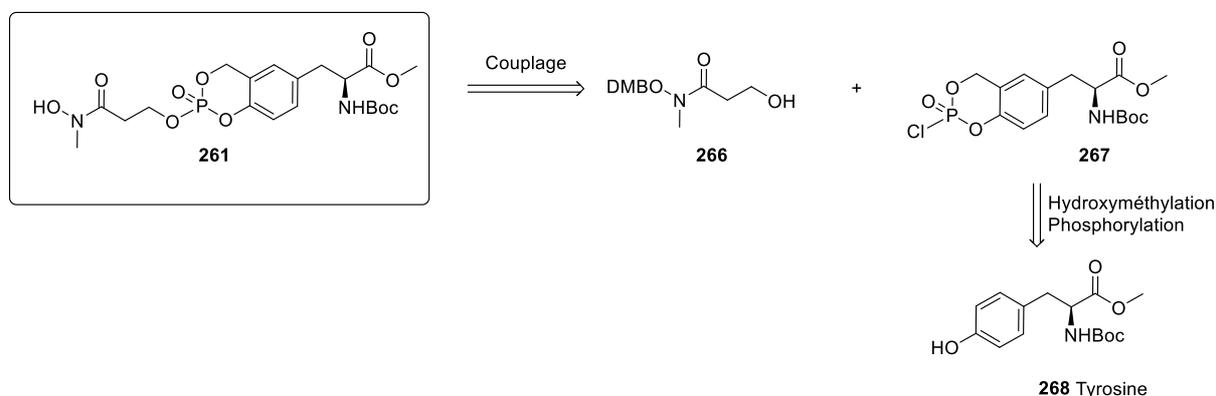


Schéma 64. Rétrosynthèse de la prodrogue **261** de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR.

## 2. Rétrosynthèse des prodrogues **262** et **263** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH

De la même manière, l'introduction du motif *cycloSal* pour accéder aux prodrogues **262** et **263** des inhibiteurs alcyne et pyridine monophosphate d'IspH pourrait se faire par un couplage entre le *cycloSal* phosphochloridate **267** et les alcools **206** et **208** respectivement (Schéma 65). L'alcool portant le cycle pyridinique pourrait être obtenu comme précédemment par une réduction de l'ester commercial correspondant (cf Chapitre 1, partie 2).

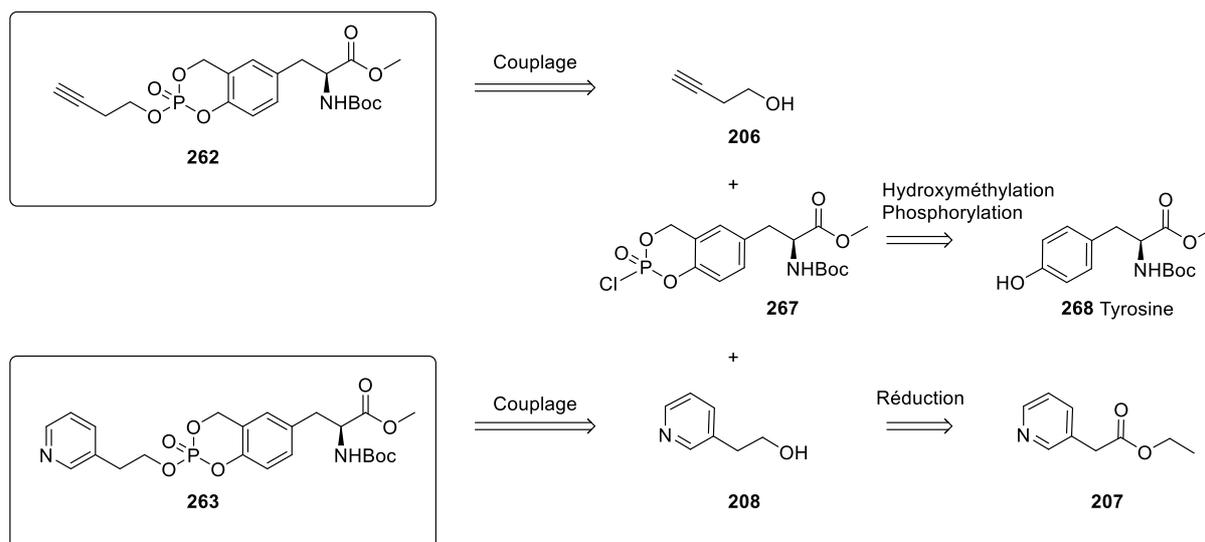
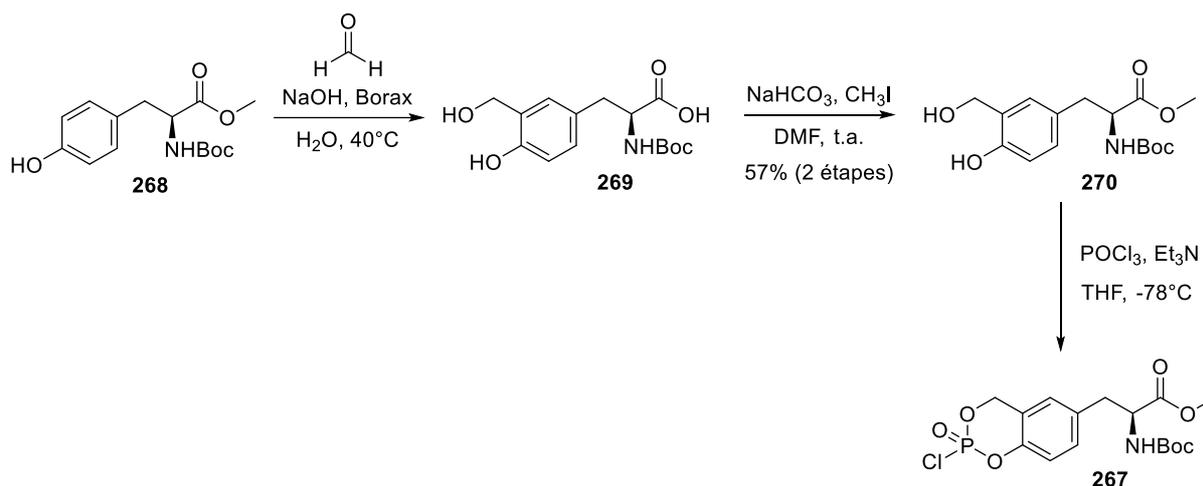


Schéma 65. Rétrosynthèse des prodrogues **262** et **263** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH.

### B. Synthèse du *cycloSal* phosphochloridate **267**

La première étape pour la synthèse du *cycloSal* phosphochloridate **267** consiste à introduire un alcool benzylique en position ortho de la tyrosine protégée **268** commerciale (Schéma 66). Pour ce faire, une substitution électrophile aromatique sur du formaldéhyde a été réalisée en milieu aqueux en présence de soude et de tétraborate de sodium décahydraté (ou borax) en suivant la méthode décrite par Huang *et al*<sup>8</sup> (Schéma 66).

Schéma 66. Synthèse du *cycloSal* phosphochloridate **267**.

La RMN-<sup>1</sup>H du brut réactionnel indique la présence d'un signal à 4,44 ppm correspondant au CH<sub>2</sub> benzylique introduit, toutefois, le singulet correspondant au méthyle de l'ester n'est plus présent. En effet, la réaction ayant lieu en milieu aqueux basique, l'ester a été saponifié. Afin de former à nouveau l'ester de méthyle précédent, le brut réactionnel est engagé dans une étape supplémentaire de méthylation sélective de l'acide carboxylique en présence d'iodométhane et d'hydrogénocarbonate dans le DMF. Le dérivé d'alcool salicylique **270** a ainsi été obtenu avec un rendement de 57 % sur deux étapes et sa structure a été confirmée par la présence des signaux du méthyle de l'ester sur les spectres RMN-<sup>1</sup>H (singulet à 3,71 ppm) et RMN-<sup>13</sup>C (signal à 52,3 ppm). La phosphorylation du saligénol **270** en présence de POCl<sub>3</sub> conduit ensuite au *cycloSaligényle* phosphochloridate **267**, dont nous observons la formation sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut avec un signal majoritaire à -6.0 ppm. Ce dernier est directement engagé dans l'étape clé de couplage.

### C. Synthèse des prodrogues *cycloSal* **261**, **262** et **263**

#### 1. Synthèse de la prodrogue **261** de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR

Nous avons d'abord synthétisé la prodrogue *cycloSal* **261** de l'inhibiteur phosphonohydroxamique **104** de la DXR. Pour ce faire, le couplage entre l'acide hydroxamique **266** et le *cycloSal* phosphochloridate **267** fraîchement préparé a été réalisé en présence de TEA et d'une quantité catalytique de DMAP (Schéma 67). Après purification, un seul signal caractéristique des prodrogues *cycloSal* est présent à -9,7 ppm sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P. Par ailleurs, la structure de la prodrogue **271** obtenue (80 %) a été confirmée par les analyses de ses spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C, ainsi que par une analyse HRMS.

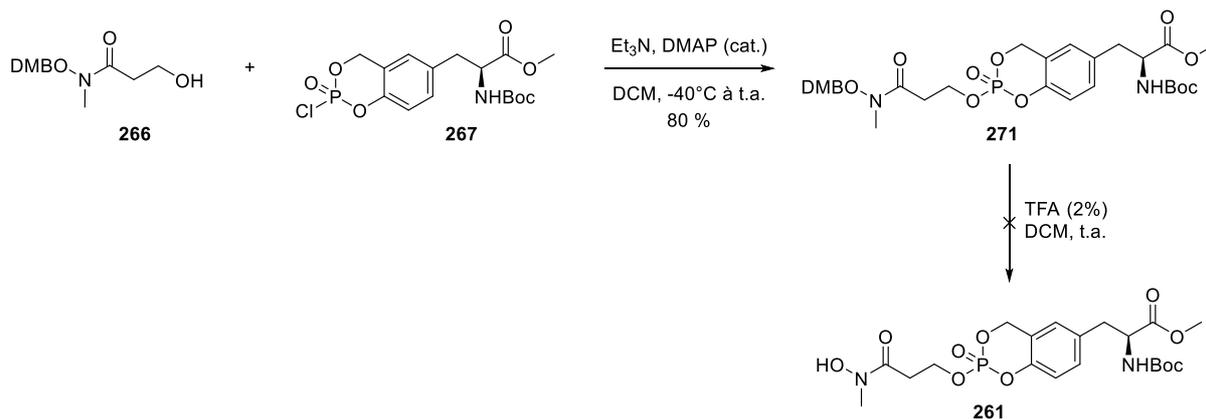


Schéma 67. Synthèse de la prodrogue **261** de l'inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR.

Un essai de déprotection du groupement DMB a été réalisé en traitant la prodrogue **271** par une solution de TFA à 2% dans le DCM. Malheureusement, le spectre RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel montre la présence de trois signaux autour de -6 ppm indiquant que la prodrogue *cycloSal* s'est dégradée. Ainsi, seule l'activité antibactérienne du composé **271** protégé sera évaluée.

## 2. Synthèse des prodrogues **262** et **263** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH

Nous avons ensuite synthétisé les prodrogues *cycloSal* **262** et **263** des analogues monophosphates des inhibiteurs alcyne et pyridine d'IspH. Dans le cas de l'inhibiteur alcyne, la réaction de couplage entre le 3-butyn-1-ol **206** commercial et le *cycloSal* phosphochloridate **267** a permis l'obtention de la prodrogue désirée qui a été isolée avec un rendement de 45 % (Schéma 68). En effet, ici encore, un unique signal à -9,9 ppm indique la formation de la prodrogue cyclique attendue.

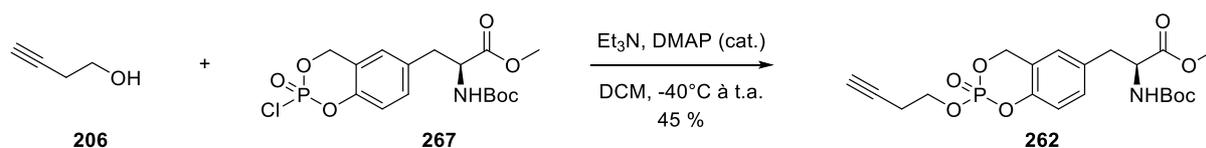
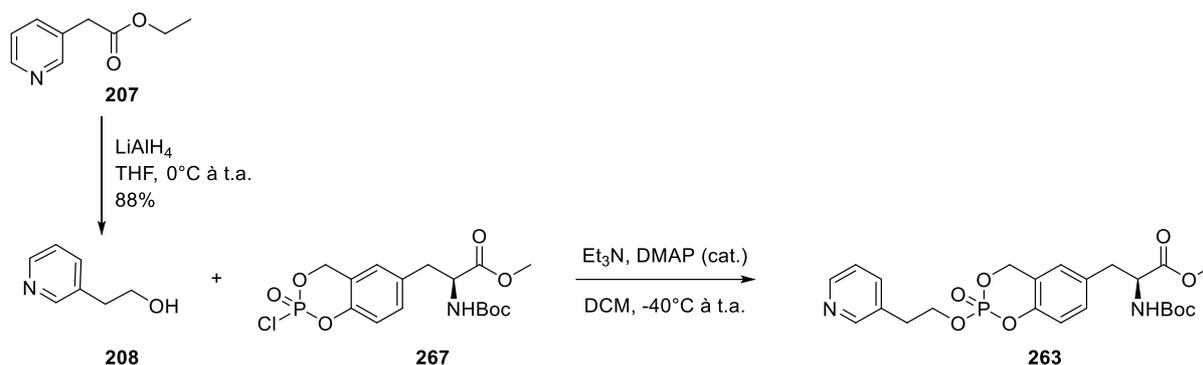


Schéma 68. Synthèse de la prodrogue **262** de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne d'IspH.

Concernant l'inhibiteur pyridine, l'alcool n'étant pas commercial, la réduction de l'ester **207** commercial par du LiAlH<sub>4</sub> permet d'accéder à l'alcool **208** (88 %) (Schéma 69). Ce dernier est alors engagé dans l'étape de couplage et la RMN-<sup>31</sup>P du brut réactionnel indique la formation de la prodrogue désirée avec un signal majoritaire à -9,8 ppm. Lors de la purification, deux fractions sont obtenues et analysées par RMN-<sup>31</sup>P. Aucun signal n'est présent sur le spectre de la première fraction, tandis qu'aucun signal caractéristique autour de -9 ppm n'est observé sur le spectre de la seconde. Quant aux spectres RMN-<sup>1</sup>H, ils sont difficilement interprétables, rendant impossible l'identification des différents composés présents dans ces fractions. Ainsi, la prodrogue **263** s'est décomposée durant la purification et n'a pas pu être isolée.

Schéma 69. Synthèse de la prodrogue **263** de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur pyridine d'IspH.

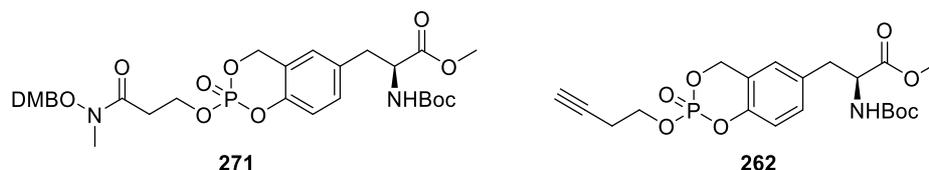
#### IV. Évaluation de l'activité antibactérienne des prodrogues *cycloSal* **271** et **262**

Comme précédemment, l'évaluation de la capacité des prodrogues *cycloSal* **271** et **262** à inhiber la croissance de souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis* a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé et par celle de la détermination des CMI par microdilution en milieu liquide (cf Chapitre 1, partie 1, III.).

##### A. Evaluation de l'inhibition de croissance par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Nous avons initialement testé les prodrogues *cycloSal* **271** et **262** par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur des cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* en déposant soit 32, soit 800 nmol de produit sur des disques de cellulose (9 mm). Pour les deux quantités déposées, aucune inhibition de croissance n'est observée, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (cf Chapitre 1, partie 2, III. A.).

Nous les avons ensuite testées sur une culture de *M. smegmatis* avec 800 nmol de produit déposé sur des disques de 6 mm et comparé leur activité inhibitrice à celle de l'isoniazide **149**. Après 48h d'incubation à 37°C, les deux prodrogues inhibent la croissance de la mycobactérie. Toutefois, elles possèdent une activité inhibitrice plus faible que l'isoniazide puisqu'une quantité de prodrogue environ 27 fois supérieure est nécessaire pour induire une inhibition environ 2 fois moins efficace (Tableau 9).

Tableau 9. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne d'une souche de *M. smegmatis* pour les prodrogues *cycloSal* **271** et **262**.

| Entrée | Composé    | Quantité déposée (nmol) | Diamètre zone inhibition (mm) |
|--------|------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1      | 149 INH    | 30                      | 21                            |
| 2      | <b>271</b> | 800                     | 9                             |
| 3      | <b>262</b> | 800                     | 16                            |

n.a. : non applicable.

La prodrogue **262** de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne d'IspH possède une activité inhibitrice plus faible que les prodrogues **182c-d** portant un atome de chlore ou un trifluorométhyle respectivement, ce qui est probablement dû au caractère donneur de la chaîne alkyle de l'acide aminé (cf Chapitre 1, partie 2, III. A.).

L'activité inhibitrice du composé **271** peut également être comparée à celle des doubles prodrogues *cycloSal* **265** des inhibiteurs phosphonohydroxamiques de la DXR (Figure 76). Dans les mêmes conditions expérimentales, les *cycloSal* substitués par un chlore ou un brome électroattracteur sont les plus efficaces avec des diamètres d'inhibition respectifs de 33 et 31 mm (35 et 42 mm de diamètre pour l'INH), tandis que le composé portant un groupement méthoxy donneur ne possède aucune activité inhibitrice<sup>7</sup>. Dans notre cas, même si la prodrogue **271** substituée par un acide aminé est moins efficace que les prodrogues portant un Cl ou un Br, l'inhibition observée indique que le composé rentrerait dans la cellule et libérerait le phosphonate protégé par un DMB. Ce dernier pourrait ensuite être déprotégé *in cellulo* pour former l'analogue phosphonohydroxamique du FR-900098.

