THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Mélina CHEBAIKI

Le 13 octobre 2023

Étude de nouveaux inhibiteurs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis* découverts par chimie click *in situ*

École doctorale : **SDM – SCIENCES DE LA MATIÈRE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique

IPBS – Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale

Thèse dirigée par

Christian LHERBET et Lionel MOUREY

Jury

Mme Gwenaëlle André, Directrice de recherche, INRA, Paris, Rapporteure
M. Cyrille Sabot, Directeur de recherche, COBRA, Rouen, Rapporteur
Mme Céline Dereave, Professeure, Université Paul Sabatier Toulouse III, Présidente du jury, Examinatrice
M. Martin Cohen-Gonsaud, Chargé de recherche, CBS, Montpellier, Examinateur
M. Christian Lherbet, Chargé de recherche, SPCMIB, Toulouse, Directeur de thèse
M. Lionel Mourey, Directeur de recherche, IPBS, Co-directeur de thèse
M. Laurent Maveyraud, Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III, Membre invité

À mes parents,

qui m'ont permis de faire des études

À cette rencontre,

qui a suscité mon intérêt pour la chimie médicinale

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire. » Gandhi

« Il vaut mieux échouer dans l'originalité que réussir dans l'imitation. » Herman Melville

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce projet a été possible grâce à la participation de différentes personnes envers qui je voudrais témoigner ma gratitude.

Je tiens tout particulièrement à remercier Christian Lherbet et Lionel Mourey, d'avoir accepté ma candidature en tant que stagiaire qui nous a permis de poursuivre pour une durée de 3 ans, pour leur encadrement, leurs précieux conseils et leur accompagnement sur l'épreuve difficile qu'est la thèse.

Je remercie les rapporteurs, Cyrille Sabot et Gwenaëlle André ainsi que les examinateurs, Céline Dereave et Martin Cohen-Gonsaud d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en espérant que ce projet les passionne tout autant que moi.

Un grand merci à Laurent Maveyraud, Saïda Danoun et Evelyne Delfourne pour leurs aides technique et scientifique sur les différents projets de thèse, leur investissement et leur suivi dans ce travail mais également pour leur gentillesse et leur soutien moral au quotidien.

Je remercie les personnes de l'équipe SySMiC pour leur accueil et leur bonne humeur et également l'ensemble des personnes du SPCMIB en particulier Yves Génisson, son directeur, Muriel Bouscasse pour l'organisation de tous ces petits-déjeuners et goûters qui dans une journée de thésard remontent le moral, Isabelle Fabing et Fernanda Goncalves pour le soutien scientifique de la chimie analytique et en général, merci à tous les autres, pour leur accueil, leur disponibilité et les moments partagés.

De la même manière, un énorme merci à tous les membres de l'équipe GBS de l'IPBS qui ont été de très bons conseils sur le plan scientifique et de très bons professeurs dans un domaine qui m'était inconnu, la biophysique structurale. Merci pour tous les moments conviviaux, votre accueil, votre disponibilité. Également, merci pour votre temps, en particulier la nuit pour tous ces runs synchrotron à passer exclusivement des cristaux d'InhA.

Je remercie l'institut de Chimie de Toulouse (ICT) et particulièrement son plateau technique pour toutes les caractérisations effectuées, RMN, spectroscopie de masse et de l'investissement dont son personnel a fait preuve en cas d'interrogation en particulier Caroline Toppan, Marc Vedrenne et Nathalie Martins-Froment.

Je tenais à remercier les membres de l'IPBS pour leur réactivité et disponibilité. Également, tous les doctorants qui ont contribué à rendre les formations plus intéressantes.

Un grand merci à tous les doctorants et stagiaires présents au SPCMIB qui ont contribué à rendre les journées meilleures en particulier Maëva Chambon, Jon Bouvet, Valentine Guilbaud, Stephen Le Garrec, Emeline Grosjean, Adèle Brison, nos conversations vont me manquer.

Merci à tous mes amis qui m'ont permis des moments de décompression nécessaires, particulièrement Emma, Crystalle et Mylan sans qui mon quotidien de thésarde n'aurait pas été le même.

Je remercie énormément Rasoul pour la transmission de ses connaissances en biologie qui nous a été grandement utile dans ce projet de thèse, merci pour ta patience et ta pédagogie. Mille mercis à Margaux et à Marc pour nos conversations quotidiennes pendant la période de rédaction, sans lesquelles je n'aurais pas gardé le moral. Vous avez été d'un très grand soutien tant sur le plan scientifique que personnel.

Enfin, je tenais à remercier ma famille, mes parents, mes frères, et Samia et Arnaud pour votre encouragement, votre motivation et votre soutien. J'adresse mes plus sincères remerciements à Thomas, qui a su prendre le temps d'écouter mes malheurs et mes petites réussites, de me soutenir, de me motiver, de me nourrir et d'avoir montré son intérêt à ce projet de thèse.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AchE : acétylcholinestérase
ACN : acétonitrile
ACP : Acyl Carrier Protein ou protéine de transport d'acyle
ACQ : Aggregation Caused Quenching
ADN : acide désoxyribonucléique
AG : arabinogalactane
AM : Acide Mycolique
AMK : amikacine
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
BAAR : Bacilles Alcoolo-Acido Résistants
BCG : bacille de Calmette et Guérin
BDQ : bédaquiline
Bn : benzyl
BODIPY : bore-dipyrrométhènes
CBT : 2-cyano-benzothiazole
CCP4 : collaborative computational project no 4
CFZ : clofazimine
CMI : concentration minimale inhibitrice
CoA : coenzyme a
Cryo-EM : cryo-Microscopie Électronique
CS : cyclosérine
CuAAC : Copper (I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée au Cuivre (I)
Da : Dalton
DAD : Diode Array Detector
DBD : *N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole
DCC : Dynamic Combinatorial Chemistry
DCI : Desorption Chemical Ionization
DCM : dichlorométhane
DDCoA : 2-*trans*-dodecenoyl-coenzyme A
DIBAL-H : hydrure de diisobutylaluminium
DLM : délamanide
DMSO : diméthylsulfoxide
DO ou OD : Densité Optique
DSF : fluorimétrie différentielle à balayage
E : éthambutol
EDTA : acide éthylènediaminetrétraacétique
ERAP: reticulum endoplasmic aminopeptidase
ESI : Electron Spray Ionization
ESRF : European Synchrotron Radiation Facility
ETH : éthionamide

EtOAc : acétate d'éthyle
FAD : Flavine Adénine Dinucleotide
FAME : Fatty Acid Methyl Ester
FAS : Fatty Acid Synthase
FBDD : Fragment Based Drug Discovery
FDA : Food and Drug Administration
hCAII : carbonic anhydrase II
HRMS : High-Resolution Mass Spectra
HTS : criblage à haut débit
IC_{50} : concentration inhibitrice médiane
INH : isoniazide
IPM-CLN : imipénème-cilastatine
IPTG : isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
IUCr : International Union of Crystallography
KTGS : Kinetic Target Guided Synthesis
LAM : lipoarabinomanname
LFX : lévofloxacine
LiHMDS : bis(triméthylsilylamidure) de lithium
LZD : linézolide
Me : méthyl
MeOH : méthanol
MFX : moxifloxacine
MmpL : Mycobacterial membrane Protein Large
MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses
MPD : 2-méthyl-2,4-pentane diol
MPM : méropénème
MS : mass spectrometry
Mtb : *Mycobacterium tuberculosis*
MTBC : *Mycobacterium tuberculosis* complexe
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NaAsc : ascorbate de sodium
NBD : nitrobenzofurane
n-BuLi : n-butyllithium
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAS : acide *para*-aminosalicylique
PDB : Protein Data Bank
PEG : polyéthylènes glycols
PG : peptidoglycane
PICT : Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse
PIPES : acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthanesulfonique)
PTH : prothionamide
Pyrazinamide : PZA
PYW : pyridomycine
QTOF : Quadruple Time-Of-Flight

Rf: retention factor ou facteur de rétention
RIF : rifampicine
RMN /NMR : Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD : Root-mean-square deviation
RND : Resistance Nodulation Division
rpm : round per minute ou tour à la minute
RuAAC : Ruthenium-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition ou cycloaddition azoture-alcyne catalysée au ruthénium
SBDD : Structure Based Drug Discovery
SBL : Substrate Binding Loop
SDR : short chain dehydrogenase/reductase
SnAr : substitution nucléophile aromatique
SPR : Résonance Plasmonique de Surface
STR : streptomycine
TA : température ambiante
TBTA : Tris(benzyltriazolylmethyl)amine
TBAF : Fluorure de tétra-n-butylammonium
TCL : triclosan
TDM : tréhaloses dimycolates
TGS : Target Guided Synthesis
THF : tétrahydrofurane
TIPS-Cl : chlorotriisopropylsilane
TLC : thin-layer chromatography
TMM : tréhaloses monomycolates
TRD : térizidone
UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV : Ultraviolets
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS 1

TABLE DES MATIÈRES 5

AVANT-PROPOS 11

INTRODUCTION GÉNÉRALE 13

I La tuberculose 14

I.A Au fil des siècles 14

I.B Généralités sur la tuberculose 15

I.B.1 La pathogenèse 15

I.B.2 Le bacille tuberculeux 16

II La situation épidémiologique actuelle 18

II.A Dans le monde 18

II.B En France 18

II.C Mécanismes et cas de résistance 19

III Les outils de lutte 20

III.A Programme de l'OMS 20

III.B Dépistage et diagnostic 21

III.C Vaccination 21

III.D Les traitements antibiotiques 23

III.D.1 Les antibiotiques de première intention 23

III.D.2 Le groupe A 25

III.D.3 Le groupe B 27

III.D.4 Le groupe C 27

IV L'enveloppe mycobactérienne 29

IV.A Structure multicouche de l'enveloppe de Mtb 29

IV.B Les acides mycoliques 32

V InhA, l'énoyl ACP réductase, la protéine cible 34

V.A Fonction et mécanisme d'action de la protéine 35

V.B Les méthodes de recherche des nouveaux inhibiteurs d'InhA 36

V.B.1 Criblage à haut débit (HTS) 36

V.B.2 La technologie des bibliothèques chimiques codées par ADN 37

V.B.3 Le criblage basé sur les fragments 37

V.C Structure cristallographique de la protéine 40

V.C.1 Comparaison des structures cristallographiques des formes apo et holo 41

V.C.2 Structure cristallographique d'InhA en complexe avec l'analogue du substrat **THT** 46

V.C.3 Structures cristallographiques d'InhA en complexe avec des inhibiteurs 47

CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENT DE SONDES FLUORESCENTES : PROJET SCREEN-IT 65

I Présentation du projet 66

I.A Objectif du projet 66

I.B Conception des molécules 67

I.B.1 Partie dérivée du triclosan 68
I.B.2 Partie fluorophore 69

II Résultats et discussion 71

II.A Synthèse chimique 71
II.A.1 Obtention des précurseurs azotures 71
II.A.2 Obtention des précurseurs alcynes 73
II.A.3 Cycloaddition de Huisgen 74

II.B Tests biologiques 76
II.B.1 Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA 76
II.B.2 Évaluation de la propriété off/on des composés synthétisés 79
II.B.3 Inhibition de la croissance mycobactérienne 81
II.B.4 Inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques 82
II.B.5 Activité cytotoxique 83

II.C Cristallographie aux rayons X 84

III Conclusion et perspectives 87

CHAPITRE 2 : MÉTHODE DE DÉCONSTRUCTION-RECONSTRUCTION POUR LA DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE FAMILLE D'INHIBITEURS DE LA PROTÉINE INHA 89

I Présentation du projet 90

I.A Objectif du projet 90

I.B Conception des molécules 91

II Résultats et discussion 96

II.A Synthèse chimique 96
II.A.1 Obtention des précurseurs azotures 96
II.A.2 Obtention des précurseurs alcynes 96
II.A.3 Cycloaddition de Huisgen 98

II.B Tests biologiques 100
II.B.1 Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA 100
II.B.2 Inhibition de la croissance mycobactérienne 102
II.B.3 Inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques 102
II.B.4 Activité cytotoxique 103

II.C Cristallographie aux rayons X 104

III Conclusion et perspectives 105

CHAPITRE 3 : APPROCHE GUIDÉE PAR LA CIBLE, MISE AU POINT DE LA KTGS 107

I Présentation du projet 108

I.A Objectif du projet 108

I.B Conception des molécules 112

II Résultats et discussion 113

II.A Mise au point de la KTGS 113

II.B Essais de KTGS 116

III Conclusion et perspectives 124

CHAPITRE 4 : MACROCYCLISATION IN SITU 125

I Présentation du projet 126

I.A Objectif du projet 126

I.B Conception des molécules 128

II Résultats et discussion 129

II.A Synthèse chimique 129

II.A.1 Synthèse des précurseurs bis-azotures 129
II.A.2 Réaction de chimie click entre bis-azotures et bis-alcynes 130
II.A.3 Synthèse des précurseurs mono-azotures 131
II.A.4 Synthèse des précurseurs dialcynes 132
II.A.5 Synthèse des ligands acycliques monophénols 135
II.A.6 Synthèse des ligands acycliques diphénols et des macrocycles 136

II.B Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA 141

II.C Cristallographie aux rayons X 143

III Conclusion et perspectives 149

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES 151

ASPECTS METHODOLOGIQUES 154

I. Production et purification de la protéine InhA 155

A. La transformation 155

B. Préculture et culture bactérienne 156

C. Expression 157

D. Purification de la protéine 157

1. Chromatographie d'affinité 157
2. Colonne de dessalage 158
3. Clivage de l'étiquette hexahistidine et deuxième étape de chromatographie d'affinité 158
4. Chromatographie d'exclusion de taille 159

II. Évaluation de l'activité de la protéine InhA 159

III. Évaluation de l'inhibition de la croissance mycobactérienne 161

IV. Cristallisation 161

A. Principe de la cristallogenèse 161

B. Techniques de cristallisation 162

1. La dialyse 162
2. La diffusion de vapeur 163

C. Cristallisation de complexes protéine-cofacteur-ligand 165

D. Congélation des cristaux 165

V. Cristallographie des rayons X 166

A. Un petit peu d'histoire sur la cristallographie aux rayons X 167

B. La caractérisation d'un cristal 169

C. La diffraction des rayons X par les cristaux 170

D. Enregistrement des données 172

E. Résolution de la structure cristallographique 174

1. Le traitement et analyse des données 175
2. Résolution et affinement de la structure 176

PARTIES EXPERIMENTALES 182

I Chemistry 183

I.A Chemical synthesis of chapter 1 183
I.A.1 Azide precursors 183
I.A.2 Alkyne precursors 189
I.A.3 Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition 192
I.A.4 Ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition 200

I.B Chemical synthesis of chapter 2 202
I.B.1 Azide precursor 202
I.B.2 Alkyne precursors 202
I.B.3 Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition 210
I.B.4 Ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition 219

I.C Chapter 3 220
I.C.1 Sample preparation 220
I.C.2 UHPLC-HRMS analysis 221
I.C.3 High-resolution mass spectrometry (HR-MS) experiments 221

I.D Chemical synthesis of chapter 4 221
I.D.1 Bis-azide precursors 221
I.D.2 Mono-azide precursors 225
I.D.3 Alkyne precursors 229
I.D.4 Copper-catalyzed alkyne azide cycloaddition 232
I.D.5 Macrocyclisation *in situ* assays 256

II Biology 257

II.A Transformation and production of InhA protein 257
II.A.1 Materials 257
II.A.2 Transformation and preparation stock solution 257
II.A.3 Bacterial culture and expression of InhA protein 258

II.B Purification of InhA protein 258
II.B.1 Materials 258
II.B.2 Protocols 259

II.C Evaluation of InhA enzyme inhibition 263

II.D Crystallization and structure determination 264
II.D.1 Materials 264
II.D.2 Solutions 265
II.D.3 Synchrotron facilities 265
II.D.4 Protocols 265

II.E Inhibition of mycobacterial growth 266
II.E.1 Collaboration with IPBS 266
II.E.2 Collaboration with Italy 266

II.F Inhibition of mycolic acid biosynthesis 267

II.G Analysis of sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG/InhA/HadABC 267

II.H Cell viability assays 268

STRUCTURE CHIMIQUE DES MOLÉCULES FINALES 269

Composés finaux décrits dans le chapitre 1 270

Composés finaux décrits dans le chapitre 2 271

Composés finaux décrits dans le chapitre 4 272

TABLES DES ILLUSTRATIONS 273

I Table des figures 274

II Table des tableaux 280

III Table des schémas 281

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 282

AVANT-PROPOS

La tuberculose est une maladie qui existe depuis des millénaires. Elle est l'une des pathologies les plus meurtrières au monde, causant encore chaque année plus de 1,4 million de décès. Le traitement antituberculeux effectif depuis les années 1950 a montré une réelle efficacité, cependant de nombreuses résistances sont rapidement survenues. La structure de l'enveloppe cellulaire mycobactérienne permet de comprendre la difficulté rencontrée pour le développement de nouveaux médicaments antituberculeux, sa grande imperméabilité lui confère une protection importante. La stratégie de cibler la biosynthèse de cette enveloppe a été validée depuis de nombreuses années. Les enzymes qui composent la voie de synthèse des acides gras du système FAS-II sont spécifiques des mycobactéries et constituent donc des cibles privilégiées. Parmi ces enzymes, on retrouve l'énoyl ACP réductase, InhA. Cette protéine a fait l'objet de nombreuses études depuis une trentaine d'années et est la cible de l'isoniazide, le principal médicament antituberculeux. L'isoniazide, agissant comme une prodrogue, activé au préalable par l'enzyme catalase-peroxydase KatG est un inhibiteur indirect de l'enzyme. De nombreuses études se sont alors orientées vers le développement d'inhibiteurs directs afin de s'affranchir d'une activation préalable. Plusieurs familles d'inhibiteurs ont alors vu le jour, la plus grande d'entre elles est constituée de composés biaryléthers, dérivés de la molécule de triclosan (**TCL**). Les structures cristallographiques de complexes avec les ligands biaryléthers ont permis de visualiser les interactions de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du cofacteur NAD(H) et la formation d'une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158 de la protéine, constituant une ancre dans le site actif.

Dans ce contexte, ce projet de thèse, à l'interface de la chimie et de la biologie, portant sur l'étude de la protéine InhA comme cible pour de nouveaux antituberculeux dérivés de la molécule du **TCL** a été mené au sein de deux laboratoires toulousains, le laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), dans l'équipe de *Chimie de Synthèse pour la synthèse et Chimie en Milieux Confinés* (SySMiC) et l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) dans le groupe de *Biophysique Structurale* (GBS). Ces travaux ont porté sur la synthèse et l'évaluation inhibitrice de nouvelles séries de molécules contre InhA et la croissance mycobactérienne. Des études structurales de la protéine InhA cristallisée en complexe avec ces molécules ainsi que l'application de nouvelles méthodes de criblage de la protéine ont été menées.

L'étude bibliographique présentée dans l'introduction de ce manuscrit sera consacrée à une présentation générale sur la tuberculose et les outils de lutte, à la description de l'enveloppe mycobactérienne ainsi qu'à la protéine cible InhA.

Les travaux de thèse ont été différenciés en 4 projets et sont présentés en autant de chapitres. Ainsi, le chapitre 1 sera dédié au développement d'une série d'inhibiteurs d'InhA possédant des propriétés fluorescentes élaborée grâce à une méthode d'hybridation. Le chapitre 2 s'appuie sur une méthode de déconstruction-reconstruction pour le développement d'une autre série d'inhibiteurs dérivée des molécules de **TCL** et d'une autre molécule décrite dans la littérature, le **GEQ**. Enfin, le chapitre 3 s'intéresse à une nouvelle stratégie de recherche d'inhibiteurs de la protéine InhA : l'approche guidée par la cible basée sur la KTGS, en particulier la chimie click *in situ*. Une extension de la réactivité de la chimie click *in situ* vers une application inédite à la macrocyclisation *in situ* sera décrite dans le chapitre 4.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La tuberculose

I.A Au fil des siècles

La tuberculose est une très vieille maladie[1]. L'anthropologie préhistorique a permis de relever des traces de tuberculose osseuse sur des squelettes datant du IIIe millénaire avant Jésus Christ[2]. La maladie est décrite depuis plusieurs centaines d'années par différents noms. Dès la période de l'antiquité gréco-romaine, plusieurs écrits, parmi lesquels ceux d'Hippocrate (V^{e} –IVe siècle avant JC), Galien et Caelius Aurelianus (Ve siècle) et Arétée de Cappadoce (fin du IIe siècle) nomment la tuberculose pulmonaire : phtisie. Elle est appelée par *Schachepheth* dans l'Ancien Testament[3], *cunsumptio* dans les rapports latins de Roman Cicero et *consumption* dans de nombreux mythes occidentaux du XIXe siècle *(la Dame aux Camélias* et *la traviata).* Durant la renaissance, en 1546, Girolamo Fracastoro de Vérone dans son ouvrage *De Contagione et de contatgiosis morbis*, rapporte la phtisie pulmonaire parmi les maladies infectieuses, contagieuses par propagation interhumaine directe[4]. En 1834, Johann Lukas Schönlein propose un nom unique « la tuberculose » due à la présence de tubercules dans toutes les formes de la maladie[5]. Ce n'est qu'à partir du XVIIIe siècle que la maladie commence à être identifiée, notamment grâce à Gaspard Laurent Bayle, médecin français, qui publia en 1810, ses *Recherches sur la phtisie pulmonaire*. Il y détaille la granulation miliaire tuberculeuse comme la lésion élémentaire de la maladie tuberculeuse. René Théophile Hyacinthe Laënnec, médecin français, a rassemblé ses travaux dans un ouvrage : *Le Traité de l 'Auscultation Médiate* décrivant la pathogenèse de la tuberculose et mettant en commun la tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire ; ces découvertes aidées aussi par la création du stéthoscope[6] ont permis une avancée majeure dans la pneumologie moderne en analysant les différents aspects de la tuberculose et de son évolution.

Malheureusement, aucun traitement ne voyait le jour, c'est donc dans ce contexte que l'« ère sanatoriale » est née. Pendant le XIXe siècle, le « traitement » privilégié était une cure de repos et la climatothérapie. Ces sanatoriums ont permis d'isoler les malades et donc de limiter la contagion pendant les périodes d'épidémies mais n'ont pas éradiqué la maladie[7]. En 1865, l'anatomo-pathologiste français, Jean Antoine Villemin fait une découverte capitale : il a observé en étudiant la distribution générale des tubercules dans l'organisme qu'ils étaient regroupés dans une région particulière. Il fit des tests sur de jeunes lapins en leur inoculant sous la peau de l'oreille des produits tuberculeux divers et comptabilisa la mort des animaux de tuberculose généralisée. De ces études, il déclara que la tuberculose était l'effet d'un agent causal spécifique : un virus[8].

Ce n'est que le 24 mars 1882 que le bacille tuberculeux est identifié par le bactériologiste allemand Robert Koch à Berlin. Il range ce bacille dans la catégorie des mycobactéries qui prend le nom de bacille de Koch et le nom scientifique de *Mycobacterium tuberculosis*. Koch a effectué cette découverte en utilisant une coloration à base d'un mélange de fuchsine et de violet de méthyle sur des crachats humains qui révéla le bacille au microscope[9]. Cette identification permit une grande avancée dans le diagnostic de la tuberculose. Suite à cette découverte, Robert Koch a poussé ses recherches. En 1890, il annonça avoir trouvé un traitement contre la tuberculose : la tuberculine, un extrait à la glycérine du bacille tuberculeux laquelle par la suite s'est avérée inefficace voire fatal. Ceci a tout de même permis de mieux comprendre la maladie. Tout d'abord, l'usage de cette tuberculine a permis à Clemens Von Pirquet, en 1902, de créer la cuti-réaction à la tuberculine qui servira de diagnostic aux patients

infectés. Ces différentes recherches ont permis de mettre en évidence que certains sujets qui avaient été en contact avec le bacille de Koch n'étaient pas malades. La découverte du bacille de Koch a valu à son auteur le prix **Nobel** de Physiologie ou Médecine en 1905[10]. Cette avancée a permis de mettre en place une thérapeutique. En 1921, les français Albert Calmette, médecin, et Camille Guérin, vétérinaire et biologiste, ont ainsi conçu le premier vaccin contre la tuberculose à partir d'une souche atténuée du bacille tuberculeux bovin *Mycobacterium bovis*. Cette découverte fut le fruit de 13 années de travail et 230 repiquetages pour avoir une souche complètement atténuée et privée de toute virulence[11]. Ce vaccin permit de diminuer le nombre de nouveaux cas ; malheureusement, les personnes malades n'en bénéficiaient pas.

Ce n'est qu'à partir du milieu du XXe siècle que des traitements voient le jour. Albert Schatz, doctorant, et son directeur de thèse Selman-Abraham Waksman furent les premiers à isoler la streptomycine de la bactérie *Streptomyces griseus* en 1944[12]. Cette découverte du premier antibiotique efficace contre la tuberculose a valu à Selman A. Waksman le prix **Nobel** de physiologie ou de médecine en 1952. Les découvertes de l'acide *para*-aminosalicylique en 1944[13,14], du pyrazinamide[15] et de l'isoniazide en 1952[16], mais également de la cyclosérine en 1955[17], de l'éthionamide[18] et de l'éthambutol[19] en 1961 ont enrichi le traitement de la tuberculose. Ce traitement antibiotique a donc permis de guérir et ainsi de réduire le nombre de décès des malades tuberculeux.

La dernière grande avancée du dernier siècle fut établie par l'équipe de Stewart Cole en 1998 qui séquença le génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[20]. Cela permit et continue de permettre de comprendre les modes d'action des différents médicaments et ainsi espérer concevoir de nouveaux traitements.

Malgré toutes les recherches effectuées sur la tuberculose, le germe pathogène *Mycobacterium tuberculosis* est responsable encore aujourd'hui de 10 millions de cas chaque année dans le monde.

I.B Généralités sur la tuberculose

I.B.1 La pathogenèse

La tuberculose est une maladie causée par la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis* qui se transmet d'une personne à l'autre par voie aérienne. Lorsque les personnes atteintes de tuberculose active toussent, parlent ou éternuent, elles projettent dans l'air les germes du bacille tuberculeux *via* des microgouttelettes de mucus appelées gouttelettes de Flügge et une simple inhalation suffit pour être infecté. En moyenne, un malade contagieux contamine 5 à 15 individus par an (Données : Institut Pasteur). La réussite de la transmission dépend de diverses conditions notamment la proximité et la durée du contact avec une personne atteinte de tuberculose active et la compétence immunitaire de la personne infectée par *M. tuberculosis*[21]. Le diagnostic clinique et le traitement de l'infection par *M. tuberculosis* sont compliqués par diverses coinfections et comorbidités[22]. Cette maladie peut toucher tous les organes. On distingue alors deux formes de tuberculose : la tuberculose pulmonaire et la tuberculose extra-pulmonaire.

Le bacille pénètre dans l'organisme par les voies respiratoires et atteint les poumons pour se loger dans les alvéoles. Généralement, des mécanismes de défense se mettent en place et les bacilles sont contrôlés ou détruits par le système immunitaire. Cette primo-infection tuberculeuse guérit le plus

souvent spontanément. Dans 90% des cas, l'agent pathogène reste au repos ce qui correspond à une infection tuberculeuse latente, asymptomatique. L'hôte infecté ne présente aucun symptôme de la maladie, n'est ni malade, ni contagieux. Dans 10% des cas néanmoins, la réaction immunitaire ne se fait pas et la personne va développer la maladie. Les comorbidités qui modulent la fonction immunitaire peuvent exacerber la tuberculose ou contribuer à la progression de la tuberculose active chez les personnes atteintes de tuberculose latente (immunodépression, diabète, malnutrition…).
La co-infection par le VIH chez les personnes infectées de manière latente augmente le risque de développer une tuberculose, passant d'un risque de 5 à 10 % au cours de la vie à un risque annuel de 10 %, l'infection par le VIH est le facteur de risque le plus important pour le développement de la tuberculose[23,24]. On note qu'en 2022, 12% de tous les décès liés à la tuberculose concernaient des personnes séropositives[25].

Dans l'organisme, les bacilles s'activent sous forme de nodules appelés granulomes qui sont peu à peu entourés de lymphocytes et macrophages destinés à contenir l'infection. Ces granulomes sont transformés en matière caséeuse qui est ensuite expulsée des poumons et crachée (d'où l'origine des excavations dans les poumons). C'est la forme active de la maladie, le malade est atteint de tuberculose pulmonaire. Cette forme de tuberculose représente environ 85% des cas de tuberculose. La tuberculose pulmonaire se caractérise par différents symptômes qui sont une toux chronique avec des crachats épais comportement quelques filets de sang, un essoufflement, des douleurs dans la poitrine, une perte d'appétit et un amaigrissement[26]. Les bacilles tuberculeux peuvent se propager dans tout l'organisme et donner lieu à une tuberculose extra-pulmonaire. Les infections extra-pulmonaires posent des défis cliniques supplémentaires, car elles ne signifient pas nécessairement que le patient sera testé positif pour la tuberculose à l'aide d'un frottis d'expectoration. En outre, la présence de *M. tuberculosis* dans des localisations extra-pulmonaires peut entraîner toute une série de symptômes supplémentaires et compliquer les schémas thérapeutiques, qui sont déjà confrontés à des défis permanents en termes d'efficacité et d'effets secondaires problématiques[27]. Les formes ganglionnaires et pleurales sont les plus fréquentes (30-60%), suivies par les formes ostéo-articulaires (10-15%) et urogénitales (4.5-27.2%). Selon différentes études, les femmes développeraient plus une forme extra-pulmonaire que les hommes ; à ce jour, aucune explication n'a été proposée[28].

Lorsque la tuberculose est diagnostiquée suffisamment tôt, elle peut être traitée de manière efficace avec un taux de succès de 85%.

I.B.2 Le bacille tuberculeux

Les mycobactéries sont les microorganismes qui réussissent le mieux à parasiter les animaux et les humains[29]. Le genre *Mycobacterium* correspond à des bacilles aérobies à croissance plus ou moins lente appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae* de la classe *Actinomycetes* sous l'ordre des *Actinomycetales*[30]. Le genre *Mycobacterium* compte 188 espèces valides décrites qui se répartissent en 4 sous-familles : le complexe de *M. tuberculosis* (MTBC), *M. leprae* (qui provoque la lèpre), *M. ulcerans* (l'agent causal de l'ulcère de Buruli) et les Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) causant des mycobactérioses (infections opportunistes)[31,32,33]. Le complexe *M. tuberculosis* se divise en plusieurs espèces : *M. pinnipedii*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. africanum, M. orygis, M. mungi* et *M. tuberculosis*[34]. Ces différentes espèces se sont adaptées à certains animaux : *M. orygis* pour les gazelles oryx, *M. caprae* pour les caprins, *M. pinnipedii* pour les phoques, *M. mungi* pour les

mangoustes, *M. microti* pour les campagnols et *M. bovis* le bacille responsable de la tuberculose bovine [35,36,37]. Seules les espèces Mtb, *M. africanum* et *M. canettii* infectent les humains et l'espèce responsable dans 99% des cas de la tuberculose est le bacille de Koch. *M. africanum* est également pathogène pour l'Homme représentant plus de 50% de cas de tuberculose en Afrique de l'Ouest et reste assez rare dans les autres régions du monde. Cependant, des exceptions ont été recensées notamment aux États-Unis, Canada et Brésil causées majoritairement par les voyages[38,39]. *M. canettii* est lui aussi pathogène pour l'Homme et se retrouve principalement dans la Corne de l'Afrique[40]. De part ces nombreux bacilles, un problème de contamination inter-espèce, de l'animale vers l'humain, peut être soulevé. Différentes recherches ont été effectuées notamment sur *M. bovis*, du fait de notre proximité avec les bovins d'élevage. Dès le début du XXIe siècle, la génomique a permis d'établir l'arbre phylogénétique de ces espèces, et la comparaison entre Mtb et *M. bovis* montre que *M. bovis* est un bacille qui a dérivé du bacille humain Mtb et est proche de *M. africanum*. Les contaminations liées à des sources animales représentent 2% des cas de tuberculose humaine au niveau mondial[36]. En 1966, une étude danoise a montré que le taux de mortalité était plus faible par une contamination de bacilles animaux qu'à partir de Mtb[41].

Les mycobactéries du genre *Mycobacterium* ont les mêmes caractéristiques. Ce sont des bacilles alcoolo-acido résistants (BAAR) c'est-à-dire qu'ils ne sont pas décolorés par le lavage. Cette propriété s'explique par leur paroi bactérienne très riche en acides gras et en lipides. Ces mycobactéries sont des organismes qui ne peuvent être classées ni dans la famille des Gram négatif, ni dans celle des Gram positif, car elles possèdent des caractéristiques des deux familles. En effet, la taxonomie moléculaire fondée sur l'ADN regroupe les mycobactéries avec les bactéries Gram positif car la plupart des gènes sont similaires. En revanche, on peut aussi les considérer comme des bactéries Gram négatif car elles ont la particularité d'avoir un périplasme, ce qui est caractéristique d'une bactérie Gram négatif. L'enveloppe mycobactérienne est assez complexe et se compose d'une couche de lipides et de protéines qui s'intercale dans la couche des acides mycoliques pour former la couche externe formant ainsi un « pseudopériplasme »[42]. L'enveloppe mycobactérienne sera décrite un peu plus loin dans ce manuscrit.

Mtb est une mycobactérie à croissance lente. Son temps de division est de 16 à 20 heures et donne en 21 jours, sur milieu enrichi, de grosses colonies en forme de « chou-fleur » de 3 à 4 mm avec des bacilles de 2 à 5 µm de long et de0,3 à 0,5 µm de large (Figure 1).

a. b.