Au vu de ces résultats, la stratégie de prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé permet de délivrer un inhibiteur dans la cellule. Ainsi, cette approche paraît prometteuse afin de pouvoir délivrer simultanément deux composés actifs *in vivo*.

## B. Évaluation de l'inhibition de croissance en milieu liquide

Nous avons également évalué l'activité inhibitrice des prodrogues *cycloSal* **271** et **262** en milieu liquide Mueller-Hinton et en microplaques 96 puits sur des cultures d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, avec une concentration finale de 100  $\mu$ M ou 2,5 mM de prodrogue dans les micropuits. Comme précédemment, la fosmidomycine a été utilisée comme antibiotique de référence lors de ces tests avec une concentration de 25  $\mu$ M.

A une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , aucune prodrogue ne possède d'activité antibactérienne. A 2,5 mM, les deux composés sont également inefficaces sur *P. aeruginosa*. Toutefois, sur les souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis*, un trouble de densité plus faible que celui du témoin dans lequel ces trois souches bactériennes sont cultivées sans aucun antibiotique est observé. Ce résultat suggère un ralentissement de la croissance bactérienne. Afin de pouvoir évaluer plus précisément et quantifier ce ralentissement de croissance, nous envisageons ici encore de réaliser un suivi cinétique de la croissance bactérienne par mesure de la densité optique. Par ailleurs, les tests d'inhibition de croissance de *M. smegmatis* en milieu liquide sont en cours de réalisation.

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la conception d'une prodrogue multimodale qui associe un inhibiteur de la DXR ou d'IspH et un PAg à l'aide d'une prodrogue *cycloSal* fonctionnalisée par un acide aminé. Afin de pouvoir préparer ce composé, la première étape consiste à vérifier que la prodrogue *cycloSal* substituée par un acide aminé estérifié et protégé par un Boc libère effectivement les composés désirés.

Ainsi, nous avons synthétisé des prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées d'un inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR ou de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne d'IspH. La prodrogue **271** de l'acide phosphohydroxamique protégé par un DMB a pu être obtenue, cependant, l'étape finale de déprotection du groupement DMB n'a pas permis d'accéder à la prodrogue désirée. Afin de pallier la difficulté liée à cette dernière étape de déprotection, nous pourrions envisager la protection de l'acide hydroxamique par un groupement TBDMS, dont les conditions de déprotection acides restent compatibles avec la présence du motif *cycloSal*. Un autre groupement protecteur envisageable pourrait être un 4-nitrobenzyle ou un 2-nitro-*N*-méthyl-imidazolyle, par exemple, qui pourrait se déprotéger spécifiquement au sein de l'environnement anoxique des tumeurs (cf Chapitre 2, II.).

Concernant les prodrogues des inhibiteurs d'IspH, la prodrogue **262** de l'inhibiteur alcyne a pu être synthétisée. En revanche, la prodrogue **263** de l'inhibiteur pyridine s'est dégradée durant la purification. Afin d'accéder à cette dernière, la réaction de couplage pourrait être réalisée en présence d' $\text{Ag}_2\text{O}$  et sans traitement du milieu réactionnel avant purification, comme cela a été décrit dans la partie 2 du Chapitre 1 pour l'AMBP.

Les deux prodrogues **271** et **262** obtenues ont été testées sur un panel de bactéries modèles dont certaines ESKAPE. Dans le test de diffusion sur disques en milieu gélosé, aucune inhibition de croissance n'est observée sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, mais les deux prodrogues inhibent la croissance de *M. smegmatis*. En effet, cette mycobactérie possède une paroi très différente des quatre autres bactéries, ce qui pourrait expliquer que nos composés inhibent *M. smegmatis* et sont inactifs sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Ainsi, cette approche prodrogue paraît prometteuse pour délivrer des

antibactériens *in vivo*. Nous pourrions alors envisager de greffer un second composé identique sur le motif *cycloSal* fonctionnalisé et les délivrer simultanément *in vivo*. A plus long terme, cette stratégie pourrait permettre d'obtenir des prodrogues multimodales fonctionnelles.

## Références

- (1) Das, N.; Dhanawat, M.; Dash, B.; Nagarwal, R. C.; Shrivastava, S. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 571–588. DOI:10.1016/j.ejps.2010.09.014.
- (2) Ciaffaglione, V.; Modica, M. N.; Pittalà, V.; Romeo, G.; Salerno, L.; Intagliata, S. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 3496–3512. DOI:10.1002/cmcd.202100473.
- (3) Aljuffali, I. A.; Lin, C.-F.; Chen, C.-H.; Fang, J.-Y. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 1311–1325. DOI:10.1080/17425247.2016.1187598.
- (4) Menger, F. M.; Rourk, M. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9083–9088. DOI:10.1021/jo971076p.
- (5) Rawat, J.; Jain, P. K.; Ravichandran, V.; Agrawal, R. K. *Arkivoc* **2007**, *2007*, 105–118. DOI:10.3998/ark.5550190.0008.112.
- (6) Zhang, R.; Song, X.-Q.; Liu, R.-P.; Ma, Z.-Y.; Xu, J.-Y. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4543–4554. DOI:10.1021/acs.jmedchem.9b00128.
- (7) Munier, M.; Tritsch, D.; Lièvreumont, D.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Molecules* **2023**, *28*, 7713. doi:10.3390/molecules28237713.
- (8) Huang, M.; Song, L.; Liu, B. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2504–2507. DOI:10.1021/ol100692x.



## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



La voie du MEP, une voie alternative pour la biosynthèse des isoprénoïdes, est utilisée par la majorité des bactéries pathogènes, mais est absente chez l'homme, ce qui en fait une cible de choix pour le développement d'antibactériens inédits aux effets secondaires minimes. Par ailleurs, cette voie de biosynthèse possède un second rôle d'intérêt majeur puisque son dernier intermédiaire, le HMBPP, est un phosphoantigène (PAg) capable de stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ces cellules effectrices, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, sont capables de lyser les cellules tumorales et contribuent à l'élimination des pathogènes. En outre, les bactéries intracellulaires présentes dans les tumeurs malignes métabolisent les anticancéreux administrés et favorisent l'apparition de mécanismes de résistance à ces derniers, ce qui contribue à diminuer l'efficacité des thérapies anticancéreuses.

Ainsi, ce projet de thèse s'est appuyé sur la dualité de la voie du MEP pour la conception de prodrogues multimodales originales visant à délivrer simultanément et sélectivement un inhibiteur de cette voie et un immunostimulant au sein du microenvironnement hypoxique des tumeurs.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons choisi de cibler deux enzymes de la voie du MEP, la deuxième enzyme, la DXR et la septième et dernière enzyme, IspH, pour lesquelles de nombreux inhibiteurs possédant une bonne activité inhibitrice *in vitro* ont été décrits. De plus, le substrat d'IspH, le HBMPP, est le PAg le plus efficace découvert à ce jour. Le groupement diphosphate de ce dernier étant rapidement métabolisé dans le plasma, des analogues phosphonates ont été synthétisés. Toutefois, ces inhibiteurs et PAg, naturels et synthétiques, possèdent des groupements phosphonate ou diphosphate polaires et chargés à pH physiologique ce qui leur confère une faible biodisponibilité *in vivo*. C'est pourquoi, nous avons envisagé la synthèse d'une prodrogue *cycloSaligényle* (*cycloSal*) fonctionnalisée afin de lier ces deux types de composés (un inhibiteur de la voie du MEP et un immunostimulant).

Ainsi, la première partie de ce travail de thèse a été consacrée à la synthèse de prodrogues d'inhibiteurs de la DXR et d'IspH. Nous nous sommes d'abord intéressés à la préparation de prodrogues bis(POM) de quatre inhibiteurs bisubstrats de la DXR précédemment synthétisés au laboratoire. Malgré plusieurs tentatives pour la dernière étape de déprotection de l'éther de benzyle (OBn), aucune prodrogue finale n'a pu être obtenue. Ainsi, les prodrogues et les acides phosphoniques protégés par OBn ont été testés sur des bactéries modèles. Aucune inhibition de croissance n'est observée sur des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. En revanche, certains acides phosphoniques inhibent faiblement *M. smegmatis* par diffusion en milieu gélosé. De plus, les quatre prodrogues bis(POM) correspondantes ont permis d'améliorer cette activité inhibitrice, suggérant (i) que l'approche prodrogue permet effectivement d'augmenter la pénétration cellulaire des composés, (ii) que les acides phosphoniques sont bien libérés dans la cellule et (iii) que ces derniers sont soit des inhibiteurs de la DXR de *M. smegmatis*, soit des inhibiteurs d'une autre voie métabolique essentielle à la bactérie.

Nous avons ensuite considéré la synthèse de prodrogues *cycloSal* des analogues monophosphates de certains inhibiteurs d'IspH, dont les analogues amino et thio du substrat, un diphosphate d'alcyne et un diphosphate de pyridine. Les divers essais de synthèse des prodrogues de l'analogue thio n'ont pas permis d'obtenir les composés finaux. En effet, une isomérisation de la double liaison lors de l'introduction de l'atome de soufre complique la suite de la synthèse et cette étape devra être optimisée. Dans le cas de l'analogue amino, des difficultés ont été rencontrées lors de l'introduction du motif *cycloSal*. Toutefois, deux produits de décomposition majoritaires ont pu être isolés et caractérisés, ce qui a permis l'optimisation des conditions de réaction et l'obtention de la double prodrogue où l'amine est protégée par un Boc. Concernant les inhibiteurs des séries alcyne et pyridine, sept prodrogues ont pu être synthétisées et les huit prodrogues ainsi obtenues ont été testées sur les mêmes cultures bactériennes que précédemment. L'inhibition de la croissance de *M. smegmatis* observée par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour les prodrogues 5-Cl et 5-CF<sub>3</sub> *cycloSal* en série alcyne et pyridine indiquerait la libération de l'analogue monophosphate dans la cellule, suivie de sa phosphorylation conduisant à l'inhibiteur diphosphate.

Ainsi, la stratégie de prodrogues *cycloSal* permettrait effectivement de délivrer des antibactériens *in vivo*. Afin de compléter les résultats prometteurs observés pour les sept prodrogues des inhibiteurs d'IspH, des tests en milieu liquide sur *M. smegmatis* sont en cours.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié la synthèse de prodrogues *cycloSal* du HMBP, analogue monophosphate du HMBPP, mais également de doubles prodrogues *cycloSal* où le groupement hydroxyle du HMBP est protégé par un *p*-nitrobenzyle capable de se déprotéger sélectivement en milieu anoxique au sein des tumeurs. Malgré plusieurs tentatives de synthèse, l'introduction du motif *cycloSal* n'a pas pu être réalisée et nous n'avons pas pu obtenir les prodrogues du HMBP correspondantes. Toutefois, l'optimisation des conditions de réaction pour ce couplage a permis d'obtenir la double prodrogue *cycloSal* non substituée du HMBP. Ainsi, l'utilisation de ces conditions optimisées devrait permettre d'accéder à diverses prodrogues *cycloSal* substituées du HMBP.

Dans une troisième partie, nous avons considéré la synthèse de prodrogues *cycloSal* substituées par un acide aminé estérifié et protégé par un Boc avec, soit un inhibiteur phosphonohydroxamique de la DXR, soit l'analogue monophosphate d'un inhibiteur alcyne ou pyridine d'IspH. La prodrogue de l'acide phosphohydroxamique protégé par un DMB a pu être obtenue, cependant, l'étape de déprotection finale n'a pas permis d'accéder à la prodrogue désirée. Concernant les inhibiteurs d'IspH, la prodrogue de l'analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne a pu être isolée, mais celle de l'inhibiteur pyridine s'est dégradée durant la purification. Ainsi, nous avons évalué l'activité antibactérienne de la double prodrogue comportant le DMB et celle de la prodrogue alcyne. En milieu gélosé, aucune inhibition de croissance n'est observée sur des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, mais les deux prodrogues inhibent la croissance de *M. smegmatis*. Ces résultats

suggèrent que cette approche de prodrogue *cycloSal* permet effectivement de délivrer les inhibiteurs *in cellulo*.

Afin de pouvoir valider le concept de cette approche de prodrogues multimodales, différents axes de travail pourront être envisagés. À court terme, il sera nécessaire de vérifier que les prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé délivrent efficacement le HMBP *in vivo*. A cet effet, plusieurs étapes sont à prévoir. Dans un premier temps et afin de vérifier que le groupement *p*-nitrobenzyle est bien spécifique des conditions réductrices rencontrées au sein du microenvironnement tumoral, des tests de déprotection des prodrogues du HMBP en milieu anoxique pourront être réalisés. Ensuite, il s'agira de synthétiser les prodrogues *cycloSal* fonctionnalisées par un acide aminé du HMBP et celles du HMBP protégé par un *p*-nitrobenzyle, puis d'évaluer leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

A moyen terme, un second composé actif, identique au premier, pourra être greffé sur l'acide aminé porté par la prodrogue *cycloSal*, ce qui permettrait de vérifier que les deux composés liés à la prodrogue sont bien libérés simultanément. Ainsi, des tests de déprotection de ces prodrogues transportant deux fois la même molécule active (soit deux inhibiteurs de la DXR, soit deux inhibiteurs d'IspH, soit deux PAg) pourront être réalisés.

Enfin, à plus long terme, les prodrogues multimodales portant un inhibiteur et un immunostimulant pourraient être synthétisées. Ici encore, des tests de déprotection pourront être réalisés afin de s'assurer de la libération des deux molécules actives dans les conditions requises et les activités antibactériennes et immunostimulantes de ces prodrogues pourront être évaluées.

D'autres axes de travail pourraient également être développés avec cette approche prodrogue multimodale. En effet, nous pourrions considérer des prodrogues multimodales portant un inhibiteur de la voie du MEP d'une part, et un antituberculeux tel que l'isoniazide, d'autre part (Figure 77).

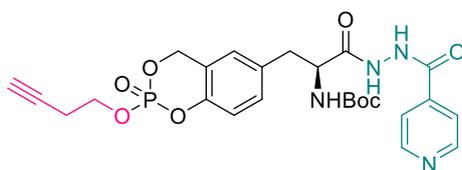


Figure 77. Exemple de prodrogue multimodale avec un analogue monophosphate de l'inhibiteur alcyne diphosphate d'IspH (en rose) et l'isoniazide (en vert).

Par ailleurs, un autre squelette pourrait être envisagé pour synthétiser des prodrogues multimodales en se basant par exemple sur les squelettes des prodrogues bis-*cycloSal* développées par Chris Meier (Figure 78).

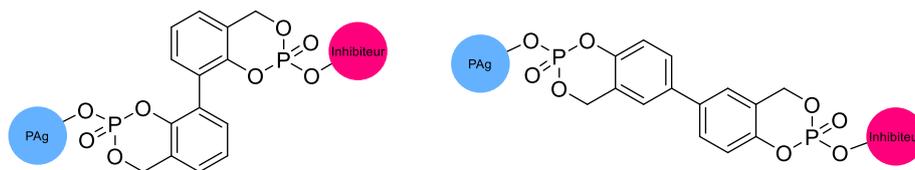


Figure 78. Exemples de prodrogues multimodales comportant un squelette bis-*cycloSal*.

Ainsi, nous pourrions synthétiser des prodrogues multimodales portant un inhibiteur de la voie du MEP et un PAG, deux inhibiteurs de la voie du MEP qui ne ciblent pas la même enzyme (la DXR et IspH), ou encore un inhibiteur de la voie du MEP et un antituberculeux.

Finalement, l'approche prodrogue *cycloSal* est une excellente stratégie pour augmenter la biodisponibilité de composés polaires comme les phosphates et phosphonates et le concept de prodrogue multimodale que nous avons développé avec ce projet pourrait faire l'objet de futures recherches.

## **EXPERIMENTAL PART**

|    |                                    |     |
|----|------------------------------------|-----|
| A. | General methods .....              | 183 |
| B. | General procedures .....           | 184 |
| C. | Procedures.....                    | 185 |
| D. | Biological general procedures..... | 221 |

## A. General methods

All non-aqueous reactions were run under argon atmosphere, using dry solvents. Commercial grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich, TCI, BLDPharm or Acros Organics and used without further purification. Petroleum ether (PE) 40–60 °C (Sigma-Aldrich) was used for purification.

Flash chromatography was performed on silica gel 60 (230-400 mesh) from Merck with the solvent system as indicated. Automated flash chromatography was performed on silica gel (30 or 50  $\mu\text{m}$ ) on a Puriflash 215 (Interchim).

TLC plates were revealed under UV light (254 or 366 nm) and/or by spraying with a cerium molybdate solution or an ethanolic solution of potassium permanganate followed by heating.

The NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 ( $^1\text{H-NMR}$ : 300 MHz;  $^{31}\text{P-NMR}$ : 121.5 MHz;  $^{19}\text{F-NMR}$ : 282.4 MHz) or a Bruker Avance 400 ( $^1\text{H-NMR}$ : 400 MHz;  $^{31}\text{P-NMR}$ : 162.0 MHz;  $^{19}\text{F-NMR}$ : 282.4 MHz) or a Bruker Avance 500 ( $^1\text{H-NMR}$ : 500 MHz;  $^{31}\text{P-NMR}$ : 202.0 MHz;  $^{13}\text{C-NMR}$ : 125.8 MHz) spectrometer.  $^1\text{H-NMR}$  experiments were performed in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  and  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  with  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  ppm),  $\text{CD}_2\text{HOD}$  ( $\delta = 3.31$  ppm),  $(\text{CD}_3)(\text{CD}_2\text{H})\text{CO}$  ( $\delta = 2.05$  ppm) and  $(\text{CD}_3)(\text{CD}_2\text{H})\text{SO}$  ( $\delta = 2.50$  ppm) as internal references.  $^{13}\text{C-NMR}$  experiments were performed in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  and  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  with  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77.2$  ppm),  $\text{CD}_2\text{HOD}$  ( $\delta = 49.0$  ppm) and  $(\text{CD}_3)(\text{CD}_2\text{H})\text{CO}$  ( $\delta = 29.8$  ppm) as internal references. For  $^{31}\text{P-NMR}$  reference, the spectrometer had an external reference corresponding to 80 % phosphoric acid in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta = 0$  ppm). The chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in ppm. s, bs, d, t, bt, q, p and m are abbreviations for multiplicity corresponding to singlet or sextuplet, broad singlet, doublet, triplet, broad triplet, quadruplet or quintuplet, pentuplet and multiplet.  $J$ -couplings are expressed in Hz.

Negative or positive mode electrospray MS were performed on a Bruker Daltonics microTOF spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray (ESI) interface. Calibration was performed using a solution of 10 mM sodium formate. Sample solutions were introduced into the spectrometer source with a syringe pump (Harvard type 55 1111: Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) with a flow rate of 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## B. General procedures

### A/ General procedure for the synthesis of *cycloSal* phosphochloridate

A solution of phosphorous oxichloride (1.1 eq) in THF (1.3 mL/mmol) was cooled down to -78°C. A solution of saligenol (1 eq) and triethylamine (2.1 eq) in THF (2 mL/mmol) was added dropwise and the mixture was allowed to slowly warm up to reach approximately 10°C overnight. After completion, the white solid was filtered under argon and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude was directly engaged in the next step.

### B/ General procedure for the synthesis of *cycloSal* phosphotriester

A solution of DMAP (0.5 eq), alcohol (1 eq) and triethylamine (1.1 eq) in DCM (3 mL/mmol) was cooled down to -40°C and a solution of *cycloSal* phosphochloridate (3 eq) in DCM (0.8 mL/mmol) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight.

#### Workup 1:

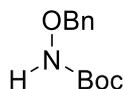
A saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl was added and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and the solvent was evaporated under reduced pressure.

#### Workup 2:

A saturated solution of NaCl was added. Then, the aqueous layer was extracted with DCM, basified with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution to a pH around 6 and extracted again with DCM. These last combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under reduced pressure.

## C. Procedures

### *t*-Butyl(benzyloxy) carbamate (146)



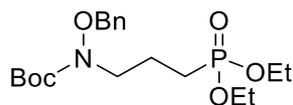
To a solution of *O*-benzyloxyamine hydrochloride (1 eq, 3.806 g, 23.6 mmol) in THF (95 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (1.1 eq, 5.709 g, 25.9 mmol) was added. The mixture was cooled down to 0 °C and triethylamine (1.1 eq, 3.65 mL, 25.9 mmol) was added carefully. The reaction was then stirred at room temperature overnight. After completion the reaction was quenched with water (30 mL) and the two layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were washed with water (30 mL) and brine (20 mL), dried over anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and evaporated. A transparent yellowish oil was obtained and purified using automated flash chromatography (from 100 % PE to 90:10 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a white solid (5.073 g, 96 %).

R<sub>f</sub> = 0.28 (90:10 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.86 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.09 (s, 1H, NH), 7.30-7.42 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 28.2 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 78.5 (OCH<sub>2</sub>), 81.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.5 (3 CH<sub>Ar</sub>), 129.1 (2 CH<sub>Ar</sub>), 135.7 (C<sub>Ar</sub>), 156.7 (CO).

### *t*-Butyl(benzyloxy)(3-(diethoxyphosphoryl)propyl) carbamate (147)



A solution of *t*-butyl(benzyloxy) carbamate **146** (1.1 eq, 822 mg, 3.68 mmol) in DMF (8 mL) was cooled down to 0 °C. Sodium hydride (1.6 eq, 135 mg, 5.36 mmol) was added portionwise and the mixture was stirred about 30 min until no more gas evolution was observed. The diethyl(3-bromopropyl) phosphonate (1 eq, 0.68 mL, 3.35 mmol) and sodium iodide (cat., 5mol%) were added at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature overnight. After completion, the reaction was quenched with water (30 mL). More water (50 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 40 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 40 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified when necessary, using flash chromatography (from 100 % EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a colorless oil in a quantitative yield (1.345 g).

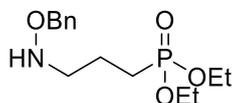
R<sub>f</sub> = 0.38 (100% EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.30 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 6H, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.67 – 1.81 (m, 2H, (EtO)<sub>2</sub>OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.82 – 1.98 (m, 2H, (EtO)<sub>2</sub>OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.47 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N(OBn)), 4.00 – 4.15 (m, 4H, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.83 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.30-7.43 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  16.5 (d,  $^3J_{C-P} = 6.0$  Hz, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.4 (d,  $^2J_{C-P} = 4.7$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.1 (d,  $^1J_{C-P} = 143$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49.9 (d,  $^3J_{C-P} = 19.2$  Hz, CH<sub>2</sub>N), 61.5 (d,  $^2J_{C-P} = 6.5$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 77.0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 81.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.5 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.6 (CH<sub>Ar</sub>), 129.4 (2 CH<sub>Ar</sub>), 135.4 (C<sub>Ar</sub>), 156.5 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  31.5

### Diethyl (3-((benzyloxy)amino)propyl)phosphonate (**142**)



To a solution of trifluoroacetic acid (5.7 eq, 9.5 mL, 123 mmol) in DCM (26 mL) was added a solution of compound **147** (1 eq, 8.635 g, 21.5 mmol) in DCM (12 mL) under stirring at room temperature, and the mixture was stirred overnight. After completion, the mixture was cooled down to 0 °C and a saturated solution of sodium carbonate (NaHCO<sub>3</sub>) was added dropwise until a pH of 7-8 was obtained. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with water (30 mL) and brine (30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified when necessary, using automated flash chromatography (from 100 % EtOAc to 90:10 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellow oil (5.897 g, 91 %).

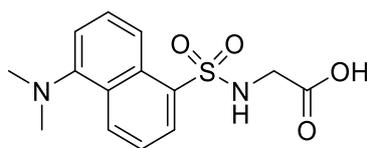
R<sub>f</sub> = 0.36 (95:5 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.31 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 6H, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.71 – 1.92 (m, 4H, (EtO)<sub>2</sub>OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.97 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N(OBn)), 4.01 – 4.15 (m, 4H, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.69 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.27 – 7.36 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  16.5 (d,  $^3J_{C-P} = 6.1$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.6 (d,  $^2J_{C-P} = 4.9$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.2 (d,  $^1J_{C-P} = 142$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 52.1 (d,  $^3J_{C-P} = 16.8$  Hz, CH<sub>2</sub>N), 61.5 (d,  $^2J_{C-P} = 6.5$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 127.9 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (2 CH<sub>Ar</sub>), 137.8 (C<sub>Ar</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  32.1

### ((5-(Dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)glycine (140a)



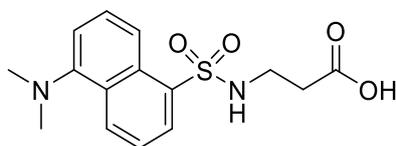
A solution of glycine (2 eq, 0.455 g, 6 mmol) in water (24 mL) was treated with sodium hydrogen carbonate (8 eq, 2.016 g, 24 mmol), added portionwise until complete dissolution. A solution of dansyl chloride (1 eq, 0.809 g, 3 mmol) in acetone (12 mL) was made under argon and then added to the aqueous mixture. Triethylamine (4 eq, 1.70 mL, 12 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight at room temperature with exclusion of light. After completion, the mixture was filtered, and the filtrate was acidified to pH 3-4 with a solution of HCl 0.5 M. The aqueous solution was extracted with EtOAc (9 x 25 mL). The combined organic layers were washed with water (60 mL) and brine (60 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product was afforded as a pale-yellow solid (791 mg, 85 %).

R<sub>f</sub> = 0.29 (70:30 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, acetone-*d*6):** δ 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.78 (d, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 6.94 (bt, 1H, NH), 7.27 (dd, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.58 (dd, J = 8.7, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.61 (dd, J = 8.7, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.24 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.41 (dt, J = 8.7, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.56 (dt, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, acetone-*d*6):** δ<sub>c</sub> 43.8 (CH<sub>2</sub>N), 44.8 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115.2 (CH<sub>Ar</sub>), 119.6 (CH<sub>Ar</sub>), 123.3 (CH<sub>Ar</sub>), 127.9 (CH<sub>Ar</sub>), 128.6 (CH<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (CH<sub>Ar</sub>), 136.2 (C<sub>Ar</sub>), 151.8 (C<sub>Ar</sub>), 169.7 (CO).

### 3-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanoic acid (140b)



A solution of β-alanine (2 eq, 0.540 g, 6 mmol) in water (24 mL) was treated with sodium hydrogen carbonate (8 eq, 2.016 g, 24 mmol), added portionwise until complete dissolution. A solution of dansyl chloride (1 eq, 0.809 g, 3 mmol) in acetone (12 mL) was made under argon and then added to the aqueous mixture. Triethylamine (4 eq, 1.70 mL, 12 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight at room temperature with exclusion of light. After completion, the mixture was filtered, and the filtrate was acidified to pH 3-4 with a solution of HCl 1 M. The aqueous solution was extracted with EtOAc (8 x 25 mL). The combined organic layers were washed with water (60 mL) and brine (60 mL), dried over

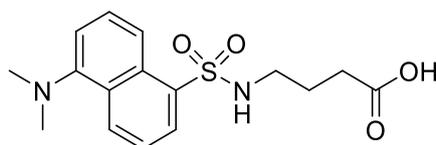
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product was afforded as a bright greenish oil (832 mg, 86 %).

R<sub>f</sub> = 0.22 (90:10 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 2.54 (t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.89 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.17 (q, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.77 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 1H, NH), 7.19 (dd, J = 7.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.53 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.56 (dd, J = 8.6, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.24 (dd, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.27 (dt, J = 8.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.55 (dt, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 33.9 (OCCH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>N), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115.4 (CH<sub>Ar</sub>), 118.7 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 130.0 (C<sub>Ar</sub>), 130.7 (CH<sub>Ar</sub>), 134.6 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 176.1 (CO)

#### 4-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanoic acid (140c)



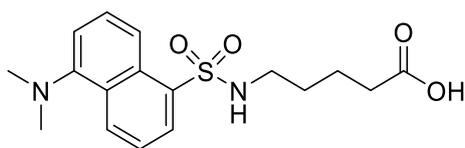
A solution of γ-aminobutyric acid (2 eq, 0.625 g, 6 mmol) in water (24 mL) was treated with sodium hydrogen carbonate (8 eq, 2.016 g, 24 mmol), added portionwise until complete dissolution. A solution of dansyl chloride (1 eq, 0.809 g, 3 mmol) in acetone (12 mL) was made under argon and then added to the aqueous mixture. Triethylamine (4 eq, 1.70 mL, 12 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight at room temperature with exclusion of light. After completion, the mixture was filtered, and the filtrate was acidified to pH 3-4 with a solution of HCl 1 M. The aqueous solution was extracted with EtOAc (8 x 40 mL). The combined organic layers were washed with water (80 mL) and brine (80 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product was afforded as a bright greenish oil (931 mg, 92 %).

R<sub>f</sub> = 0.22 (90:10 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.72 (q, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.95 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.04 (bt, 1H, NH), 7.18 (dd, J = 7.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.54 (dd, J = 8.6, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.23 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.26 (dt, J = 8.6, 0.94 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.53 (dt, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 24.5 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30.6 (OCCH<sub>2</sub>), 42.5 (CH<sub>2</sub>N), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115.3 (CH<sub>Ar</sub>), 118.7 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.7 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.5 (CH<sub>Ar</sub>), 134.5 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 178.0 (CO)

### 5-((5-(Dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentanoic acid (140d)



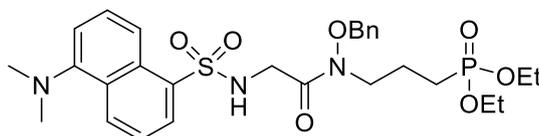
A solution of 5-aminovaleric acid (2 eq, 0.710 g, 6 mmol) in water (24 mL) was treated with sodium hydrogen carbonate (8 eq, 2.016 g, 24 mmol), added portionwise until complete dissolution. A solution of dansyl chloride (1 eq, 0.835 g, 3 mmol) in acetone (12 mL) was made under argon and then added to the aqueous mixture. Triethylamine (4 eq, 1.70 mL, 12 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight at room temperature with exclusion of light. After completion, the mixture was filtered, and the filtrate was acidified to pH 3-4 with a solution of HCl 0.5 M. The aqueous solution was extracted with EtOAc (9 x 25 mL). The combined organic layers were washed with water (75 mL) and brine (75 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product was afforded as a yellow oil (786 mg, 72 %).

R<sub>f</sub> = 0.41 (95:5 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.37 – 1.58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.90 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.91 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.85 – 2.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.92 (t, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.56 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.24 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 21.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 28.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 33.1 (OCCH<sub>2</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>NH), 45.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115.3 (CH<sub>Ar</sub>), 118.7 (CH<sub>Ar</sub>), 123.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.7 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.5 (CH<sub>Ar</sub>), 134.6 (C<sub>Ar</sub>), 151.9 (C<sub>Ar</sub>), 178.6 (CO).

### Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)acetamido)propyl) phosphonate (143a)



To a solution of carboxylic acid **140a** (1 eq, 450 mg, 1.46 mmol) in THF (5.8 mL), HOBt (1.2 eq, 236 mg, 1.75 mmol) and DCC (1.2 eq, 365 mg, 1.75 mmol) were added. After stirring at room temperature for about 1 hour, a solution of phosphonate **142** (1 eq, 440 mg, 1.46 mmol) in THF (5.8 mL) was added. The mixture was stirred overnight at r.t. with exclusion of light. The white solid was then filtered and washed with Et<sub>2</sub>O, and the filtrate was evaporated. The

crude was purified using automated flash chromatography (from 100 % EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellow oil (757 mg, 87 %).

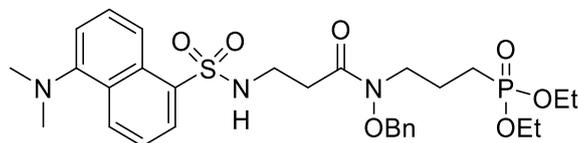
Rf = 0.43 (95:5 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.27 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 6H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.53 – 1.69 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.89 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.61 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.75 (d,  $^3J = 4.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.95 – 4.09 (m, 4H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.68 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.59 (bt, 1H, NH), 7.18 (dd,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.21 – 7.35 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd,  $J = 8.6, 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.57 (dd,  $J = 8.7, 7.6$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.17 (dd,  $J = 7.3, 1.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.31 (dt,  $J = 8.7, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.54 (dt,  $J = 8.5, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  16.4 (d,  $^3J_{C-P} = 5.0$  Hz, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 19.9 (d,  $^2J_{C-P} = 5.0$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 22.8 (d,  $^1J_{C-P} = 142$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.9 (d,  $^3J_{C-P} = 17.6$  Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 61.7 (d,  $^2J_{C-P} = 6.3$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 115.4 (CH<sub>Ar</sub>), 119.0 (CH<sub>Ar</sub>), 123.0 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 128.8 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (4 CH<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.6 (CH<sub>Ar</sub>), 133.4 (C<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 151.8 (C<sub>Ar</sub>), 168.9 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  30.8

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanamido)propyl)phosphonate (**143b**)



To a solution of carboxylic acid **140b** (1 eq, 1.881 g, 5.8 mmol) in THF (24 mL), HOBt (1.2 eq, 0.965 g, 7.1 mmol) and DCC (1.2 eq, 1.483 g, 7.1 mmol) were added. After stirring at room temperature for about 1 hour, a solution of phosphonate **142** (1.02 eq, 1.778 g, 5.9 mmol) in THF (24 mL) was added. The mixture was stirred overnight at r.t. with exclusion of light. The white solid was then filtered and washed with Et<sub>2</sub>O, and the filtrate was evaporated. The crude was purified using automated flash chromatography (from 100 % EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellow oil (3.409 g, 97 %).

Rf = 0.34 (95:5 EtOAc/MeOH)

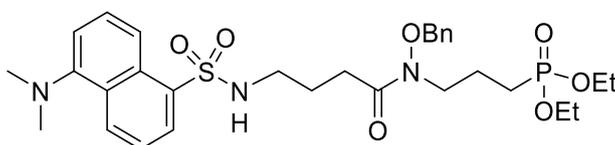
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.30 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 6H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.59 – 1.76 (m, 2H, (EtO)<sub>2</sub>OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.77 – 1.95 (m, 2H, (EtO)<sub>2</sub>OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.49 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.15 (q,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.63 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.97 – 4.12 (m, 4H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.58 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.59 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 1H, NH), 7.18 (dd,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.20 – 7.40 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.51 (dd,  $J =$

8.6, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.57 (dd,  $J = 8.7, 7.6$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.24 (dd,  $J = 7.3, 1.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.31 (dt,  $J = 8.7, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.51 (dt,  $J = 8.5, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  16.5 (d,  $^3J_{C-P} = 6.0$  Hz, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.2 (d,  $^2J_{C-P} = 3.9$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 22.9 (d,  $^1J_{C-P} = 142$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 32.4 (OCCH<sub>2</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.5 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 61.7 (d,  $^2J_{C-P} = 6.5$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 115.3 (CH<sub>Ar</sub>), 118.9 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 128.8 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.1 (CH<sub>Ar</sub>), 129.2 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.4 (CH<sub>Ar</sub>), 133.8 (C<sub>Ar</sub>), 135.2 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 173.0 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  31.0

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-4-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanamido)propyl)phosphonate (**143c**)



To a solution of 4carboxylic acid **140c** (1 eq, 2.312 g, 6.9 mmol) in THF (20 mL), HOBt (1.2 eq, 1.099 g, 8.1 mmol) and DCC (1.2 eq, 1.685 g, 8.1 mmol) were added. After stirring at room temperature for about 1 hour, a solution of phosphonate **142** (1 eq, 2.073 g, 6.9 mmol) in THF (20 mL) was added. The mixture was stirred overnight at r.t. with exclusion of light. The white solid was then filtered and washed with Et<sub>2</sub>O, and the filtrate was evaporated. The crude was purified using automated flash chromatography (from 100 % EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellow oil (3.784 g, 88 %).