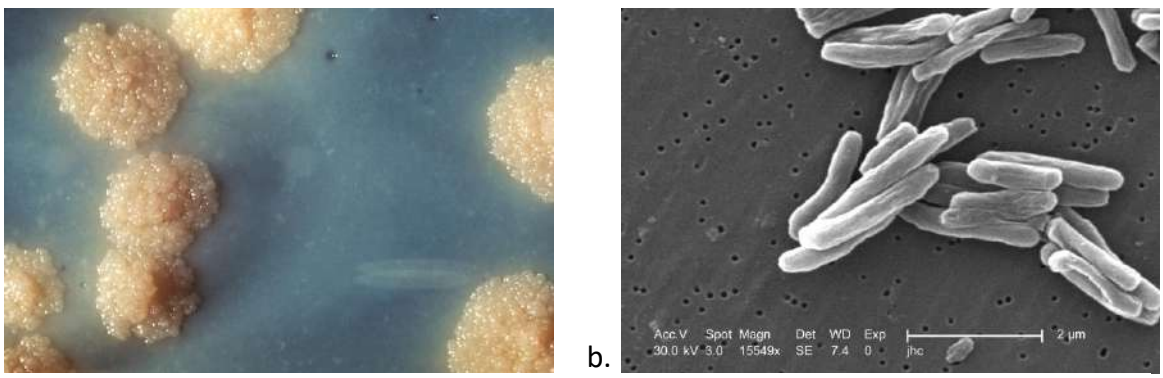


Figure 1 : a. Colonies de Mtb. b. Visualisation de Mtb au microscope électronique.
Source : commons.wikipedia.

II La situation épidémiologique actuelle

II.A Dans le monde

D'après le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2022, ce sont environ 10,6 millions de personnes qui ont développé une tuberculose en 2021, ce qui représente une augmentation de 4,5% par rapport aux chiffres de 2020. Les zones du monde principalement touchées sont l'Asie du Sud-Est (45%), l'Afrique (23%) et le Pacifique de l'Est (18%). L'Inde est le pays comptant le plus de cas de tuberculose, elle représente 28% des cas dans le monde (Figure 2).

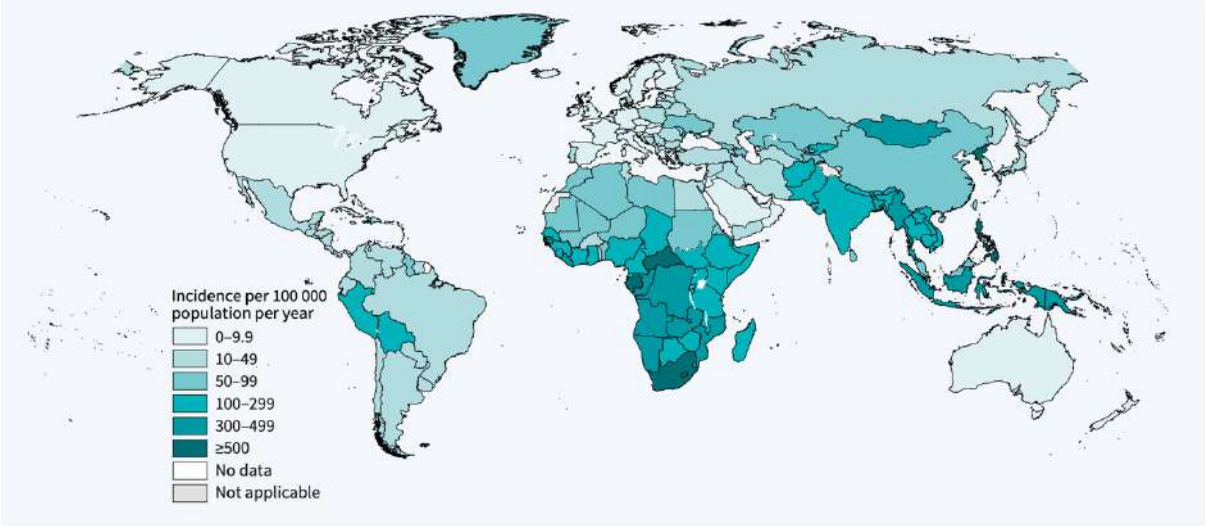


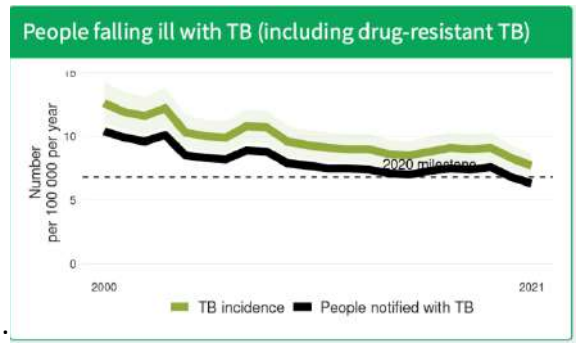
Figure 2 : estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculose en 2021.
Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS.

Globalement, la tuberculose affecte toute personne, homme, femme et enfant. Majoritairement, ce sont les hommes qui sont les plus touchés représentant 56,5% des cas tandis que les femmes représentent 32,5% et les enfants 11%.

En 2020, le nombre de nouveaux malades a nettement diminué par rapport à 2019 sans doute dû à la perturbation liée à l'épidémie de COVID-19. Entre 2016 et 2020, cette baisse représente 18% passant de 7,1 millions à 5,8 millions de nouveaux cas recensés. Une reprise partielle des nouveaux cas notifiés a eu lieu en 2021 atteignant 6,4 millions de cas. En revanche, le taux de décès entre 2020 et 2021 a augmenté, atteignant 1,4 million de personnes, ce qui en fait la treizième cause de décès dans le monde. Les contaminations de tuberculose ont pu diminuer grâce à tous les gestes barrières mis en place (port du masque, confinement…). En revanche, les différents programmes de prévention de la tuberculose étaient à l'arrêt et le nombre de décès causés par la tuberculose a augmenté[43].

II.B En France

En France, ce sont près de 4900 cas qui ont été recensés en 2021 et malheureusement 511 décès. Ces chiffres sont en baisse depuis les années 2000. Entre 2015 et 2021, on a pu noter une réduction de 9,4% sur l'incidence et de 4,3% du nombre de décès (Figure 3). L'OMS a recensé les facteurs de risque par pays. En France, différents facteurs augmentent le risque de développer la tuberculose, le tabagisme en est le premier avec environ 750 cas représentant 6,5% de personnes malades.

a. 

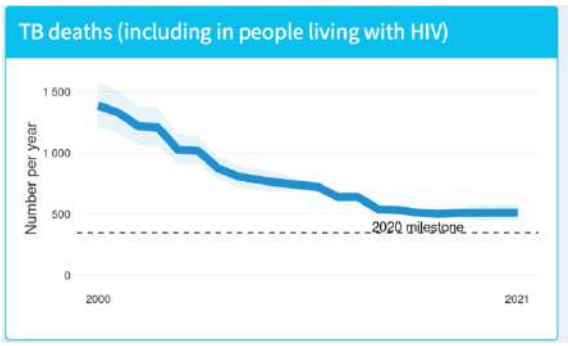
b. 

Figure 3 : a. Estimation du nombre de cas en France. b. Estimation du nombre de décès en France.
Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS.

II.C Mécanismes et cas de résistance

Les bactéries développent des mécanismes de résistance face à l'utilisation des antibiotiques. Cette résistance amène les scientifiques à une recherche perpétuelle de nouveaux antibiotiques et de mécanismes d'action originaux.

Tout d'abord, on parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Il s'agit de bactéries qui sont insensibles au mode de fonctionnement de l'antibiotique. Cette résistance a un caractère permanent transmissible aux cellules filles lors de la réplication bactérienne. La résistance acquise correspond, quant à elle, au fait qu'une ou plusieurs souches bactériennes deviennent résistances à la suite d'un contact avec l'antibiotique. Cette résistance peut résulter soit d'une mutation survenant sur le chromosome bactérien, soit de l'acquisition d'une information génétique provenant d'une bactérie déjà résistante. Il existe différents mécanismes de résistance qui sont l'imperméabilité bactérienne, la modification de la cible, l'inactivation directe de la molécule active et la diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible[44]. Tous ces différents mécanismes se mettent en place plus ou moins rapidement après un premier contact avec l'antibiotique.

Les mutations survenant sur Mtb entraînent les souches résistantes (MDR pour « multidrug resistant ») et extrêmement résistantes (XDR pour « extensively multidrug resistant »). La tuberculose résistante aux médicaments (TB-R) reste une menace pour la santé publique. Les souches MDR sont les souches résistantes aux médicaments de première intention : la rifampicine et l'isoniazide et nécessitent un traitement avec les médicaments de deuxième intention. Au niveau mondial, le nombre estimé de personnes ayant développé une tuberculose résistante est relativement stable entre 2015 et 2020, cependant une augmentation est observée en 2021. Ce sont 450 000 cas qui ont été reportés en 2021. Ces chiffres sont expliqués par l'impact de l'épidémie de COVID-19 au niveau des détections de la tuberculose. Ces résistances sont majoritaires dans trois pays qui représentaient 42% des cas mondiaux en 2021 : l'Inde (26%), la fédération de Russie (8,5%) et le Pakistan (7,9%) (Figure 4).

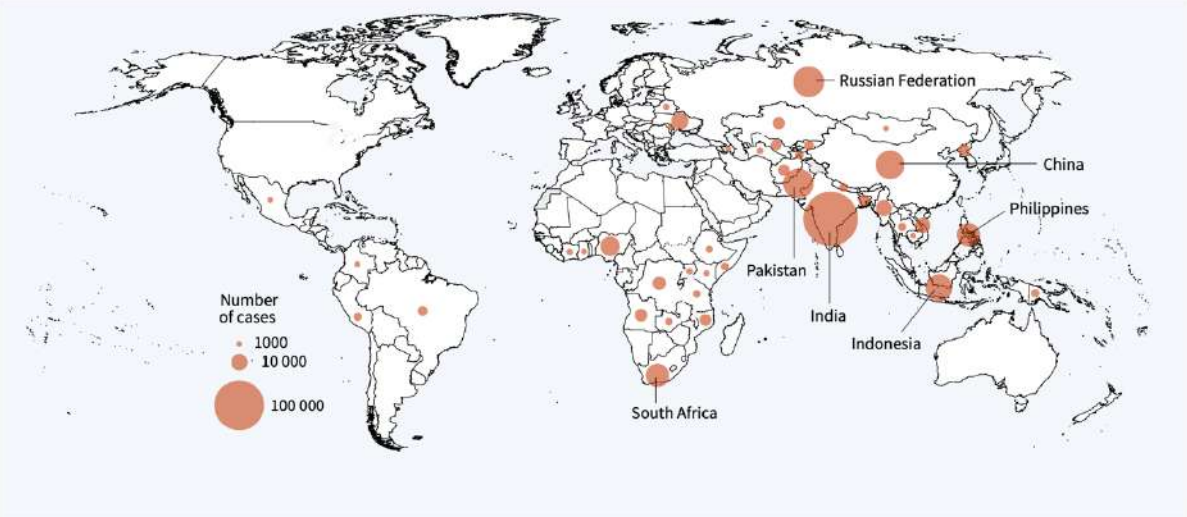


Figure 4 : estimation de l'incidence de la tuberculose MDR en 2021, pour les pays comptant au moins 1000 cas incidents.
Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS.

III Les outils de lutte

Pour lutter contre cette maladie, différents outils ont été mis en place pour diminuer l'incidence, diagnostiquer, prévenir la maladie et soigner les personnes infectées.

III.A Programme de l'OMS

Depuis 1997, l'OMS publie chaque année des rapports globaux sur la tuberculose. Ceux-ci fournissent une évaluation complète et actualisée de la situation de l'épidémie de la tuberculose ainsi que des progrès faits aux niveaux mondial, national et régional.

Depuis 2015, tous les états membres de l'OMS et des Nations Unies se sont engagés à mettre fin à l'épidémie mondiale de la tuberculose d'ici à 2035.

Ce programme contient des paliers clés, reportés dans le Tableau 1, 2020, 2025 et 2030. La stratégie de l'OMS est de diminuer l'incidence de la tuberculose de 90% en 2035 avec un palier à 20% en 2020, 50% en 2025 et 80% en 2030. L'OMS souhaite également diminuer de 95% le nombre de décès causés par la tuberculose d'ici à 2035, avec une étape à 35% en 2020, 75% en 2025 et 90% en 2030.

VISION	**A WORLD FREE OF TB — zero deaths, disease and suffering due to TB**			
GOAL	**END THE GLOBAL TB EPIDEMIC**			
INDICATORS	MILESTONES		TARGETS	
	2020	2025	2030	2035
Percentage reduction in the absolute number of TB deaths[a] (compared with 2015 baseline)	35%	75%	90%	95%
Percentage reduction in the TB incidence rate (compared with 2015 baseline)	20%	50%	80%	90%
Percentage of TB-affected households facing catastrophic costs due to TB[b] (level in 2015 unknown)	0%	0%	0%	0%

Tableau 1 : chiffres clés des objectifs d'éradication de la tuberculose.
Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS.

La stratégie de l'OMS pour atteindre les objectifs repose sur plusieurs piliers. Tout d'abord, une prévention et des soins intégrés et centrés sur le patient avec notamment un diagnostic précoce comprenant des tests universels de sensibilité aux médicaments et un dépistage systématique des contacts et des groupes à haut risque seront maintenus et développés pour tous, ainsi que le traitement de toutes les personnes atteintes de la tuberculose y compris la tuberculose résistante aux médicaments. Également des activités de collaboration tuberculose/VIH et la gestion des comorbidités doivent être mises en place. Enfin le traitement préventif des personnes à haut risque et la vaccination contre la tuberculose doivent se poursuivre. En second élément, des politiques et des systèmes de soutien doivent se développer notamment avec un engagement politique des ressources adéquates pour les soins et la prévention de la tuberculose, ainsi que l'engagement des communautés, des organisations de la société civile et des prestataires de soins publics et privés. Une politique de couverture sanitaire universelle et des cadres réglementaires pour la notification des cas, l'enregistrement de l'état civil, la qualité et l'utilisation rationnelle des médicaments et la lutte contre les infections doivent s'uniformiser. Enfin, le dernier pilier correspond à une intensification dans l'innovation et la recherche avec spécifiquement la découverte, le développement et l'adoption rapide de nouveaux outils, interventions et stratégies permettant de lutter contre la tuberculose.

En 2021, les chiffres ciblés sont loin de la réalité et montrent qu'il est urgent d'intensifier les efforts. En effet, il a été montré que la crise de COVID-19 a eu un impact négatif sur l'accès au traitement de la tuberculose. La priorité absolue est de rétablir l'accès et la fourniture des services essentiels de lutte contre la tuberculose pour que les chiffres puissent revenir aux niveaux de 2019. De plus, le contexte géopolitique actuel montre une nécessité d'agir. En effet, la guerre en Ukraine, les conflits en cours dans d'autres parties du monde, la crise énergétique mondiale et les risques associés pour la sécurité alimentaire sont des facteurs susceptibles d'entraver la lutte contre la tuberculose[25].

III.B Dépistage et diagnostic

Le diagnostic de cette maladie doit se faire le plus tôt possible pour éviter de nouvelles contaminations, pour adapter le traitement curatif et aussi pour pouvoir administrer un traitement préventif dans le cas d'un contact avec un patient contaminé. L'OMS recommande des tests rapides et efficaces et a mis à jour ses recommandations en 2022. Il existe des tests cutanés basés sur l'antigène de Mtb (TBST), les tests cutanés à la tuberculine (TST) aussi appelés tests de Mantoux[45] ou les tests de libération de l'interféron-gamma (IGRA pour Interferon-Gamma Release Assays).

Ces tests sont validés par une analyse microscopique des expectorations pulmonaires et/ou par une radiographie des poumons[46].

III.C Vaccination

Le vaccin bilié du BCG, pour Bacille de Calmette et Guérin, a été utilisé pour la première fois en 1921, soit 39 ans après la découverte de Mtb. La souche atténuée de *M. bovis* permet de prévenir la tuberculose dans le monde entier. En effet, on estime que ce sont plus de 90% des nouveau-nés qui reçoivent le vaccin chaque année. Près de 100 ans après sa première utilisation, le BCG reste le seul vaccin commercialisé contre la tuberculose malgré son efficacité variable. Chez les adultes, son efficacité est estimée entre 0 et 80%[47,48] et malheureusement, les raisons de cette grande disparité restent inconnues.

Le développement de nouveaux candidats vaccins est en cours, mais il se confronte à différents obstacles. En effet, le vaccin devra fonctionner à la fois sur les souches sensibles et résistantes de Mtb. Malheureusement, l'absence d'un modèle animal validé et prédictif freine ces essais. Aussi, l'évaluation du candidat vaccin doit être comparée au vaccin homologué (BCG) qui protège contre la tuberculose et également contre la lèpre chez le nourrisson, cela augmente le nombre d'exigences pour ces candidats vaccins[45]. Les candidats vaccins en cours de développement peuvent être caractérisés en plusieurs groupes[49] :

- Les vaccins préventifs de préexposition ou vaccins prophylactifs. Ces vaccins sont administrés avant le contact avec l'agent infectieux, typiquement aux nouveau-nés.
- Les vaccins préventifs de post-exposition. Ces vaccins visent à protéger les adolescents et les adultes atteints d'une infection tuberculeuse latente et immunisés par le BCG. Ils peuvent renforcer les réactions naturelles provoquées par l'infection.
- Les vaccins thérapeutiques. Ces vaccins sont administrés à une population déjà infectée par Mtb en plus des médicaments antituberculeux, notamment pour prévenir la récurrence de la maladie après un traitement réussi.

Les candidats vaccins sont réunis dans le Tableau 2 suivant. Ils sont au nombre de treize, trois d'entre eux sont en phase III des essais cliniques[45,49,50].

Candidat vaccin	Mode d'immunisation	Partenaires	Description	Essai clinique
VPM 1002	Prophylactique et thérapeutique	Serum institute of India (India), Max Planck institute (Germany), Vakzine Projekt Management GmbH (Germany) and TuBerculosis Vaccine Initiative (Pays-Bas)	BCG recombinant	Phase III
MTBVAC	Prophylactique	Biofabri (Espagne), TuBerculosis Vaccine Initiative (Netherlands) et University of Zaragoza (Espagne)	Mtb vivant atténué	Phase III
AEC / BC02	Prophylactique et thérapeutique	Quratis	Protéine recombinante adjuvante	Phase I
RUTI	Thérapeutique	Achivel farma (Espagne)	Cellules de Mtb détoxifiées et fragmentées	Phase II
ID93 : GLA-SE	Prophylactique et thérapeutique	Infectious Disease Research Institute (USA) and the Wellcome Trust (Royaume-Uni)	Protéine recombinante adjuvante	Phase II
H56:IC31	Prophylactique et thérapeutique	Statens Serum Institut (Danemark), Valneva (France) and Aeras (USA)	Protéine recombinante adjuvante	Phase II
M72/ASO1$_E$	Préventif	GlaxoSmithKline (GSK) Vaccines (Royaume-Uni) ans Aeras (USA)	Protéine recombinante adjuvante	Phase II
DAR-901	Prophylactique	Dartmouth College (USA)	Mycobactérie non tuberculeuse inactivée	Phase II
GamTBvac	Prophylactique	Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry of the Russian Federation	Protéine recombinante adjuvante	Phase III
Ad5 Ag85A	Prophylactique et post-exposition	McMaster University (Canada) and CanSino (Chine)	Vecteur viral (adénovirus humain 5) exprimant l'antigène Ag85A de Mtb	Phase I / II

ChAdOx1-85A / MVA85A	Prophylactique	University of Oxford (Royaume-Uni)	Vecteurs viraux (adénovirus de chimpanzé/virus Vaccinia Ankara modifié)	Phase I
TB / FLU-04L	Prophylactique et thérapeutique	Research Institute for Biological Safety Problems (Republique du Kazakhstan)	Vecteur viral (Virus influenza A)	Phase II
***M. Indicus pranii* (MIP)**	Prophylactique	Ministry of Science and technology (Inde)	*M. Indicus pranii* inactivé	Phase III

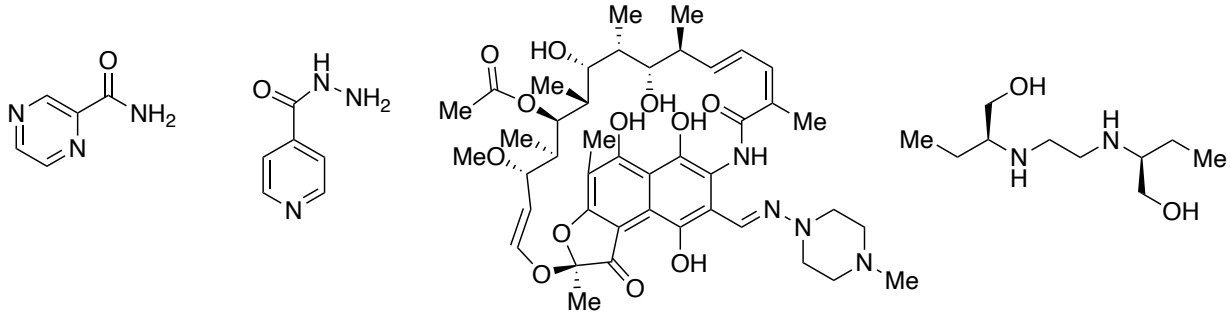
Tableau 2 : les candidats vaccins en essais cliniques. Les informations sont tirées du site du TBVI (https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/).

III.D Les traitements antibiotiques

Le premier traitement antituberculeux est apparu au cours du XXe siècle avec la streptomycine[12] et la majorité des antibiotiques antituberculeux ont été découverts entre 1950 et 1970. Depuis 2018, l'OMS distingue deux familles d'antibiotiques, ceux prescrits dans le cas d'une tuberculose non résistante, ce sont les antibiotiques de première ligne et ceux qui sont prescrits dans la tuberculose multirésistante reclassés en trois groupes. Les activités sur les souches mycobactériennes sont données pour la souche de référence, H37Rv, et sont représentées par les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

III.D.1 Les antibiotiques de première intention

Dans le cas d'une tuberculose non résistante aux antibiotiques de première intention, le traitement de première ligne efficace contre la souche Mtb repose sur l'association des quatre principes actifs : la rifampicine (**RIF**), l'isoniazide (**INH**), le pyrazinamide (**PZA**) et l'éthambutol (**EMB**) (Figure 5). Pendant les deux premiers mois la quadrithérapie se fait en une seule prise orale quotidienne à jeun. Les quatre mois suivants, une bithérapie isoniazide/rifampicine est maintenue afin d'éviter toute rechute et d'assurer une extermination complète du bacille dans l'organisme. Le traitement a une durée minimale de six mois.



Le pyrazinamide (**PZA**)
130 < CMI < 400 µM

L'isoniazide (**INH**)
CMI = 0,18 µM

La rifampicine (**RIF**)
CMI = 0,5 µM

L'éthambutol (**EMB**)
CMI = 2,5 µM

Figure 5 : structures chimiques des quatre antibiotiques de première ligne et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

Le **pyrazinamide (PZA**) est un antituberculeux très important dans la quadrithérapie, c'est le seul composé qui agit sur les bacilles dormants intracellulaires résidant en milieu acide et qui permet de réduire le traitement à trois mois. Cette prodrogue, dérivée du nicotinamide (vitamine B3), et commercialisée pour la première fois en 1956[51], est hydrolysée en acide pyrazinoïque (**POA**) dans le cytoplasme mycobactérien par la pyrazinamidase/nicotinamidase (PZAase), encodée par le gène *pncA*.

La protéine ribosomale S1 (RpsA) a été identifiée comme la cible principale de l'action du **POA**. RpsA est essentielle pour la traduction, en établissant un pont avec la sous-unité du ribosome 30S[52,53]. La CMI est comprise entre 130 et 400 µM.

L'**isoniazide (INH)** est l'un des antituberculeux les plus efficaces sur Mtb. La CMI est de 0,18 µM[54]. Synthétisé pour la première fois en 1912, sa première utilisation clinique intervient en 1952. L'**INH** est une prodrogue, activée par l'hémoprotéine catalase-peroxidase KatG qui inhibe l'énoyl-ACP (acyl carrier protein) réductase InhA, dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). InhA est impliquée dans la synthèse des acides gras. Les résistances à l'isoniazide résultent de mutations sur le gène cible, *inhA* et sur celui de l'enzyme d'activation, *katG*. Les mutations sur le gène *katG* conduisent à une augmentation de la CMI d'un facteur 200[55].

La **rifampicine (RIF)** a été développée à partir de la rifamycine, le métabolite naturel de *Streptomyces mediterranei*, découvert en 1957[56]. Cette molécule, commercialisée en 1972, agit sur la synthèse d'ARN en se liant à la sous-unité β de l'ARN polymérase, enzyme encodée par le gène *rpoB* et indispensable dans la transcription et l'expression des gènes mycobactériens. Sa CMI est d'environ 0,5 µM. Plus de 97% des résistances à la rifampicine apparaissent à la suite des mutations sur le gène *rpoB*[57].

L'**éthambutol (EMB)** a été introduit dans le traitement contre la tuberculose en 1966. Sa CMI est d'environ 2,5 µM. Il permet d'inhiber l'arabinosyl transférase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire notamment dans la synthèse de deux polymères, l'arabinogalactane (AG) et le lipoarabinomannane (LAM). Dans la majorité des cas, les résistances apparaissent suite à des mutations sur le gène *embA* ou *embB* [58].

Les mutations de certains gènes de Mtb entrainent l'inefficacité du traitement de première ligne et amènent donc à une recherche perpétuelle de nouveaux médicaments. Il en découle le traitement antibiotique de la tuberculose résistante qui permet de combattre les souches bactériennes multirésistantes et extrêmement résistantes. Depuis 2018, ces antibiotiques ont été reclassés en trois groupes[59]. L'OMS recommande la prise de ces médicaments en suivant les indications transmises lors du rapport de 2018 (Figure 6).

Groups & steps	Medicine	
Group A: **Include all three medicines**	levofloxacin *OR* moxifloxacin	Lfx Mfx
	bedaquiline[2,3]	Bdq
	linezolid[4]	Lzd
Group B: **Add one or both medicines**	clofazimine	Cfz
	cycloserine *OR* terizidone	Cs Trd
Group C: **Add to complete the regimen and when medicines from Groups A and B cannot be used**	ethambutol	E
	delamanid[3,5]	Dlm
	pyrazinamide[6]	Z
	imipenem–cilastatin *OR* meropenem[7]	Ipm–Cln Mpm
	amikacin (*OR* streptomycin)[8]	Am (S)
	ethionamide *OR* prothionamide[9]	Eto Pto
	p-aminosalicylic acid[9]	PAS

Figure 6 : réorganisation des antituberculeux. Recommandation de l'OMS en cas de tuberculose résistance de 2018. Source : rapport global de la tuberculose, 2018, OMS.

III.D.2 Le groupe A

Le groupe A se compose des fluoroquinolones, la lévofloxacine (**LFX**) et la moxifloxacine (**MFX**), la bédaquiline (**BDQ**) et le linézolide (**LZD**) (Figure 7). Ces drogues sont considérées comme très efficaces et sont fortement recommandées dans tous les schémas thérapeutiques de tuberculose résistance sauf contre-indication.

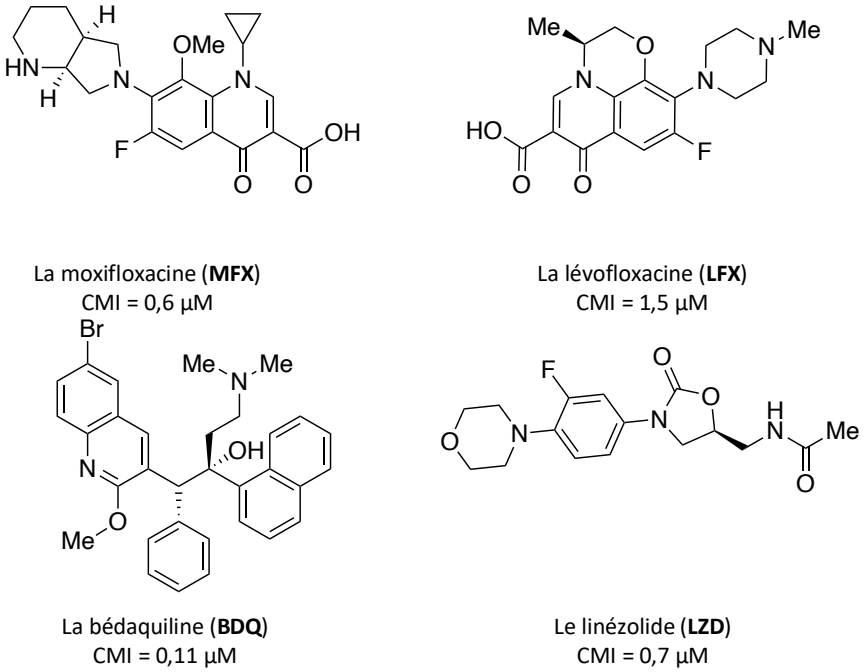


Figure 7 : structures chimiques et CMI des quatre antibiotiques du groupe A et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

La **moxifloxacine (MFX)** fait partie de la famille des fluoroquinolones. C'est un bactéricide avec une activité contre les bactéries Gram positives et Gram négatives[60,61]. Son mécanisme d'action consiste en sa liaison aux enzymes topoisomérases IV (ADN gyrase) empêchant ainsi la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN bactérien[62]. L'action létale se produirait en deux étapes : la formation de complexes bactériostatiques quinolone-gyrase-ADN suivie de la fragmentation des chromosomes. Il a été montré que la moxifloxacine possédait une capacité unique à éradiquer les mycobactéries en l'absence de synthèse protéique c'est-à-dire les mycobactéries latentes[63,64]. Les mutations sur les gènes *gyr*A et *gyr*B confèrent les résistances à cet antibiotique[65]. Sa CMI est de 0,6 µM[66].

La **lévofloxacine (LFX)** fait également partie de la famille des fluoroquinolones, énantiomère de la forme L du racémique ofloxacine, isolée en 1985, elle est mise sur le marché en 1998. Elle possède de nombreuses caractéristiques identiques à la moxifloxacine notamment son mode d'action. Sa CMI est de 1,5 µM[67,68].

La **bédaquiline (BDQ)** est un des derniers antibiotiques visant la tuberculose à avoir été commercialisé. En 2012, la FDA (U.S. Food and Drug Administration) a donné son autorisation de mise sur le marché. C'est une diarylquinoline qui bloque la pompe à protons de l'adénosine triphosphate (ATP) synthase[69]. Cet antibiotique permet de réduire la mortalité lorsqu'il est ajouté dans le traitement luttant contre la forme résistante ou multirésistante de la tuberculose. Sa CMI est de 0,11 µM[70].

Le **linézolide (LZD)** est un antibiotique de synthèse appartenant à la famille des oxazolidinones. Il est utilisé en premier lieu pour les infections dues à des bactéries et depuis les années 2000, il est prescrit contre les mycobactéries[71,72]. Il inhibe de façon sélective la synthèse des protéines bactériennes en se liant à l'ARN sur les sous-unités ribosomiques 30S et 50S. Il inhibe la formation du complexe d'initiation ce qui peut réduire la longueur des chaînes peptidiques développées et diminuer la vitesse de la réaction de traduction[73,74]. Sa CMI est de 0,7 µM[75].

III.D.3 Le groupe B

Le groupe B comprend trois antibiotiques, la clofazimine (**CFZ**), la cyclosérine (**CS**) et la térizidone (**TRD**) qui sont recommandés comme des agents antituberculeux de second choix (Figure 8).

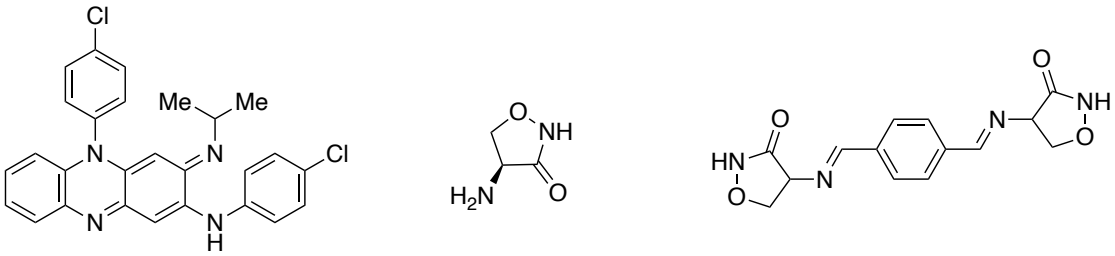


Figure 8 : structures chimiques des trois antibiotiques du groupe B et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

La **clofazimine (CFZ)** est un antibiotique dérivé d'un composé appelé anilinoaposafranine lui-même dérivé d'un composé extrait d'un lichen (*Buellia canescens*)[76]. Il a été synthétisé pour la première fois en 1954 et a été commercialisé en 1969[77]. Le mécanisme d'action contre Mtb n'est pas encore complètement élucidé[78]. Une hypothèse récente indique que la clofazimine interagirait avec les phospholipides de la membrane bactérienne pour générer des lysophospholipides antimicrobiens, l'efficacité bactéricide peut alors résulter des effets combinés de déstabilisation de la membrane par la clofazimine et des lysophospholipides qui interfèreraient avec la production d'ATP[79]. Sa CMI est de 0,2 µM[77].

La **cyclosérine (CS)** est un analogue de l'acide aminé D-alanine, correspondant à un antibiotique à large spectre. Elle permet d'inhiber l'alanine racémase et la D-alanine ligase, deux enzymes essentielles à la synthèse du peptidoglycane et en conséquence inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire. Sa CMI est de 0,2 mM[80].

La **térizidone (TRD)** est un produit de condensation entre deux molécules de cyclosérine et le téréphtalaldéhyde et agit comme une prodrogue. En effet, une hydrolyse *in vivo* au niveau du tractus gastro-intestinal a lieu libérant ainsi la cyclosérine et le téréphthalaldéhyde. Aucune donnée de CMI n'est connue à ce jour[65,81].

III.D.4 Le groupe C

Le dernier groupe est composé des antibiotiques, l'éthambutol (**EMB**), le délamanide (**DLM**), le pyrazinamide (**PZA**), l'imipénème-cilastatine (**IMP-CLN**), le méropénème (**MPM**), l'amikacine (**AK**), la streptomycine (**STR**), l'éthionamide (**ETH**) et le prothionamide (**PTH**) (Figure 9). Ils sont recommandés pour compléter le traitement ou si les médicaments des groupes A et B sont sans effet.