R<sub>f</sub> = 0.37 (95:5 EtOAc/MeOH)

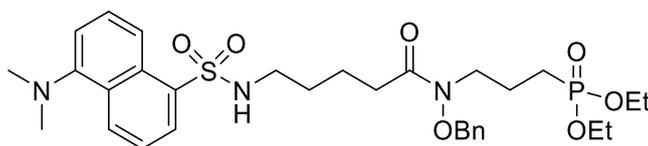
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.30 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 6H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.56 – 1.79 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.81 – 1.98 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.38 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.87 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.90 (q,  $^3J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.68 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.98 – 4.17 (m, 4H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.72 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.25 (bs, 1H, NH), 7.17 (dd,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.29 – 7.43 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.51 (dd,  $J = 8.5, 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.55 (dd,  $J = 8.5, 7.4$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.22 (dd,  $J = 7.3, 1.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.27 (dt,  $J = 8.7, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.52 (dt,  $J = 8.5, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  16.4 (d,  $^3J_{C-P} = 6.0$  Hz, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.2 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 22.9 (d,  $^1J_{C-P} = 142$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 23.9 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.5 (OCCH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.5 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 61.6 (d,  $^2J_{C-P} = 6.5$  Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 115.1 (CH<sub>Ar</sub>), 119.0 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.7 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.0

(CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.4 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.2 (CH<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 135.0 (C<sub>Ar</sub>), 151.9 (C<sub>Ar</sub>), 174.3 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ 31.2

Diethyl (3-(*N*-(benzyloxy)-5-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1 sulfonamido) pentanamido)propyl) phosphonate (**143d**)



To a solution of carboxylic acid **140d** (1 eq, 2.600 g, 7.4 mmol) in THF (24 mL), HOBt (1.2 eq, 1.256 g, 9.3 mmol) and DCC (1.2 eq, 1.595 g, 9.1 mmol) were added. After stirring at room temperature for about 1 hour, a solution of phosphonate **142** (1 eq, 2.229 g, 7.4 mmol) in THF (24 mL) was added. The mixture was stirred overnight at r.t. with exclusion of light. The white solid was then filtered and washed with Et<sub>2</sub>O, and the filtrate was evaporated. The crude was purified using automated flash chromatography (from 100 % EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellow oil (3.278 g, 69 %).

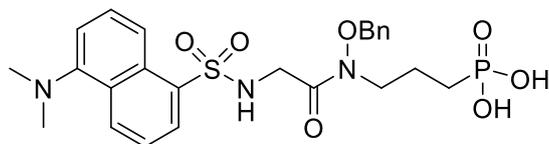
R<sub>f</sub> = 0.36 (95:5 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.28 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 6H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 – 1.55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.61 – 1.76 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.80 – 1.96 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.26 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.82 (q, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.87 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.65 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.97 – 4.12 (m, 4H, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.74 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.22 (bs, 1H, NH), 7.16 (dd, J = 7.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.27 – 7.40 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd, J = 8.6, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.54 (dd, J = 8.7, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.21 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.30 (dt, J = 8.7, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.52 (dt, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 16.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0 Hz, P(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.2 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 21.0 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.0 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 142 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 29.1 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.4 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 42.8 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.5 Hz, OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 115.2 (CH<sub>Ar</sub>), 118.9 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.8 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.1 (CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.3 (CH<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 134.9 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 174.6 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ 31.3

(3-(*N*-(Benzyloxy)-2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)acetamido)propyl) phosphonic acid (**145a**)



To a solution of diethyl phosphonate **143a** (1 eq, 1.500 g, 2.54 mmol) in DCM (3 mL/mmol), TMSBr (5 eq, 1.8 mL, 13 mmol) was added carefully at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for about 1 hour and then at room temperature overnight with exclusion of light. After completion, the reaction was quenched with methanol, the mixture was stirred for 15 min and the solvents were evaporated. The desired product was obtained without further purification as a beige solid, (981 mg, 72 %).

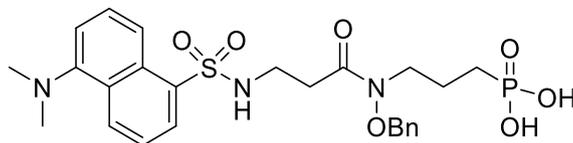
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  1.33 – 1.61 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.46 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.53 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.78 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.27 – 7.43 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.84 (dd, *J* = 8.7, 7.4 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.86 (dd, *J* = 8.8, 7.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.15 (dd, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.29 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.55 (dt, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.98 (dt, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta_c$  20.0 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.8 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 139 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 43.0 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 21.6 Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 46.3 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 75.9 (OCH<sub>2</sub>Ph), 119.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.6 (CH<sub>Ar</sub>), 126.5 (CH<sub>Ar</sub>), 127.1 (CH<sub>Ar</sub>), 127.9 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.9 (CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.8 (CH<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 137.1 (C<sub>Ar</sub>), 138.4 (2 C<sub>Ar</sub>), 169.4 (CO)

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  28.5

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PS [M+H]<sup>+</sup> 536.1615, found 536.1589.

(3-(*N*-(Benzyloxy)-3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanamido)propyl) phosphonic acid (**145b**)



To a solution of diethyl phosphonate **143b** (1 eq, 1.350 g, 2.23 mmol) in DCM (3 mL/mmol), TMSBr (5 eq, 1.52 mL, 11.1 mmol) was added carefully at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for about 1 hour and then at room temperature overnight with exclusion of light. After completion, the reaction was quenched with methanol, the mixture was stirred for 15 min and the solvents were evaporated. The desired product was obtained without further purification as a beige solid (872 mg, 71 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E*.

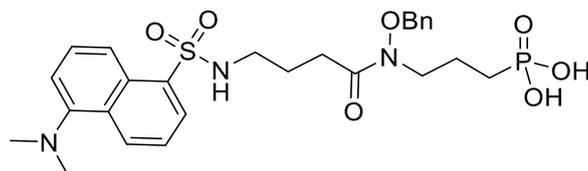
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  1.56 – 1.86 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.41 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 0.1 of 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.50 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 1.9 of 2H, OCCH<sub>2</sub>), 3.16 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.48 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.63 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.73 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.29 – 7.41 (m, 4.7 of 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.41 – 7.50 (m, 0.3 of 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.83 – 7.97 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.16 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.40 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.58 (bt, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta_c$  17.3 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 4.4 Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.2 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.9 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 140 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 24.0 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 140 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 32.2 (bs, OCCH<sub>2</sub>), 34.0 (OCCH<sub>2</sub>), 38.0 (bs, CH<sub>2</sub>NH), 38.3 (CH<sub>2</sub>NH), 46.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 46.6 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.5 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 15.1 Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 75.9 (bs, OCH<sub>2</sub>Ph), 76.0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 119.4 (CH<sub>Ar</sub>), 119.5 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (CH<sub>Ar</sub>), 125.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.7 (C<sub>Ar</sub>), 125.8 (C<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>), 127.3 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (CH<sub>Ar</sub>), 127.5 (CH<sub>Ar</sub>), 127.5 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.6 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.8 (CH<sub>Ar</sub>), 129.2 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.4 (CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (CH<sub>Ar</sub>), 130.0 (CH<sub>Ar</sub>), 132.6 (C<sub>Ar</sub>), 137.5 (C<sub>Ar</sub>), 137.6 (C<sub>Ar</sub>), 138.7 (C<sub>Ar</sub>), 138.8 (C<sub>Ar</sub>), 171.8 (CO), 172.4 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  27.9, 29.6

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PS [M+H]<sup>+</sup> 550.1771, found 550.1787.

**(3-(*N*-(Benzyloxy)-4-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanamido)propyl) phosphonic acid (145c)**



To a solution of diethyl phosphonate **143c** (1 eq, 1.639 g, 2.64 mmol) in DCM (3 mL/mmol), TMSBr (5 eq, 1.8 mL, 13.2 mmol) was added carefully at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for about 1 hour and then at room temperature overnight with exclusion of light. After completion, the reaction was quenched with methanol, the mixture was stirred for 15 min and the solvents were evaporated. The desired product was obtained without further purification as a beige solid (1.091 g, 73 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E*.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  1.55 (p, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 0.5 of 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.59 – 1.69 (m, 0.5 of 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.64 (p, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 1.5 of 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.72 – 1.82 (m, 0.5 of 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.88 (m, 1.5 of 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.04 – 2.14 (m, 1.5 of 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.22 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1.5 of 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.30 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 0.5 of 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.90 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 0.5 of 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.92 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 1.5 of 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.49 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1.5 of 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.50 (s, 1.6 of 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.55 (s, 4.4 of 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.67

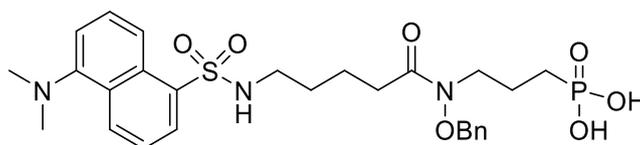
(t,  $^3J = 6.8$  Hz, 0.5 of 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 4.79 (s, 0.5 of 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.15 (s, 1.5 of 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.37 – 7.50 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.81 – 7.90 (m, 0.6 of 2H, CH<sub>Ar</sub>), 7.90 (dd,  $J = 8.8$ , 7.8 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.92 (dd,  $J = 8.7$ , 7.3 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.10 (d,  $J = 7.8$  Hz, 0.3 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.19 (dd,  $J = 7.8$ , 1.1 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.35 (dd,  $J = 7.4$ , 1.0 Hz, 0.3 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.38 (dd,  $J = 7.4$ , 1.0 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.61 (dt,  $J = 8.7$ , 1.0 Hz, 0.3 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.63 (dt,  $J = 8.7$ , 1.0 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.93 (dt,  $J = 8.0$ , 1.0 Hz, 0.3 of 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.95 (dt,  $J = 8.8$ , 1.0 Hz, 0.7 of 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>):**  $\delta_c$  17.3 (d,  $^2J_{C-P} = 4.4$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.3 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.9 (d,  $^1J_{C-P} = 140$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 24.0 (d,  $^1J_{C-P} = 140$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 24.0 (bs, OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24.6 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7 (bs, OCCH<sub>2</sub>), 30.0 (OCCH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>NH), 42.0 (CH<sub>2</sub>NH), 46.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 46.6 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.5 (d,  $^3J_{C-P} = 15.2$  Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 75.8 (OCH<sub>2</sub>Ph), 76.0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 119.4 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (CH<sub>Ar</sub>), 125.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.7 (C<sub>Ar</sub>), 125.8 (C<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>), 127.3 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (CH<sub>Ar</sub>), 127.5 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.6 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.7 (CH<sub>Ar</sub>), 129.2 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (CH<sub>Ar</sub>), 132.6 (C<sub>Ar</sub>), 137.6 (C<sub>Ar</sub>), 137.7 (C<sub>Ar</sub>), 138.7 (C<sub>Ar</sub>), 138.8 (C<sub>Ar</sub>), 173.6 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>):**  $\delta$  28.0, 29.9

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PS [M+H]<sup>+</sup> 564.1928, found 564.1924.

**(3-(*N*-(Benzyloxy)-5-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentanamido)propyl) phosphonic acid (145d)**



To a solution of diethyl phosphonate **143d** (1 eq, 1.707 g, 2.69 mmol) in DCM (3 mL/mmol), TMSBr (4.8 eq, 1.8 mL, 13 mmol) was added carefully at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for about 1 hour and then at room temperature overnight with exclusion of light. After completion, the reaction was quenched with methanol, the mixture was stirred for 15 min and the solvents were evaporated. The desired product was obtained without further purification as a beige solid (1.207 g, 78 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E*.

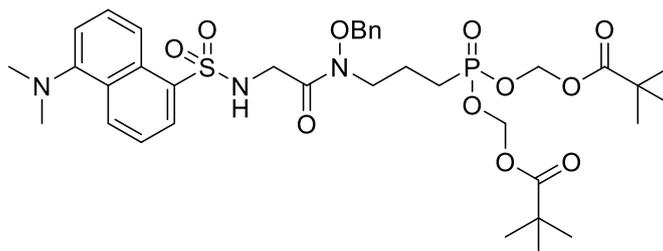
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>):**  $\delta$  1.25 – 1.37 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.57 – 1.73 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.76 – 1.94 (m, 2H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.18 (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.87 (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.47 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.70 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 4.82 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.31 – 7.41 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.82 – 7.93 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.07 – 8.16 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.36 (dd,  $J = 7.4$ , 1.0 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.55 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta_c$  17.3 (d,  $^2J_{C-P} = 4.4$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.3 (bs, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 21.1 (bs, OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 21.5 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.9 (d,  $^1J_{C-P} = 140$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 24.0 (d,  $^1J_{C-P} = 140$  Hz, OPCH<sub>2</sub>), 28.6 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.1 (bs, OCCH<sub>2</sub>), 32.6 (OCCH<sub>2</sub>), 42.1 (CH<sub>2</sub>NH), 42.1 (CH<sub>2</sub>NH), 46.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 46.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.5 (d,  $^3J_{C-P} = 15.1$  Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 75.8 (bs, OCH<sub>2</sub>Ph), 76.0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 119.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (CH<sub>Ar</sub>), 125.8 (C<sub>Ar</sub>), 125.9 (C<sub>Ar</sub>), 126.7 (CH<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>), 127.3 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.6 (2 CH<sub>Ar</sub>), 128.7 (CH<sub>Ar</sub>), 129.2 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.8 (CH<sub>Ar</sub>), 129.8 (CH<sub>Ar</sub>), 132.6 (C<sub>Ar</sub>), 134.6 (C<sub>Ar</sub>), 137.7 (C<sub>Ar</sub>), 137.7 (C<sub>Ar</sub>), 139.1 (C<sub>Ar</sub>), 139.2 (C<sub>Ar</sub>), 174.0 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, methanol-*d*4):**  $\delta$  28.8

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>PS [M+Na]<sup>+</sup> 600.1904, found 600.1881.

**(((3-(*N*-(Benzyloxy)-2-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)acetamido)propyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (148a)**



Phosphonic acid **145a** (1 eq, 1.665 g, 3.1 mmol) was dissolved in DMF (6 mL/mmol) and triethylamine (3.3 eq, 1.44 mL, 10.2 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 min, then chloromethyl pivalate (11 eq, 5 mL, 34 mmol) and sodium iodide (cat., 5mol%) were added. The mixture was heated for 4h at 70°C and then, it was stirred at room temperature overnight with exclusion of light. Et<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O were added and the aqueous layer was extracted 3 times with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) and water (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 55:45 EtOAc/PE to 80:20 EtOAc/PE). The desired product was afforded as a yellow oil (855 mg, 35 %).

R<sub>f</sub> = 0.33 (60:40 EtOAc/PE)

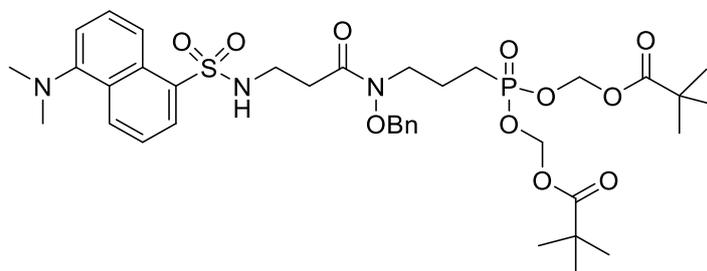
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.18 (s, 18H, ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.60 – 1.90 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.59 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 3.73 (d,  $^3J = 4.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.68 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.53 (t,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H, NH), 5.60 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 5.65 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 7.19 (dd,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.21 – 7.36 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd,  $J = 8.6, 7.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.57 (dd,  $J = 8.7, 7.6$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.17 (dd,  $J = 7.3, 1.3$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.31 (dt,  $J = 8.7, 0.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.55 (dt,  $J = 8.5, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  19.6 (d,  $^2J_{C-P}$  = 4.8 Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.7 (d,  $^1J_{C-P}$  = 142 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 26.8 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 38.7 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>NH), 45.5 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.6 (d,  $^3J_{C-P}$  = 19.0 Hz, CH<sub>2</sub>NOBn), 76.8 (OCH<sub>2</sub>Ph), 81.3 (d,  $^2J_{C-P}$  = 6.2 Hz, P(OCH<sub>2</sub>OR)<sub>2</sub>), 115.4 (CH<sub>Ar</sub>), 119.0 (CH<sub>Ar</sub>), 123.0 (CH<sub>Ar</sub>), 128.5 (CH<sub>Ar</sub>), 128.9 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (CH<sub>Ar</sub>), 129.4 (CH<sub>Ar</sub>), 129.4 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.7 (CH<sub>Ar</sub>), 133.4 (C<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 151.9 (C<sub>Ar</sub>), 168.9 (CO), 176.9 ((*t*-BuCO)<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  31.6

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>11</sub>PS [M+Na]<sup>+</sup> 786.2796, found 786.2776.

**(((3-(*N*-(Benzyloxy)-3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)propanamido)propyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (148b)**



Phosphonic acid **145b** (1 eq, 1.896 g, 3.45 mmol) was dissolved in DMF (6 mL/mmol) and triethylamine (3 eq, 1.42 mL, 10.1 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 min, then chloromethyl pivalate (10 eq, 5 mL, 34 mmol) and sodium iodide (cat., 5mol%) were added. The mixture was heated for 4h at 70°C and then, it was stirred at room temperature overnight with exclusion of light. Et<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O were added and the aqueous layer was extracted 3 times with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) and water (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 55:45 EtOAc/PE to 80:20 EtOAc/PE). The desired product was afforded as a yellow oil (716 mg, 26 %).

R<sub>f</sub> = 0.54 (60:40 DCM/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.19 (s, 18H, ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.70 – 1.92 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.47 (t,  $^3J$  = 5.6 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.84 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.14 (q,  $^3J$  = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.60 (bt,  $^3J$  = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 4.55 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.61 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 5.66 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 5.73 (t,  $^3J$  = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.17 (dd,  $J$  = 7.6, 0.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.20 – 7.25 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 7.31 – 7.38 (m, 3H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd,  $J$  = 8.5, 7.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.57 (dd,  $J$  = 8.6, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.21 – 8.29 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.51 (dt,  $J$  = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

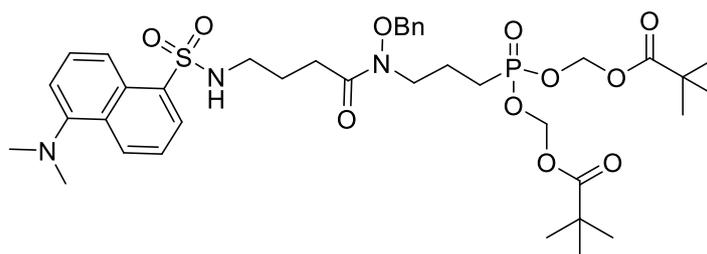
**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  19.8 (d,  $^2J_{C-P}$  = 4.7 Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.8 (d,  $^1J_{C-P}$  = 142 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 26.8 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 32.4 (OCCH<sub>2</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>NH), 38.7 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.2 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 81.4 (d,  $^2J_{C-P}$  = 6.2 Hz, P(OCH<sub>2</sub>OR)<sub>2</sub>),

115.3 (CH<sub>Ar</sub>), 118.9 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.4 (CH<sub>Ar</sub>), 128.8 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.1 (CH<sub>Ar</sub>), 129.2 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.4 (CH<sub>Ar</sub>), 133.8 (C<sub>Ar</sub>), 135.3 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 173.0 (CO), 176.9 ((*t*-BuCO)<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ 31.9

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>PS [M+H]<sup>+</sup> 778.3133, found 778.3147.

**((3-(*N*-(Benzyloxy)-3-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butanamido)propyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (148c)**



Phosphonic acid **145c** (1 eq, 1.713 g, 3.04 mmol) was dissolved in DMF (6 mL/mmol) and triethylamine (3.7 eq, 1.58 mL, 11.2 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 min, then chloromethyl pivalate (12 eq, 5.46 mL, 37.2 mmol) and sodium iodide (cat., 5mol%) were added. The mixture was heated for 4h at 70°C and then, it was stirred at room temperature overnight with exclusion of light. Et<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O were added and the aqueous layer was extracted 3 times with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) and water (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 55:45 EtOAc/PE to 80:20 EtOAc/PE). The desired product was afforded as a yellow oil (753 mg, 31 %).

R<sub>f</sub> = 0.43 (60:40 DCM/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.18 (s, 18H, ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.67 (p, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.73 – 1.96 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.88 (q, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.64 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 4.68 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.42 (bs, 1H, NH), 5.61 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 5.66 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 7.15 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.27 – 7.37 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.49 (dd, *J* = 8.7, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.52 (dd, *J* = 8.8, 7.7 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.20 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.27 (dt, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.50 (dt, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

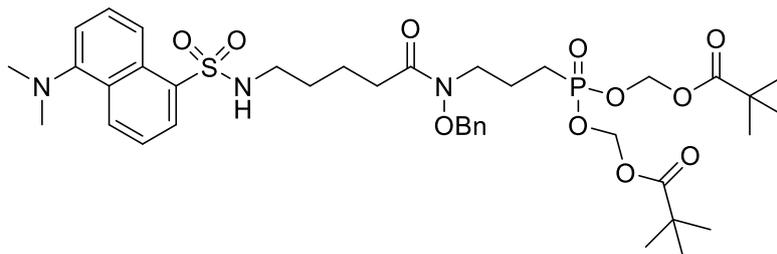
**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 19.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.0 Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 142 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 23.9 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26.8 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 29.4 (OCCH<sub>2</sub>), 38.7 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>NH), 45.3 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 81.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.2 Hz, P(OCH<sub>2</sub>OR)<sub>2</sub>), 115.3 (CH<sub>Ar</sub>), 118.9 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.8

(2 CH<sub>Ar</sub>), 129.0 (CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.2 (CH<sub>Ar</sub>), 134.2 (C<sub>Ar</sub>), 135.0 (C<sub>Ar</sub>), 151.9 (C<sub>Ar</sub>), 174.3 (CO), 176.9 ((*t*-BuCO)<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ 32.1

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>PS [M+H]<sup>+</sup> 792.3289, found 792.3272.

**((3-(*N*-(Benzyloxy)-5-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentanamido)propyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (148d)**



Phosphonic acid **145d** (1 eq, 1.955 g, 3.42 mmol) was dissolved in DMF (6 mL/mmol) and triethylamine (3.3 eq, 1.6 mL, 11.4 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 min, then chloromethyl pivalate (11 eq, 5.6 mL, 38 mmol) and sodium iodide (cat., 5mol%) were added. The mixture was heated for 4h at 70°C and then, it was stirred at room temperature overnight with exclusion of light. Et<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O were added and the aqueous layer was extracted 3 times with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) and water (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 55:45 EtOAc/PE to 80:20 EtOAc/PE). The desired product was afforded as a yellow oil (945 mg, 34 %).

R<sub>f</sub> = 0.47 (80:20 EtOAc/PE)

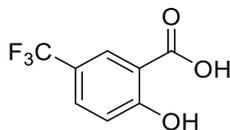
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.20 (s, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.31 – 1.56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.72 – 1.97 (m, 4H, OPCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.25 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>), 2.82 (q, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.64 (t, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NOBn), 4.74 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.08 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, NH), 5.63 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 5.67 (s, 2H, OPOCH<sub>2</sub>), 7.17 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.27 – 7.40 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd, *J* = 8.6, 7.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.55 (dd, *J* = 8.7, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.22 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.30 (dt, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.52 (dt, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 19.9 (bs, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NOBn), 21.0 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 23.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 142 Hz, OPCH<sub>2</sub>), 26.9 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 29.2 (OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.4 (bs, CH<sub>2</sub>NOBn), 38.7 ((C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>NH), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 76.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 81.3 (P(OCH<sub>2</sub>OR)<sub>2</sub>), 115.2 (CH<sub>Ar</sub>), 118.9 (CH<sub>Ar</sub>), 123.2 (CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (CH<sub>Ar</sub>), 128.9 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.1 (CH<sub>Ar</sub>), 129.3 (2 CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (CH<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.3 (CH<sub>Ar</sub>), 134.1 (bs, C<sub>Ar</sub>), 134.9 (C<sub>Ar</sub>), 152.0 (C<sub>Ar</sub>), 174.6 (bs, NCO), 177.0 (2 CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  32.2

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>11</sub>PS [M+Na]<sup>+</sup> 828.3265, found 828.3229.

#### 2-Hydroxy-5-(trifluoromethyl)benzoic acid (185)



Iodocyclohexane (10 eq, 6.3 mL, 48 mmol) was added to a solution of 2-methoxy-5-(trifluoromethyl)benzoic acid (1 eq, 1.062 g, 4.8 mmol) in DMF (1.1 mL/mmol, 5 mL) and the reaction mixture was refluxed for 5h. After completion, the reaction was allowed to cool down to room temperature, was diluted with DCM (15 mL) and was washed multiple times with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (8 x 10 mL). The aqueous layer was then acidified with a 10% HCl solution to a pH around 2 and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to give an orange oil. The crude was then dissolved in EtOAc and the different steps of this workup were repeated at least a second time to give the desired product without purification as a colorless solid (0.909 g, 91 %).

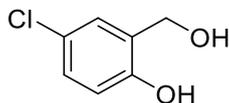
R<sub>f</sub> = 0.20 (100% EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  7.13 (dpseudo-t, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0.63 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.64 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0.63 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.20-8.26 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 10.64 (s, 1H, COOH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  111.1 (C<sub>Ar</sub>), 118.8 (CH<sub>Ar</sub>), 122.3 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 33.7 Hz, C<sub>Ar</sub>CF<sub>3</sub>), 123.5 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 270.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 128.7 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 4.1 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 133.5 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.3 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 164.5 (q, <sup>4</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 1.1 Hz, C<sub>Ar</sub>), 173.5 (CO).

**<sup>19</sup>F NMR (282.4 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_F$  -62.1

#### 4-Chloro-2-(hydroxymethyl)phenol (173c)



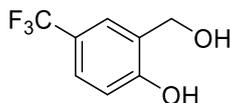
To a solution of 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid (1 eq, 2.372 g, 13.5 mmol) in THF (9 mL/mmol, 120 mL) cooled down to 0°C was added dropwise a 1M solution of LiAlH<sub>4</sub> in THF (1.2 eq, 17 mL) and the reaction mixture was then stirred overnight at room temperature. After completion, the reaction mixture was quenched by addition of a saturated solution of Seignette's salt. The solvent was evaporated and Et<sub>2</sub>O (30 mL) was added. The organic layer was washed with a solution of 10% HCl (15 mL) and brine (15 mL) prior to be dried over

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by automated flash chromatography (from 80:20 PE/EtOAc to 40:60 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (1.764 g, 85 %).

R<sub>f</sub> = 0.32 (70:30 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 2.21 (bs, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6.82 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.02 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.16 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.7 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.30 (PhOH).

### 2-(Hydroxymethyl)-4-(trifluoromethyl)phenol (173d)



To a solution of 2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)benzoic acid **185** (1 eq, 1.545 g, 7.5 mmol) in THF (6.7 mL/mmol, 50 mL) cooled down to 0°C was added dropwise a 1M solution of LiAlH<sub>4</sub> in THF (1.2 eq, 9.0 mL) and the reaction mixture was then stirred overnight at room temperature. After completion, the reaction mixture was quenched by addition of a saturated solution of Seignette's salt. The solvent was evaporated under reduced pressure and Et<sub>2</sub>O (20 mL) was added. The organic layer was washed with a solution of 10% HCl (20 mL) and brine (20 mL) prior to be dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by automated flash chromatography (from 80:20 PE/EtOAc to 40:60 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (1.002 g, 69 %).

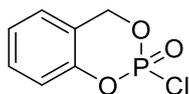
R<sub>f</sub> = 0.53 (60:40 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 2.39 (bs, 1H, OH), 4.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6.96 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.28-7.32 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.47 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0.63 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.85 (bs, 1H, PhOH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 64.4 (CH<sub>2</sub>), 116.9 (CH<sub>Ar</sub>), 122.3 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 32.8 Hz, C<sub>Ar</sub>CF<sub>3</sub>), 124.3 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 271.1 Hz, CF<sub>3</sub>), 124.5 (C<sub>Ar</sub>), 124.9 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.8 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 126.7 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.7 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 159.0 (q, <sup>4</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 1.1 Hz, C<sub>Ar</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (282.4 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>F</sub> -61.5

### 2-Chloro-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (179a)

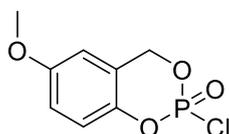


The general procedure **A** was applied to synthesize compound **179a** from 2-(hydroxymethyl)phenol (1 eq, 1.024 g, 8.0 mmol). A  $^{31}\text{P}$ -NMR confirmed the presence of the product obtained as a yellow oil (proportion: 95 %).

R<sub>f</sub> = 0.40 (70:30 PE/EtOAc)

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  -6.0

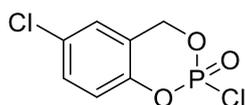
### 2-Chloro-6-methoxy-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (179b)



The general procedure **A** was applied to synthesize compound **179b** from 2-(hydroxymethyl)-4-methoxyphenol (1 eq, 0.913 g, 5.9 mmol) previously synthesized. A  $^{31}\text{P}$ -NMR confirmed the presence of the product obtained as a dark orange oil (proportion: 65 %).

$^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  -5.9

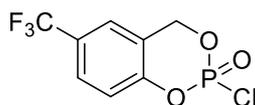
### 2,6-Dichloro-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (179c)



The general procedure **A** was applied to synthesize compound **179c** from saligenol **173c** (1 eq, 1.003 g, 6.3 mmol). A  $^{31}\text{P}$ -NMR confirmed the presence of the product obtained as a yellow solid (proportion: 95 %).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  -6.5

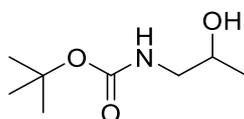
## 2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (179d)



The general procedure **A** was applied to synthesize compound **179d** from saligenol **173d** (1 eq, 1.026 g, 5.3 mmol). A  $^{31}\text{P}$ -NMR confirmed the presence of the product obtained as a yellow oil (proportion: 83 %).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  -6.8

## *tert*-Butyl (2-hydroxypropyl)carbamate (191A)



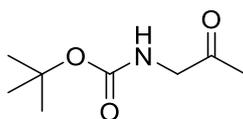
To a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (1.1 eq, 2.839 g, 12.6 mmol) in DCM (16 mL) cooled down to 0°C, 1-amino-2-propanol (1 eq, 0.95 mL, 11.5 mmol) and triethylamine (1.1 eq, 1.77 mL, 12.6 mmol) were added carefully. The mixture was stirred overnight at room temperature. After completion, the reaction was quenched with water (5 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (4 x 2mL) and the combined organic layers were washed with brine (5 mL) prior to be dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated. The desired product was afforded as a colorless oil in a quantitative yield (2.167 g) without further purification and as a mixture of two isomers in a 93:7 ratio.

$R_f$  = 0.30 (70:30 PE/EtOAc)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  1.12 (d,  $^3J$  = 6.7 Hz, 0.3 of 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.15 (d,  $^3J$  = 6.3 Hz, 2.7 of 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.80 (bs, 1H, OH), 2.98 (ddd,  $^1J$  = 14.0 Hz,  $^3J$  = 7.5 Hz,  $^3J$  = 5.6 Hz, 0.93 of 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.24 (ddd,  $^1J$  = 14.0 Hz,  $^3J$  = 6.6 Hz,  $^3J$  = 3.3 Hz, 0.93 of 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.41 – 3.53 (m, 0.07 of 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.54 – 3.65 (m, 0.07 of 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.66 – 3.79 (m, 0.07 of 1H, CH), 3.87 (m, 0.93 of 1H, CH), 4.74 (bs, 0.6 of 1H, NH), 5.05 (bs, 0.88 of 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):  $\delta_c$  20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 48.0 ( $\text{CH}_2$ ), 67.7 (CH), 79.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.9 (CO).

### *tert*-Butyl (2-oxopropyl)carbamate (**192**)



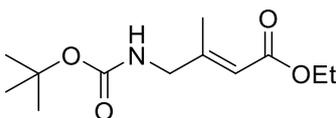
To a solution of *tert*-butyl (2-hydroxypropyl)carbamate **191A** (1 eq, 0.854 g, 4.53 mmol) in DCM (6mL/mmol, 25 mL) was added Dess Martin periodinane (1.1 eq, 2.191 g, 5.01 mmol) and the solution was stirred vigorously. After completion, the mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O and the solvent was evaporated. Then, the crude was dissolved in Et<sub>2</sub>O again and washed with a 1:1 solution of 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and saturated NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), with water (10 mL) and with brine (10 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (65:35 PE/EtOAc). The oil obtained was dissolved in Et<sub>2</sub>O and washed again with the same aqueous solutions as before. The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product was afforded as a yellowish oil (0.563 g, 71 %).

R<sub>f</sub> = 0.43 (70:30 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, OCCH<sub>3</sub>), 4.01 (d, <sup>3</sup>J = 4.9 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 5.22 (bs, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 27.1 (OCCH<sub>3</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 50.9 (CH<sub>2</sub>), 79.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.6 (NCO), 203.6 (CO).

### Ethyl (*E*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbut-2-enoate (**189**)



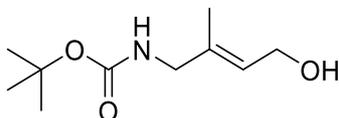
Ethyl 2-(triphenyl-phosphoranylidene)acetate (1.3 eq, 0.636 g, 1.79 mmol) was dissolved in acetonitrile (6 mL) and a solution of *tert*-butyl (2-oxopropyl)carbamate **192** (1 eq, 0.238 g, 1.37 mmol) in acetonitrile (6 mL) was added. The mixture was then heated at reflux (90°C). After completion, the solvent was evaporated. Then, the crude was dissolved in Et<sub>2</sub>O and sonicated to make a white solid precipitate. The solid was filtered and the solvent of the filtrate evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 90:10 PE/EtOAc to 85:15 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (0.225 g, 67 %).