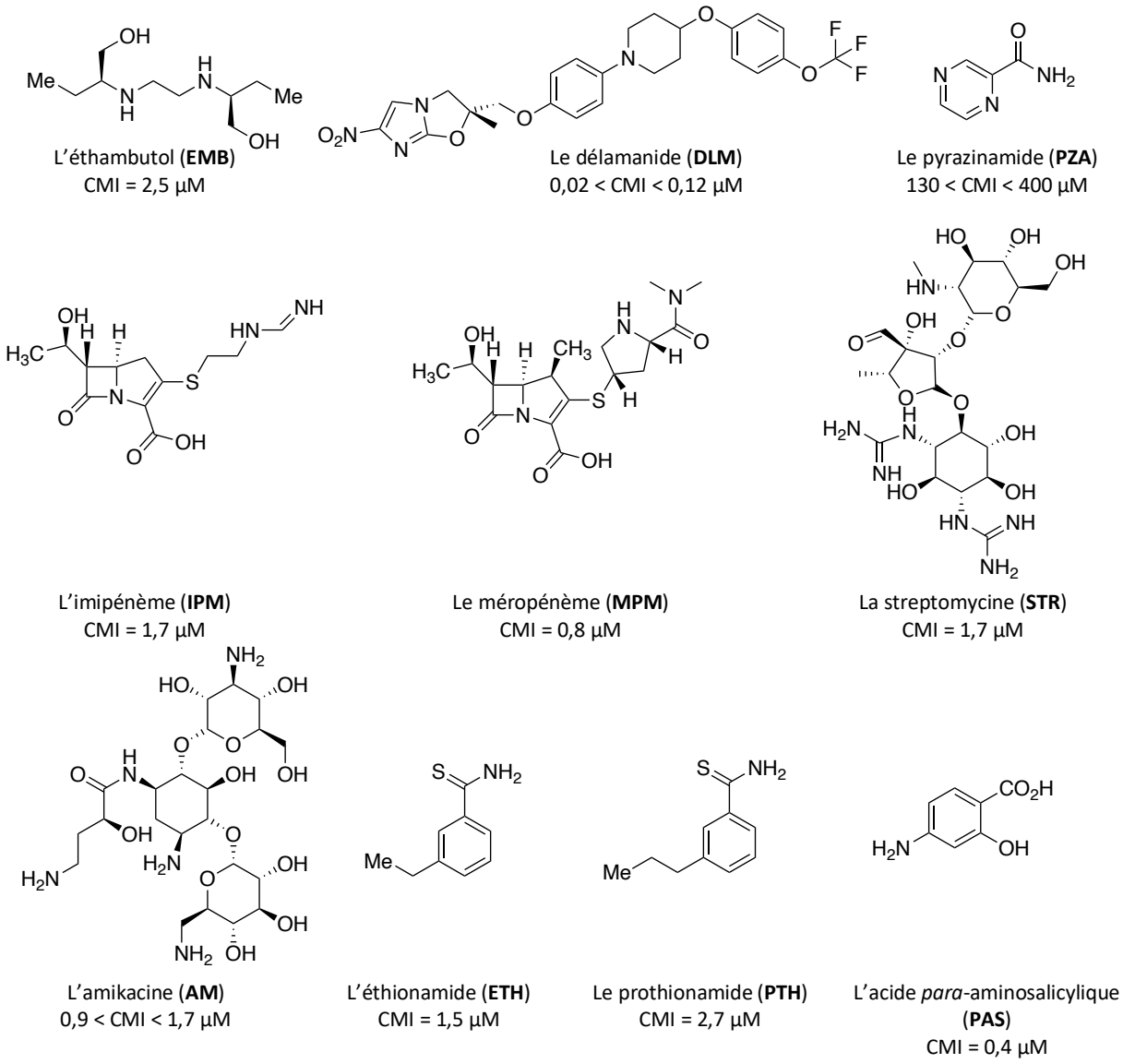


Figure 9 : structures chimiques des dix antibiotiques du groupe C et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

L'**éthambutol (E)** et le **pyrazinamide (PZA)** font également partie de la famille des antibiotiques de première ligne.

Le **délamanide (DLM)** est le dernier antibiotique à avoir été commercialisé, il a obtenu son autorisation de mise sur le marché en 2014. Appartenant à la classe des nitroimidazoles bicycliques, il est isolé à partir des *Streptomyces eurocidicus* et est aussi connu sous le nom de 2-nitroimidazole[82]. Ce médicament agit comme une prodrogue, activée par la nitroréductase dépendante de la déazaflavine (F420) et inhibant la synthèse des acides mycoliques[83], ce qui lui confère une activité mycobactérienne. Sa CMI est comprise entre 0,02 et 0,12 µM[84].

Les carbapénèmes regroupant **l'imipénème-cilastatine (IPM-CLN)**, dérivé synthétique de la thiénamycine, produit par la bactérie *Streptomyces cattleya* et accepté pour la première fois par la FDA en 1985 et le **méropénème (MPM),** découvert en 1987. Tous deux sont des médicaments de la famille

des β-lactamines. L'**IPM-CLN** est une association de deux composés : l'imipénème, est le principe actif jouant le rôle de bactéricide alors que la cilastatine est utilisée pour prolonger la demi-vie de l'imipénème. Leur mécanisme d'action est similaire à celui d'autres antibiotiques à noyau β-lactames qui inactivent les protéines de liaison de la pénicilline causant ainsi la lyse de la paroi cellulaire[85]. La CMI de l'**IPM-CLN** est de 1,7 µM[86], celle du **MPM** est de 0,8 µM en association avec le clavulanate contre 20,9 µM lorsqu'utilisé seul[87]. Il a été démontré que cette association était efficace à prévenir l'hydrolyse des β-lactames[88].

Les aminosides regroupent l'**amikacine (AMK)** et la **streptomycine (STR)**. Historiquement, la **STR** est le premier antituberculeux à avoir été utilisé cliniquement en 1946. Cet antibiotique, à large spectre d'action, est très actif. Ce médicament a été longtemps utilisé en première intention mais l'apparition de nouvelles molécules plus actives l'a relégué en deuxième intention. L'**AMK** est un dérivé hémi-synthétique de la kanamycine, un autre antituberculeux de la même famille. Ces antibiotiques permettent l'inhibition de la synthèse protéique en se liant de manière covalente et irréversible aux ribosomes bactériens[89,90]. Leurs CMI sont très proches : 1,7 µM pour la **STR** et comprise entre 0,9 et 1,7 µM pour l'**AMK**[54].

Les thionamides, **éthionamide (ETH)** et **prothionamide (PTH)** sont des prodrogues analogues à l'isoniazide et ont le même mode d'inhibition. Une pré-activation par l'enzyme EthA est nécessaire pour former le métabolite actif se liant au cofacteur NADH pour inhiber InhA[91,92]. Les CMI de l'**ETH** et du **PTH** sont similaires, respectivement 1,5 µM et 2,7 µM[54,93].

L'**acide *para*-aminosalicylique (PAS)** fait également partie des premiers médicaments antituberculeux et sa commercialisation a débuté en 1946. Cette molécule a longtemps été utilisée comme un antibiotique de première ligne mais a été remplacée par l'**éthambutol**, dès le début des années 1960[94]. Son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé mais quelques hypothèses ont été émises, notamment qu'il agirait comme une prodrogue de par son analogie avec l'acide *para*-aminobenzoïque qui est un précurseur essentiel dans la biosynthèse des folates[95]. Sa CMI est de 0,4 µM[96].

IV L'enveloppe mycobactérienne

L'enveloppe de Mtb est complexe. Depuis les années 1990, différentes recherches ont mis en évidence sa structure pour mieux comprendre son rôle notamment au niveau des mécanismes de résistance aux antibiotiques[97]. Ces recherches ont montré que l'enveloppe est structurée en différentes couches.

IV.A Structure multicouche de l'enveloppe de Mtb

Décrite en 1998, l'enveloppe mycobactérienne possède trois composants structuraux : la membrane plasmique, la paroi cellulaire et la capsule[98,99]. Cette capsule se trouvant à l'interface entre la bactérie et les cellules de l'hôte est impliquée dans la pathogénicité bactérienne[100,29]. La Figure 10 montre l'enveloppe mycobactérienne vue par microscopie électronique.

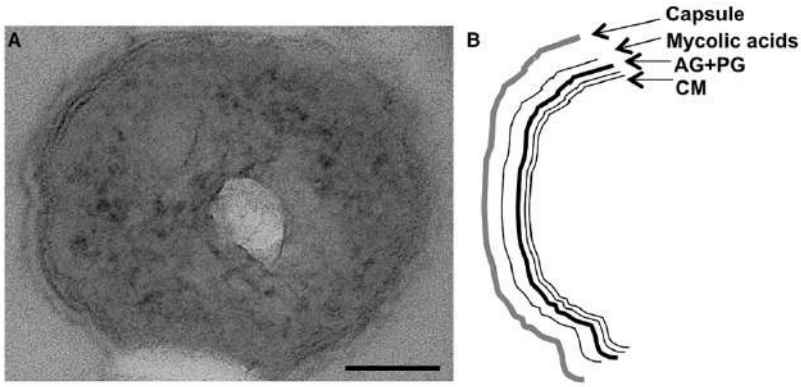


Figure 10 : visualisation de l'enveloppe de Mtb par microscopie électronique. AG : arabinogalactane, PG : peptidoglycane et CM : membrane plasmique.
Source : Kalscheuer *et al*, *Biochem. J.* **2019**, *476* (14), 1995–2016.

La membrane plasmique est la couche la plus interne et son épaisseur est estimée à 7 nm[101]. Cette membrane est structurée en bicouche, similaire à celle des bactéries Gram positives et négatives. Elle est composée de phospholipides, (lipo)polysaccharides et de protéines avec des fonctions métaboliques spécifiques[102], incluant également les protéines membranaires mycobactériennes larges (MmpL) impliquées dans le transport des lipides[103]. Ces constituants jouent un rôle vital en fournissant une barrière de perméabilité sélective autour de la cellule et en participant à un certain nombre de processus physiologiques critiques comprenant le transport d'électrons, la formation d'ATP et la biosynthèse de divers composants de l'enveloppe cellulaire[104]. La membrane plasmique permet les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie. La mycobactérie est ensuite composée d'un périplasme représentant 14 nm d'épaisseur. Cet espace contient une couche granulaire et d'autres protéines.

Le reste de l'enveloppe est riche en lipides, représentant 40% de sa structure et a pour fonction de protéger la mycobactérie des attaques extérieures notamment grâce à la paroi cellulaire et à la capsule externe.

La capsule externe est structurée par une matrice de glycanes contenant des protéines, des (lipo)polysaccharides et d'une petite quantité de lipides[101]. Elle est très complexe, car très hétérogène et de constitution spécifique en fonction de chaque espèce. Elle est principalement constituée de trois polysaccharides :

- L'α-D-glucane qui est un homopolysaccharide ramifié de poids moléculaire élevé composé de résidus α-D-glucoses
- Le D-arabino-D-mannane qui est un hétéropolysaccharide ramifié par des D-arabinoses
- Le D-mannane qui est un homopolysaccharide d'une masse moléculaire apparente de 4 kDa composé de résidus α-D-mannoses.

La paroi cellulaire est formée d'un squelette composé du peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'acides mycoliques. Son épaisseur est estimée à 7-8 nm. Le peptidoglycane (PG), composé d'unités répétitives de *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétyl/glycolylmuramique, est réticulé avec une chaîne latérale peptidique qui, elle-même, peut être fortement réticulée. Le PG permet de maintenir la forme cellulaire et fortifie la membrane plasmique contre la pression osmotique du cytoplasme[105].

L'arabinogalactane (AG) est un hétéropolysaccharide ramifié qui contient une chaîne galactane composée de résidus D-galactofuranosyl liés en alternance aux positions 5 et 6 et dont les acides mycoliques estérifient les deux tiers des terminaisons non réductrices des motifs penta-arabinosyl[29].
Les acides mycoliques (AM) jouent un rôle essentiel dans la membrane externe ; liés de manière covalente aux AG, ils représentent environ la moitié du poids sec de la paroi cellulaire. Ce sont des acides gras à longues chaînes α-ramifiés β-hydroxylés ; leur structure joue un rôle clé dans la perméabilité de l'enveloppe cellulaire. Ces caractéristiques font de la voie de biosynthèse des acides mycoliques la cible de nombreux médicaments[104,106].

La Figure 11 ci-dessous représente l'enveloppe mycobactérienne. Chaque couleur représente un constituant différent ce qui permet de se rendre compte de la diversité et la complexité de cette membrane[105].

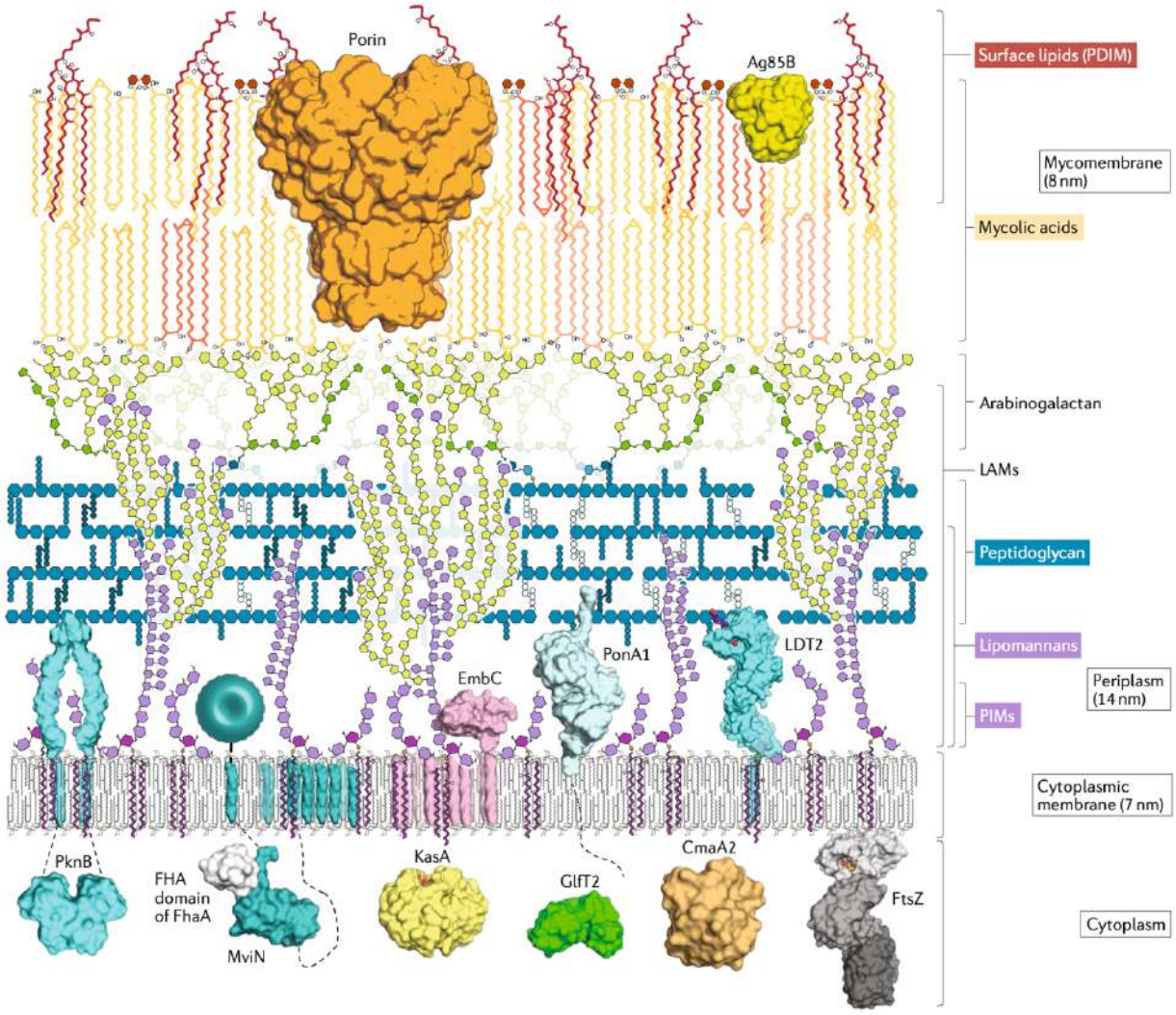


Figure 11 : enveloppe cellulaire de Mtb. LAMs : lipoarabinomannanes et PIMs : phospatidylinositol mannosides.
Source : Dulberger *et al*, *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18* (1), 47–59.

L'enveloppe mycobactérienne est un véritable rempart contre les médicaments antituberculeux. Sa complexité rend la découverte de nouveaux médicaments difficile puisque pour qu'un médicament

soit efficace, il faut qu'il réussisse à traverser cette membrane épaisse et très lipophile. Aujourd'hui, l'étude des protéines intervenant dans la biosynthèse de la membrane est une stratégie pour éliminer la bactérie.

IV.B Les acides mycoliques

Les acides mycoliques ont été isolés pour le première fois en 1938 par Andersen et ses collègues au département de chimie de l'université de Yale à partir d'un extrait humain de Mtb[107] mais ce n'est qu'en 1950 qu'ils ont été décrits par Asselineau et Lederer comme des acides gras à longue chaîne, à deux branches et trois hydroxylations (groupements COOH, OH et OCH_3), caractéristiques qui confèrent à la molécule la propriété d'être scindée à haute température par une réaction similaire à une condensation inverse de type Claisen, en une chaîne principale d'aldéhyde « méro » également appelée « chaîne méromycolique » et un « acide gras »[108]. La chaîne méromycolique comprend 42 à 62 carbones et la chaîne d'acide gras comprend 24 à 26 carbones. Les acides mycoliques ont également été isolés dans différentes mycobactéries et chez les bactéries du genre *Corynbacterium*. Chez Mtb, il existe trois sous-familles d'acides mycoliques : les α-mycolates contenant des cycles cyclopropane dans la configuration *cis*, les méthoxy-mycolates et les céto-mycolates qui possèdent respectivement des groupes méthoxy ou cétone et des cycles cyclopropane en configuration *cis* ou *trans* (Figure 12). Ces acides mycoliques sont la clé de voute de la paroi mycobactérienne et sont des éléments essentiels qui régulent la perméabilité, la viabilité et la virulence de Mtb[109].

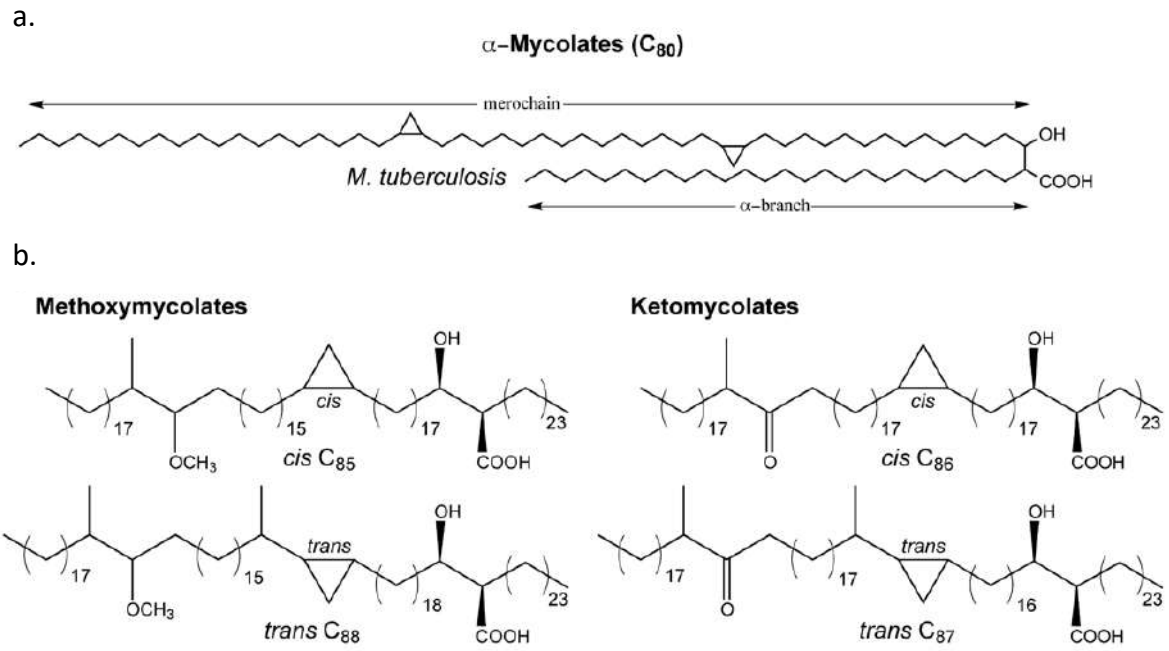


Figure 12 : a. structure générale des acides mycoliques, exemple d'acide α-mycolique. b. structures des autres sous-familles des acides mycoliques de Mtb.
Source : Nataraj *et al*, *Mol. Microbiol.* **2015**, *98* (1), 7–16.

La biosynthèse de ces acides mycoliques s'effectue dans le cytoplasme impliquant deux voies de synthèse distinctes appelées acides gras synthases (FAS pour « Fatty Acid Synthase ») de types I et II (FAS-I et FAS-II)[110]. Le système FAS-I est ubiquitaire, commun aux mammifères, champignons et bactéries. Il permet de produire des acides gras avec une distribution bimodale $C_{16\text{-}18}$ et $C_{24\text{-}26}$, ce dernier

correspondant à la chaine α des acides mycoliques. Ce système, n'étant pas spécifique aux bactéries, il ne constitue pas une cible privilégiée. Le système FAS-II, quant à lui, spécifique aux bactéries et végétaux, est composé d'une série d'enzymes solubles et permet l'élongation des acides gras provenant du système FAS-I jusqu'à atteindre des longueurs de chaînes en C_{42}-C_{62}[109]. Les composants principaux du système FAS-II sont quatre enzymes constituant un cycle réductif qui permet de catalyser l'extension de la chaîne acyl-ACP (acyl carrier protein) de deux carbones. Ces quatre enzymes représentent des cibles privilégiées pour les antituberculeux[111].

L'acétyl-CoA constitue la molécule de départ de la voie de biosynthèse des acides mycoliques, elle est carboxylée par l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé pour la plupart des organismes vivants pour produire le malonyl-CoA[112]. La synthèse des acides mycoliques se termine par une condensation de Claisen entre une chaîne méromycolate et un acide gras C_{26} dérivé du FAS-I pour produire un acide oxo-mycolique qui est ensuite réduit pour produire un mycolate mature. Cette réaction est catalysée par la polykétide synthase Pks13. Enfin, les acides mycoliques formés sont transportés en dehors du cytoplasme par des protéines membranaires, les MmpL qui font partie de la famille des pompes à efflux de la famille RND (résistance-nodulation-division), notamment par la MmpL3 qui est essentielle à la mycobactérie[113]. Le Schéma 1 ci-dessous représente la biosynthèse des acides mycoliques et notamment les différentes enzymes impliquées et les médicaments qui les ciblent[109].

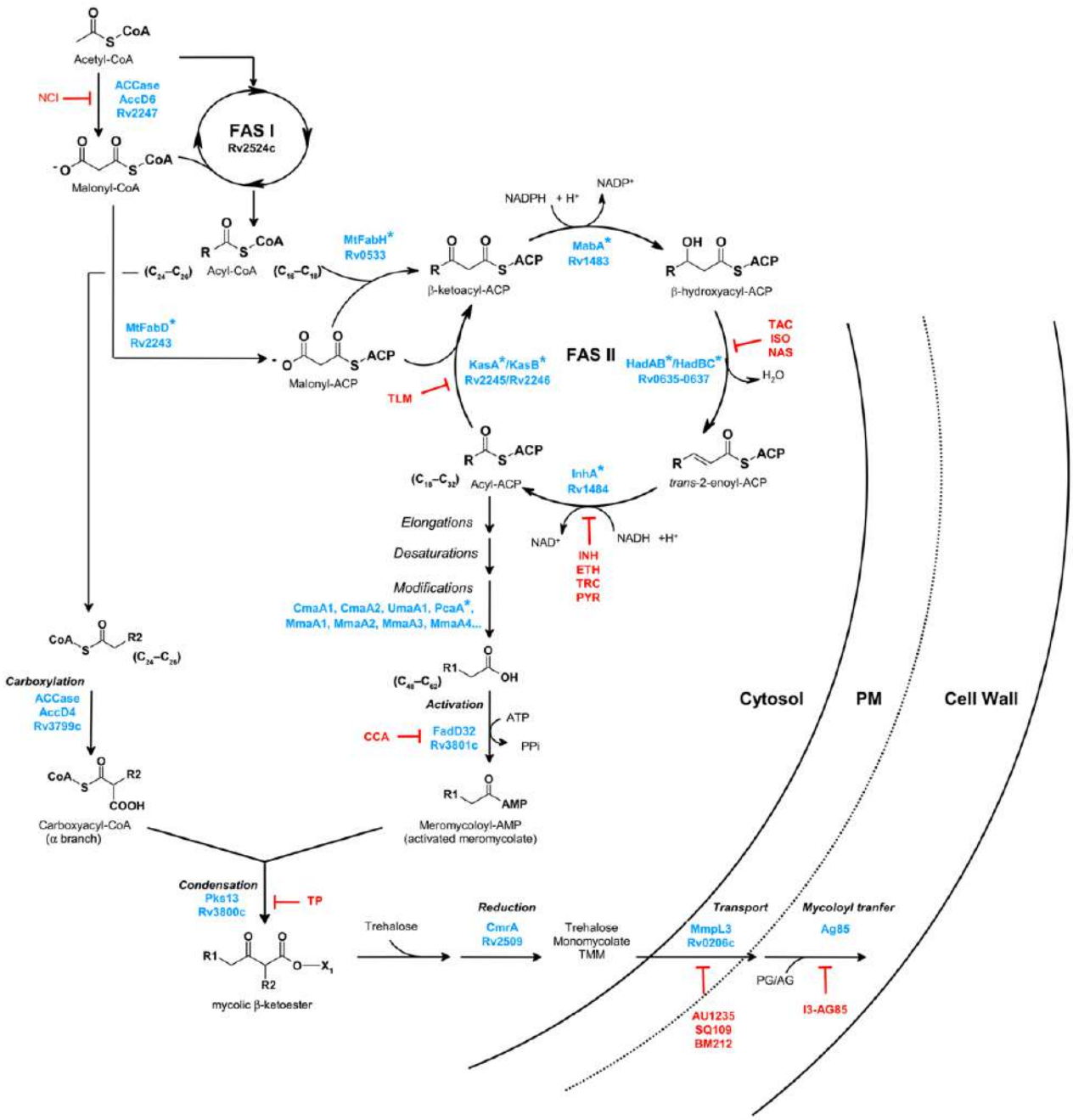


Schéma 1 : biosynthèse des acides mycoliques et les médicaments qui ciblent les enzymes impliquées. Les protéines régulées par les protéines Ser/Thr kinases sont indiquées par un astérisque (*). Les inhibiteurs connus et les étapes inhibées dans la voie sont indiqués (en rouge) : NCI : NCI-172033, TAC : thiacétazone, ISO : isoxyle, NAS : phénylsulfanylméthyl-[1,4]-naphtoquinones NAS-21 et NAS-91, INH : isoniazide, ETH : éthionamide, TRC : triclosan, PYR : pyridomycine , TLM : thiolactomycine, CCA : 4,6-diaryl-5,7-diméthylcoumarine, TP : composé comprenant un thiophène, AU1235, SQ109, BM212 et I3-AG85.
Source : Marrakchi *et al, Chem. Biol.* **2014**, *21* (1), 67–85.

V InhA, l'énoyl ACP réductase, la protéine cible

Le système FAS-II fonctionne *via* l'activité consécutive de quatre enzymes : MabA, HadAB/HadBC, InhA et KasA/KasB.

V.A Fonction et mécanisme d'action de la protéine

Depuis les années 1950, l'isoniazide est l'antibiotique le plus largement utilisé pour lutter contre la tuberculose, mais ce n'est qu'en 1994 que son mécanisme d'action, basé sur l'inhibition de l'enzyme InhA, a été élucidé. Au fil des ans, différentes résistances sont apparues le rendant inactif sur certaines souches tuberculeuses. Une équipe américaine a fait la corrélation entre les résistances dans les isolats de Mtb et la diminution, voire la perte d'activité du gène *katG* montrant ainsi le rôle essentiel joué par la catalase-peroxidase KatG dans l'activité de l'isoniazide. Par la suite, cette même équipe a montré que l'isoniazide inhibait la biosynthèse des acides mycoliques[114].

InhA, produit du gène *inhA*, est une énoyl-acyl carrier protein (ACP) réductase dépendante du NADH, appartenant à la famille des enzymes déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR) qui catalyse la réduction des chaînes de 2-*trans*-énoyl possédant au moins 12 atomes de carbone (Schéma 2). Cette activité enzymatique correspond à la dernière étape de chaque cycle d'élongation de deux atomes de carbone dans la voie de biosynthèse des acides gras[115]. De par son activité au sein du système FAS-II, InhA a été largement caractérisée et étudiée depuis sa découverte[116].

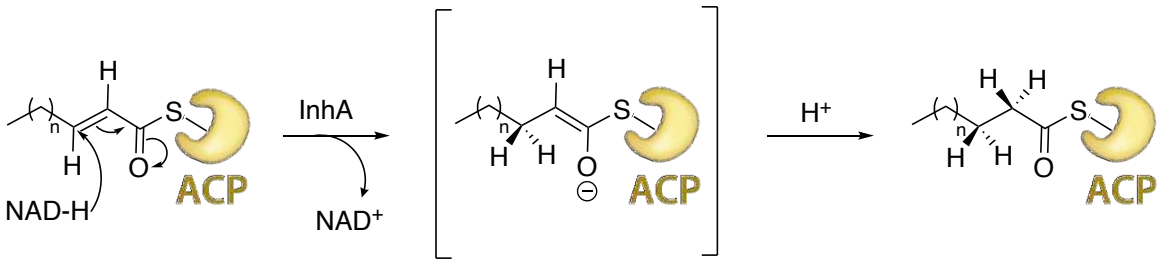


Schéma 2 : réduction du substrat 2-*trans*-énoyl-ACP catalysée par InhA en présence du cofacteur NADH.

La protéine InhA comprend 269 résidus d'acides aminés correspondant à un poids moléculaire de 28,5 kDa. Son coefficient d'extinction molaire théorique est de 30 940 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 280 nm. En solution, elle est majoritairement sous forme tétramérique.

Différentes études ont mis en évidence les résidus jouant un rôle important dans la réduction de la double liaison du substrat. La réduction catalytique de la double liaison du substrat consisterait en la formation d'un intermédiaire énolate par le transfert direct d'un anion hydrure du carbone en position 4 du nicotinamide vers la position C3 du substrat. Dans ce processus, le résidu Phe149 a été identifié comme jouant un rôle critique, car il s'avère nécessaire pour induire la bonne conformation du motif nicotinamide du cofacteur NADH facilitant ainsi le transfert d'hydrure entre le cofacteur et le substrat énoyle[117]. Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus Tyr158 et Lys165 comme deux autres résidus importants sur le plan catalytique. La mutation de la Lys165 en alanine ou en méthionine empêche la liaison du NADH, tandis que la mutation en glutamine ou en arginine n'a pratiquement aucun effet. La structure cristallographique du complexe sous forme holo (InhA/NAD(H)) montre que le résidu Lys165 établit une liaison hydrogène avec les deux groupements hydroxyles du ribosyle du nicotinamide. En ce qui concerne le résidu Tyr158, des études de mutagenèse dirigée ont montré que son remplacement par un résidu de type Ser n'avait aucun effet sur la fixation du NADH et par des résidus de type Phe et Ala améliorait de manière significative le K_M pour le cofacteur (d'un facteur de 33 et 13 pour les mutations en phénylalanine et alanine, respectivement). Des études structurales ont confirmé que le résidu Tyr158 ne contribuait pas de manière significative à la liaison

du NADH mais jouerait plutôt le rôle de catalyseur électrophile, stabilisant l'énolate intermédiaire de la réaction. Une fois cet énolate formé, un transfert de proton se produit impliquant les deux hydroxyles du ribose ainsi que la lysine 165[118,119]. La sérine 123 assure le bon positionnement d'une molécule d'eau par le biais de liaisons hydrogène avec la chaîne peptidique. Le Schéma 3 représente le mécanisme catalytique de la réduction de la double liaison par la protéine InhA en indiquant les résidus qui y contribuent[120].

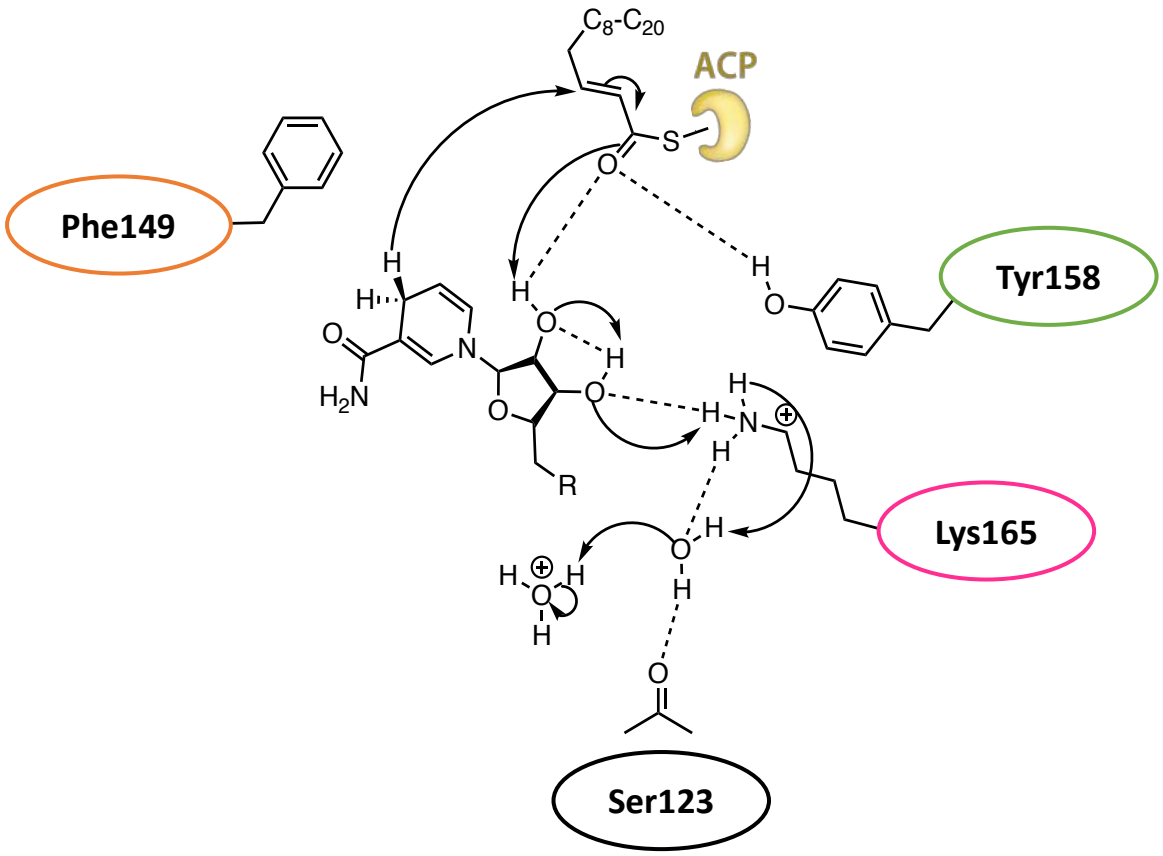


Schéma 3 : représentation du mécanisme catalytique de la réduction de la double liaison du substrat par la protéine InhA et les acides aminés qui y contribuent.
Source : Parikh *et al*, *Biochemistry,* **1999**, *38(41)*, 13623-13634.