R<sub>f</sub> = 0.34 (85:15 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.26 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.11 (bs, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.77 (d, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.15 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.76 (bs, 1H, NH), 5.76 (*pseudo*-q, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, CH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  14.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 16.8 (CH<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.6 (CH<sub>2</sub>NH), 59.8 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 79.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 114.6 (CH), 155.5 (C<sub>alkene</sub>), 155.7 (NCO), 166.5 (CO)

***tert*-Butyl (*E*)-(4-hydroxy-2-methylbut-2-en-1-yl)carbamate (**188**)**



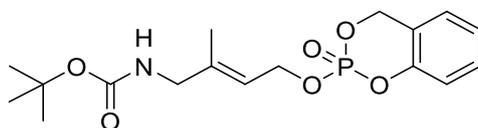
A solution of ester **189** (1 eq, 0.225 g, 0.92 mmol) in DCM (3 mL) was cooled down to -78°C. Boron trifluoride diethyl etherate (1.1 eq, 0.12 mL, 1.01 mmol) was added slowly and the mixture was stirred for 30 min. Then, diisobutylaluminium hydride (3 eq, 2.80 mL, 2.76 mmol) was added dropwise while keeping the temperature at -78°C. After completion, the reaction was allowed to warm to room temperature, quenched with a saturated solution of Seignette's salt (15 mL) and stirred overnight. Then, the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (from 65:35 PE/EtOAc to 60:40 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (0.152 g, 82 %).

R<sub>f</sub> = 0.24 (50:50 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.66 (*pseudo*-q, <sup>4</sup>*J* = 0.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.79 (bs, 1H, OH), 3.65 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.17 (dd, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 0.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.69 (bs, 1H, NH), 5.76 (*t-pseudo*-s, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.4 Hz, CH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  14.6 (CH<sub>3</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.4 (CH<sub>2</sub>NH), 59.0 (CH<sub>2</sub>OH), 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 123.9 (CH), 136.0 (C<sub>alkene</sub>), 156.0 (CO).

***tert*-Butyl (*E*)-(2-methyl-4-((2-oxido-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)but-2-en-1-yl)carbamate (**193a**)**



To a stirred solution of allyl alcohol **188** (1 eq, 280 mg, 1.4 mmol), DMAP (0.4 eq, 68 mg, 0.55 mmol) and Ag<sub>2</sub>O (2.3 eq, 744 mg, 3.2 mmol) in DCM cooled down to -50°C was added dropwise a solution of *cyclo*Sal phosphochloridate **179a** (4.4 eq, 6.3 mmol) in DCM (6 mL). The mixture was allowed to warm to room temperature overnight. Upon reaction completion, the reaction mixture was purified by flash chromatography (PE/Et<sub>2</sub>O, from 50:50 to 5:95) to afford the desired compound (223 mg, 43 %) as a colorless oil.

$R_f = 0.48$  (50:50 PE/Et<sub>2</sub>O).

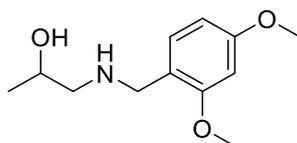
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 4.61 (s, 1H, NH), 4.69 – 4.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 5.31 – 5.37 (*pseudo*-d,  $J = 14.1$  Hz, 2H, POCH<sub>2</sub><sub>cycloSal</sub>), 5.53 (*t-pseudo*-s,  $J = 7.1, 1.4$  Hz, 1H, CH), 7.04 (dd,  $J = 8.1, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.07 (dd,  $J = 7.8, 1.6$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.12 (td,  $J = 7.5, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.27 – 7.35 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  14.9 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.2 (NHCH<sub>2</sub>), 64.7 (d,  $^2J_{C-P} = 5.6$  Hz, POCH<sub>2</sub>), 68.7 (d,  $^2J_{C-P} = 6.9$  Hz, POCH<sub>2</sub>), 79.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 118.6 (d,  $^3J_{C-P} = 5.4$  Hz, CH), 118.9 (d,  $J_{C-P} = 9.0$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 120.8 (d,  $J_{C-P} = 10.0$  Hz, C<sub>Ar</sub>), 124.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.4 (d,  $J_{C-P} = 1.1$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (d,  $J_{C-P} = 1.7$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 140.7 (C<sub>alkene</sub>), 150.7 (d,  $^2J_{C-P} = 6.9$  Hz, OC<sub>Ar(cycloSal)</sub>), 156.0 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta = -9.0$ .

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NNaO<sub>6</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> 392.1233, found 392.1222.

#### 1-((2,4-Dimethoxybenzyl)amino)propan-2-ol (197<sub>A</sub>)

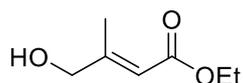


A solution of 2,4-dimethoxybenzaldehyde (1 eq, 0.848 g, 5 mmol) and 1-amino-2-propanol (1 eq, 0.42 mL, 5 mmol) in DCM (3.5 mL/mmol) was treated with NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.4 eq, 1.561 g, 7.1 mmol) and stirred at room temperature for 1h. After completion, the reaction mixture was quenched with a NaHCO<sub>3</sub> saturated solution, extracted with DCM (4 x 10mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The desired product was afforded as a yellow oil in a quantitative yield (1.126 g) without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.71 (d,  $^3J = 6.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.34 (dd,  $^2J = 12.2$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 2.67 (dd,  $^2J = 12.1$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 2.92 (bs, 2H, OH and NH), 3.73 (d,  $^3J = 2.6$  Hz, 2H, ArCH<sub>2</sub>NH), 3.75-3.79 (m, 1H, CH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.39-6.43 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 6.43-6.47 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.09 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  20.3 (CH<sub>3</sub>), 48.4 (ArCH<sub>2</sub>NH), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 55.6 (CHCH<sub>2</sub>), 65.1 (CH), 98.6 (CH<sub>Ar</sub>), 103.7 (CH<sub>Ar</sub>), 120.2 (C<sub>Ar</sub>), 130.6 (CH<sub>Ar</sub>), 158.7 (C<sub>Ar</sub>), 160.3 (C<sub>Ar</sub>).

### Ethyl (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enoate (201)



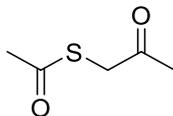
Hydroxyacetone (1 eq, 1.85 mL, 27 mmol) was added to a solution of ethyl 2-(triphenylphosphoranylidene)acetate (1.2 eq, 11.3 g, 32.4 mmol) in acetonitrile (190 mL). The mixture was refluxed (90°C) for 120h. The solvent was evaporated and cold Et<sub>2</sub>O was added until there was no more precipitation. The solid was filtered and the filtrate evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (70:30 PE/AcOEt) and the desired product was afforded as a pale-yellow oil (1.870 g, 48 %).

R<sub>f</sub> = 0.38 (70:30 PE/AcOEt).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.27 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.07 (dt, <sup>3</sup>J = 1.4, 0.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.16 (q, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.96 (m, 1H, CH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 14.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 15.6 (CH<sub>3</sub>), 59.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 67.1 (CH<sub>2</sub>OH), 113.8 (CH), 157.1 (C<sub>alkene</sub>), 166.8 (CO).

### S-(2-Oxopropyl) ethanethioate (205)



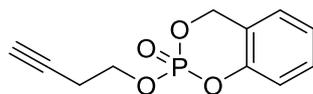
A solution of Br<sub>2</sub> (1 eq, 1 mL, 19.4 mmol) in acetone (33 mL) was prepared and the mixture was cooled down to -15°C. A solution of AcSH (1 eq, 1.5 mL, 19.8 mmol) and triethylamine (1.4 eq, 3.8 mL, 27 mmol) in acetone (6.7 mL) was prepared, cooled down to -15°C and added dropwise to the former solution. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then filtered. The crude product was purified by flash chromatography (from 90:10 PE/EtOAc to 100% EtOAc). The desired product was afforded as a red liquid oil (0.645 g, 25 %).

R<sub>f</sub> = 0.18 (90:10 PE/AcOEt).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COS), 3.74 (s, 1H, SCH<sub>2</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 28.9 (CH<sub>3</sub>CO), 30.2 (CH<sub>3</sub>COS), 39.7 (SCH<sub>2</sub>), 194.3 (SCO), 201.8 (CO).

## 2-(But-3-yn-1-yloxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (182a)



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **182a** from 3-butyn-1-ol (1 eq, 0.5 mL, 6.4 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 70:30 PE/EtOAc to 50:50 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless solid (0.337 g, 22 %).

R<sub>f</sub> = 0.31 (60:40 PE/EtOAc)

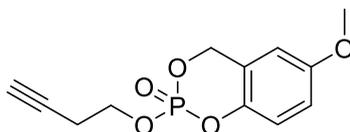
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.96 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.7 Hz, 1H, CH), 2.61 (td, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 4.22-4.36 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.29-5.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 7.07 (t, *J* = 8.3 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 7.13 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.9 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 7.29-7.34 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 20.7 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 66.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 68.7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 70.6 (CH), 79.0 (CCH), 118.8 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 9.1 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 120.6 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 9.9 Hz, C<sub>Ar</sub>), 124.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.3 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 1.1 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 129.8 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 1.7 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 150.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, OC<sub>Ar</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.9

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 239.0468, found 239.0486.

## 2-(But-3-yn-1-yloxy)-6-methoxy-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (182b)



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **182b** from 3-butyn-1-ol (1 eq, 0.1 mL, 1.34 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 60:40 PE/EtOAc to 50:50 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (0.225 g, 62 %).

R<sub>f</sub> = 0.41 (50:50 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.97 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.7 Hz, 1H, CH), 2.60 (td, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.7 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.15-4.35 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.20-4.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 6.57 (d, *J* = 3.0 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 6.79-6.87 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 6.99 (d, *J* = 8.9 Hz, CH<sub>Ar</sub>).

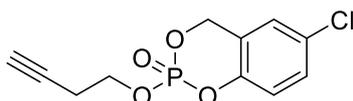
**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 20.7 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 65.9 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 68.7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 70.5 (CH), 79.0

(CCH), 110.1 (bs, CH<sub>Ar</sub>), 115.0 (d,  $J_{C-P} = 1.6$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 119.6 (d,  $J_{C-P} = 9.1$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 121.2 (d,  $^3J_{C-P} = 10.0$  Hz, C<sub>Ar</sub>), 143.8 (d,  $^2J_{C-P} = 6.9$  Hz, OC<sub>Ar</sub>), 156.0 (C<sub>Ar</sub>OCH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  -9.6

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 269.0573, found 269.0593.

### 2-(But-3-yn-1-yloxy)-6-chloro-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (182c)



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **182c** from 3-butyn-1-ol (1 eq, 0.17 mL, 2.18 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 70:30 PE/EtOAc to 60:40 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless solid (0.439 g, 77 %).

R<sub>f</sub> = 0.24 (60:40 PE/EtOAc)

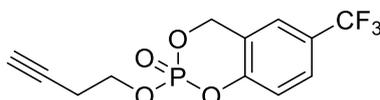
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.97 (t,  $^4J = 2.7$  Hz, 1H, CH), 2.61 (td,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^4J = 2.7$  Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 4.20 - 4.37 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.22 - 5.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 7.00 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.06 - 7.10 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.25-7.30 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  20.7 (d,  $^3J_{C-P} = 6.8$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 66.3 (d,  $^2J_{C-P} = 5.6$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 68.1 (d,  $^2J_{C-P} = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>OP), 70.6 (CH), 78.9 (CCH), 120.2 (d,  $J_{C-P} = 9.4$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 119.6 (d,  $^3J_{C-P} = 9.9$  Hz, C<sub>Ar</sub>), 125.2 (d,  $J_{C-P} = 1.1$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 129.8 (d,  $J_{C-P} = 1.5$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 148.7 (d,  $^2J_{C-P} = 6.9$  Hz, OC<sub>Ar</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  -10.3

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>ClKO<sub>4</sub>P [M+K]<sup>+</sup> 310.9637, found 310.9647.

### 2-(But-3-yn-1-yloxy)-6-(trifluoromethyl)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (182d)



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **182d** from 3-butyn-1-ol (1 eq, 0.013 mL, 0.17 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 70:30 PE/EtOAc to 60:40 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (0.047 g, 90 %).

R<sub>f</sub> = 0.38 (70:30 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.96 (t,  $^4J = 2.6$  Hz, 1H, CH), 2.62 (td,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^4J = 2.6$  Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 4.42 - 4.19 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.54 - 5.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 7.16 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.41 - 7.34 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.59 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

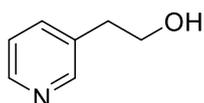
**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  20.7 (d,  $^3J_{C-P} = 6.7$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 66.5 (d,  $^2J_{C-P} = 5.7$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 68.2 (d,  $^2J_{C-P} = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>OP), 70.7 (CH), 78.8 (CCH), 119.4 (d,  $J_{C-P} = 9.3$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 121.1 (d,  $^3J_{C-P} = 10.1$  Hz, C<sub>Ar</sub>), 122.9 (q,  $^3J_{C-F} = 3.7$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 123.5 (q,  $^1J_{C-F} = 271.9$  Hz, CF<sub>3</sub>), 126.8 (q,  $^2J_{C-F} = 33.7$  Hz, C<sub>Ar</sub>CF<sub>3</sub>), 127.0-127.2 (m, CH<sub>Ar</sub>), 152.6 (bdd,  $^2J_{C-P} = 6.7$ ,  $^5J_{C-F} = 1.5$  Hz, OC<sub>Ar</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  -10.7

**<sup>19</sup>F NMR (282.4 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_F$  -62.2

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 307.0342, found 307.0368.

## 2-(Pyridin-3-yl)ethan-1-ol (208)



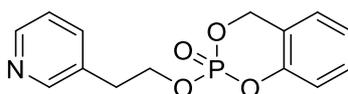
To a solution of ethyl 2-(pyridin-3-yl)acetate (1 eq, 0.46 mL, 3.0 mmol) in THF (6 mL/mmol, 18 mL) cooled down to 0°C was added dropwise a 1M solution of LiAlH<sub>4</sub> in THF (1.1 eq, 3.3 mL) and the reaction mixture was then stirred at room temperature for 3h. After completion, the reaction mixture was cooled down to 0°C, quenched with a saturated solution of Seignette's salt and allowed to warm to room temperature for 30 min. Then, Et<sub>2</sub>O (10 mL) was added and after separation of the layers, the aqueous one was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by automated flash chromatography (from 100% EtOAc to 90:10 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a yellowish oil (0.327 g, 88 %).

R<sub>f</sub> = 0.24 (90:10 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  2.67 (bs, 1H, OH), 2.85 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 3.87 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 7.21 (dd,  $^3J = 7.7$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.56 (d-*pseudo*-t,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8.32-8.47 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  36.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 62.9 (CH<sub>2</sub>OH), 123.4 (CH<sub>Ar</sub>), 134.7 (C<sub>Ar</sub>), 136.8 (CH<sub>Ar</sub>), 147.5 (CH<sub>Ar</sub>), 150.1 (CH<sub>Ar</sub>).

## 2-(2-(Pyridin-3-yl)ethoxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (183a)



The general procedure **B** with workup 2 was applied to synthesize compound **183a** from 2-(pyridin-3-yl)ethan-1-ol **208** (1 eq, 0.205 g, 1.66 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 98:2 EtOAc/MeOH to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a colorless oil (0.107 g, 22 %).

R<sub>f</sub> = 0.29 (95:5 EtOAc/MeOH)

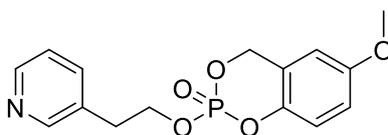
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 3.02 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>pyr), 4.32-4.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 5.12-5.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 6.96-7.06 (m, 2H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.11 (*pseudo*-td, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.17 (ddd, *J* = 7.8, 4.8, 0.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 7.26-7.34 (m, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.46-7.54 (m, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.46 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 33.9 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>pyr), 68.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 5.9 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 68.6 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 118.7 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 8.9 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 120.5 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 10.0 Hz, C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 123.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 124.3 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 125.3 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 1.0 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 129.8 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 1.8 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 132.4 (C<sub>Ar-pyr</sub>), 136.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 148.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 150.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.9 Hz, OC<sub>Ar-cycloSal</sub>), 153.3 (CH<sub>Ar-cycloSal</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.8

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 292.0733, found 292.0735.

## 6-Methoxy-2-(2-(pyridin-3-yl)ethoxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (183b)



The general procedure **B** with workup 2 was applied to synthesize compound **183b** from 2-(pyridin-3-yl)ethan-1-ol **208** (1 eq, 0.084 g, 0.68 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 100% EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a colorless oil (0.057 g, 23 %).

R<sub>f</sub> = 0.25 (95:5 EtOAc/MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, chloroform-*d*):** δ 2.99 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>pyr), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.28-4.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 5.06-5.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 6.51 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 6.76-6.82 (m, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 6.87-6.93 (m, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 7.13-7.20 (m, 2H,

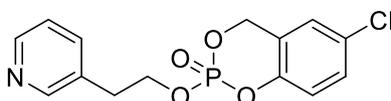
CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.48 (dt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.41 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.45 (dd, J = 4.9 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 33.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>pyr), 55.6 (OCH<sub>3</sub>), 68.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 68.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 110.1 (bs, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 115.0 (d, J<sub>C-P</sub> = 1.6 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 119.5 (d, J<sub>C-P</sub> = 9.1 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 121.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 10.0 Hz, C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 123.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 132.4 (C<sub>Ar-pyr</sub>), 136.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 143.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, OC<sub>Ar-cycloSal</sub>), 148.3 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 150.3 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 156.0 (C<sub>Ar-cycloSal</sub>OCH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.6

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 322.0838, found 322.0845.

### 6-Chloro-2-(2-(pyridin-3-yl)ethoxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (183c)



The general procedure **B** with workup 2 was applied to synthesize compound **183c** from 2-(pyridin-3-yl)ethan-1-ol **208** (1 eq, 0.118 g, 0.93 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 100% EtOAc to 95:5 EtOAc/MeOH). The desired product was afforded as a colorless oil (0.047 g, 15 %).

R<sub>f</sub> = 0.59 (95:5 EtOAc/MeOH)

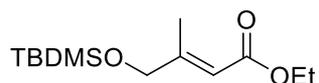
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 3.01 (t, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>pyr), 4.31-4.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 5.10-5.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 6.91 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.00 (d, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 7.14-7.26 (m, 2H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.49 (dt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.42 (d, J = 2.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>), 8.46 (dd, J = 4.9 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, CH<sub>Ar-pyr</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 33.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>pyr), 68.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 68.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.9 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>pyr), 120.1 (d, J<sub>C-P</sub> = 9.2 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 121.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 10.1 Hz, C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 123.5 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 125.3 (d, J<sub>C-P</sub> = 1.0 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 129.6 (C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 129.8 (d, J<sub>C-P</sub> = 1.5 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 132.3 (C<sub>Ar-pyr</sub>), 136.4 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 148.3 (CH<sub>Ar-pyr</sub>), 148.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.9 Hz, OC<sub>Ar-cycloSal</sub>), 150.2 (CH<sub>Ar-pyr</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -10.4

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 326.0343, found 326.0348.

Ethyl (*E*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbut-2-enoate (**236**)

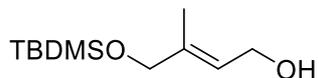


To a solution of alcohol **201** (1 eq, 0.635 g, 4.4 mmol) in DCM (6.2 mL) was added TBDMSCl (1.2 eq, 0.796 g, 5.28 mmol). The solution was cooled down to 0°C, DMAP (0.05 eq, 0.027 g, 0.22 mmol) and triethylamine (1.2 eq, 0.74 mL, 5.28 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 3h at room temperature. After completion, brine (20 mL) was added and the product was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with NH<sub>4</sub>Cl (2 x 7 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The desired product was afforded as a yellow oil (0.796 g, 70 %) without further purification.

R<sub>f</sub> = 0.90 (70:30 PE/AcOEt)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 0.08 (s, 6H, CH<sub>3</sub>SiCH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 1.28 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.05 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OTBS), 4.16 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.98 (m, 1H, CH).

(*E*)-4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbut-2-en-1-ol (**234**)



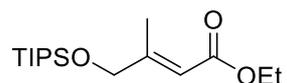
To a solution of ester **236** (1 eq, 0.796 g, 3.08 mmol) in THF (31 mL) cooled down at -78°C, DIBAL-H (4 eq, 12.32 mL of a 1M solution in THF, 12.32 mmol) was added dropwise and the solution was stirred overnight at room temperature. After completion, a saturated solution of Seignette's salt (20 mL) was added and the product was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The crude was purified by flash chromatography (85:15 PE/AcOEt). The desired product was afforded as a colorless oil (0.351 g, 62 %).

R<sub>f</sub> = 0.52 (70:30 PE/AcOEt)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 0.07 (s, 6H, CH<sub>3</sub>SiCH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 1.65 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OSi), 4.21 (dq, <sup>3</sup>J = 6.9, 1.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5.68 (m, 1H, CH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> -5.3 (CH<sub>3</sub>SiCH<sub>3</sub>), 13.5 (CH<sub>3</sub>), 18.4 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 25.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 59.2 (CH<sub>2</sub>OH), 67.7 (CH<sub>2</sub>O), 122.5 (CH), 138.4 (C<sub>alkene</sub>).

Ethyl (*E*)-3-methyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)but-2-enoate (**239**)

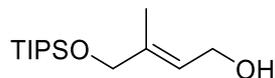


To a solution of alcohol **201** (1 eq, 0.765 g, 5.31 mmol) in DCM (7.6 mL) was added TIPSCl (1.2 eq, 1.42 mL, 6.37 mmol). The solution was cooled down to 0°C, DMAP (0.05 eq, 0.033 g, 0.266 mmol) and triethylamine (1.2 eq, 0.9 mL, 6.37 mmol) were added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After completion, brine (20 mL) was added and the product was extracted with DCM (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with NH<sub>4</sub>Cl (2 x 15 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The desired product was afforded as a yellow oil (1.154 g, 60 %) without further purification.

R<sub>f</sub> = 0.64 (85:15 PE/AcOEt)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*): δ 1.23 – 1.00 (m, 21H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH)<sub>3</sub>Si), 1.28 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.05 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.16 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OTIPS), 6.05 (m, 1H, CH).

(*E*)-3-Methyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)but-2-en-1-ol (**240**)



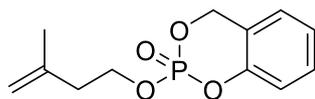
To a solution of ester **239** (1 eq, 1.154 g, 3.84 mmol) in THF (38 mL) cooled down at -78°C, DIBAL-H (4 eq, 15.2 mL of a 1M solution in THF, 15.2 mmol) was added dropwise. The solution was stirred overnight at room temperature. A saturated solution of Seignette's salt (30 mL) was added and the product was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 30 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The crude was purified by flash chromatography (85:15 PE/AcOEt). The desired product was afforded as a colorless oil (0.652 g, 66 %).

R<sub>f</sub> = 0.37 (85:15 PE/AcOEt)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*): δ 1.16 – 1.02 (m, 21H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH)<sub>3</sub>Si), 1.65 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OTIPS), 4.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5.73 (m, 1H, CH).

<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*): δ<sub>c</sub> 12.0 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH)<sub>3</sub>Si), 13.5 (CH<sub>3</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH)<sub>3</sub>Si), 59.2 (CH<sub>2</sub>OH), 67.6 (CH<sub>2</sub>OTIPS), 122.1 (CH), 138.5 (C<sub>alkene</sub>).

## 2-((3-Methylbut-3-en-1-yl)oxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (250)



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **250** from 3-méthyl-3-buten-1-ol (1 eq, 0.5 mL, 4.9 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 80:20 PE/EtOAc to 60:40 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a yellowish oil (1.230 g, 98 %).

R<sub>f</sub> = 0.33 (70:30 PE/EtOAc)

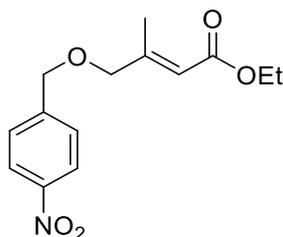
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.72 (bs, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.41 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 4.22-4.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 4.68-4.73 (m, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.76-4.81 (m, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 5.24-5.39 (m, 2H, ArCH<sub>2</sub>OP), 7.00-7.16 (m, 3H, CH<sub>Ar</sub>), 7.27-7.35 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 22.3 (CH<sub>3</sub>), 38.2 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 66.8 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 68.6 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, ArCH<sub>2</sub>OP), 113.0 (C=CH<sub>2</sub>), 118.7 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 9.0 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 120.7 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 10.0 Hz, C=CH<sub>2</sub>), 124.2 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (bs, CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 1.7 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 140.6 (C<sub>Ar</sub>), 150.2 (C<sub>Ar</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.6

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>KO<sub>4</sub>P [M+K]<sup>+</sup> 293.0339, found 293.0342.

## Ethyl (*E*)-3-methyl-4-((4-nitrobenzyl)oxy)but-2-enoate (251)



To a solution of nitrobenzylbromide (1.9 eq, 400 mg, 1.85 mmol) in DCM (5 mL) was added Ag<sub>2</sub>O (1.4 eq, 351 mg, 1.52 mmol) followed by a solution of ester **201** (1 eq, 154 mg, 1.07 mmol) in DCM (1 mL). The reaction mixture was heated at reflux for 24 h. Ag<sub>2</sub>O (1 eq, 231 mg, 1 mmol) was added to the reaction mixture which was then heated for 3 days to ensure full conversion. After completion, the mixture was filtered and evaporated. The crude was purified by flash chromatography (90:10 PE/EtOAc) to afford the desired compound (190 mg, 64 %).

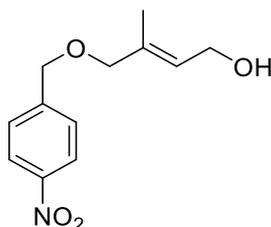
R<sub>f</sub> = 0.24 (90:10 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.29 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.16 – 2.11 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.07 – 4.03 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.18 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.63 (s, 2H,

ArCH<sub>2</sub>O), 6.00 (*pseudo-s*,  $J = 1.5$  Hz, 1H, CH), 7.52 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):  $\delta_c$  14.5 (CH<sub>3</sub>), 16.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 60.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 71.4 (OCH<sub>2</sub>), 74.9 (OCH<sub>2</sub>), 115.9 (CH), 123.9 (CH<sub>Ar</sub>), 127.8 (CH<sub>Ar</sub>), 145.5 (C<sub>Ar</sub>), 147.6 (C<sub>Ar</sub>), 153.7 (C<sub>alkene</sub>), 166.6 (CO).

**(*E*)-3-Methyl-4-((4-nitrobenzyl)oxy)but-2-en-1-ol (235)**



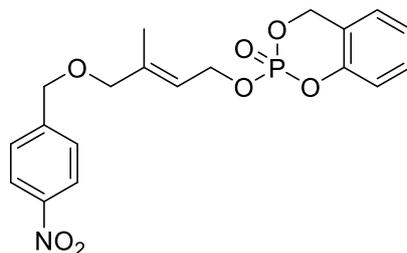
A solution of DIBAL-H (4.2 eq, 1.0 M in THF, 1.5 mL, 1.5 mmol) was added dropwise to a solution of ester **251** (1 eq, 100 mg, 0.36 mmol) in THF (3.25 mL) at -78°C. The mixture was allowed to warm up to room temperature overnight. After completion, the reaction mixture was cooled down to 0°C, carefully quenched by the addition of a saturated solution of Seignette's salt and extracted several times with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with water, brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to afford the desired compound (72 mg, 84 %) without further purification.

$R_f = 0.35$  (50:50 PE/EtOAc)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  1.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.25 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.58 (s, 2H, ArCH<sub>2</sub>O), 5.71 (t-*pseudo-s*,  $J = 6.7, 1.4$  Hz, 1H, CH), 7.51 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.21 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):  $\delta_c$  14.2 (CH<sub>3</sub>), 59.2 (CH<sub>2</sub>OH), 70.8 (CH<sub>2</sub>O), 76.1 (CH<sub>2</sub>O), 123.8 (CH<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH), 127.8 (CH<sub>Ar</sub>), 135.2 (C<sub>Ar</sub>), 146.1 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (C<sub>alkene</sub>).

**(E)-2-((3-Methyl-4-((4-nitrobenzyl)oxy)but-2-en-1-yl)oxy)-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (233a)**



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **233a** from alcohol **235** (1 eq, 0.096 g, 0.40 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography to afford the desired product (0.011 g, 7 %).

$R_f = 0.33$  (50:50 DCM/EtOAc)

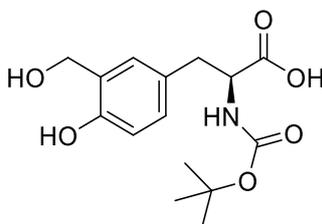
**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta$  1.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.97 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.57 (s, 2H, ArCH<sub>2</sub>O), 4.75 – 4.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 5.35 (*pseudo-d*,  $J = 13.5$  Hz, 2H, POCH<sub>2-cycloSal</sub>), 5.72 (*t-pseudo-s*,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H, CH), 7.03 (dd,  $J = 8.2, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.07 (dd,  $J = 7.6, 1.9$  Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.13 (td,  $J = 7.4, 1.1$  Hz, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.27 – 7.36 (m, 1H, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 7.49 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 8.20 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta_c$  14.2 (CH<sub>3</sub>), 64.6 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$  Hz, POCH<sub>2</sub>), 68.7 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 6.9$  Hz, POCH<sub>2</sub>), 70.9 (OCH<sub>2</sub>), 75.3 (OCH<sub>2</sub>), 118.8 (d,  $J_{\text{C-P}} = 9.0$  Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 120.8 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 10.0$  Hz, CH), 120.9 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.1$  Hz, C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 123.8 (CH<sub>Ar</sub>), 124.4 (CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 125.4 (d,  $J_{\text{C-P}} = 1.1$  Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 127.8 (CH<sub>Ar</sub>), 129.9 (d,  $J_{\text{C-P}} = 1.7$  Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 139.2 (C<sub>alkene</sub>), 145.9 (C<sub>Ar</sub>), 147.5 (CH<sub>Ar</sub>), 150.3 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 7.0$  Hz, OC<sub>Ar-cycloSal</sub>).

**$^{31}\text{P}$  NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):**  $\delta = -9.2$

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:**  $m/z$  calculated for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NNaO<sub>7</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> 428.0870, found 428.0889.

**2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanoic acid (269)**

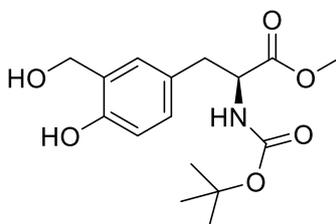


To a solution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine methyl ester (1 eq, 2.200 g, 7.45 mmol) and sodium tetraborate decahydrate (borax) (2 eq, 5.721 g, 14.9 mmol) in water (2.4 mL/mmol, 18 mL) was added a 1M solution of sodium hydroxide (2.3 mL/mmol, 17 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then aqueous formaldehyde (4 eq, 2.23 mL

of a 37% solution, 29.8 mmol) was added and the reaction was stirred at 40°C for 5 days. After completion, the reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and acidified with a 10% HCl solution to pH 2. The suspension was extracted with EtOAc (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with water (20 mL), brine (20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The desired product (1.942 g) was used in the next step without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):** δ 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.70 (dd, <sup>3</sup>J = 13.7 Hz, 10.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 2.88 (dd, <sup>3</sup>J = 13.9 Hz, 4.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 3.96-4.05 (m, 1H, CH), 4.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.94 (bt, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, 1H, NH), 6.64 (d, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 6.90 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 2.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 6.97 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.15 (s, 1H, PhOH).

**Methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanoate (270)**



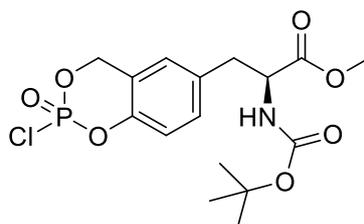
A solution of NaHCO<sub>3</sub> (2 eq, 1.017 g, 12 mmol) and carboxylic acid **269** (1 eq, 1.879 g, 6.0 mmol) in DMF (3 mL/mmol, 18 mL) was stirred at room temperature for 30 min prior to dropwise addition of methyl iodide (2 eq, 0.75 mL, 12 mmol) and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After completion, water (30 mL) was added, and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 15 mL), brine (2 x 15 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was purified by automated flash chromatography (from 60:40 PE/EtOAc to 50:50 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless solid (1.413 g, 69 %).

R<sub>f</sub> = 0.22 (60:40 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.77-3.06 (m, 3H, CH and CH<sub>2</sub>CH), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.96-4.05 (m, 1H, CH), 4.49 (*pseudo*-q, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.75 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5.01 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, NH), 6.72-6.83 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 6.87-6.95 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.54 (bs, 1H, PhOH).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>CHN), 52.3 (OCH<sub>3</sub>), 54.7 (CH), 64.1 (CH<sub>2</sub>OH), 80.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 116.5 (CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (C<sub>Ar</sub>), 127.3 (C<sub>Ar</sub>), 128.7 (CH<sub>Ar</sub>), 130.0 (CH<sub>Ar</sub>), 155.1 (C<sub>Ar</sub>), 155.3 (NCO), 172.6 (CO).

**Methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(2-chloro-2-oxido-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinin-6-yl)propanoate (267)**

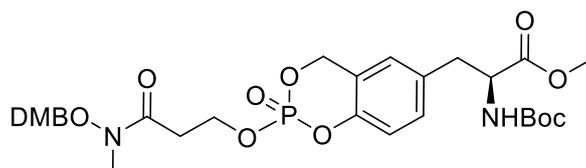


The general procedure **A** was applied to synthesize compound **267** from saligenol **270** (1 eq, 0.939 g, 2.9 mmol). A  $^{31}\text{P}$ -NMR confirmed the presence of the product obtained as a colorless solid (proportion: 71 %).

$R_f = 0.72$  (30:70 PE/EtOAc)

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  -6.0

**Methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(2-(3-(((3,4-dimethylbenzyl)oxy)(methyl)amino)-3-oxopropoxy)-2-oxido-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinin-6-yl)propanoate (271)**



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **271** from *N*-(((3,4-dimethylbenzyl)oxy)-3-hydroxy-*N*-methylpropanamide (1 eq, 0.250 g, 0.93 mmol) previously synthesized. The crude was purified by automated flash chromatography (from 80:20 EtOAc/PE to 100% EtOAc). The desired product was afforded as a colorless solid (0.476 g, 80 %).

$R_f = 0.38$  (10:90 PE/EtOAc)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, chloroform-*d*):  $\delta$  1.39 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.78-2.89 (2H, m, CH<sub>2</sub>CON), 2.94-3.08 (2H, m, ArCH<sub>2</sub>), 3.16 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3.68 (3H, s, CH<sub>3</sub>OCO), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.36-4.48 (2H, m, POCH<sub>2</sub>), 4.77 (2H, s, CH<sub>2</sub>DMB), 5.02 (1H, d,  $^3J = 6.6$  Hz, NH), 5.19-5.38 (2H, m, ArCH<sub>2</sub>OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH<sub>Ar</sub>), 6.82 (1H, s, CH<sub>Ar</sub>), 6.93 (1H, *pseudo*-d,  $J = 8.4$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 7.02 (1H, *pseudo*-d,  $J = 7.8$  Hz, CH<sub>Ar</sub>), 7.17 (1H, *pseudo*-d,  $J = 9$  Hz, CH<sub>Ar</sub>).