V.B Les méthodes de recherche des nouveaux inhibiteurs d'InhA

Diverses stratégies de criblage, telles que le criblage à haut débit (HTS), la technologie des bibliothèques encodées, le criblage basé sur les fragments et la conception *in silico*, ont été utilisées pour identifier de nouvelles classes d'inhibiteurs d'InhA[121].

V.B.1 Criblage à haut débit (HTS)

Le criblage à haut débit consiste à tester un très grand nombre de structures chimiques différentes contre une protéine cible d'une maladie ou à faire un criblage phénotypique afin d'identifier les composés les plus performants. Les toutes premières campagnes de HTS ciblant InhA ont conduit à l'identification de pyrazoles et de pipérazine indoleformamide comme nouvelles pistes d'inhibiteurs de la protéine. He Xin *et al* ont identifié 30 molécules parmi lesquelles les arylamides et les pyrrolidine

carboxamides ont été sélectionnés comme composés principaux[122–124]. Les structures chimiques des familles identifiées par criblage haut débit sont reportées dans la Figure 13.

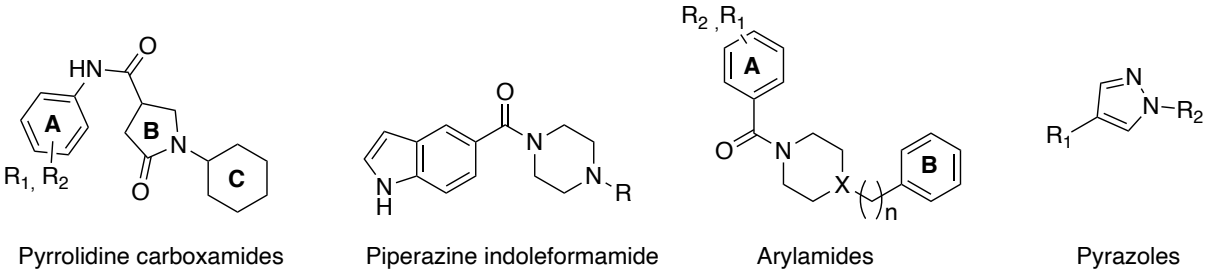


Figure 13 : structure générale des pyrrolidines carboxamides, des pipérazines indoleformamides, des arylamides et des pyrazoles.
Source : Campaniço *et al, Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 150, 525–545.

V.B.2 La technologie des bibliothèques chimiques codées par ADN

En 1995, Brenner et Lerner ont proposé la technologie des bibliothèques codées par ADN comme plateforme technologique utilisant des bibliothèques combinatoires marquées par l'ADN pour l'identification de petites molécules se liant à des cibles protéiques. Chaque molécule de la bibliothèque codée est représentée par une compilation unique de blocs de construction attachés à la région codante de l'ADN. Le criblage des bibliothèques est effectué par une sélection axée sur l'affinité[125]. Encinas *et al* ont identifié une nouvelle classe de puissants inhibiteurs d'InhA à l'aide de cette technologie et de son optimisation ultérieure. Cette étude a permis de mettre à jour des composés de la classe des prolines (Figure 14) avec une concentration inhibitrice médiane (IC_{50}, concentration permettant d'inhiber de 50% l'activité de l'enzyme) de 34 nM et une CMI de 8 µM[126].

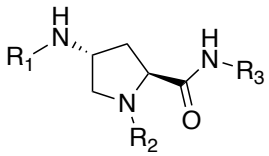


Figure 14 : structure générale des prolines.
Source : Encinas *et al, J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1276–1288.

V.B.3 Le criblage basé sur les fragments

La technique FBDD (Fragment-Based Drug Discovery) est reconnue comme un outil puissant pour découvrir des ligands ou des fragments de petites molécules, qui sont ensuite transformés en composés principaux pour le développement de médicaments. Cette approche a été largement utilisée dans la lutte contre la tuberculose[127,128]. Contrairement aux composés utilisés dans le criblage à haut débit, les fragments sont plus petits, avec un poids moléculaire généralement inférieur à 300 Da, et ont des affinités de liaison plus faibles, de l'ordre de 0,1 à 10 mM[129].
Les différences entre le HTS et le FBDD sont représentées dans la Figure 15.

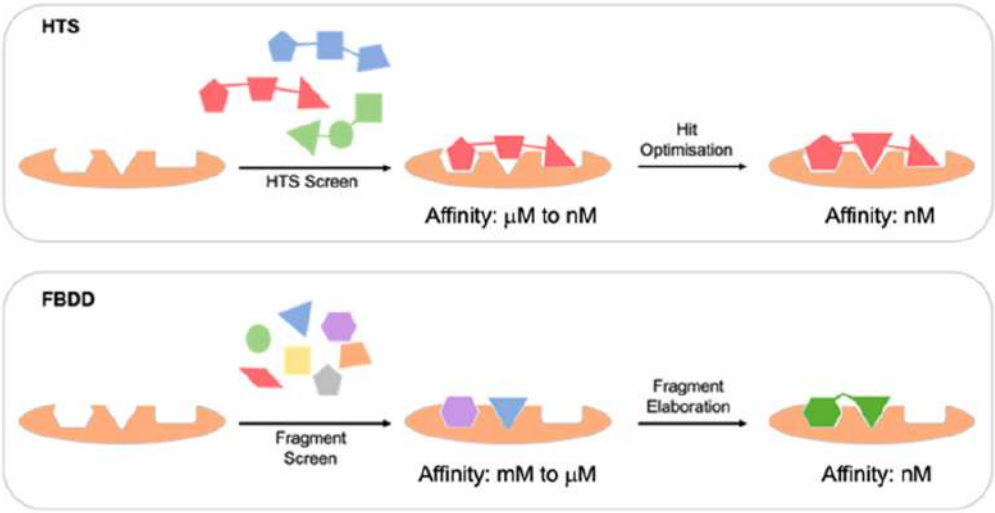


Figure 15 : comparaison des interactions cible-ligand entre le HTS et le FBDD.
Source : Bedwell *et al*, *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, *100* (4), 469–486.

L'identification des nouveaux composés par fragments est généralement divisée en plusieurs étapes. Un criblage préliminaire des fragments peut être effectué utilisant des techniques biophysiques ou biochimiques telles que la fluorimétrie différentielle à balayage (DSF), la résonance plasmonique de surface (SPR) ou des techniques de RMN ou de cristallographie aux rayons X afin d'identifier un certain nombre de fragments dits « points de départs »[130]. L'enjeu, ensuite, consiste à transformer le fragment initial en un candidat médicament pour en améliorer l'affinité (représentée par la constance de dissociation K_d) et l'activité (représentée par l'IC_{50}) selon trois approches, reportées dans la Figure 16, la croissance, la liaison ou la fusion des fragments. Il est à noter que la résolution des structures 3D des complexes protéine-ligand est un outil puissant pour étudier les possibilités de modification de la molécule, favorisant ainsi de nouvelles interactions avec la protéine[131,132,133].

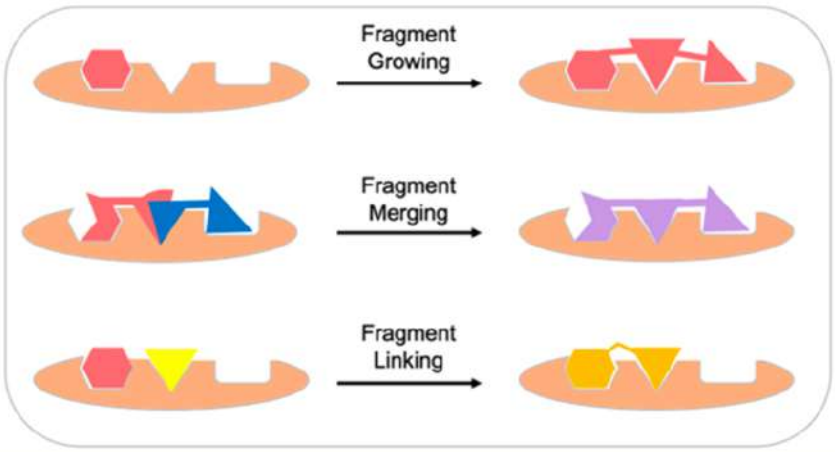


Figure 16 : représentation des méthodes d'évolution de fragments ; la croissance, la liaison ou la fusion.
Source : Bedwell *et al*, *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, *100* (4), 469–486.

La technique par croissance de fragments permet d'ajouter des fonctionnalités supplémentaires au fragment initial par le biais d'une synthèse chimique par étapes. Il s'agit de la méthode la plus utilisée. En effet, 90 % des petites molécules dérivées de fragments actuellement en essais cliniques ont été développées de cette manière[134]. La fusion de fragments est l'approche la moins courante et consiste

à combiner deux fragments ou plus par des motifs qui se chevauchent pour générer un seul ligand plus puissant. Enfin, la technique de liaison de fragments choisit deux fragments qui se lient à des régions distinctes de la protéine et utilise un espaceur pour les lier de manière covalente, formant ainsi un inhibiteur plus grand et plus puissant[135]. En théorie, cette dernière approche devrait être le moyen le plus efficace d'améliorer l'affinité de la liaison en raison de ce que l'on appelle « l'effet de super-additivité »[136]. Le défi de cette stratégie est d'identifier des fragments très proches dans le site actif pour lesquels l'espaceur introduit n'a pas d'effet négatif sur l'activité du fragment. La méthode de déconstruction-reconstruction, les approches basées sur la structure et les approches basées sur la cible permettent l'application de ces stratégies d'évolution des fragments[134]. Des inhibiteurs potentiels de la protéine InhA ont été conçus par l'approche basée sur la structure, les autres méthodes n'ont pas fait l'objet d'étude.

La découverte de médicaments basée sur la structure (SBDD) est apparue dans les années 70 et s'est développée depuis dans le milieu académique et l'industrie pharmaceutique[137]. La conception et l'optimisation du composé sont facilitées à partir d'informations structurales obtenues par la cristallographie aux rayons X, la RMN ou la cryo-microscopie électronique. Cette approche a guidé le développement de nouveaux inhibiteurs contre une série de cibles notamment les enzymes, les acides nucléiques jusqu'aux interactions protéine-protéine[138,139].

En 2020, une approche basée sur la structure a permis le développement d'un ligand actif sur la protéine InhA de Mtb. Une bibliothèque de 800 fragments a préalablement été analysée par criblage biophysique permettant l'identification de cinq fragments, représentés ci-dessous (Figure 17) grâce à la DSF, la RMN basée sur les ligands et la cristallographie aux rayons X[140].

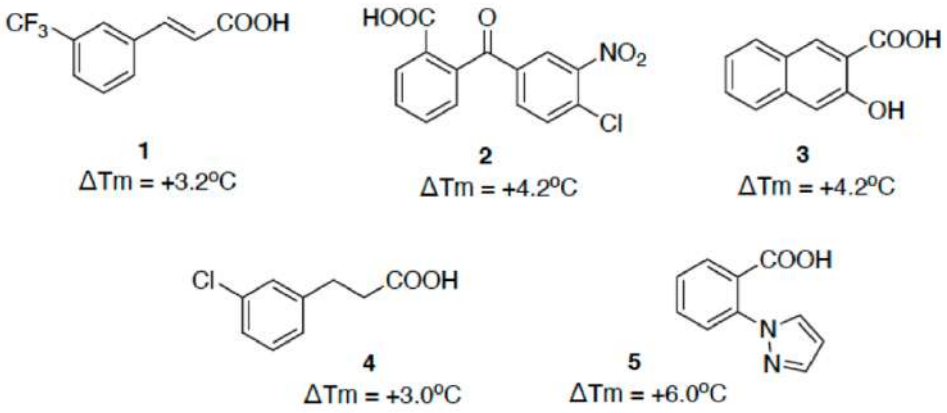
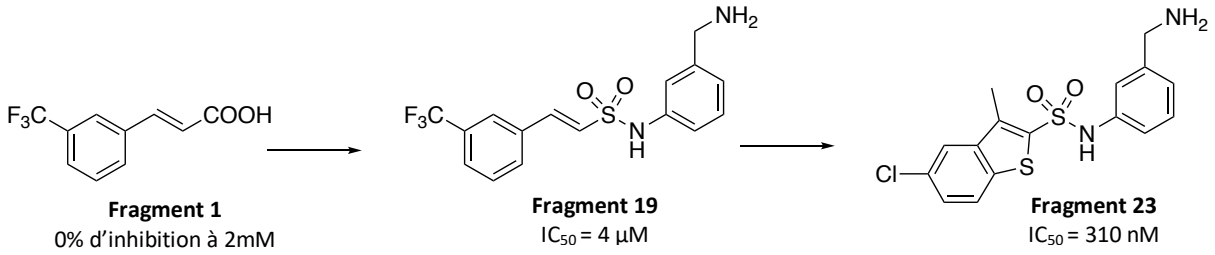


Figure 17 : structures chimiques des cinq fragments sélectionnés.
Source : Sabbah *et al*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4749–4761.

La croissance des ligands faite à partir du fragment **1** (Figure 18), choisi pour sa nouveauté et sa facilité de synthèse, a été suivie par des essais enzymatiques, de cristallographie aux rayons X et par des études de docking moléculaire. L'acide carboxylique du fragment **1** a alors été remplacé par un sulfonamide agissant comme espaceur sur lequel ont été greffés différents groupements analysés avec les outils précédemment cités. Les auteurs de l'étude ont ainsi validé le groupement benzèneméthanamine comme motif inhibant la protéine InhA. Le remplacement du phényle du fragment **1** par le noyau 5-chloro-3-méthylbenzothiophène a permis d'augmenter l'activité inhibitrice contre InhA, passant d'un

IC_{50} de 4 µM à 310 nM. Ces trois outils ont permis d'évaluer les fragments individuellement puis tout au long de la croissance afin de vérifier l'inhibition. De manière générale et confirmée par cette étude, la radiocristallographie aux rayons X permet d'élucider le mode de fixation des fragments et des ligands assemblés pour apporter des modifications chimiques judicieuses[140].



Fragment 1
0% d'inhibition à 2mM

Fragment 19
IC_{50} = 4 µM

Fragment 23
IC_{50} = 310 nM

Figure 18 : stratégie de croissance des fragments et activités inhibitrices contre InhA de Mtb.
Source : Sabbah *et al*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4749–4761.

Toutes les approches préalablement citées ont permis la découverte de nombreux inhibiteurs d'InhA mais nombre d'entre eux ne sont pas devenus des candidats médicaments. En effet, pour avoir un candidat médicament contre la tuberculose, il faut à la fois une activité *in vitro* correspondant à la liaison d'un ligand à la protéine InhA et une activité *in vivo* sur la mycobactérie indiquant que ce ligand a pu franchir l'enveloppe mycobactérienne particulièrement imperméable et ces deux conditions ne sont pas toujours réunies.

V.C Structure cristallographique de la protéine

La première structure cristallographique d'InhA de Mtb a été publiée sous forme holo (avec le cofacteur NAD(H)) en 1995[141]. À ce jour, la Protein Data Bank (PDB) compte 115 structures cristallographiques d'InhA sous forme apo (seule) ou de complexes avec le cofacteur et des ligands. Toutes les structures ont été résolues à plutôt haute résolution (2,1 Å en moyenne).

La description d'un cristal se fait avec le groupe d'espace et les paramètres de maille. La protéine InhA a une certaine capacité à induire un polymorphisme cristallin, c'est-à-dire une aptitude à cristalliser dans des formes cristallines différentes. Au total, 13 groupes d'espace différents sont répertoriés, certains d'entre eux sont retrouvés avec des paramètres de maille différents correspondant à des formes cristallines distinctes.

L'unité asymétrique d'un cristal est le plus petit volume à l'intérieur de la maille à partir duquel l'ensemble du cristal peut être reconstitué. Une chaîne correspond à l'ensemble des résidus de la protéine, soit les 269 résidus dans le cas d'InhA. Au sein d'une même unité asymétrique, nous pouvons observer plusieurs chaînes de protéine (1, 4, 6, 8 chaînes). Le nombre de chaînes dans l'unité asymétrique est dépendant du groupe d'espace et des paramètres de maille et ces chaînes sont considérées comme « indépendantes », nous pouvons voir des fluctuations au niveau des conformations des acides aminés et des ligands d'une chaîne à une autre.

Dans le tableau suivant (Tableau 3), toutes les structures ont été classées par groupe d'espace et paramètres de maille identiques, triées en fonction de leur redondance. Le groupe d'espace le plus courant de la protéine InhA est $P6_222$, il s'agit d'un groupe hexagonal.

Groupe d'espace	Paramètres de mailles a, b, c (Å); α, β, γ (°)	Code PDB des structures	Nombre de molécule dans l'unité asymétrique	Nombre de structures
$P6_222$	100, 100, 140 ; 90, 90, 120	1ENY, 1ENZ, 1ZID, 2AQ8, 2AQH, 2AQI, 2AQK, 2H9L, 2IDZ, 2IE0, 2IEB, 2NV6, 2PR2, 3OEW, 3OEY, 3OF2, 4D0R, 4DQU, 4DRE, 4DTI, 4TRJ, 4TRN, 4TRO, 4TZK, 4TZT, 4U0J, 4U0K, 4UVD, 4UVE, 4UVG, 5CP8, 5OIC, 5OIL, 5OIM, 5OIP, 5OIR, 6EP8, 6SQ5, 6SQ7, 6SQ9, 6SQB, 6SQD, 6SQL, 7KXA	1	44
$P2_12_12_1$	90, 100, 180 ; 90, 90, 90	4COD, 4OHU, 4OXK, 4OXY, 4OYR, 5CPF, 5JFO, 5OIN, 5OIS, 5OIT, 7KLI	4	11
$P2_1$	65, 110, 68 ; 90, 98 90	4BII, 4BQR, 4D0S, 4UVH, 4UVI, 5G0S, 5GOT, 5G0U, 5G0V, 5G0W, 5OIQ	4	11
$C2$	100, 80, 190 ; 90, 95, 90	1BVR, 1P44, 2B35, 2B36, 4BGE, 4BGI, 4BQP, 4TRM, 6R9W	6	9
$I4_122$	90, 90, 180 ; 90, 90, 90	3FNG, 3FNH, 4OIM, 5UGU, 5VRL, 5W07, 6UDF	1	7
$I2_12_12_1$	90, 100, 190 ; 90, 90, 90	1P45, 2NSD, 2NTJ, 2NTV, 4OXN, 5OIO	2	6
$C2$	125, 92, 103 ; 90, 106, 90	3FNE, 3FNF, 5COQ, 5VRM	4	4
$P3_2$	100, 100, 120 ; 90, 90, 120	4R9R, 4R9S, 7E48	4	3
$P2$	88, 92, 180 ; 90, 95, 90	5MTP, 5MTQ, 5MTR	8	3
$C222_1$	80, 100, 380 ; 90, 90, 90	2B37, 5CPB, 5VRN	6	3
$P2_1$	85, 85, 90 ; 90, 115, 90	2X23, 4QXM	4	2
$P6_422$	95, 95, 130 ; 90, 90, 120	6YUU	1	1
$P2_122_1$	90, 130, 177 ; 90, 90, 90	5UGS	6	1
$P2_1$	74, 90, 91 ; 90, 90, 90	7K73	4	1
$P1$	55, 63, 65 ; 97, 85, 103	2IED	4	1
$I121$	87, 93, 180 ; 90, 97, 90	5UGT	4	1
$C222_1$	90, 160, 91 ; 90, 90, 90	2X22	2	1
$C2$	78, 102, 77 ; 90, 114, 90	7U0M	2	1
$C2$	207, 92, 98 ; 90, 118, 90	7L6C	4	1
$C2$	73, 113, 65 ; 90, 104, 90	5OIF	2	1

Tableau 3 : classification des structures d'InhA à partir des données de la PDB.

Les différentes structures d'InhA ont été analysées afin de visualiser les éléments importants des interactions avec ou sans les ligands. Nous verrons les différents éléments que l'on considère comme important de la structure cristallographique d'InhA.

V.C.1 Comparaison des structures cristallographiques des formes apo et holo

InhA fait partie de la famille des enzymes déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR). La principale caractéristique de cette famille est le motif structural protéique nommé « Rossmann fold » composé d'un feuillet β comprenant 6 brins parallèles reliés à deux paires d'hélices α. Ce motif permet

de former le site de liaison du NADH et les trois hélices α5, α6 et α7 et feuillets β4 et β5 permettent de créer la cavité profonde du substrat. Une partie de cette extension, appelée « boucle de liaison du substrat », la SBL (résidus 196 à 219) qui consiste en deux hélices α6 et α7 perpendiculaires, forme un côté de la cavité de liaison du substrat[119,142]. La protéine InhA est une enzyme tétramétrique (Figure 19).

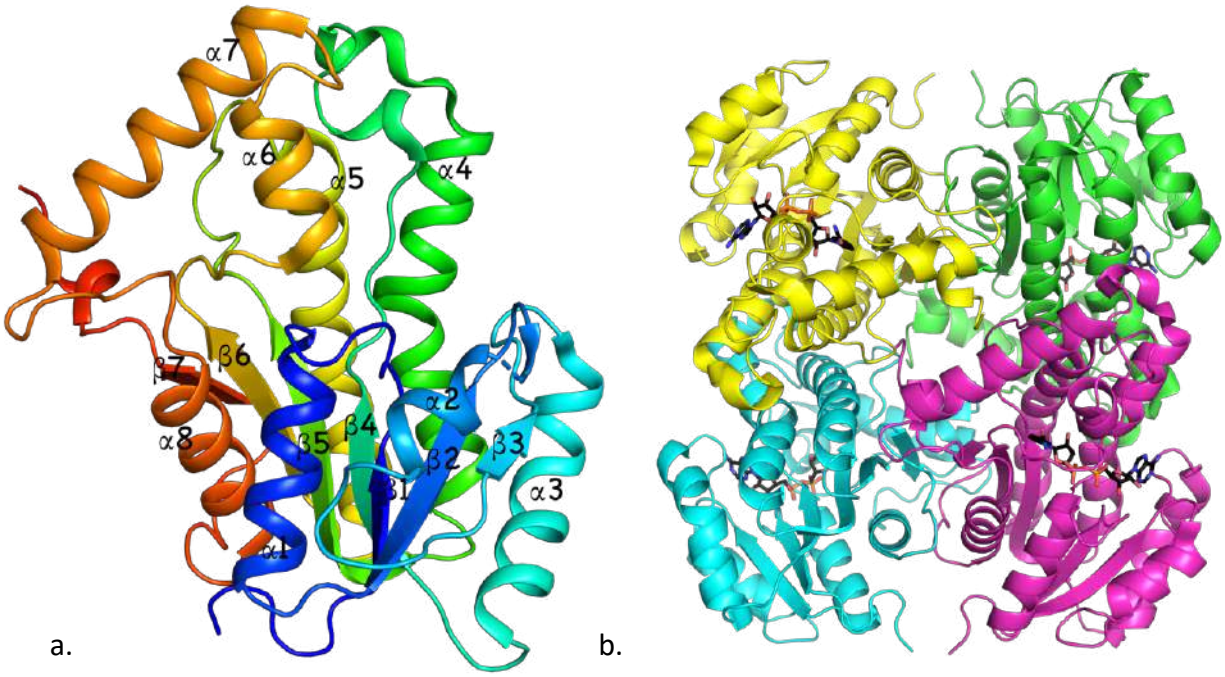


Figure 19 : a. Structure tertiaire de InhA. Forme apo (4TRM-E) colorée du bleu au rouge des extrémités N- à C- terminales. b. Structure tétramérique de InhA (4COD). Chaque protomère est représenté d'une couleur différente, le cofacteur NAD(H) est représenté en noir.

La SBL peut adopter plusieurs conformations : soit en position ouverte comme dans la structure cristallographique de la forme apo (PDB : 4TRM-E[a])[143] où la poche enzymatique est plus grande, soit en position fermée (2X23-A, **TCU**)[144] ou encore en position intermédiaire. La poche du site actif est très large et comprend deux espaces composés du portail majeur qui est complètement ouvert et exposé au solvant et du portail mineur qui correspond à une deuxième cavité plus petite et moins exposée. Les deux espaces sont reliés par une petite ouverture (Figure 20, Figure 21).

[a] Dans ce manuscrit, les structures seront déclinées de la façon suivante : (codePDB-chaîne, **nom PDB du ligand**).

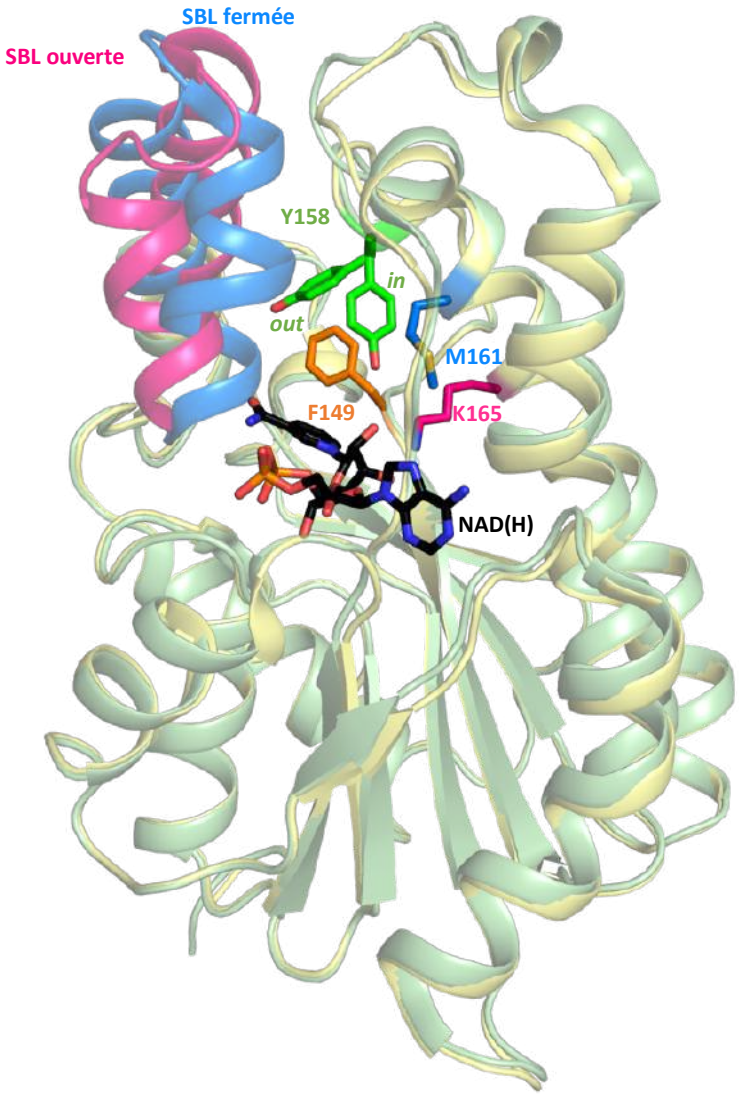


Figure 20 : a. Comparaison de la forme apo (4TRM-E, en jaune et SBL en magenta) et forme fermée de la SBL (2X23-A, en vert et SBL en bleu). Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement. Les résidus Phe149, Tyr158 et Lys165 de la triade catalytique et Met161 sont respectivement en orange, vert, magenta et bleu et le cofacteur NAD(H) en noir. Pour des raisons de clarté, le ligand **TCU** n'est pas représenté.

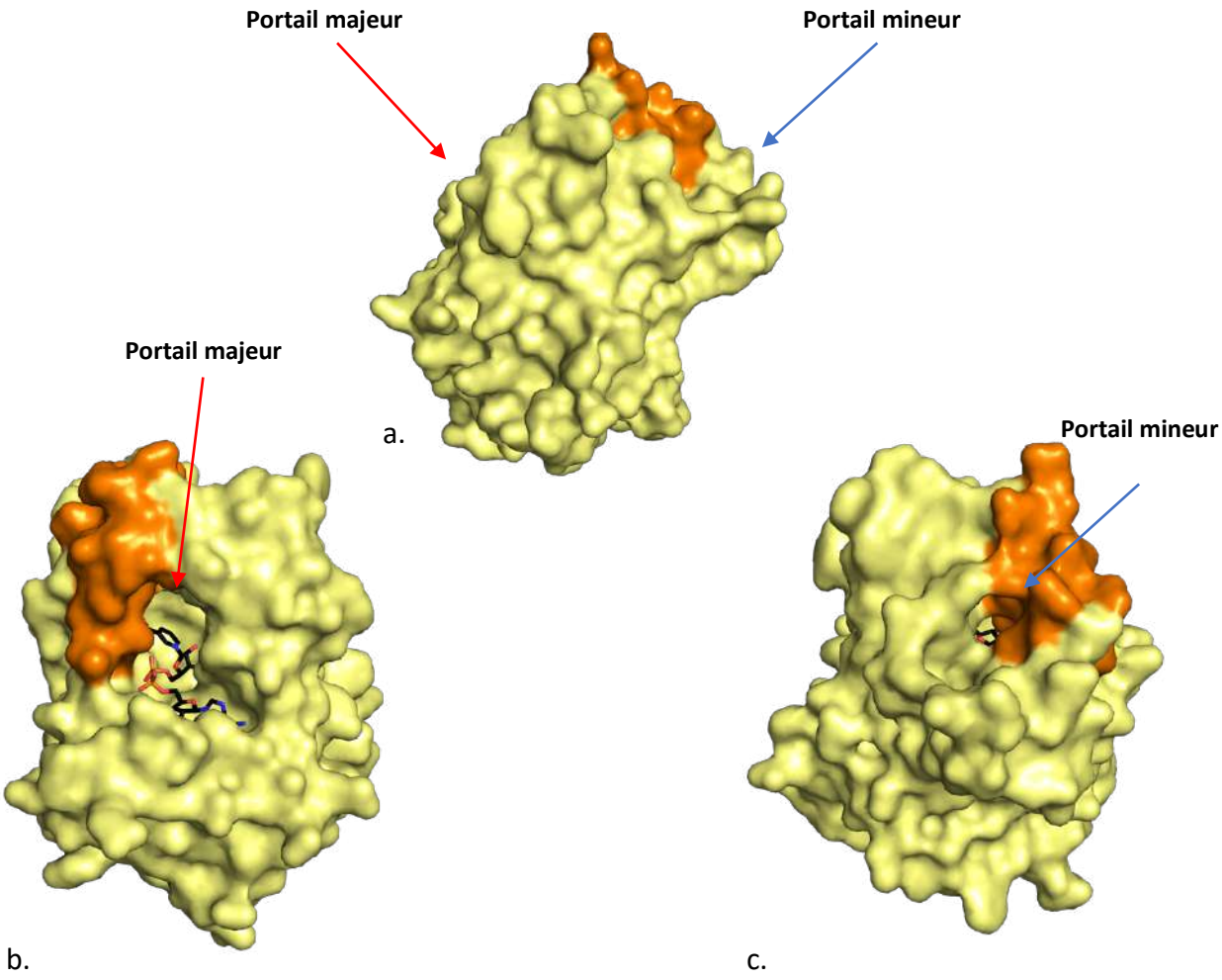


Figure 21 : structure de la surface de la protéine InhA. a. Surface de la structure 2X23-A. b. Surface de la structure 1ENY montrant le portail majeur. c. Surface de la structure 2X23-A montrant le portail mineur.

La structure de la forme holo a été résolue pour la première fois en 1995 à une résolution de 2,2 Å. Cette structure a permis de visualiser la molécule de NAD(H) qui est enfouie dans le site de liaison et de nombreuses liaisons hydrogène et interactions de van der Waals sont observées. Les résidus Phe41, Asp64 et Val65 stabilisent la partie adénine, tandis que les résidus Ile21, Met147, Phe149, Ala191 et Ile194 interagissent avec le motif nicotinamide au fond de la poche de liaison. Les résidus Ser20, Ile21 et Thr196 contribuent à la liaison de la partie pyrophosphate alors que les résidus Gly14, Gly96, Met147 et Lys165 interagissent avec les riboses. Depuis 1995, de nouvelles structures cristallographiques de la forme holo ont également été publiées : 2AQ8[145], 3OEW[146], 4DRE[147] et 4TRN[143] à des résolutions respectives de 1,9 Å, 2,2 Å, 2,4 Å et 2,0 Å. La comparaison des cinq structures cristallographiques a montré une parfaite superposition confirmant que la forme holo a potentiellement une seule conformation. Dans certaines structures, il est observé une molécule de MPD, l'agent cristallisant, au centre de la poche enzymatique mais cela n'entraîne pas de perturbation du cofacteur ou des acides aminés.