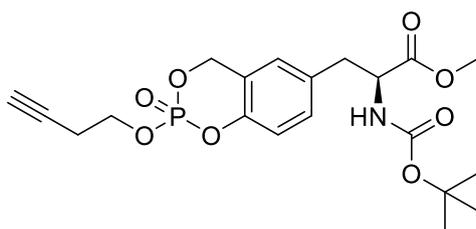
$^{13}\text{C}$  NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):  $\delta_c$  28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.6 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.9$  Hz, CH<sub>2</sub>CON), 33.1 (CH<sub>3</sub>N), 37.4 (ArCH<sub>2</sub>CH), 52.4 (CH<sub>3</sub>OCO), 54.3 (CHN), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 64.2 (d, 5.1 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 68.4 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$  Hz, ArCH<sub>2</sub>OP), 71.1 (CH<sub>2</sub>DMB), 80.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 98.6 (CH<sub>Ar-DMB</sub>), 104.3 (CH<sub>Ar-DMB</sub>), 114.8 (C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 118.7 (d,  $J_{\text{C-P}} = 8.9$  Hz,

CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 120.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 9.4 Hz, C<sub>Ar-cycloSal</sub>), 125.8 (d, J<sub>C-P</sub> = 4.9 Hz, CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 130.5 (CH<sub>Ar-cycloSal</sub>), 132.3 (C<sub>Ar-DMB</sub>), 132.8 (CH<sub>Ar-DMB</sub>), 149.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.7 Hz, POC<sub>Ar-cycloSal</sub>), 155.1 (NCO), 159.7 (C<sub>Ar</sub>OCH<sub>3</sub>), 162.0 (C<sub>Ar</sub>OCH<sub>3</sub>), 171.0 (CONCH<sub>3</sub>), 172.1 (COOCH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.7

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>12</sub>P [M+Na]<sup>+</sup> 661.2132, found 661.2145.

**Methyl 3-(2-(but-3-yn-1-yloxy)-2-oxido-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaphosphinin-6-yl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate (262)**



The general procedure **B** with workup 1 was applied to synthesize compound **262** from 3-butyn-1-ol (1 eq, 0.1 mL, 1.34 mmol). The crude was purified by automated flash chromatography (from 60:40 PE/EtOAc to 40:60 PE/EtOAc). The desired product was afforded as a colorless oil (0.265 g, 45 %).

R<sub>f</sub> = 0.34 (50:50 PE/EtOAc)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, chloroform-*d*):** δ 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.97 (t, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz, 1H, CCH), 2.62 (td, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz, 1H, CCH<sub>2</sub>), 2.97 (dd, <sup>3</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 3.10 (dd, <sup>3</sup>J = 13.9 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.19-4.38 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.49 (*pseudo-q*, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, NCH), 4.98 (d, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, NH), 5.22-5.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 6.81-6.88 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 6.98 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J = 0.9 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.02-7.10 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, chloroform-*d*):** δ<sub>c</sub> 20.7 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>CHN), 52.4 (OCH<sub>3</sub>), 54.3 (CHN), 66.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.8 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 68.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 70.6 (CCH), 79.0 (CCH), 118.8 (d, J<sub>C-P</sub> = 8.7 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 120.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 10.4 Hz, C<sub>Ar</sub>), 125.9 (d, J<sub>C-P</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 130.6 (d, J<sub>C-P</sub> = 5.7 Hz, CH<sub>Ar</sub>), 132.5 (C<sub>Ar</sub>), 149.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.3 Hz, POC<sub>Ar</sub>), 155.0 (NCO), 172.0 (CO).

**<sup>31</sup>P NMR (121.5 MHz, chloroform-*d*):** δ -9.9

**HRMS (EI)<sup>+</sup>:** *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>KNO<sub>8</sub>P [M+K]<sup>+</sup> 478.1028, found 478.1039.

## D. Biological general procedures

### Micro-organisms and culture conditions

*Escherichia coli* XL1 Blue, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were grown at 37°C either in Luria-Bertani medium or in Mueller-Hinton medium with agitation. On Petri dishes, they were plated on Luria-Bertani medium containing 1.5 % agar.

*Mycobacterium smegmatis* DSM43756 (ATCC 19420) was obtained from the Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany). Bacteria were grown aerobically at 37°C in a liquid medium containing 0.4 % yeast extract, 1 % malt extract, 0.2 % CaCO<sub>3</sub> and 0.4 % D-glucose. They were plated on Petri dishes containing the same medium with 1.5 % agar.

### Antimicrobial activity of prodrugs

The antimicrobial activity against *M. smegmatis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* was determined using the paper disc diffusion method in Petri plates or liquid medium in 96-well microplates.

#### Paper disc diffusion method:

One or two bacterial colonies picked from a freshly streaked Petri plate (24h) are inoculated in LB broth and grown until the exponential layer. The culture was then five-fold diluted and 150 µL of the suspension were used to inoculate the Petri plates with pre-sterilized glass beads (3-4 mm). The discs are then deposited with forceps on the surface of the appropriate medium and impregnated with the compounds to be tested and control molecules (fosmidomycin or isoniazid).

Prodrugs, not soluble in water, were dissolved in DMSO (4 mM and 100 mM). Fosmidomycin and isoniazid were dissolved in water (1 mM and 5 mM respectively) and were used as controls for *E. coli* and *M. smegmatis* respectively. DMSO was used as negative control. Paper discs (diameter 6 mm) were impregnated with the prodrug solutions (8 µL), fosmidomycin (2 µL) or isoniazid (6 µL) and placed on Petri dishes. Bacterial growth inhibition was examined after a 24h-incubation at 37°C for *E. coli*, and after a 48h-incubation at 30°C for the mycobacteria. The diameter (in mm) of the circular zone of inhibition around each disc was measured. All tests were duplicated.

#### Antimicrobial activity of prodrugs in liquid medium:

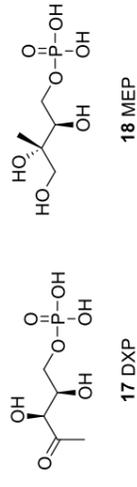
A direct Mueller-Hinton broth suspension (4-5 mL) of isolated bacterial colonies selected from an 18- to 24-hour LB agar plate was prepared. The broth culture was incubated overnight

at 37°C. The cell density of the culture was then adjusted to approximately  $5.10^5$  cells/mL in the same medium.

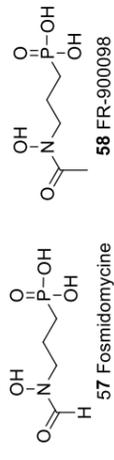
In a 96-well sterile microplate, the compounds to be tested (in DMSO) and the bacterial suspension in Mueller-Hinton broth ( $5.10^5$  cells/mL) were dispensed in a final volume of 150  $\mu$ L. Bacterial suspension was added within 15 min after being adjusted at  $5.10^5$  cells/mL. Final concentrations in the microwells of antimicrobial compounds were 100  $\mu$ M or 2.5 mM and volumes did not exceed 3.75  $\mu$ L/microwell. Positive growth control microwell (bacteria in MH broth), negative growth control (bacteria in MH broth with fosmidomycin), growth control microwell (bacteria in MH broth with DMSO), and sterility control microwell (only MH broth) were included in each test. The microplates were parafilmmed and incubated at 37°C for 24h. Bacterial growth or absence of bacterial growth was detected by the naked eye. All tests were duplicated.

For the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination, the same protocol was used except that for each potential antimicrobial compound to be tested, a two-fold serial dilution was performed. The lowest concentration that completely inhibits bacterial growth was detected by the naked eye. All tests were duplicated.

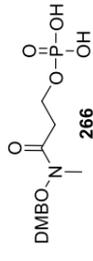
**Substrat et produit de la DXR**



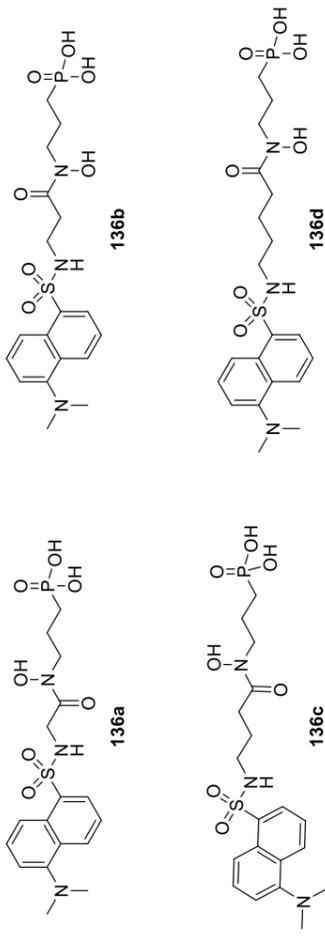
**Inhibiteurs naturels de la DXR**



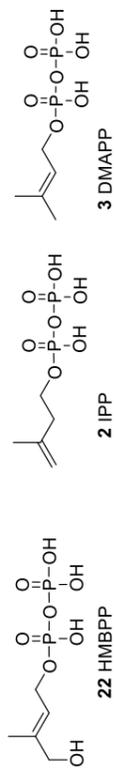
**Inhibiteur phosphate de la DXR**



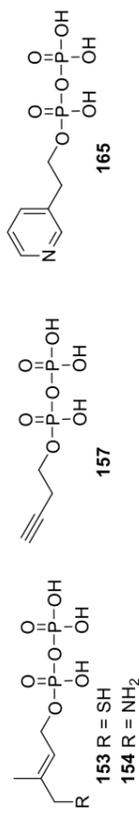
**Inhibiteurs bisubstrats de la DXR**



**Substrat et produits d'Isph (immunostimulants)**



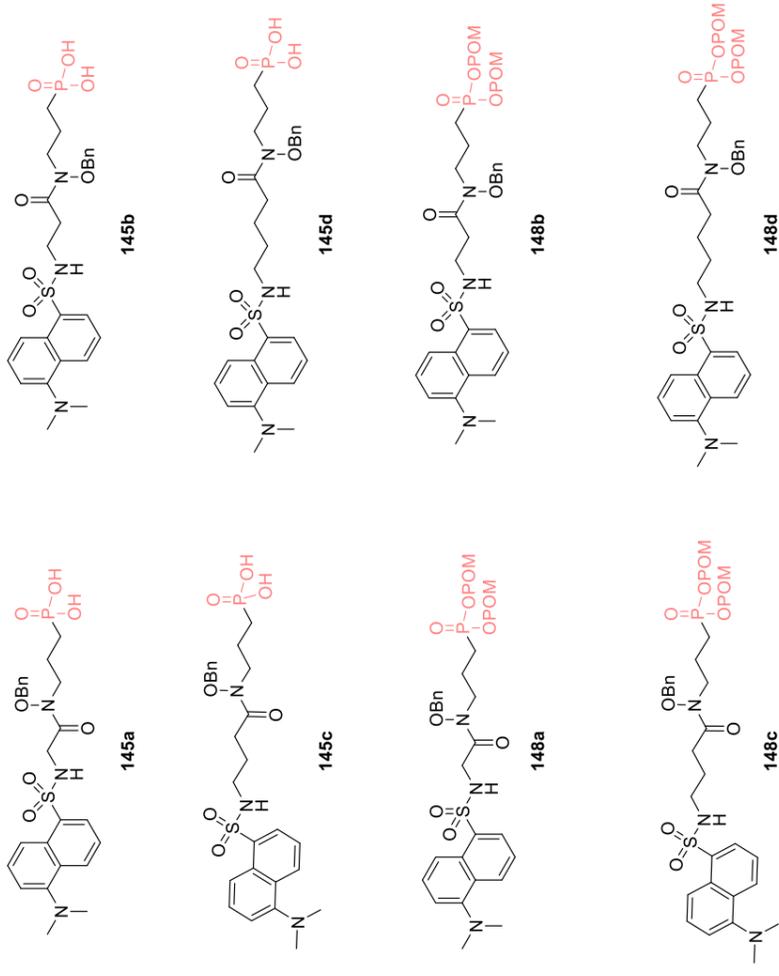
**Inhibiteurs diphosphate d'Isph**



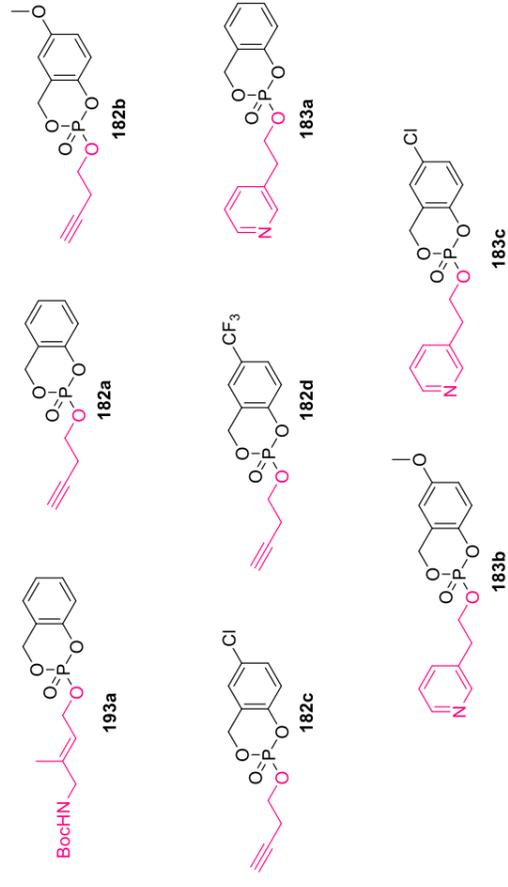


## Chapitre 1 : Prodrogues d'inhibiteurs de la DXR et d'IspH

### Partie 1 : Prodrogues bis(POM) d'inhibiteurs phosphonates de la DXR

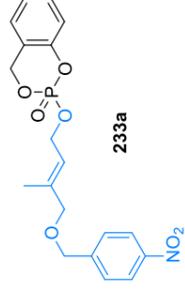
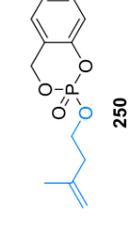


### Partie 2 : Prodrogues cycloSal d'analogues monophosphates d'inhibiteurs d'IspH

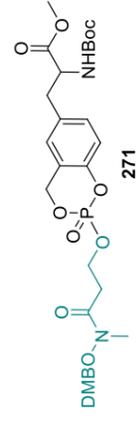
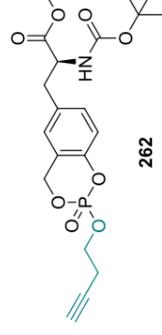




**Chapitre 2 : Prodrogues cyc/oSal d'analogues monophosphates d'immunostimulants**



**Chapitre 3 : Vers la synthèse de prodrogues multimodales Composés intermédiaires - prodrogues cyc/oSal**





## Vers la synthèse de prodrogues multimodales ciblant les bactéries endotumorales : le double rôle de la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

### Résumé

La voie métabolique du méthylérythritol phosphate (MEP), permettant la biosynthèse des isoprénoïdes, est présente chez la majorité des bactéries pathogènes, mais complètement absente chez l'homme. Ainsi, les sept protéines enzymatiques de cette voie sont des cibles potentielles pour le développement d'antibactériens inédits aux effets secondaires minimes. En outre, cette voie de biosynthèse interviendrait dans la réponse immunitaire puisque son dernier intermédiaire, le HMBPP, est un phosphoantigène (PAG) capable de stimuler la prolifération des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. S'appuyant sur cette dualité de fonction, ce travail se propose de concevoir des prodrogues multimodales originales visant à délivrer simultanément un inhibiteur de la voie du MEP et un immunostimulant de manière sélective en conditions hypoxiques afin de pouvoir cibler les bactéries endotumorales. La première partie a été consacrée à la synthèse de prodrogues d'inhibiteurs phosphonates de la DXR, seconde enzyme de la voie du MEP, et de prodrogues *cycloSaligényle* d'analogues monophosphates d'inhibiteurs d'IspH, dernière enzyme de cette voie. Seules les prodrogues *cycloSaligényle* ont pu être obtenues et celles substituées par un Cl ont montré une nette activité antibactérienne chez *M. smegmatis*. En parallèle, la synthèse de prodrogues *cycloSaligényle* du HMBP, précurseur monophosphate du HMBPP, a permis d'obtenir les produits en faible quantité. Enfin, les premières étapes de la synthèse des prodrogues multimodales, contenant à la fois un inhibiteur et un PAG liés par un squelette tyrosine, ont été initiées et les composés intermédiaires obtenus. L'activité antibactérienne de l'ensemble des composés synthétisés a été évaluée vis-à-vis des bactéries *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *M. smegmatis*.

**Mots-clés :** biosynthèse des isoprénoïdes, inhibiteurs de la voie du MEP, phosphoantigènes, synthèse de prodrogues, prodrogues multimodales

### Résumé en anglais

The methylerythritol phosphate (MEP) metabolic pathway, which synthesizes isoprenoids, is present in most pathogenic bacteria, but is absent in humans. Thus, its seven enzymatic proteins are potential targets for developing novel antibacterials with minimal side effects. This pathway is also thought to be involved in the immune response as the final intermediate, HMBPP, is a phosphoantigen (PAG) capable of stimulating the proliferation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Based on this dual function, this work proposes to design original multimodal prodrugs aimed at simultaneously delivering an inhibitor of the MEP pathway and an immunostimulant selectively under hypoxic conditions in order to target endotumoral bacteria. First, the synthesis of phosphonate inhibitor prodrugs of DXR, the second enzyme in the MEP pathway, and *cycloSaligenyl* prodrugs of monophosphate analogs of IspH inhibitors, the last enzyme, was undertaken. Only *cycloSaligenyl* prodrugs could be synthesized and those substituted by a Cl atom showed obvious antibacterial activity in *M. smegmatis*. Second, the synthesis of HMBP *cycloSaligenyl* prodrugs, a monophosphate precursor of HMBPP, enabled to isolate the products in small quantities. Finally, the first steps in synthesizing multimodal prodrugs containing both an inhibitor and a PAG linked by a tyrosine backbone were initiated and intermediate compounds obtained. The antibacterial activity of all synthesized compounds was evaluated against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *M. smegmatis*.

**Keywords:** isoprenoids biosynthesis, MEP pathway inhibitors, phosphoantigens, prodrug synthesis, multimodal prodrugs