La forme apo a été résolue en 2015 à une résolution de 1,8 Å (4TRM)[143]. Une superposition quasi-parfaite des six chaînes de l'unité asymétrique est observée excepté pour la Tyr158 qui adopte deux conformations distinctes ; soit prise en « sandwich » entre les résidus Met161 et Phe149, appelée conformation *in,* soit pointant en dehors du site actif, vers la SBL, appelée conformation *out*.

La comparaison entre les structures des formes apo et holo permet d'identifier certaines perturbations structurales. La SBL de la forme apo montre un désordre qui n'est pas observé dans la forme holo. Cela peut s'expliquer par la stabilisation du dipôle de l'hélice α6 par les charges négatives du groupe pyrophosphate à proximité du résidu Thr19 et par la formation de liaison hydrogène entre la fonction amide du nicotinamide et la chaîne principale du résidu Ile194. Dans la forme holo, la Tyr158 est stabilisée en conformation *out* tandis que la forme apo montre les deux conformations (Figure 22).

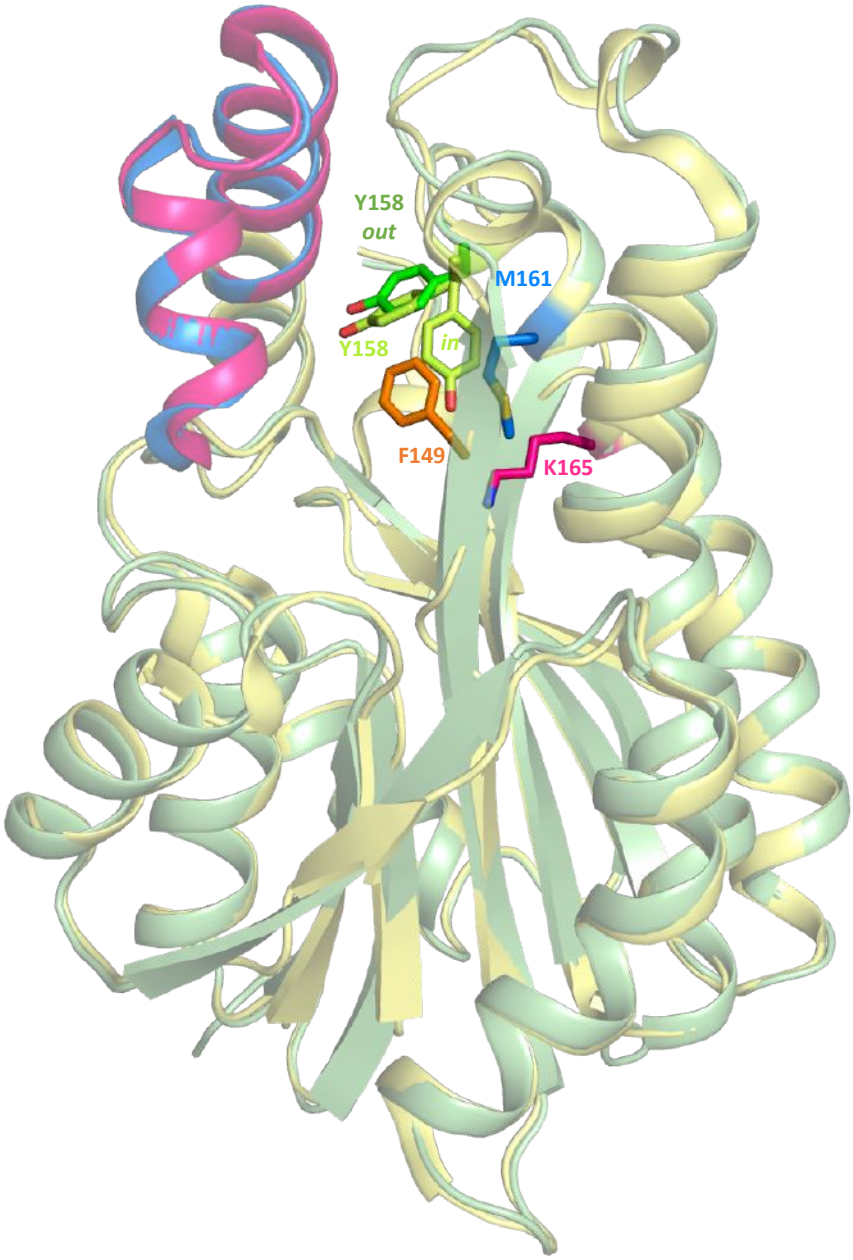


Figure 22 : comparaison de la forme apo (4TRM-E, en jaune et SBL en magenta) et forme holo (1ENY-A en vert et SBL en bleu). Les résidus Phe149 et Lys165 de la triade catalytique et Met161 sont respectivement en orange, vert, magenta et bleu. La Tyr158 de la forme apo est en jaune citron et le celle de la forme holo est en vert. Pour des raisons de clarté, le cofacteur NAD(H) n'est pas représenté.

V.C.2 Structure cristallographique d'InhA en complexe avec l'analogue du substrat THT

InhA permet la réduction de 2-*trans*-énoyl-ACP possédant une longue chaîne carbonée. Rozwarski et ses collègues ont synthétisé un analogue du substrat, le *trans*-2-hexadécénoyl-(*N*-acétylcysteamine)-thioester **THT** (Figure 23) afin de visualiser ses interactions dans la poche enzymatique d'InhA et de faire la corrélation avec les substrats à longue chaîne. Ce dérivé du substrat est composé d'une chaîne d'acide gras à 16 carbones avec une double liaison *trans* entre les positions C2 et C3 qui est attachée par une liaison thioester à une petite partie du bras phosphopantethéine du porteur d'acyle.

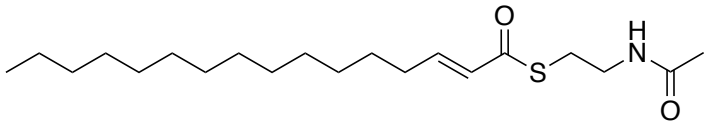


Figure 23 : structure du **THT** (*trans*-2-hexadécénoyl-(N-acétylcysteamine)-thioester).

La structure cristallographique du complexe InhA/NAD(H)/**THT** (1BVR, **THT**)[119] a été résolue en 1999 à une résolution de 2,8 Å montrant que le substrat prend la forme d'un U dans le site actif et se positionne exclusivement dans le portail majeur. La double liaison *trans* du substrat est localisée proche du noyau nicotinamide du NAD(H), au niveau du site de liaison I. La chaîne carbonée du substrat, représentée en bleu, est située proche des résidus hydrophobes de la SBL (Ala198, Met199, Ala201, Ile202, Leu207, Ile215 et Leu218) dans le site de liaison II. Cette structure a permis de confirmer la triade catalytique, composée du résidu Phe149 qui induit la conformation correcte de la partie nicotinamide du cofacteur NAD(H), du résidu Tyr158, en conformation *in*, qui interagit avec l'oxygène du thioester ainsi que de la chaîne latérale du résidu Lys165 qui interagit avec le ribose du NAD(H) (Figure 24).

Pour une simplicité dans la suite du manuscrit, le site de liaison de la double liaison du substrat sera nommé I, le fond du site actif sera représenté par le II et l'entrée du site actif sera le III.

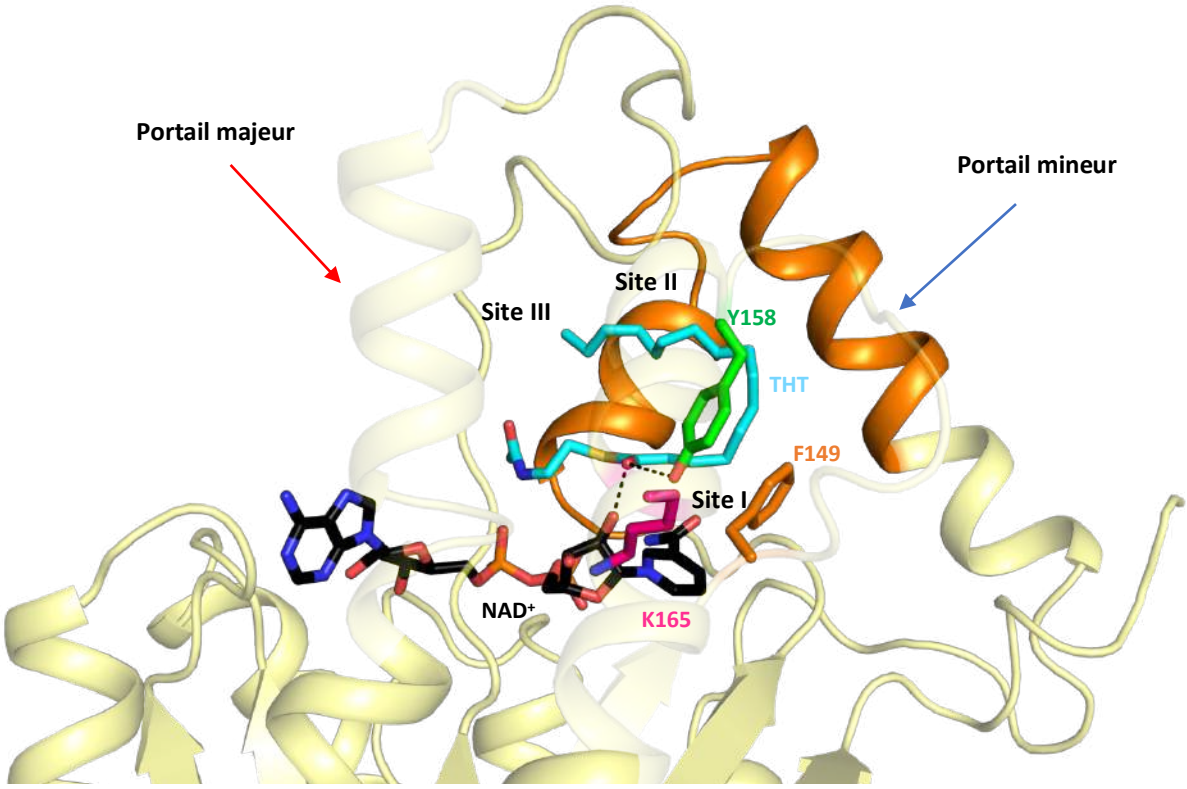


Figure 24 : structure de InhA/NAD(H)/**THT** (1BVR-A en jaune, **THT** en bleu) avec le NAD(H) en noir et les chaînes latérales de la triade catalytique Phe149 (en orange), Tyr158 (en vert) et Lys165 (en rose). La SBL est représentée en orange. Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement. Les sites de liaison I, II et III sont indiqués.

Tous ces paramètres structuraux sont à prendre en compte lors de la synthèse de nouveaux inhibiteurs. L'inhibition d'InhA sera meilleure et plus forte si le ligand établit le maximum d'interaction dans la poche enzymatique prenant ainsi la place du substrat naturel.

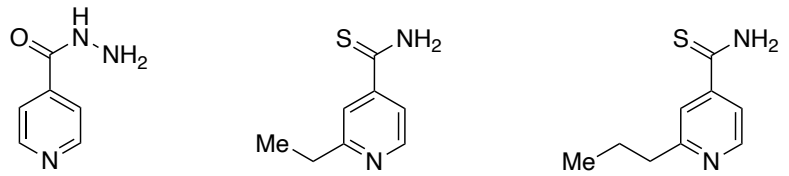
V.C.3 Structures cristallographiques d'InhA en complexe avec des inhibiteurs

InhA est une cible privilégiée pour le traitement de la tuberculose. L'isoniazide, mis sur le marché en 1952 est l'un des agents thérapeutiques le plus efficace et le plus économique pour traiter la tuberculose. C'est une prodrogue qui nécessite une pré-activation par l'enzyme KatG, elle est donc considérée comme un inhibiteur indirect et reste encore largement utilisée comme antibiotique de première intention avec la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol[148].

Depuis maintenant presque 30 ans après la découverte de la protéine InhA, de nombreux inhibiteurs ont émergé qu'ils soient directs ou indirects. Dans la suite, une liste non exhaustive des structures cristallographiques des inhibiteurs d'InhA seront décrites pour analyser leurs liaisons dans le site actif de la protéine.

V.C.3.a Les inhibiteurs indirects d'InhA

La famille des thionamides comprend l'éthionamide et le prothionamide qui sont dérivés de l'isoniazide (Figure 25).



L'isoniazide (**INH**) L'éthionamide (**ETH**) Le prothionamide (**PTH**)

Figure 25 : structures chimiques de l'isoniazide et des thionamides.

L'isoniazide (hydrazide d'acide isonicotinique, **INH**) a une structure simple contenant un noyau pyridinique et un groupe hydrazide, les deux étant essentiels à son activité. En effet, l'hydrazide d'acide benzoïque (analogue structural) ou l'hydrazide d'acide nicotinique (régioisomère de l'**INH**) sont beaucoup moins actifs, tandis que l'isonicotinamide et l'acide isonicotinoïque sont inactifs[149–151]. Les formes actives de Mtb sont très sensibles à l'**INH** avec une CMI allant de 0,15 à 0,44 µM, malheureusement, l'**INH** montre une activité très limitée contre les bacilles dormants[152]. L'**INH** traverse les membranes de la mycobactérie par diffusion passive grâce aux porines présentes dans la paroi cellulaire[153]. Son mécanisme d'action est connu[154,155]. L'**INH** est converti par l'enzyme multifonctionnelle catalase-peroxydase KatG en un intermédiaire actif, le radical isonicotinoyle. Ce dernier se lie de façon covalente au cofacteur NADH pour former, après une étape de réduction, le métabolite actif, l'adduit INH-NADH. Plusieurs adduits ont été formés chimiquement après activation au $MnCl_2$, seule la forme *(4S)*-céto-carboxamide-1,4 dihydropyridine est observée dans la structure cristallographique (4TRO-A) par Rozwarski *et al*. en 1998[143,156–159].

L'éthionamide et le prothionamide sont des antituberculeux appartenant au groupe C, utilisés en dernière intention. Ce sont des prodrogues moins puissantes que l'isoniazide et présentant plus d'effets secondaires. Ces composés sont activés par la monooxygénase EthA contenant de la flavine adénine dinucléotide (FAD) pour former après oxydation un premier intermédiaire *S-oxyde* qui évolue ensuite vers le radical pyridin-4-yl-méthanimine correspondant. Ce radical forme un adduit avec la molécule de cofacteur NADH pour donner l'adduit ETH-NADH et PTH-NADH[93]. Le mécanisme d'action de ces prodrogues est décrit dans la Figure 26.

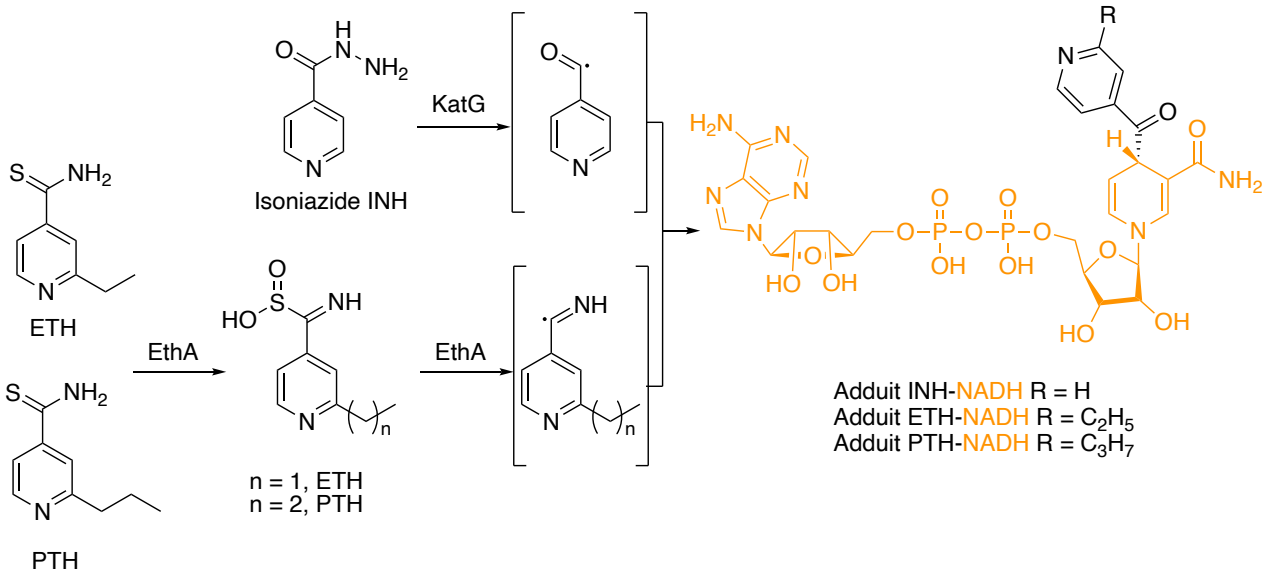
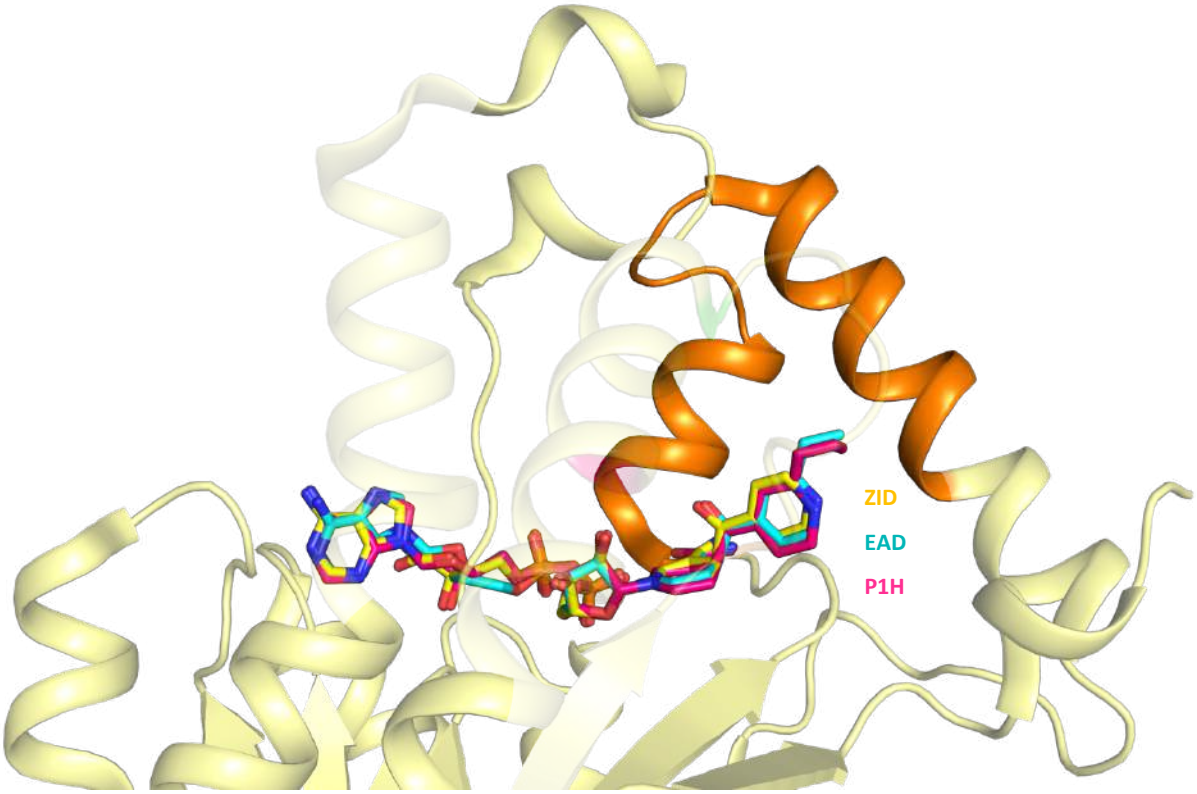
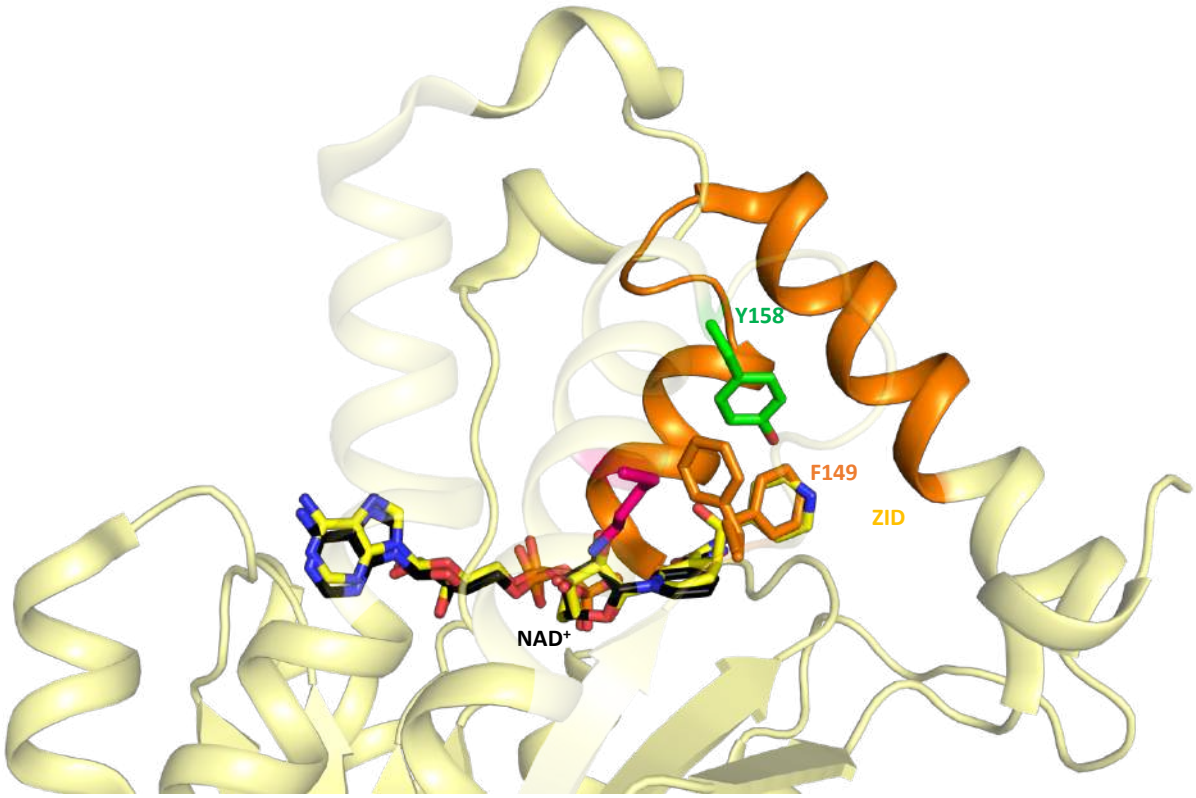


Figure 26 : mécanisme d'action de l'isoniazide et des thionamides avec formation des adduits **INH/NADH**, **ETH/NADH** et **PTH/NADH**.

La structure cristallographique du complexe InhA/**INH-NADH** (1ZID, **ZID**)[156] a été résolue pour la première fois en 1998 par Rozwarski *et al* à une résolution de 2,7 Å et également par deux autres équipes à des résolutions de 2,2 Å (2IDZ, **ZID**)[160] et 1,4 Å (4TRO, **ZID**)[143]. Les structures cristallographiques des complexes InhA/**ETH-NADH** (2H9I, **EAD**)[93]et InhA/**PTH-NADH** (2NTJ, **P1H**)[93]ont été décrites à des résolutions respectives de 2,2 Å et de 2,5 Å. La superposition des cinq structures (1ZID-A, 2IDZ-A, 4TRO-A, 2H9J-A et 2NTJ-A) a montré une même conformation dans le site actif, la SBL est en position ouverte, le résidu Tyr158 est en conformation *out* et la lysine 165 fait des interactions hydrogène avec le noyau ribose du nicotinamide du NADH. La structure cristallographique 4TRO-A a montré la présence concomitante du NADH et de l'adduit **INH-NADH** dans le site actif. Une différence de position du résidu Phe149 est observée. Celui-ci adopte une conformation *out* et fait des interactions avec le noyau nicotinamide du NADH. En revanche cette conformation n'est pas compatible en présence de l'adduit en raison d'un conflit stérique. Le résidu adopte alors une conformation *in* et est stabilisée par le noyau pyridine de l'adduit (Figure 27).



a.



b.

Figure 27 : structures de InhA en présence des adduits. a. Superposition des complexes INH/NADH (4TRO-A, **ZID**, en jaune), ETH/NADH (2H9I-A, **EAD**, en vert) et PTH/NADH (2TNJ-A, **P1H**, en rose). La SBL est en orange. b. Dans la structure 4TRO-A, concomitance de l'adduit et du cofacteur. Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose.

V.C.3.b Les inhibiteurs directs d'InhA

La stratégie de travailler avec des ligands directs d'InhA, c'est-à-dire ceux qui ne nécessitent pas d'étape de pré-activation permet de s'affranchir des résistances liées aux enzymes d'activation. Depuis le début des années 2000, ces inhibiteurs ont été largement étudiés et sont classés par famille chimique qui comprend des thiazoles, des imidazopipéridines, des pyrazoles, des arylamides, de la pyridomycine, des biaryléthers, etc. Seules les familles, biaryléthers, pyridomycine et pipérazine indoleformamides, qui nous ont intéressés au cours de cette thèse, seront répertoriées ci-dessous.

Dans cette partie, les structures cristallographiques sont représentées dans la même orientation. Les chaînes latérales des résidus de la triade catalytique Phe149-Tyr158-Lys165 sont représentées en orange, en vert et en rose respectivement, le cofacteur NAD(H) est en noir et la SBL en orange.

V.C.3.b.1 Les biaryléthers

La famille des molécules biaryléthers est la famille la plus étudiée sur la protéine InhA. En effet, 26 des structures répertoriées dans la PDB, soit 23%, concernent des ligands biaryléthers.

Le triclosan (**TCL**, 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol, Figure 28) est un agent antibactérien et antifongique synthétique à large spectre, utilisé pour la première fois dans des solutions chirurgicales et, depuis les années 80, dans d'innombrables produits ménagers et de soins personnels, ainsi que sur des textiles et des sutures[161].

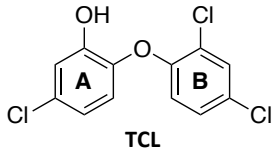


Figure 28 : structure chimique du **TCL**.

Il avait tout d'abord été montré que le **TCL** inhibait EnvM (FabI), l'énoyl réductase d'*Escherichia coli*, ainsi que l'énoyl réductase de *M. smegmatis*[162,163]. Les énoyl réductases de Mtb et de *M. smegmatis* présentent un degré élevé, 97%, de similitude suggérant que le triclosan pourrait être un bon inhibiteur d'InhA. Il a rapidement été étudié sur la protéine InhA et a révélé un pouvoir inhibiteur non compétitif d'InhA, se liant préférentiellement au complexe enzyme/NAD avec une valeur de K_i plutôt modeste (0,2 mM)[164]. Il présente une activité sur les souches mycobactériennes H37Rv assez faible, CMI = 43,1 µM et une activité sur InhA, (IC_{50}) de 1 µM[165]. La première structure cristallographique du complexe InhA/NAD/**TCL** (1P45, **TCL**)[166] résolue en 2003 par Kuo *et al* à une résolution de 2,6 Å a permis de comprendre les interactions et d'identifier les éléments structuraux importants du composé. Celui-ci occupe le même site de liaison I que le **THT** et la position de la SBL est fermée. Le cycle A du **TCL** est engagé dans une interaction de type π-stacking avec le cycle nicotinamide du NAD(H) et est lié par liaison hydrogène au résidu Tyr158 ainsi qu'au ribose du NAD(H). Le cycle B est orienté perpendiculairement par rapport au cycle A, avec un atome de chlore pointant vers le groupement pyrophosphate du cofacteur tandis que l'autre atome de chlore est orienté vers l'entrée de la cavité de liaison, des contacts étroits avec les atomes de la chaîne principale des résidus Phe97 et Met98 sont observés. La SBL se trouve dans une conformation fermée (Figure 29).

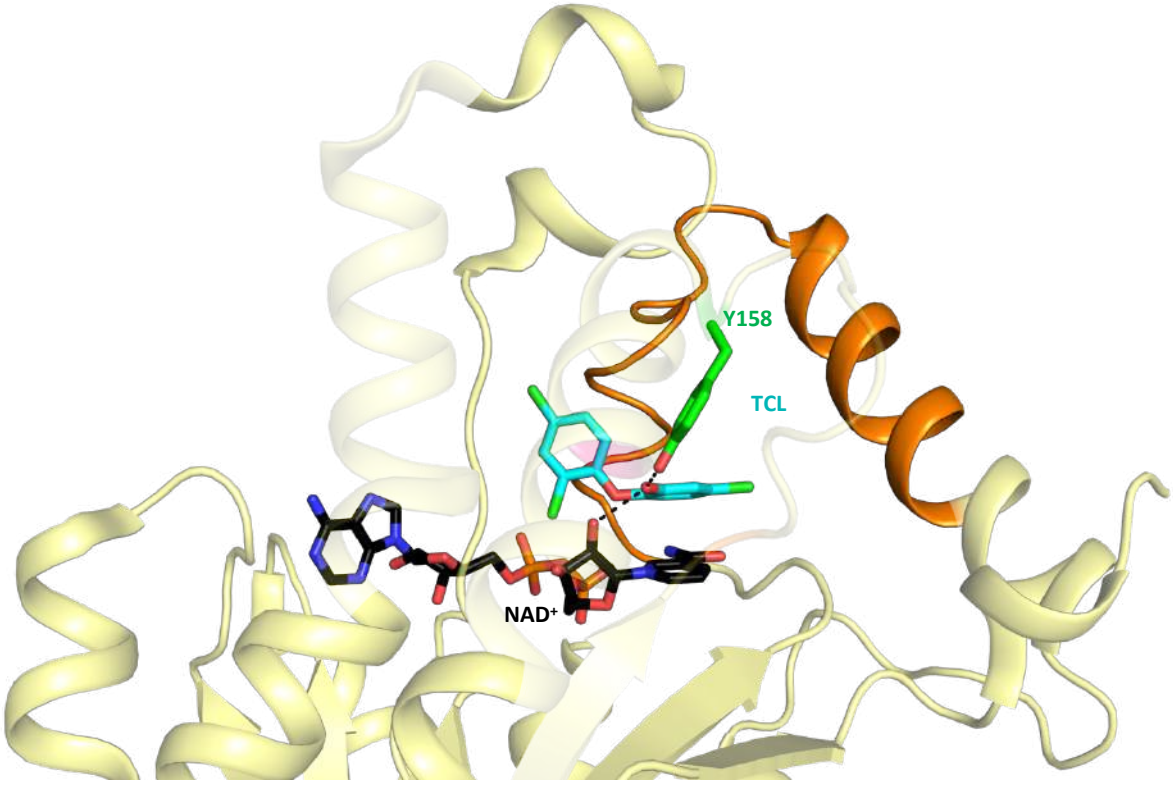
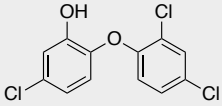
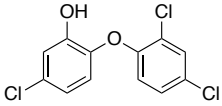
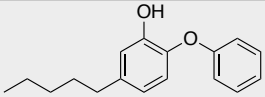
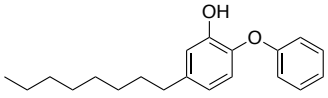
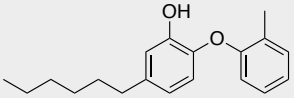
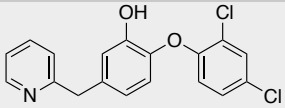


Figure 29 : structure de InhA en présence du **TCL** (1P45-B en jaune, **TCL** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

À partir de ces informations structurales, de nombreuses séries dérivées du **TCL** ont été étudiées afin d'améliorer l'activité *in vitro* et *in vivo*. Seuls les composés cristallisés avec la protéine InhA de Mtb sous forme sauvage sont répertoriés dans le Tableau 4 ci-dessous et seront analysés avec le **TCL** comme référence.

Code PDB	Ligand ID/ PDB	Structure du ligand	Résolution (Å)	IC_{50} InhA	CMI_{50}	Phe 149	Tyr 158	SBL
1P45[166]	**TCL**		2.6	1 µM	20 µM	Out	In	Ouverte / fermée
2B35[165]	**TCL**		2.3	1 µM	20 µM	Out	In	Désordonnée
2B36[165]	**5PP**		2.8	17 nM	CMI_{99} = 3.5 µM	Out	In	Ouverte
2B37[165]	**8PS**		2.6	5 nM	CMI_{99} = 6.4 µM	Out	In	
2X22[144]	**TCU**		2.1	50.7 nM	10.9 µM	Out	In	Fermée
2X23[144]			1.8					
3FNE[167]	**8PC**		2.0	ND	ND	Out	In	Fermée

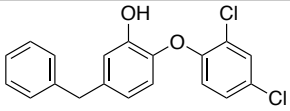
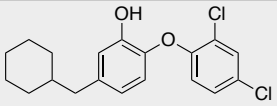
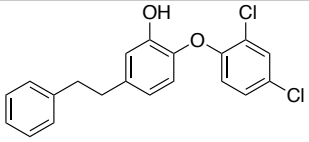
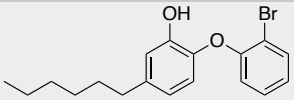
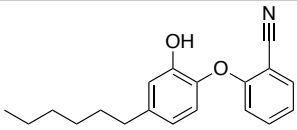
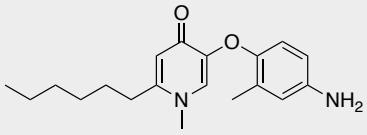
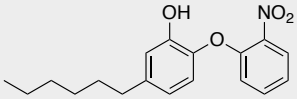
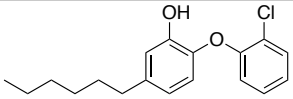
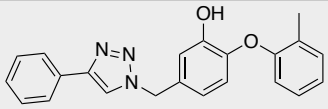
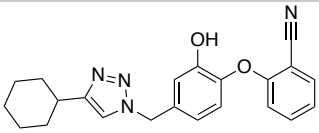
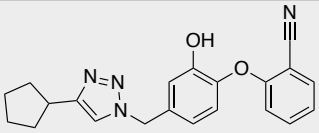
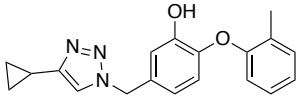
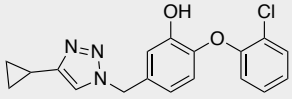
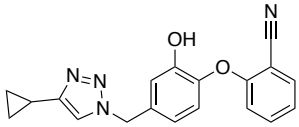
3FNF[167]	**JPM**		2.3	51 nM	27 µM	Out	In	Fermée
3FNG[167]	**JPL**		2.0	110 nM	27 µM	Out	In	Fermée
3FNH[167]	**JPJ**		2.8	21 nM	52 µM	Out	In	Fermée
4OHU[168]	**2TK**		1.6	10 nM	8.8 µM	Out	In	Fermée
4OIM[169]	**JUS**		1.8	235.6 nM	8.4 µM	Out	In	Fermée
4OXK[168]	**1S5**		1.8	40 nM		Out	In	Fermée / Désordonnée
4OXN[168]			2.3					
4OXY[168]	**1TN**		2.4	129 nM	39.6 µM	Out	In	Fermée
4OYR[168]	**1US**		2.3	49 nM	5.1 µM	Out	In	Fermée
5MTP[170]	**53K**		2.0	ND	17 µM	Out	In	Fermée
5MTQ[170]	**XT3**		2.6	ND	1.66 µM	Out	In	Fermée
5MTR[170]	**XT0**		2.0	ND	1.66 µM	Out	In	Fermée
5UGS[170]	**XT5**		2.8	ND	2.4 µM	Out	In	Fermée
5UGT[170]	**XTW**		2.6	ND	0.46 µM	Out	In	Fermée
5UGU[170]	**XTV**		2.0	ND	0.94 µM	Out	In	Fermée

Tableau 4 : récapitulatif des structures cristallographiques d'InhA avec des ligands diaryléthers dans la PDB. ND : non déterminée.

D'après les structures chimiques des ligands cristallisés, les dérivés peuvent être classés en quatre groupes : i) ajout d'un substituant aryle sur le cycle A et conservation des atomes de chlore du cycle B, ii) ajout d'une chaîne alkyle sur le cycle A et modification des substituants du cycle B, iii) ajout d'un noyau triazole sur le cycle A et enfin iv) la modification du phénol.

V.C.3.b.1.1 Ajout d'un substituant aryle sur le cycle A et conservation des atomes de chlore du cycle B

Cette série, représentée dans la Figure 30, est constituée des ligands **8PC**, **JPM**, **JPL** et **JPJ** (selon leur identifiant dans la PDB). Les atomes de chlore du cycle B sont conservés, les modifications ont lieu sur le cycle A par l'ajout de groupements cycliques.

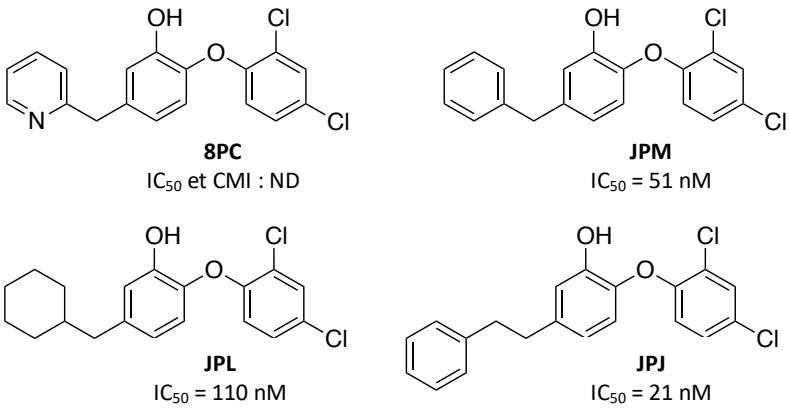


Figure 30 : structures chimiques des molécules **8PC**, **JPM**, **JPL** et **JPJ** et activités inhibitrices contre InhA de Mtb.

D'un point de vue de l'activité sur la protéine, ces ligands sont très affins avec des IC_{50} de 51, 110 et 21 nM pour **JPM**, **JPL** et **JPJ** respectivement. Cependant, les activités sur les souches mycobactériennes sont similaires à celle du **TCL** (27 µM, 52 µM *vs* 20 µM).

L'analyse des structures cristallographiques des complexe InhA/NAD^+/**8PC** (3FNE-A, 8PC)**,** InhA/NADH/**JPM** (3FNF-A, **JPM**), InhA/NADH/**JPL** (3FNG-A, **JPL**) et InhA/NADH/**JPJ** (3FNH-A, **JPJ**), montre une superposition des ligands avec quelques différences mineures au niveau du substituant. Comme décrit précédemment, le résidu Tyr158, en conformation *in*, est engagé dans une liaison hydrogène avec le phénol du cycle A qui fait lui-même une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide. La SBL se trouve en position fermée (Figure 31).

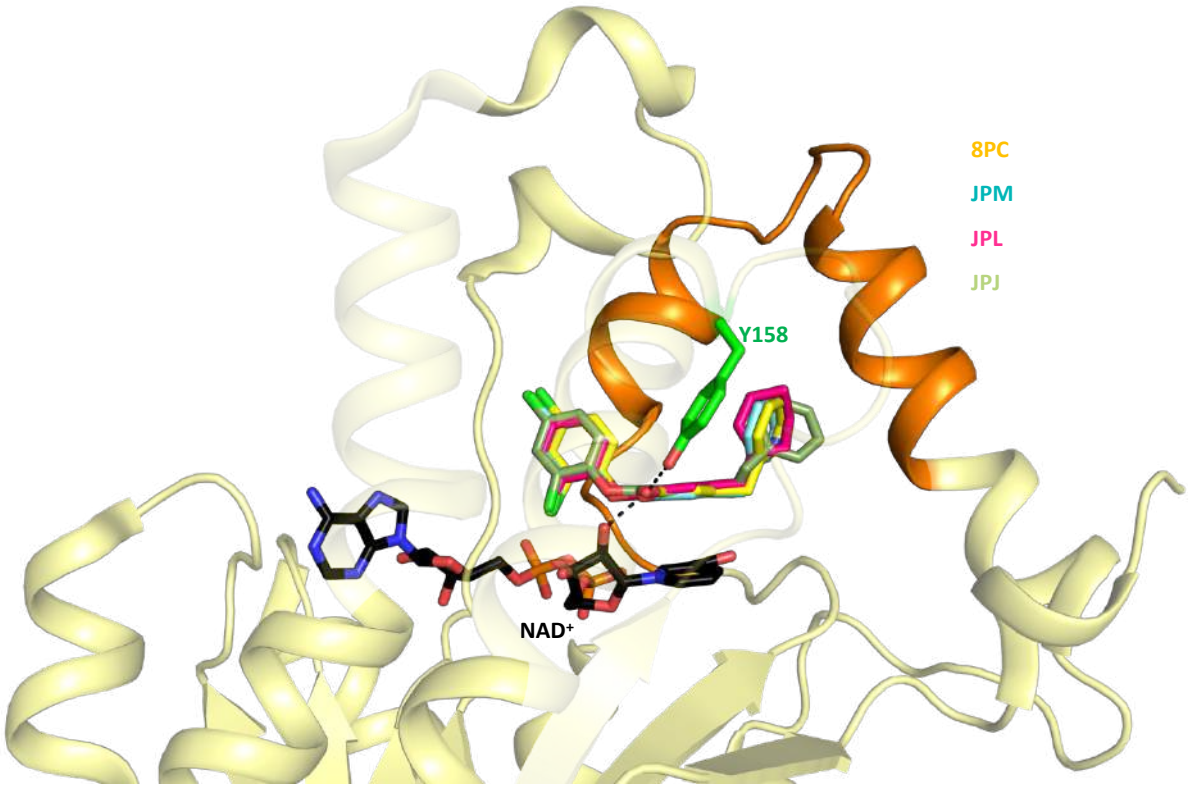


Figure 31 : structure de InhA en présence des dérivés du **TCL**. Superposition des complexes InhA/ NAD^+ /**8PC** (3FNE-A, **8PC**, en jaune), InhA/ NAD^+ /**JPM** (3FNF-A, **JPM**, en cyan), InhA/ NAD^+ /**JPL** (3FNG-A, **JPL**, en rose) et InhA/ NAD^+ /**JPJ** (3FNH-A, **JPJ**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

En conclusion, les substituants aryles et cycliques permettent de stabiliser l'interaction du ligand et augmentent l'activité inhibitrice contre la protéine InhA de Mtb.

V.C.3.b.1.2 Conservation de la chaîne alkyle du cycle A et modification des substituants du cycle B

D'autres dérivés ont été inspirés de la structure du **TCL** combinée à celle du **THT**. Les auteurs ont ainsi préparé une série de molécules en intégrant une chaîne alkyle sur le cycle A et en enlevant tous les atomes de chlore du cycle B, démontrés comme non essentiels pour l'inhibition d'InhA et contribuant majoritairement à la haute lipophilicité de la molécule[171].

Cette série, constituée de sept ligands (Figure 32), le **5PP**, le **8PP**, le **TCU**, le **2TK**, le **JUS**, le **1TN** et le **1US**, présente de très bonnes activités sur la protéine InhA. Ils possèdent tous une chaîne alkyle de 5, 6 ou 8 carbones sur le cycle A. Pour les ligands **5PP** et **8PP**, le cycle B ne porte aucun substituant alors que les autres ligands présentent des substituants méthyle, halogènes (chlore ou brome) ou encore des groupements nitro ou nitrile. Le meilleur ligand de la série, le **JUS**, composé d'un groupement nitrile, a un IC_{50} de 2,14 nM. Le ligand **TCU** a été caractérisé comme étant un inhibiteur lent d'InhA avec une valeur de K_i de 22 pM alors que le composé non méthylé a un K_i de 9,4 nM[144]. Dans le site actif, le **TCU** présente un temps de résidence de 24 min tandis que celui du **6PP** (ligand identique au **5PP** avec 6 carbones sur la chaîne alkyle) est de 0,1 s[172]. Il a donc été envisagé que la réduction de la flexibilité conformationnelle de l'éther diphénylique du composé **5PP** pourrait réduire le coût entropique de

l'ordonnancement de la SBL et conduire à une inhibition lente couplée à la fermeture de la cavité de liaison au substrat, confirmée par la valeur de K_i[144]. En termes d'activité, l'ajout du groupement méthyle (**TCU** *vs* **6PP**) diminue l'activité sur la protéine passant de 11 nM à 50 nM.

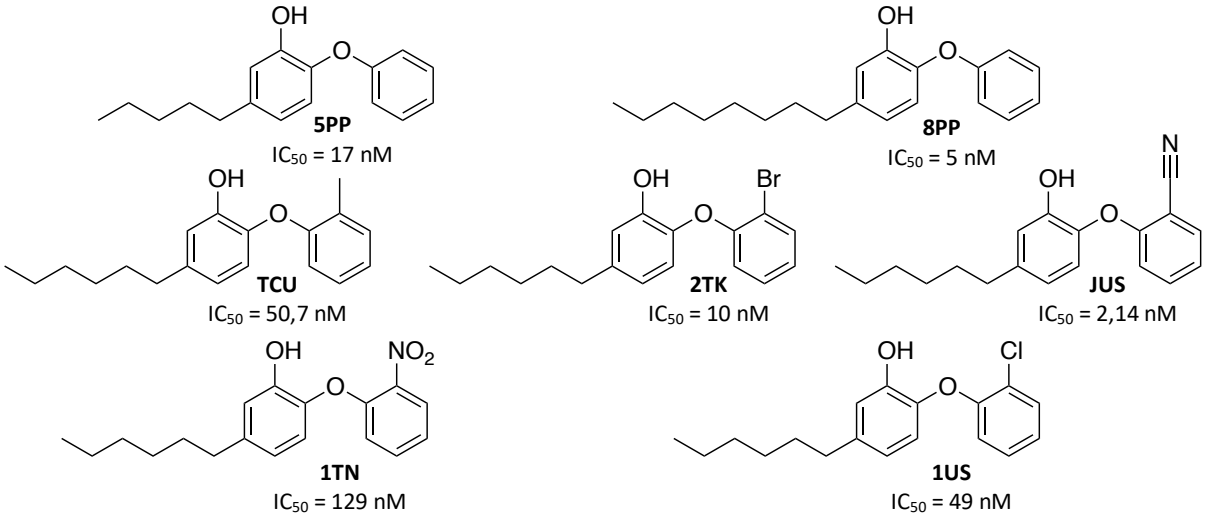


Figure 32 : structures chimiques des molécules **5PP**, **8PP**, **TCU**, **2TK**, **JUS**, **1TN** et **JUS** et activités inhibitrices contre InhA de Mtb.

Les structures cristallographiques des complexes InhA/NAD(H)/**5PP** (2B36-A, **5PP**), InhA/NAD(H)/**8PP** (2B37-A, **8PS**), InhA/NAD(H)/**TCU** (2X23-A, **TCU**), InhA/NAD(H)/**2TK** (4OHU-A, **2TK**), InhA/NAD(H)/**JUS** (4OIM-A, **JUS**), InhA/NAD(H)/**1TN** (4OWY, **1TN**) et InhA/NAD(H)/**1US** (4OYR, **1US**) montrent une liaison identique à celle du **TCL** avec une liaison hydrogène entre le phénol du composé et le phénol du résidu Tyr158 et une interaction de type π-stacking entre le cycle A et le noyau nicotinamide alors que la SBL adopte une conformation fermée. La chaîne alkyle du **5PP** se replie sur elle-même pour prendre une forme de U similaire à celle adoptée par le composé **THT**. Au contraire, les chaînes C_6 et C_8 prennent une conformation linéaire et sont orientées vers le portail mineur. La chaîne du **8PP**, plus longue, fait des interactions dans le portail mineur notamment avec les résidus hydrophobes Ala157, Ile215 et Leu218. Seules les quatre structures cristallographiques correspondant aux meilleures IC_{50} ont été superposées dans la Figure 33 (InhA/NAD(H)/**5PP** (2B36-A, **5PP**), InhA/NAD(H)/**8PP** (2B37-A, **8PS**), InhA/NAD(H)/**2TK** (4OHU-A, **2TK**) et InhA/NAD(H)/**JUS** (4OIM-A, **JUS**)).

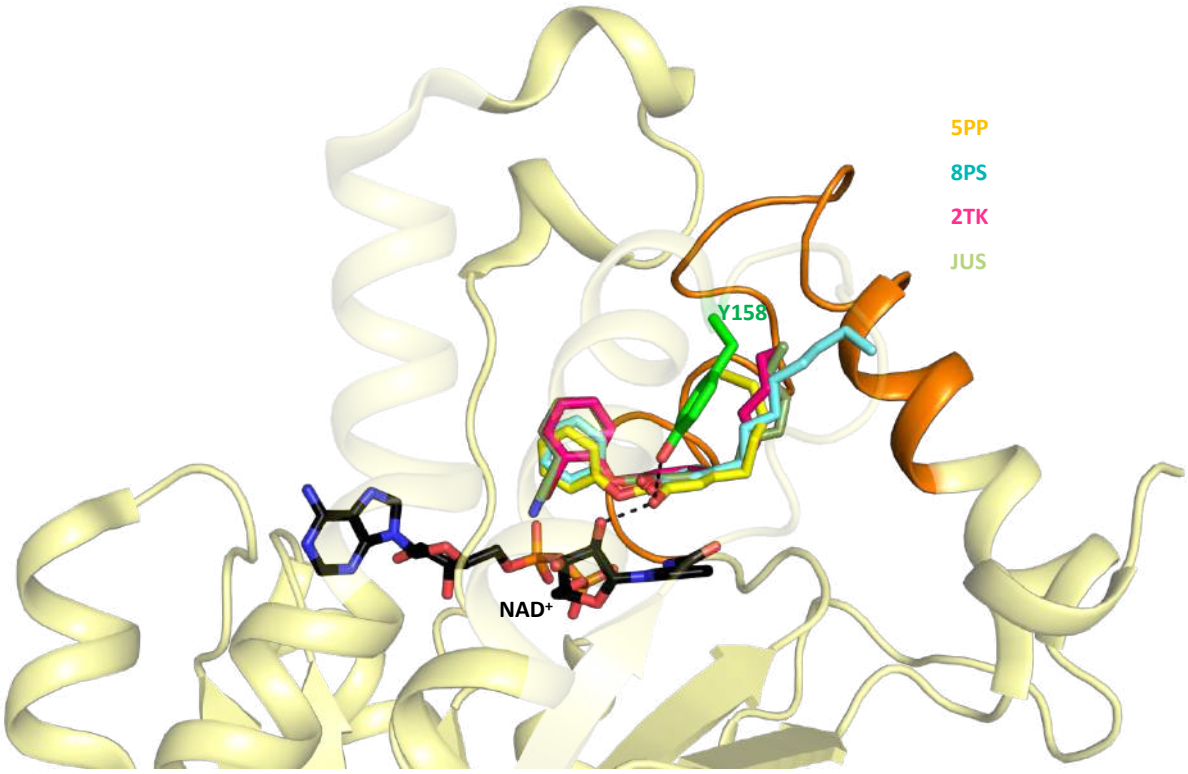


Figure 33 : structure de InhA en présence des quatre dérivés du **TCL** portant une chaîne alkyle et montrant les meilleures IC_{50}. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/**5PP** (2B36-A et **5PP**, en jaune), InhA/NAD(H)/**8PP** (2B37-A, **8PS**, en cyan), InhA/NAD(H)/**2TK** (4OHU-A, **2TK**, en rose) et InhA/NAD(H)/**JUS** (4OIM-A, **JUS**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

En conclusion, la chaîne alkyle permet d'obtenir de bonnes activités sur la protéine, l'apport de groupements tels que nitrile, brome ou méthyle permet de conserver cette activité voire de l'augmenter. Or, les groupements nitro ou chlore entraînent une diminution de l'activité.

V.C.3.b.1.3 Ajout d'un noyau triazole

Le groupement 1,2,3-triazole occupe une place importante dans la chimie médicinale. En premier lieu, il est utilisé comme espaceur pour lier deux molécules entre elles en utilisant la chimie click catalysée au cuivre (CuAAC), synthèse qui montre de très bons rendements. Au fil de son utilisation, ce noyau s'est montré plus intéressant notamment comme bon pharmacophore[173].

En 2014, Stec *et al* ont synthétisé des dérivés du **TCL** en ajoutant un noyau triazole substitué ou non afin d'étudier l'apport de ce motif et ont ainsi conclu qu'il permettait d'augmenter l'activité antimicrobienne (CMI = 15 µM et 1,5 µM pour les composés substitués *vs* 43 µM pour le **TCL**)[174] (Figure 34).

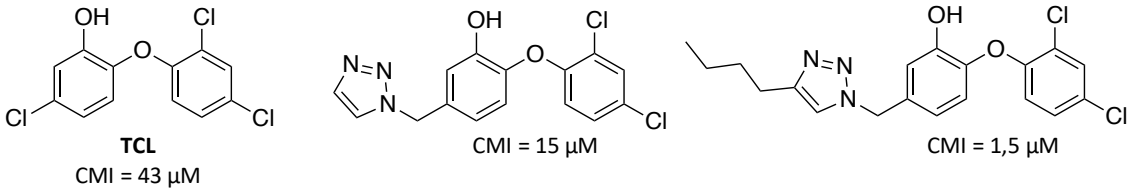


Figure 34 : structures chimiques des molécules de **TCL** et ses dérivés avec un noyau triazole et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne inhibitrices (H37Rv).

Les modifications apportées sur les noyaux A et B ont pris en compte les observations précédemment effectuées. Ainsi les auteurs ont greffé sur le cycle A le noyau triazole et ont modifié le substituant en position *ortho* du lien éther sur le cycle B.

Une série de six nouveaux ligands (Figure 35) a pu être co-cristallisée avec la protéine. Le ligand **53K** est dérivé du **TCU** avec un groupement méthyle sur le cycle B et le triazole est décoré d'un groupement phényle, les ligands **XT3** et **XT0** ont un groupement nitrile sur le cycle B, dont on a vu l'intérêt dans la série précédente, et le triazole est substitué en position 4 avec un cyclohexane ou un cyclopentane. La dernière série correspond à l'ajout d'un cyclopropane sur le triazole alors que le cycle B est décoré d'un groupement méthyle, un chlore ou par le groupement nitrile (ligands **XT5**, **XTW** et **XTV**). Des études cinétiques ont montré que le motif triazole permettait de réduire le taux d'activation global pour l'association du complexe ligand-cible. Ainsi une nouvelle stratégie a été développée pour moduler le temps de séjour du ligand dans la protéine[170]. L'apport du triazole vis-à-vis de l'activité antimycobactérienne est de nouveau confirmée pour cette nouvelle série.

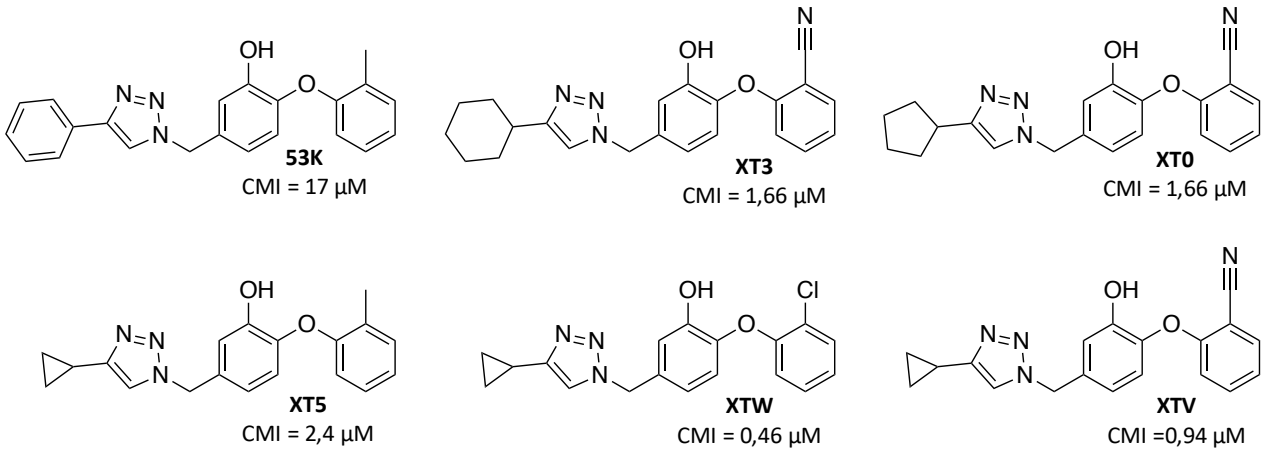


Figure 35 : structures chimiques des molécules **53K**, **XT3**, **XT0**, **XT5**, **XTW** et **XTV** et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

Les structures cristallographiques des complexes, InhA/NAD(H)/**53K** (5MTP, **53K**), InhA/NAD(H)/**XT3** (5MTQ, **XT3**), InhA/NAD(H)/**XT0** (5MTR, **XT0**), InhA/NAD(H)/**XT5** (5UGS, **XT5**), InhA/NAD(H)/**XTW** (5UGT, **XTW**), InhA/NAD(H)/**XTV** (5UGU, **XTV**), comme ce qui aurait pu être prédit en fonction des analyses précédentes, montrent que les composés se superposent. Le noyau A fait une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du NAD(H) et le phénol est engagé dans une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. Tous les triazoles se lient de la même façon indépendamment de leur substituant ; les atomes d'azote sont dirigés vers la SBL qui est en position fermée. Contrairement à la structure avec l'analogue de substrat **THT** décrite ci-dessus, où une conformation en U est observée, il est plutôt observé ici une forme de S avec les substituants cycliques allant vers le portail mineur Pour

des raisons de clarté, seules les structures cristallographiques des quatre composés montrant les meilleures IC_{50} ont été superposées (Figure 36).

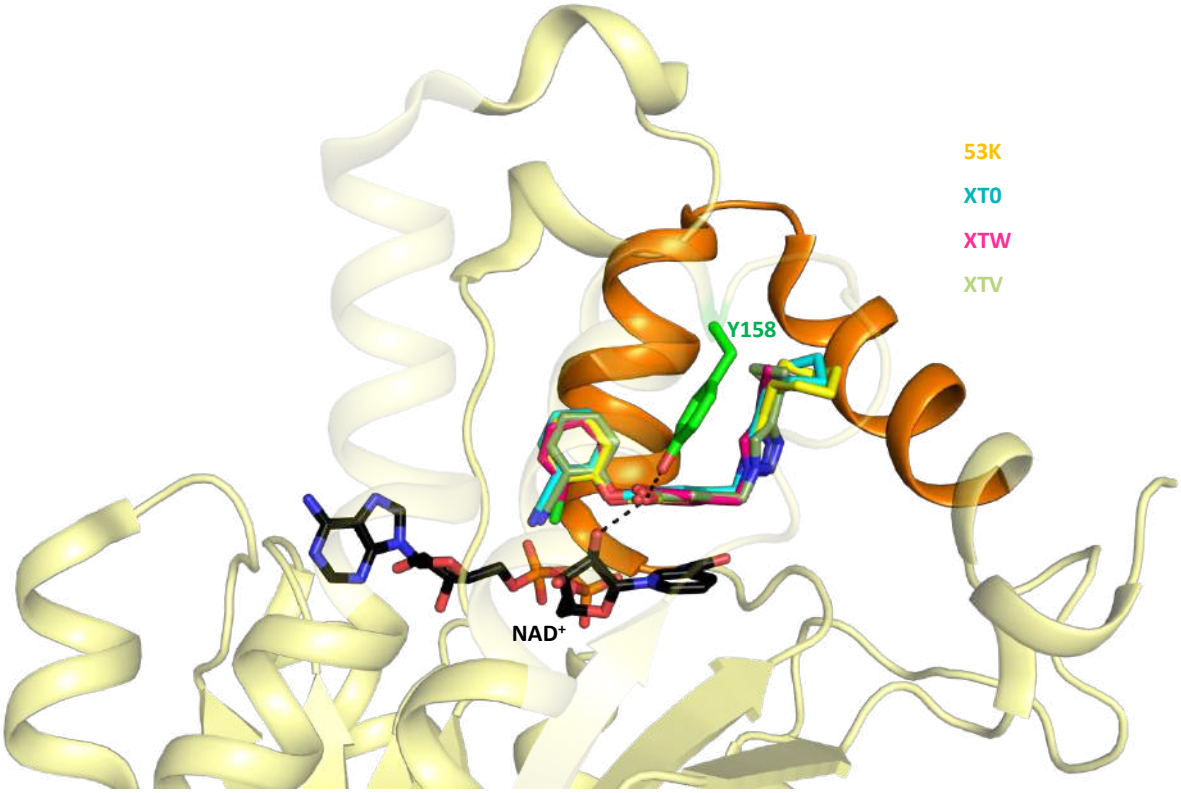
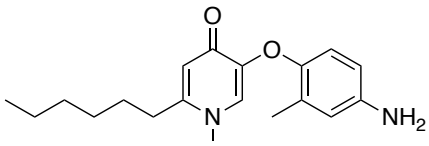


Figure 36 : structure de InhA en présence des quatre dérivés du **TCL** portant un noyau triazole et montrant les meilleures IC_{50}. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/**53K** (5MTP-A et **53K**, en jaune), InhA/NAD(H)/XT0 (5MTR-A, **XT0**, en cyan), InhA/NAD(H)/**XTW** (5UGT-A, **XTW**, en rose) et InhA/NAD(H)/**XTV** (5UGU-A, **XTV**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

V.C.3.b.1.4 Modification du phénol

La modification du phénol du cycle A a été entreprise afin de vérifier son apport dans l'activité envers InhA. Le ligand **1S5**, représenté dans la Figure 37, composé d'un biaryléther avec une chaîne carbonée en C_6, sur lequel le cycle A est remplacé par un noyau pyridinone et le cycle B par un noyau toluidine, montre un IC_{50} de 40 nM.



1S5
IC_{50} = 40 nM

Figure 37 : structure chimique de la molécule **1S5** et activité inhibitrice contre InhA de Mtb.

La structure cristallographique du complexe InhA/NAD/**1S5** (4OXK-A, **1S5**) a une résolution de 2,3 Å montre que le noyau pyridinone se lie de la même façon que le cycle A du **TCL**, faisant une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide alors que la cétone est engagée dans une liaison

hydrogène avec le résidu Tyr158. La chaîne carbonée en C_6 adopte une conformation linéaire pour se lier avec les résidus hydrophobes du portail mineur (Figure 38)[168].

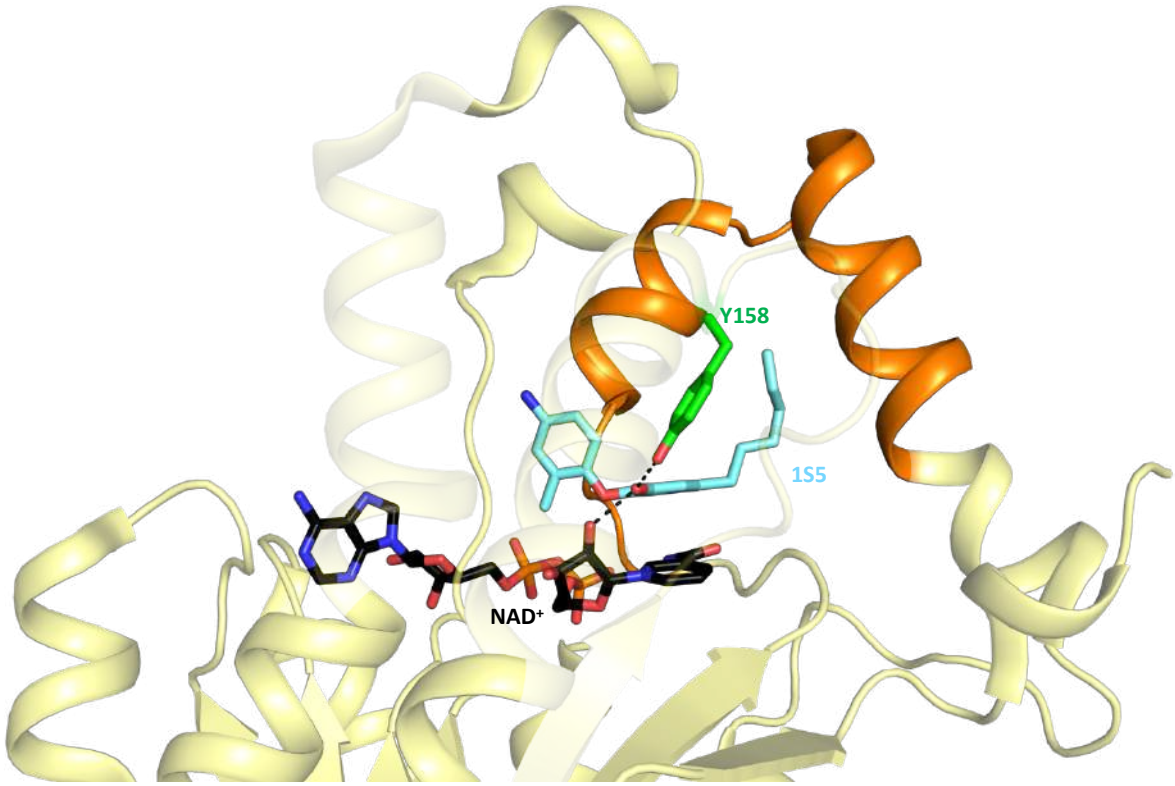


Figure 38 : structure du complexe InhA/NAD^+/**1S5** (4OXK-A en jaune et **1S5**, en cyan). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

Pour conclure sur cette modification, le groupe phénol n'est pas indispensable à condition de le remplacer par un groupe qui puisse interagir par liaison hydrogène avec le résidu Tyr158.

V.C.3.b.1.5 Interaction originale du TCL

La première structure de la protéine contenant le **TCL** (1P45, **TCL**) a montré une interaction originale du ligand. En effet, la chaîne A de la structure 1P45 montre une deuxième molécule de **TCL** se liant dans le portail majeur[166]. La première molécule de **TCL** occupe le même espace que le groupe cystéamine du **THT** (1BVR) dans le site de liaison I. La seconde molécule de **TCL** se lie à la position de la partie aliphatique de cet analogue de substrat au niveau du site de liaison II, dans une orientation inversée par rapport à la première molécule de **TCL**. Cette seconde molécule de **TCL** est entourée par les chaînes latérales hydrophobes de résidus Met103, Phe149, Ala157, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 et Leu218. En conséquence, l'hélice α6 est repoussée du site de liaison et se trouve dans une conformation largement ouverte identique à celle observée dans la structure 1BVR, en présence de l'analogue du substrat (Figure 39).

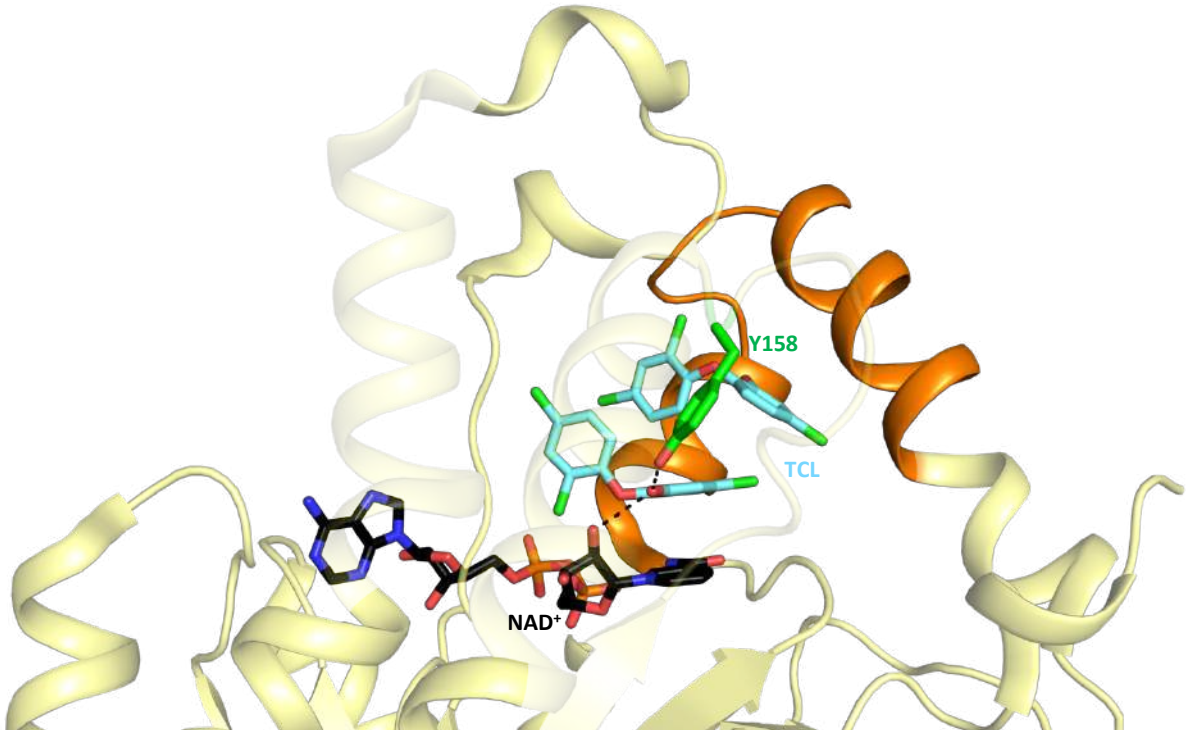
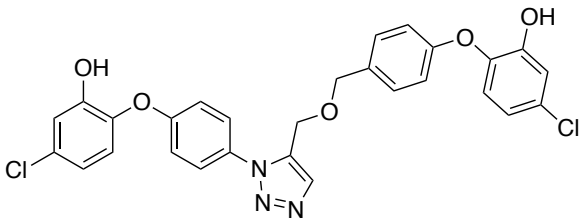
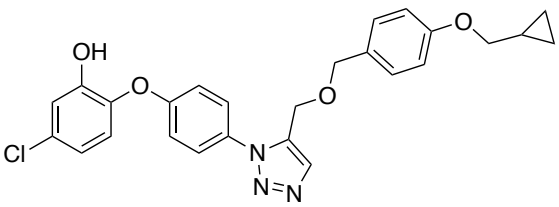


Figure 39 : structure de InhA en présence des deux molécules de **TCL** (1P45-A en jaune, **TCL** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

Ce mode de liaison original a ouvert la voie à de nouvelles molécules bisbiaryléthers (Figure 40). Ainsi, en 2020, une étude a permis de synthétiser ce type de composés, reliant deux molécules de **TCL** par un espaceur 1,2,3-triazole. Contrairement au ligand **53K**, cet espaceur est substitué sur le cycle B du **TCL** (Figure 40)**.**



IC_{50} = 5,6 µM

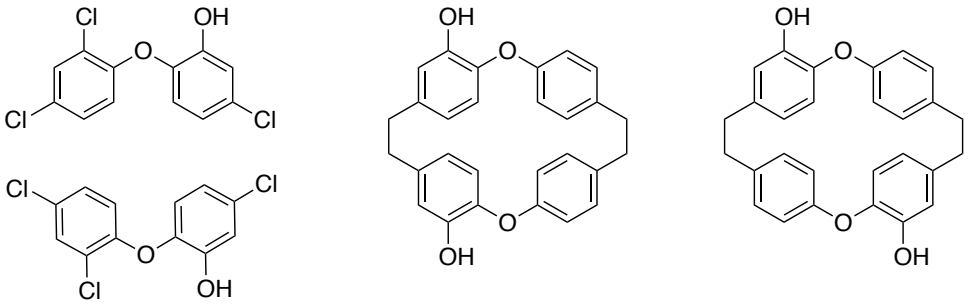


IC_{50} > 50 µM

Figure 40 : structures chimiques des molécules bisbiaryléthers et activité inhibitrice contre InhA de Mtb.

Des études de docking moléculaire ont montré que les ligands synthétisés se superposaient aux deux molécules de **TCL** de la structure 1P45-A. Les activités inhibitrices contre la protéine sont modestes avec pour le meilleur composé un IC_{50} de 5,6 µM.

En 2020, notre équipe a étudié une nouvelle classe de macrocycles bisbiaryléthers mimant les deux molécules de **TCL** trouvées dans le site actif de la protéine observée dans la structure 1P45 déposée dans la PDB (Figure 41). La différence entre ces deux molécules se situe au niveau de la position des phénols, soit en *cis* correspondant aux deux molécules de **TCL**, soit en *trans*. La molécule *cis* montre une inhibition de la souche mycobactérienne H37Rv identique à celle du **TCL** mais n'a révélé aucune activité sur la protéine InhA tandis que la molécule *trans* a une CMI de 94 µM mais présente une meilleure activité sur la protéine InhA avec un IC_{50} de 4,7 µM, activité restant toutefois modeste[175].



CMI = 47 µM
IC_{50} = 1 µM

CMI = 47 µM

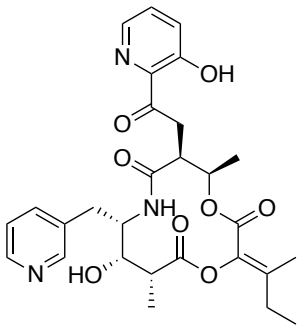
CMI = 94 µM
IC_{50} = 4,7 µM

Figure 41 : structures chimiques des molécules de **TCL** et des macrocycles bisbiaryléthers et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et contre InhA de Mtb.

Pour conclure sur les biaryléthers, les études ont révélé des points intéressants, notamment sur la conception de nouveaux inhibiteurs potentiels. Ainsi, il est impératif de garder un noyau aromatique pour favoriser les interactions de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du cofacteur NAD(H) et un groupement pouvant établir des liaisons hydrogènes avec le résidu Tyr158 (alcool ou cétone). Les atomes de chlore ne sont pas indispensables pour maintenir l'activité biologique et enfin l'ajout d'un noyau triazole permet d'améliorer l'activité sur les souches mycobactériennes.

V.C.3.b.2 Inhibiteur macrocyclique

La pyridomycine (**PYW**) est le seul composé macrocyclique qui a été cristallisé avec la protéine InhA de Mtb (Figure 42). En 1953, il a été montré que la **PYW** décrite pour la première fois comme un antibiotique, pouvait inhiber spécifiquement l'activité de différentes mycobactéries notamment Mtb et *M. smegmatis*. Cet antibiotique naturel est produit par *Streptomyces pyridomyceticus*[176]. Son activité sur la souche mycobactérienne H37Rv est très bonne avec une CMI de 0,57 µM. Ce n'est qu'en 2012 qu'il a été montré que la pyridomycine ciblait la protéine InhA avec un IC_{50} de 3,43 µM[177]. Des études enzymatiques ont indiqué que la pyridomycine était un inhibiteur compétitif d'InhA par rapport au cofacteur NADH, avec un K_i de 6,5 µM suggérant que ces composés pourraient partager un site de liaison commun[178].



PYW
CMI (H37Rv) = 0,57 µM

Figure 42 : structure chimique de la pyridomycine et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

La structure cristallographique du complexe InhA/NAD/**PYW** (4BII-D, **PYW**) permet de confirmer que l'inhibiteur occupe simultanément le site de liaison du substrat et du NAD(H), montrant ainsi une interaction novatrice et originale. L'atome d'oxygène du groupe carbonyle de l'amide cyclique est lié

par liaison hydrogène au résidu Tyr158, ce qui place le cycle pyridyle et l'acide picolinique 3-hydroxyle dans la même position que celle où se trouvent normalement le cycle nicotinamide et le groupement ribose du NAD(H). Le groupe hydroxyle en position 3 de l'acide picolinique est engagé dans une liaison hydrogène avec la lysine 165. Des interactions de van der Waals sont établies avec les résidus Met147, Phe149, Met199, et Ile202. La SBL présente une conformation ouverte et les résidus Phe149 et Tyr158 adoptent respectivement une conformation *out* et *in* (Figure 43).

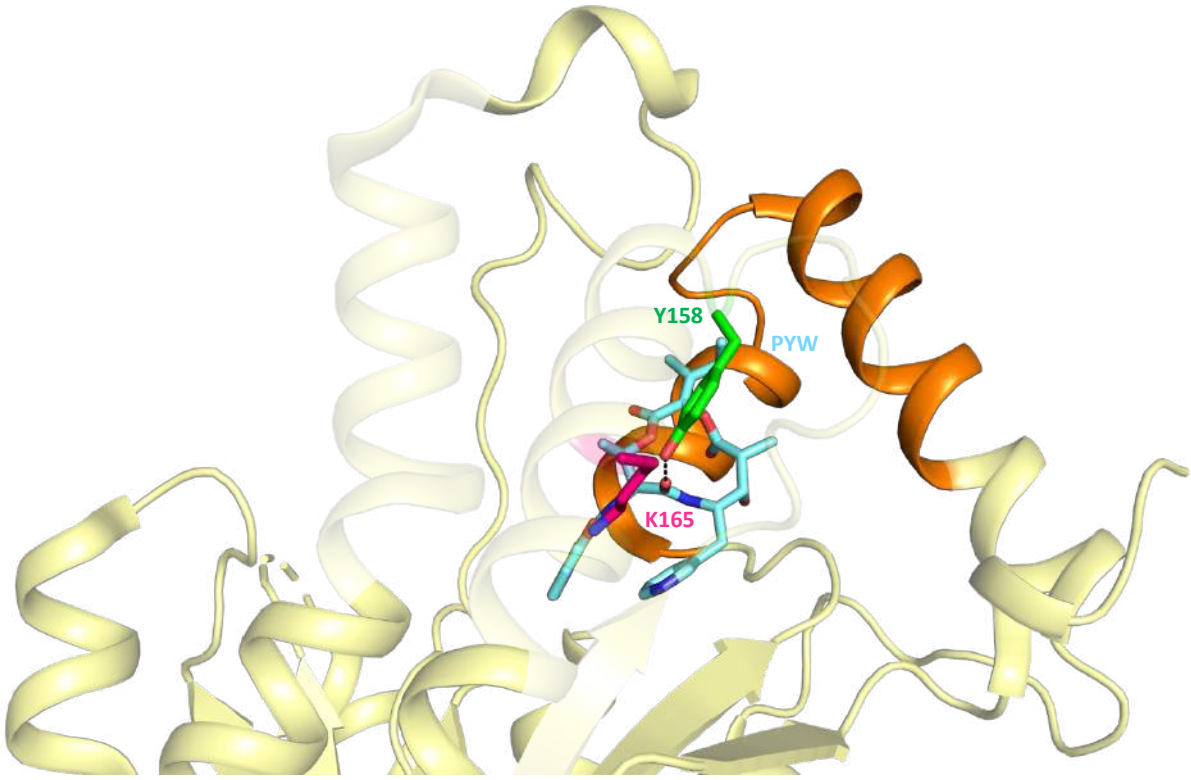
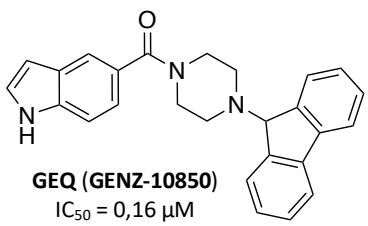


Figure 43 : structure de InhA en présence de la pyridomycine (4BII-D en jaune, **PYW** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose et la SBL est en orange.

V.C.3.b.3 Pipérazine indoleformamide

Un criblage à haut débit (HTS) d'une bibliothèque combinatoire d'environ 500 000 composés a permis d'identifier la molécule **GEQ** (autrement appelé **GENZ-10850**) qui est un dérivé de fluorényl-pipérazine-indole (Figure 44). Malgré une bonne activité inhibitrice sur la protéine InhA de Mtb (IC_{50} = 0,16 µM), cette molécule ne présente aucune activité inhibitrice envers la croissance de Mtb H37Rv (CMI > 125 µM)[166].



GEQ (**GENZ-10850**)
IC_{50} = 0,16 µM

Figure 44 : structure chimique du GEQ (GENZ-10850) et activité inhibitrice contre InhA de Mtb.

La structure cristallographique du complexe InhA/NAD/**GEQ** (**GENZ-10850**) (1P44, **GEQ**)[166] révèle que l'inhibiteur est proche du noyau nicotinamide du NAD(H), dans le site de liaison occupé par l'analogue du substrat **THT**. Le carbonyle du **GEQ** établit une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. Le groupe indole se trouve à proximité du groupement pyrophosphate du cofacteur et l'atome d'azote est engagé dans une liaison hydrogène avec le phosphate de l'adénosine. Le groupement fluorène volumineux est ancré au fond de la cavité et est stabilisé par des interactions de van der Waals avec les résidus Phe149, Met155, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile215 et Leu218 dans le site de liaison II. La SBL se trouve en position ouverte et les résidus Phe149 et Tyr158 adoptent respectivement une conformation *out* et *in* (Figure 45).

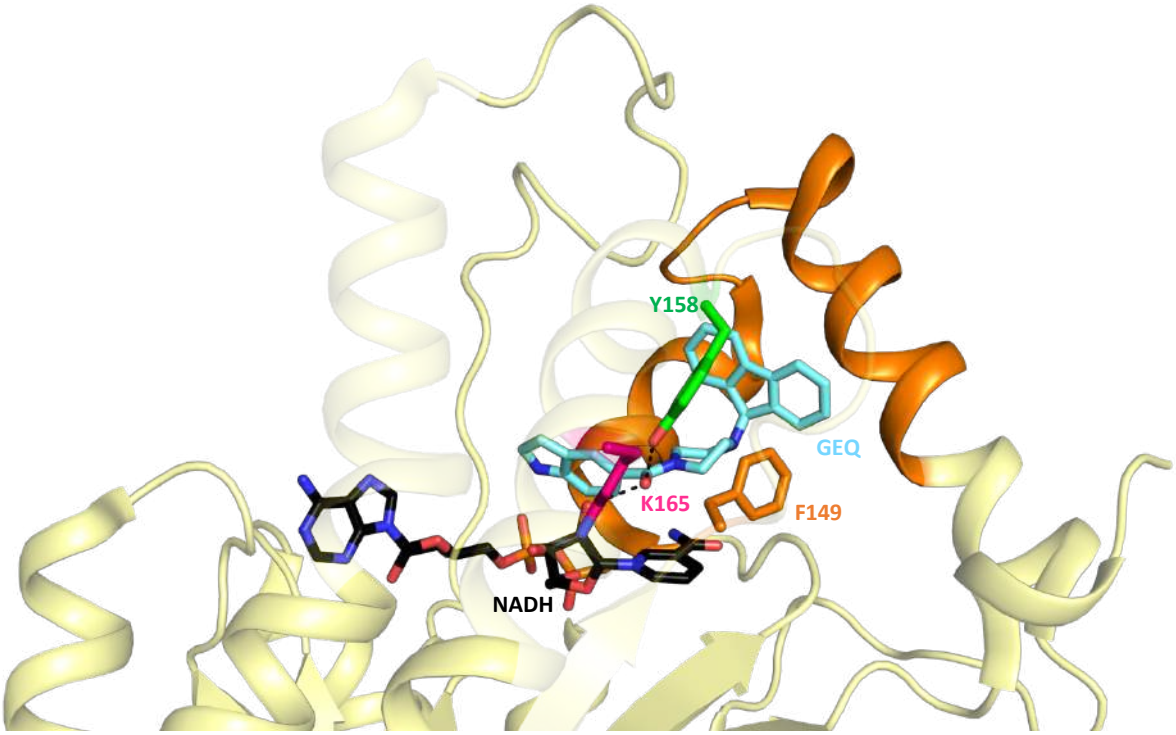


Figure 45 : structure de InhA en présence de la molécule de **GEQ** (1P44-A en jaune, **GEQ** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NADH en noir.

Toutes ces études des structures cristallographiques permettent de mieux comprendre le mode de fixation des inhibiteurs. Ces informations primordiales vont permettre de guider le développement de nouvelles molécules potentielles envers la protéine InhA.

CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENT DE SONDES FLUORESCENTES : PROJET SCREEN-IT

I Présentation du projet

I.A Objectif du projet

En chimie médicinale, l'hybridation est une méthode connue pour la conception de nouveaux inhibiteurs. Si l'on considère deux ligands présentant des propriétés différentes ou de même nature, il est possible en les assemblant chimiquement d'additionner leurs propriétés ou de les potentialiser sur le nouveau ligand.

L'imagerie médicale est un domaine important de la médecine, les techniques d'imagerie existantes sont diverses et permettent de différencier les cibles. L'utilisation de sondes fluorescentes de petite taille capables de détecter des protéines spécifiques sont particulièrement intéressantes car elles permettent une détection sensible, simple et spécifique[179]. Habituellement, le mécanisme d'action de ces sondes est basé sur une réaction enzymatique avec les sondes qui convertit un substrat non fluorescent en un métabolite fluorescent permettant la visualisation d'enzymes telles que les glucosidases, les protéases, les lactamases et les kinases pour mesurer leur activité[180]. De nouvelles stratégies pour visualiser des protéines non enzymatiques sont en cours d'étude, en particulier l'utilisation de sondes dont la fluorescence varie en fonction de l'environnement. Il a, par exemple, été démontré que certaines sondes ayant une très faible fluorescence dans un environnement polaire et protique montraient une très forte exaltation de fluorescence en milieu hydrophobe (Figure 46)[181].

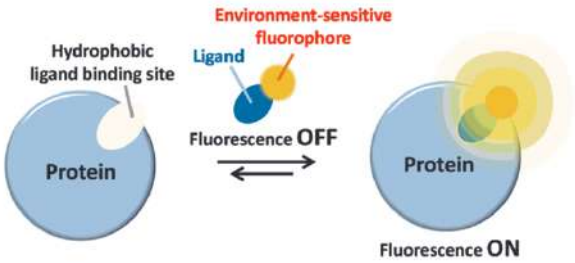


Figure 46 : principe des sondes fluorescentes on/off.
Source : Zhuang *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2013**, *52* (31), 8124–8128.

Le présent projet a permis de concevoir de nouveaux ligands de la protéine InhA pouvant combiner à la fois des propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'enzyme et des propriétés de fluorescence. Les sondes fluorescentes ainsi constituées pourraient servir d'outils pour des essais de criblage afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la protéine, pour l'imagerie de la protéine et sa visualisation au sein des mycobactéries *in vivo*. L'évaluation de ces sondes pour une application on/off a également été effectuée (Figure 47).

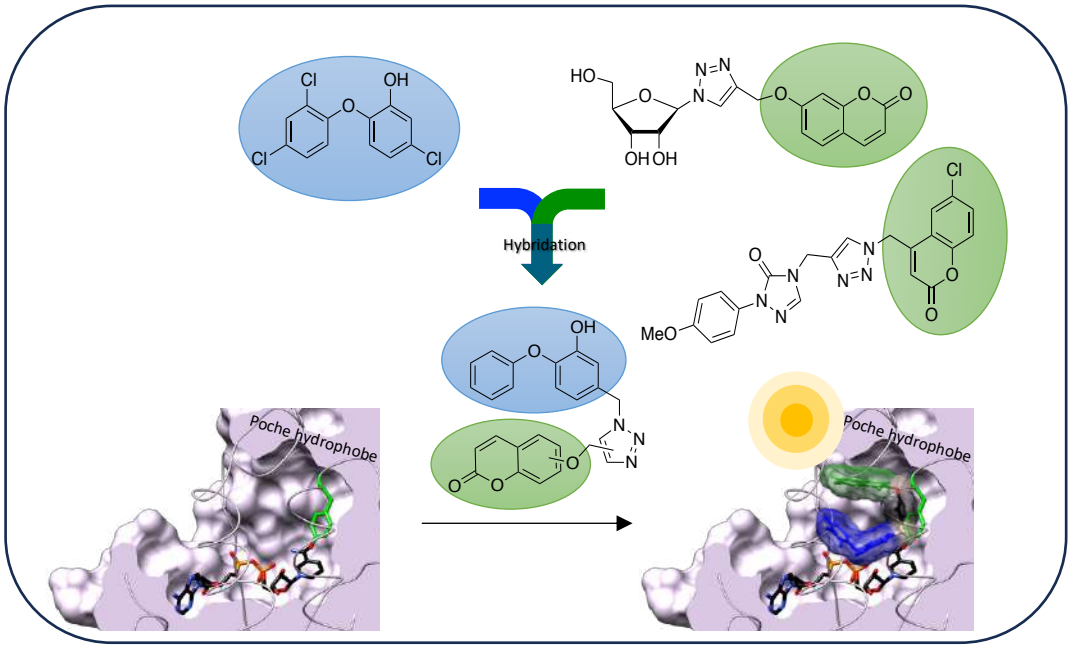


Figure 47 : objectif du projet mettant en pratique l'hybridation entre une molécule dérivée du **TCL** et des fluorophores pour former des composés aux propriétés fluorescentes visant la protéine. Mise en pratique des sondes on/off sur la protéine InhA.

I.B Conception des molécules

Pour la conception des sondes étudiées dans ce travail, le **TCL**, présenté précédemment, a été retenu comme premier élément de l'hybridation pour son activité inhibitrice sur la protéine. Nous avons ensuite sélectionné comme deuxième élément de l'hybridation des molécules de la famille des coumarines pour induire les propriétés de fluorescence. Les motifs BODIPY, le nitrobenzofurane (NBD) et le *N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole (DBD) ont également été choisis pour étendre la famille des fluorophores. Il est à noter que quelques études ont mis en évidence l'activité antituberculeuse de molécules comportant un motif coumarine dont certaines ciblent la protéine InhA (Figure 48)[182–184].

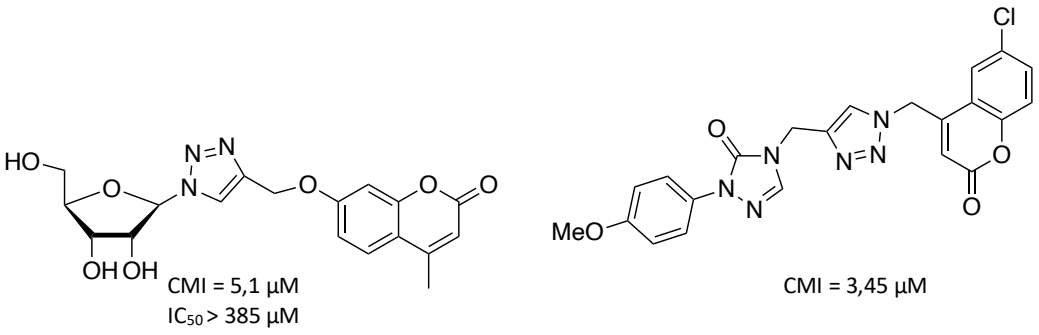


Figure 48 : structures chimiques de molécules coumarines et leurs activités *in vivo* et *in vitro* contre Mtb et InhA.
Source : Srivastava *et al*, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 268–281.
Somagond *et al*, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2019**, *352* (10), e1900013.

La jonction entre les deux éléments de l'hybridation se fera *via* une réaction de cycloaddition de Huisgen permettant de faire réagir les fonctions azoture et alcyne pour former un pentacycle 1,2,3-triazole. Cette réaction peut être réalisée soit thermiquement, permettant d'obtenir deux isomères, le 1,4-disubstitué (*anti*) et le 1,5-disubstitué (*syn*)[185], soit par catalyse au cuivre (I) (CuAAC) également appelée « chimie click » aboutissant seulement au produit *anti* comme rapporté par Sharpless en 2001. Cette découverte valut à Karl Berry Sharpless et Morten Meldal le prix **Nobel** de chimie en 2022. En 2005, Fokin et ses collègues ont mis au point l'utilisation de la catalyse au ruthénium (RuAAC) permettant d'obtenir seulement le produit *syn*[186] (Schéma 4).

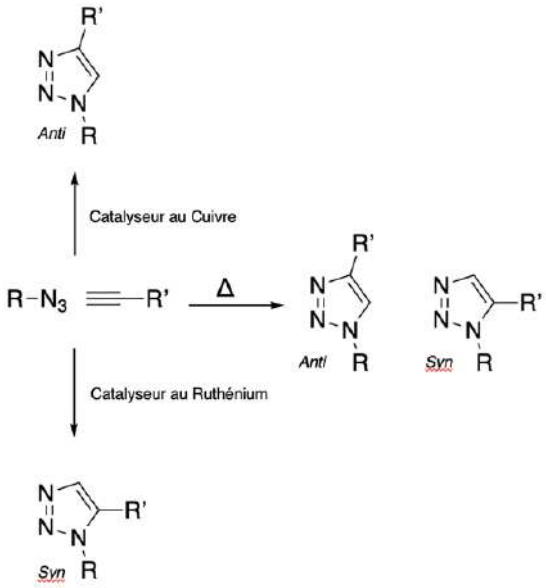


Schéma 4 : formation du noyau1,2,3-triazole par différentes méthodes.

I.B.1 Partie dérivée du triclosan

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de composés biaryléthers permet de cibler la protéine InhA.

Dans ce projet, nous avons étudié le rôle de la position du groupement hydroxyle afin de cribler différentes positions dans le site actif, en particulier l'entrée du site (site de liaison III). L'étude des structures cristallographiques montre que le phénol du cycle A du **TCL** guide la position dans le site actif puisqu'il fait une interaction de type π-stacking avec le groupe nicotinamide du cofacteur et est engagé dans une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. Des molécules biaryléthers ont été synthétisées avec le phénol et l'azoture sur le même noyau (composé **1e**), le groupe hydroxyle et l'azoture sur chacun des cycles pour favoriser des interactions vers l'entrée du site (composé **2e**) et enfin une chaine aliphatique sur le composé **2e** afin de reproduire la molécule **6PP** qui a montré de très bonnes activités *in vitro* et *in vivo* (Figure 49)[187,165].

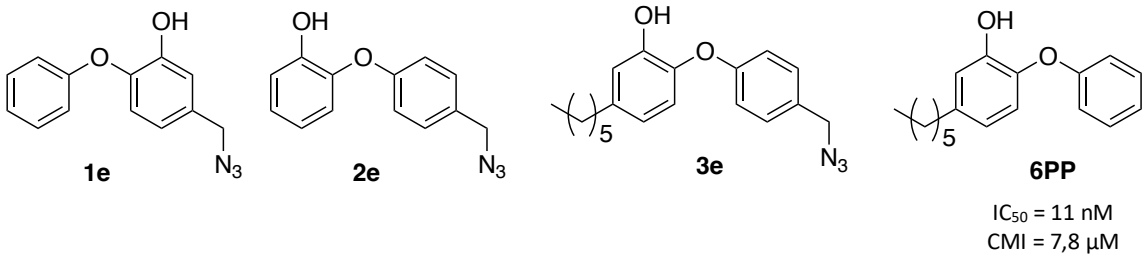


Figure 49 : structures chimiques des précurseurs **1e**, **2e** et **3e** comportant le motif biaryléther et la molécule de **6PP** et ses activités *in vitro* et *in vivo*.

I.B.2 Partie fluorophore

Les fluorophores choisis sont divers et se classifient en plusieurs groupes, les coumarines, le motif BODIPY et les motifs NBD et DBD.

Les coumarines sont des molécules aromatiques très présentes dans l'environnement, notamment dans les plantes. Le nom coumarine vient de « cumuru » qui est le nom, dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka dont les fèves sont riches en coumarines (1 à 3%)[188]. Elles sont largement utilisées en chimie médicinale pour leurs propriétés diverses : antimicrobiennes, antitumorales, antioxydantes ou anticoagulantes[189]. Elles appartiennent à la famille des benzopyrones dont la structure (Figure 50) comprend deux cycles aromatiques à 6 chaînons comportant un motif lactone. Du fait de leur forte conjugaison, les coumarines sont aussi utilisées comme sondes fluorescentes pour l'imagerie médicale[190]. Les coumarines utilisées en synthèse sont dérivées de la coumarine simple. Elles peuvent être substituées au niveau des positions 4, 5, 6, 7 et 8.

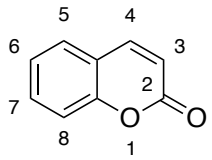
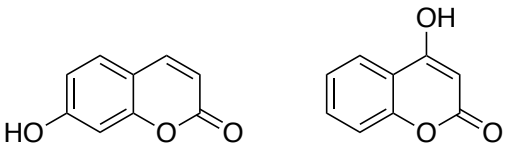


Figure 50 : structure chimique de la coumarine.

La 7-hydroxycoumarine ou ombelliférone possède aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes notamment sa capacité à absorber les rayons ultraviolets, ce qui lui permet d'être utilisée comme agent de protection solaire[191]. Le composé 4-hydroxycoumarine est connu pour ses propriétés médicinales et employé pour ses propriétés anti-coagulante, antibactérienne, antifongique, antivirale, antitumorale, antioxydante et anti-inflammatoire. Il est largement utilisé en chimie organique et participe à la synthèse de nombreux composés hétérocycliques puisqu'il possède de nombreux sites réactifs, deux sites électrophiles en position 2 et 4 et un site nucléophile en position 3[192]. Les structures chimiques sont représentées dans la Figure 51.



7-hydroxycoumarine ou ombelliférone **4-hydroxycoumarine**

Figure 51 : structures chimiques de l'ombelliférone et de la 4-hydroxycoumarine.

Les bore-dipyrrométhènes ou BODIPY (Figure 52), décrits pour la première fois en 1968, ont largement été utilisés dans le domaine de l'imagerie, en particulier la photothérapie[193,194]. Ils présentent une bonne stabilité structurale dans laquelle le BF_2 chélaté inhibe la rotation autour des liaisons C-N du pyrrole, ce qui renforce la rigidité structurale et confère au système des propriétés d'émission de fluorescence. Cette fluorescence varie avec de faibles modifications structurales et peut être suivie en fonction de l'environnement et de la conformation des composés ce qui va permettre de suivre le positionnement de la sonde au niveau du site actif[195].

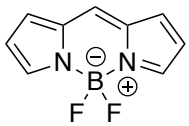
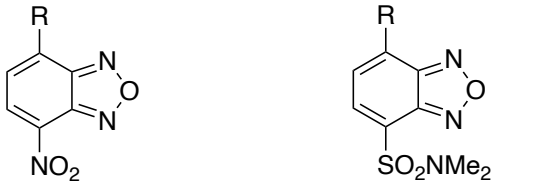


Figure 52 : structure chimique du noyau BODIPY.

Les hétérocycles nitro benzoxadiazole (**NBD**) et *N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole (**DBD**) (Figure 53) sont très connus dans le domaine de la biochimie et largement employés en tant que sondes fluorescentes. Les composés possédant ces motifs présentent des changements colorimétriques et fluorescents distincts, une capacité d'extinction de la fluorescence et une petite taille. La plupart d'entre eux facilitent la détection et l'autoassemblage des biomolécules[196,197]. Les sondes on/off composées des motifs NBD et DBD ont déjà été exploitées[181].



Nitro benzoxadiazole (NBD) ***N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole (DBD)**

Figure 53 : structures chimiques des hétérocycles NBD et DBD.

Le dernier fluorophore évalué, un complexe de rhénium, nous a été fourni par l'équipe MAGENTA du SPCMIB qui est spécialisée dans la conception de marqueurs originaux et d'outils d'analyse efficaces pour des applications biomédicales à visée diagnostique et/ou thérapeutique. Il était intéressant de pouvoir étudier ce type d'outil sur la protéine InhA. Les composés organométalliques sont reconnus comme des candidats antitumoraux et antibiotiques prometteurs. Parmi les ions métalliques, le rhénium est un bon candidat et ses composés tricarbonylés possèdent des propriétés luminescentes qui permettent des utilisations théranostiques (nouvelle approche médicale visant au développement des aspects diagnostic et thérapeutique)[198]. Les complexes de rhénium(I) tricarbonyle possèdent des

propriétés intéressantes : ils sont versatiles, ce sont les ligands qui gouvernent les propriétés pharmacologiques, ils sont biocompatibles et stables à l'air et à l'humidité[199]. Les ligands peuvent être divers et variés ; ceux que nous avons utilisés dans ce travail sont composés d'un noyau 1,2,4-pyridyltriazole (pince pyta) et d'un atome de chlore, le noyau 1,2,4-triazole est substitué par un noyau aromatique. Ce ligand pyta possède de bonnes propriétés de chélation alors que le substituant aromatique présente des bonnes propriétés de luminescence à l'état solide[200] (Figure 54).

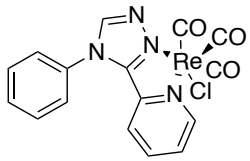


Figure 54 : structure chimique du complexe de rhénium avec les ligands pyta et atome de chlore.

II Résultats et discussion

II.A Synthèse chimique

La préparation des différents composés de ce chapitre a été le fruit d'un travail collectif de l'équipe SySMiC du SPCMIB. Evelyne Delfourne, Pascal Hoffmann, Emeline Grosjean, Joëlle Azéma-Despeyroux et moi-même avons participé à la synthèse chimique. Les purifications et les analyses de pureté des composés ont été effectuées par Fernanda Goncalves et Saïda Danoun.

Les 18 molécules finales ont été obtenues par une cycloaddition de Huisgen catalysée entre les précurseurs biaryléthers azotures et les précurseurs fluorophores alcynes pour former le noyau 1,2,3-triazole. La réaction catalysée au cuivre (CuAAC) a permis de former spécifiquement les régioisomères *anti* tandis qu'une catalyse au ruthénium (RuAAC) a été utilisée pour former les régioisomères *syn*.

II.A.1 Obtention des précurseurs azotures

Les précurseurs, **1e**, **2e** et **3e**, comportant la fonction azoture, ont été préparés en cinq étapes (Schéma 5).

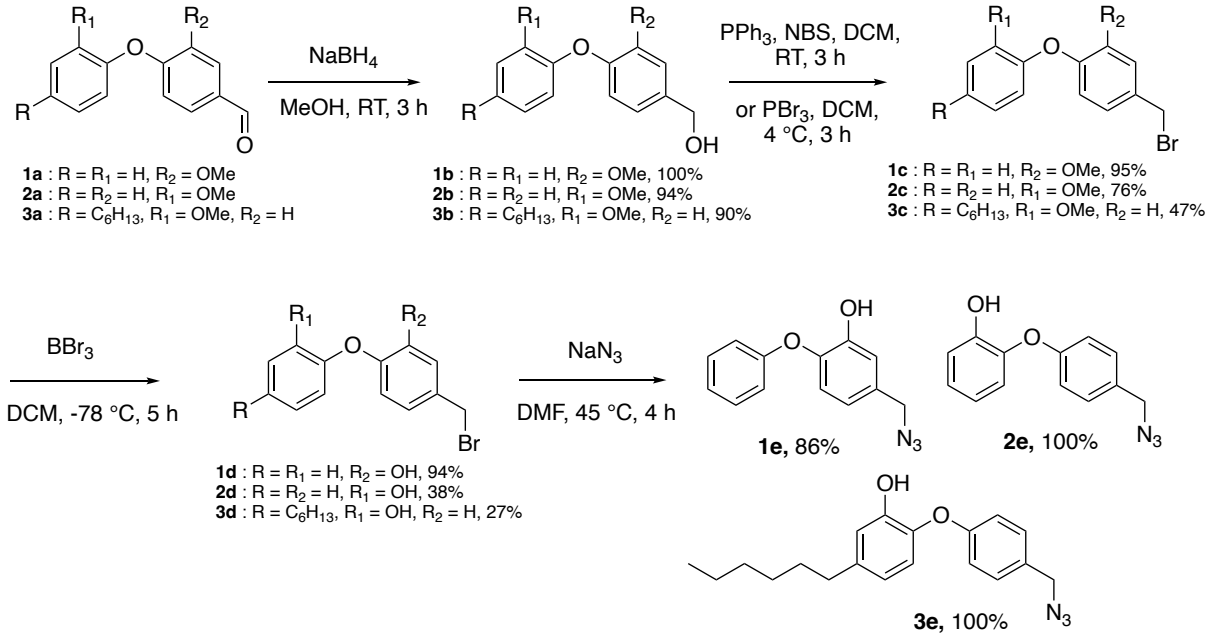


Schéma 5 : formation des précurseurs azotures **1e**, **2e** et **3e**.

Les aldéhydes **1a**[201,202] et **2a**[203] ont été synthétisés selon les procédures déjà décrites mettant en pratique une substitution nucléophile aromatique (SnAr) ou le couplage de Cham-Lam. L'aldéhyde **3a** a été obtenu avec un rendement de 81% en adaptant la substitution nucléophile aromatique entre le 4-hexyl-2-méthoxyphénol (synthétisé en 2 étapes suivant le protocole décrit[169]) et le 4-fluorobenzaldéhyde. Le fluor étant un bon groupe partant, il est stratégiquement plus judicieux d'utiliser un dérivé fluoré (Schéma 6).

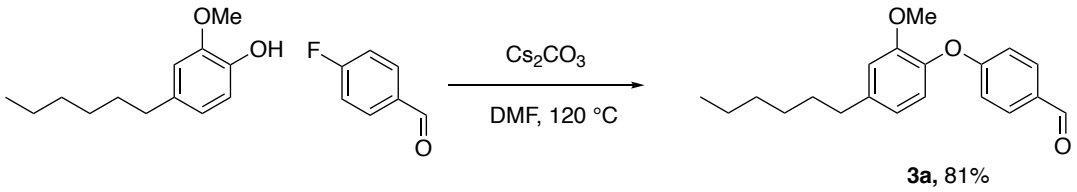


Schéma 6 : formation du biaryléther **3a**.

La réduction des aldéhydes effectuée par le tétrahydruroborate de sodium a permis l'obtention des composés **1b**, **2b** et **3b** avec des rendements élevés variant de 90% à 100%. Les produits réduits ont ensuite été bromés soit par le mélange *N*-bromosuccinimide et triphénylphosphine, soit par le tribromure de phosphore. L'étape suivante a consisté en la déméthylation par l'acide de Lewis, le tribromure de bore pour obtenir le composé phénolique correspondant. Généralement, la déméthylation d'un anisole est initiée par la formation d'un adduit éther suivie de la perte d'un bromure. Ce bromure libre est un nucléophile qui attaque le groupe méthyle de l'intermédiaire cationique clivant ainsi la liaison C-O et produisant le composé $PhOBBr_2$. Ce dernier subit ensuite une hydrolyse aqueuse libérant de l'acide borique et de l'acide bromhydrique (Figure 55)[204].

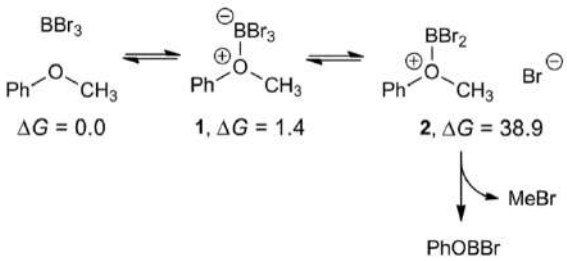


Figure 55 : mécanisme de la déméthylation de l'anisole. Les énergies de Gibbs sont données en kcal/mol. Source : Sousa *et al*, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (35), 8048–8049.

Une mise au point de l'étape de déméthylation a été effectuée car les conditions initiales conduisaient à une dégradation des produits bromés. Les différents paramètres de la réaction, concentration, quantité de tribromure de bore et temps de réaction ont été étudiés concluant qu'une réaction à froid (-78 °C), un large excès de tribromure de bore (10 eq/OMe) et une faible concentration en réactif anisole (0,035 M) ont permis d'améliorer les rendements, notamment pour le produit **1d** qui a été obtenu avec 94% de rendement. Ce haut rendement peut s'expliquer par la présence d'un substituant bromé sur l'anisole qui peut jouer un rôle de stabilisant lors de la déprotection. Néanmoins, cette étape, avec des rendements respectifs de 38% et 27% pour les composés **2d** et **3d,** constitue l'étape limitante de la synthèse des dérivés **2e** et **3e**. Les produits azotures **1e**, **2e** et **3e** ont été préparés par réaction de l'azoture de sodium sur les composés bromés avec des rendements élevés (86-100%). Au total, les précurseurs **1e**, **2e** et **3e** ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs de 77%, 27% et de 9%.

L'azoture complexe de rhénium **4e** nous a été gracieusement donné par l'équipe MAGENTA.

II.A.2 Obtention des précurseurs alcynes

Les molécules 3-carboxamide-coumarines ont été préparées à partir des 3-acide-coumarines correspondantes déjà décrites[205–209]. La formation de la liaison peptidique a été effectuée par action de la propargylamine en présence d'un activateur, le carbonyldiimidazole. Cette méthode a permis l'obtention des précurseurs alcynes originaux **4c** et **4e** et de ceux déjà décrits **4a**[210], **4b**[211] et **4d**[212] (Schéma 7).

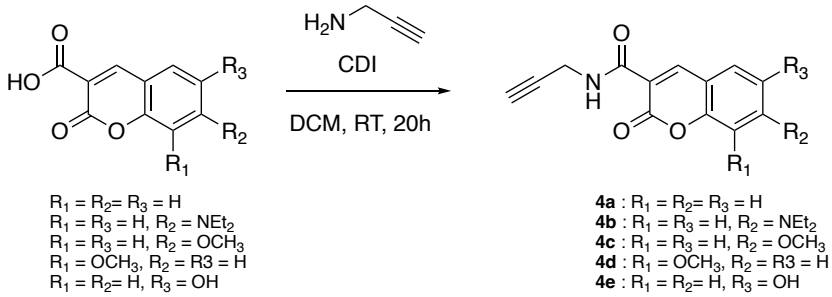


Schéma 7 : synthèse des composés 3-carboxamide-coumarines **4a-e**.

La synthèse des molécules **4f**[213], **4h**[214] et **4i**[215] déjà décrites et **4g** comprenant les motifs 4-hydroxycoumarine et 7-hydroxycoumarine a été réalisée par substitution nucléophile entre les dérivés hydroxycoumarines correspondants et le bromure de propargyle (Schéma 8).

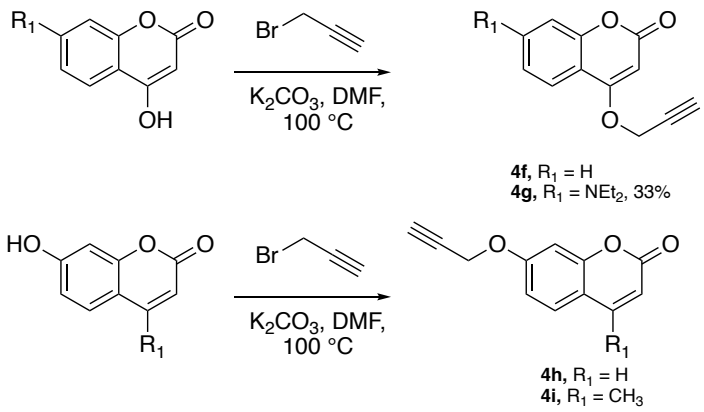


Schéma 8 : formation des précurseurs **4f-i**.

Enfin, les molécules alcyniques comportant les motifs BODIPY[216], NBD (nitrobenzofurane)[217,218] et DBD (*N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole)[219], ont déjà été décrites et ont été synthétisées en suivant les protocoles reportés.

L'alcyne **4p** a été synthétisé en trois étapes : i) hydrolyse basique de la fonction cyano en acide carboxylique, ii) couplage direct avec la propargylamine pour former le lien amide et iii) déprotection de l'anisole pour former le phénol correspondant **4p**. Le rendement global de cette séquence est de 70% (Schéma 9).

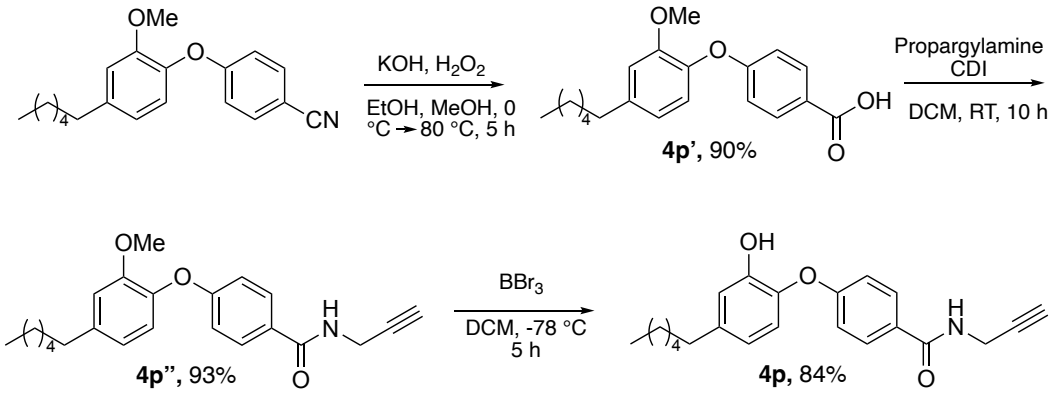


Schéma 9 : formation du précurseur **4p**.

II.A.3 Cycloaddition de Huisgen

La majorité des produits régioisomères *anti* a été synthétisée par CuAAC faisant intervenir les différents azotures et alcynes en présence de Cu(I). C'est la raison pour laquelle le sulfate de cuivre pentahydraté dans lequel le cuivre est un Cu(II) est associé à l'ascorbate de sodium permettant la réduction du Cu(II) en Cu(I). Les rendements de la CuAAC varient entre 33% et 86%, cette disparité s'explique par la

mauvaise solubilité de certains produits finaux. D'une façon générale, en fin de réaction, les produits de condensation se présentent sous forme d'une huile non soluble qui colle aux parois du ballon. Quatre séries différentes ont ainsi été obtenues. La première série, comprenant les composés **5a-l**, dérive de l'azoture **1e** (Schéma 10) et les séries suivantes sont respectivement obtenues à partir des azotures **2e** (**5m**), **3e** (**5n** et **5o**) et **4e** (**5p**) (Schéma 11).

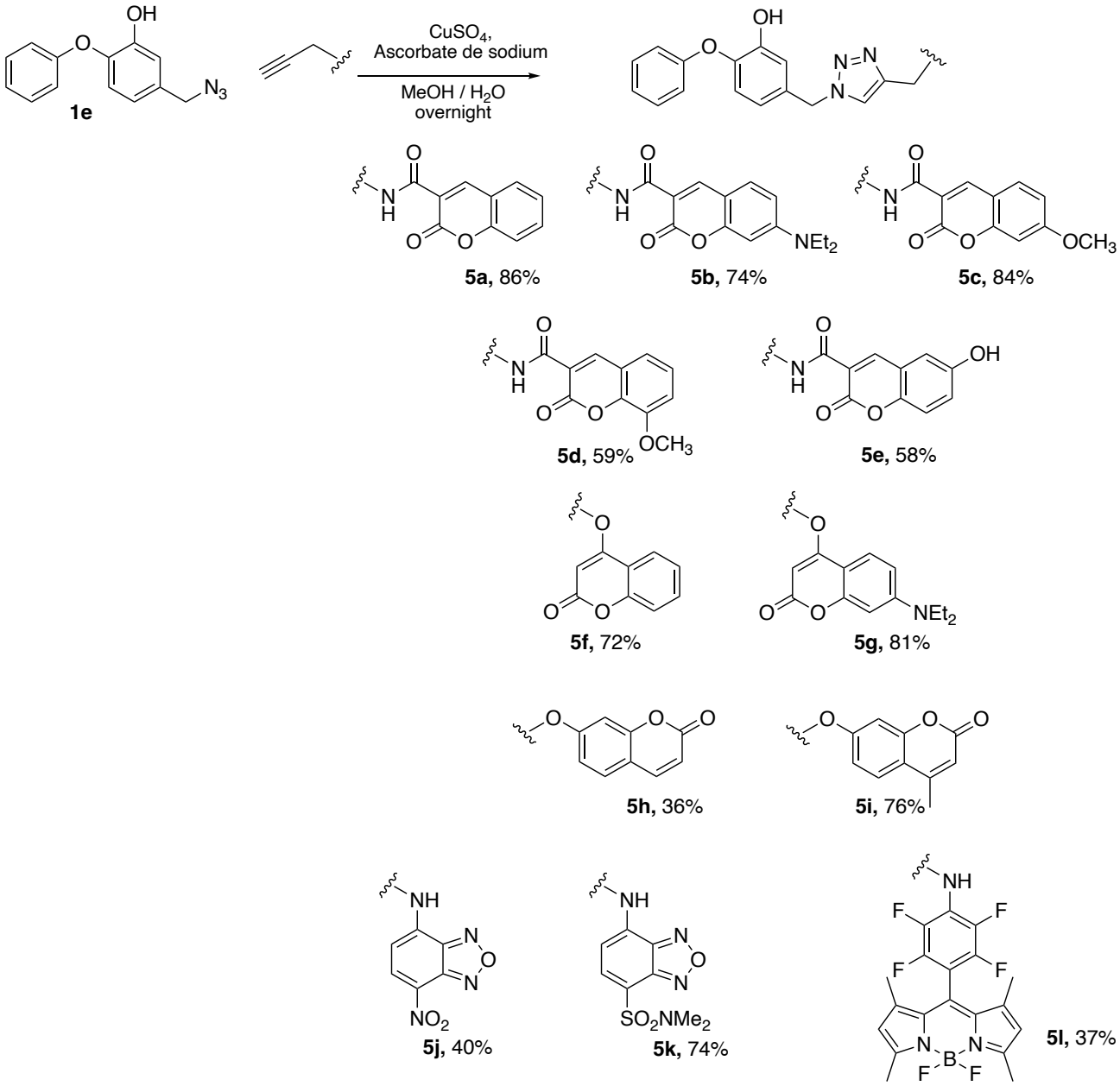


Schéma 10 : synthèse de la première série des composés *anti* par CuAAC.

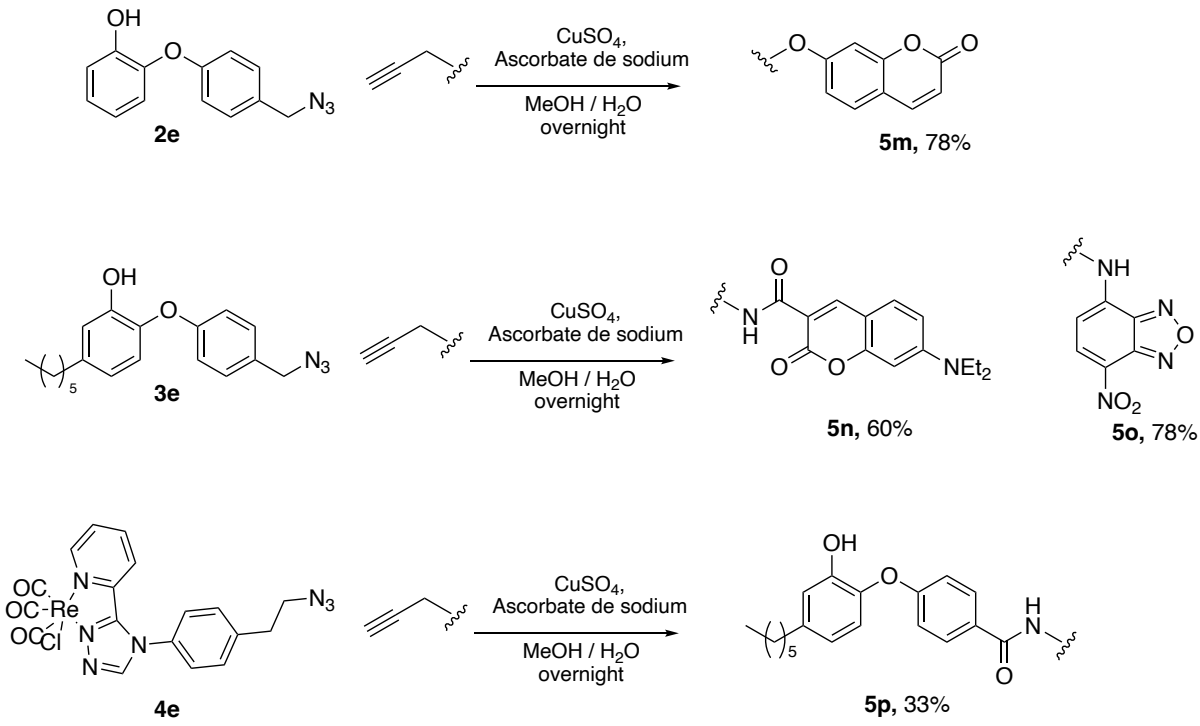


Schéma 11 : synthèse des séries 2, 3 et 4 des composés *anti* par CuAAC.

Deux composés supplémentaires avec une régioisomérie *syn,* **5q** et **5r**, ont été préparés par RuAAC. Le protocole utilisé est inspiré de celui décrit par l'équipe de Lecouvey faisant intervenir le catalyseur chlorure de pentaméthylcyclopentadiénylbis(triphénylphosphine)ruthénium (II) ($Cp^*RuCl(PPh_3)_2$)[220]. Les rendements obtenus sont assez faibles, 29% et 35% (Schéma 12).

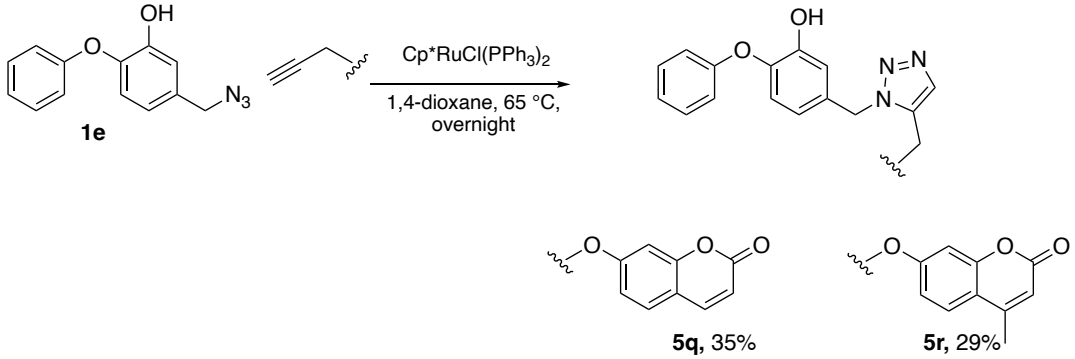


Schéma 12 : synthèse des composés *syn* par RuAAC.

II.B Tests biologiques

II.B.1 Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA

Une campagne de tests enzymatiques a été effectuée pour évaluer le potentiel inhibiteur des produits *anti*, *syn,* de certains précurseurs alcynes et de l'azoture **1e**. Les essais ont été réalisés en présence de 2-*trans*-dodécénoyl-CoA et du cofacteur NADH. Les molécules ont d'abord été testées à 500 µM pour les précurseurs alcynes et à 50 µM pour les dérivés "click" et l'azoture. Pour les inhibiteurs les plus

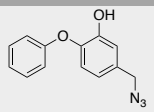
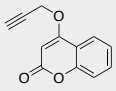
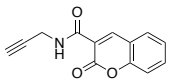
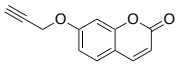
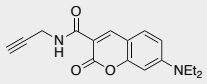
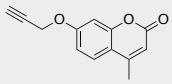
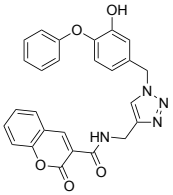
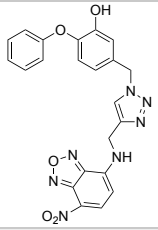
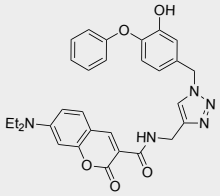
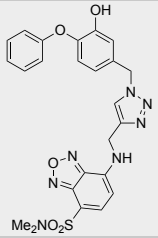
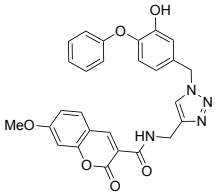
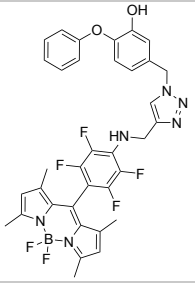
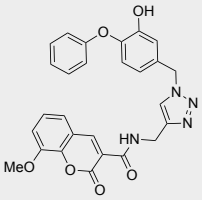
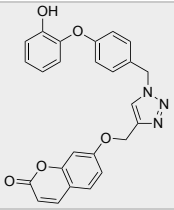
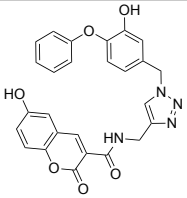
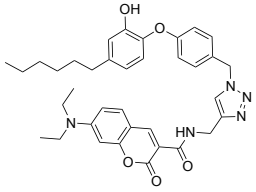
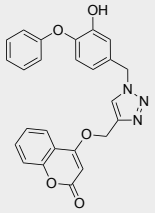
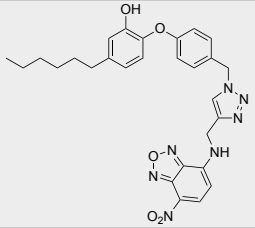
puissants, les valeurs d'IC_{50} ont été déterminées (Tableau 5). Les IC_{50}, ou concentrations inhibitrices médianes correspondent à la concentration permettant d'inhiber 50% de l'activité de l'enzyme. Pour ce test, le **TCL** ayant un IC_{50} de 1 µM[174] a servi de molécule de référence. J'ai effectué ces tests sous la supervision du Dr Christian Lherbet.

La tendance générale montre que les précurseurs alcynes présentent de faibles activités inhibitrices par rapport aux produits triazoles ou à l'azoture **1e**. Ces résultats affirment clairement que la protéine ne reconnaît pas ces précurseurs alcynes. L'azoture **1e** inhibe la protéine avec un IC_{50} de 843 nM démontrant une bonne interaction de ce ligand dans le site actif d'InhA. Douze molécules sur les 18 de la série ont permis de déterminer un IC_{50} inférieur ou égal à celui du précurseur **1e**.

Les 3-carboxamide-coumarines **5a-e** montrent des différences d'inhibition très importantes en fonction du substituant et de la position sur la coumarine. La 7-diéthylamino-coumarine **5b** présente une IC_{50} de 3,5 µM tandis que le dérivé 7-méthoxy-coumarine **5c**, moins volumineux, est 10 fois plus actif avec un IC_{50} de 0,345 µM. Le composé **5g** portant une 7-diéthylaminocoumarine, substituée en position 4, a montré la meilleure activité inhibitrice avec une IC_{50} de 54 nM, soit une diminution d'un facteur 15 par rapport à **1e**. Le remplacement du substituant 7-diéthylamino par un hydrogène (composé **5f**) entraîne une diminution de l'activité. La comparaison des composés **5h** et **5m**, qui ne diffèrent que par la position du groupe hydroxyle, montre l'importance de ce groupe qui dicte le positionnement du reste de la molécule en interagissant avec le résidu Tyr158 par liaison hydrogène. Le remplacement des coumarines par le nitrobenzoxadiazole (NBD) (**5j**), le 4-(*N,N*-diméthylaminosulfonyl)benzoxadiazole (DBD) (**5k**) ou encore par le BODIPY (**5l**) n'a pas permis d'obtenir une meilleure inhibition.

Deux autres composés, **5n** et **5o**, portant une chaîne alkyle en C_6, ont été évalués. Ces composés sont des analogues de l'un des plus puissants inhibiteurs d'InhA, le 5-hexyl-2-phénoxyphénol (**6PP**), qui présente une inhibition nanomolaire et une très bonne CMI (7,8 µM)[165]. La chaîne alkyle en C_6 joue un rôle crucial en interagissant avec la région plutôt hydrophobe proche du portail mineur dans le site de liaison du substrat de la protéine. La présence de la chaîne C_6 et la position du groupe hydroxyle guident le positionnement des hétérocycles NBD et coumarine vers le portail majeur. Les deux molécules ont une faible activité inhibitrice contre l'enzyme InhA, à 50 µM, une inhibition respective de 54% et 32%. Le composé **5p** (complexe de rhénium) inhibe la protéine de façon très modeste, IC_{50} = 9,7 µM.

Enfin, les régioisomères *syn* **5q** et **5r** ont montré une inhibition légèrement plus faible par rapport à **5h** et **5i**, avec des IC_{50} de 0,630 µM et 0,510 µM, respectivement. Cela représente une diminution de l'inhibition de seulement 2,5 à 3,8 fois. Ces résultats mettent en évidence que les dérivés *syn*, malgré un espace conformationnel très différent de celui des produits *anti*, ont également la capacité d'inhiber la protéine InhA.

Ligand	Structure	IC_{50} InhA* (µM)	CMI H37Rv (µM)	Ligand	Structure	IC_{50} InhA* (µM)	CMI H37Rv (µM)
1e		0,843 ± 0.094	/	**4f**		500 µM : NI	/
4a		200 µM : NI	/	**4h**		200 µM : 99% 100 µM : 30%	/
4b		500 µM : 10%	/	**4i**		500 µM : 90% 200 µM : 37%	/
5a		0.598 ± 0.061	10	**5j**		0.459 ± 0.040	10
5b		3.55 ± 1.03	> 100	**5k**		0.733 ± 0.065	> 100
5c		0.345 ± 0.029	> 10	**5l**		3.251 ± 0.047	> 100
5d		0.74 ± 0.15	10	**5m**		50 µM : 10%	5
5e		0.844 ± 0.095	> 10	**5n**		50 µM : 54%	> 100
5f		0.181 ± 0.016	5	**5o**		50 µM : 32%	2.5

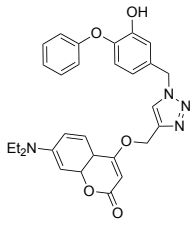
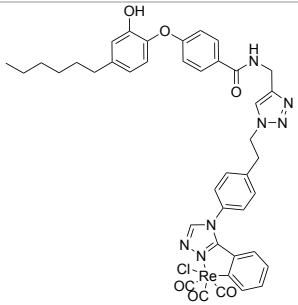
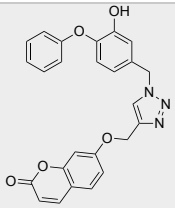
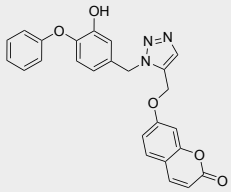
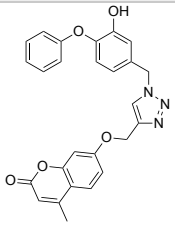
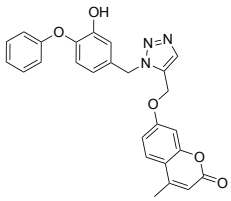
5g		0.054 ± 0.015	1.25	**5p**		9.733 ± 0.996	10
5h		0.163 ± 0.017	5	**5q**		0.63 ± 0.05	ND
5i		0.205 ± 0.012	1.25	**5r**		0.51 ± 0.06	ND

Tableau 5 : récapitulatif des activités enzymatiques et antimycobactériennes des molécules du projet SCREEN-It. * ou % à la concentration testée. ND : non déterminée / NI : non inhibiteur.

II.B.2 Évaluation de la propriété off/on des composés synthétisés

Le site actif de la protéine InhA contient une partie hydrophobe, située au niveau du site de liaison I de la chaîne alkyle du **THT**. Nous pouvons penser que la partie fluorophore des molécules peut se lier dans le site hydrophobe pour mimer le repliement de l'analogue du substrat.

Zhuang *et al* ont travaillé sur la protéine humaine anhydrase carbonique II (hCAII), une protéine soluble monomérique qui comporte un site de liaison hydrophobe pour de nombreux ligands arylsulfonamides. Les auteurs ont greffé des noyaux 4-nitrobenzoxadiazole (**NBD**) et *N*-diméthylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole (**DBD**) sur ce type de molécules. Les sondes à NBD et DBD sont d'excellentes sondes de polarité. Non seulement leur fluorescence montre un fort solvatochromisme positif, mais elle est très intense en milieu apolaire et pratiquement éteinte dans un milieu polaire et protique. La comparaison entre les spectres d'émission enregistrés à une longueur d'onde d'excitation donnée avec et sans la protéine permet de visualiser la différence de fluorescence. Les résultats montrent une exaltation de la fluorescence d'un facteur 9 lorsque la protéine est ajoutée, ce qui suggère que le ligand se lie bien dans le site actif hydrophobe. Les meilleurs résultats obtenus (Figure 56) correspondent à la sonde dérivée du **DBD** tandis que les auteurs n'ont observé aucune différence de fluorescence avec les sondes dérivées du **NBD**.[181] L'ajout d'éthoxzolamide, inhibiteur fort de la hCAII, entraîne le déplacement de la sonde du milieu hydrophobe (site actif de l'enzyme) vers le tampon hydrophile, provoquant ainsi une extinction de la fluorescence.

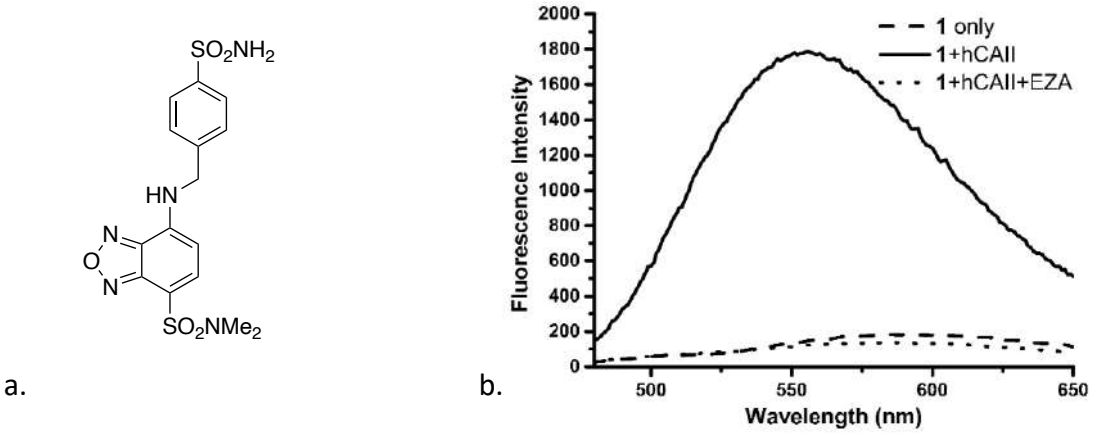


Figure 56 : a. Structure chimique de la sonde off/on à base de **DBD** b. Spectre de fluorescence obtenu avec 1 µM de la sonde en absence (ligne en tirets) et présence (ligne continue) de 10 µM de hCAII dans le tampon PBS (1% DMSO) et après addition de 100 µM éthoxzolamide (EZA, ligne en pointillés), λ_{ex} = 430 nM.
Source : Zhuang *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (31), 8124–8128.

De façon analogue à cette étude, nous avons entrepris des analyses spectrophotométriques pour évaluer le potentiel des molécules synthétisées comme sondes fluorescentes off/on. Les ligands **5b**, **5j** et **5k** ont été sélectionnés pour les essais. Les résultats avec le ligand 5b sont présentés à titre d'exemple. Une série d'analyse a été effectuée en faisant varier la concentration de la protéine InhA (Figure 58) et celle du cofacteur (Figure 58).

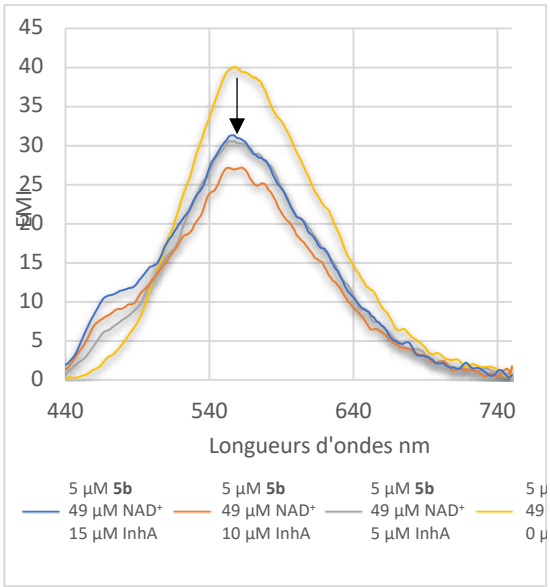


Figure 58 : courbes d'émission corrigées de **5b** à 5 µM et variation de la concentration de la protéine InhA de 0 à 15 µM et [NAD+] = 49 µM.

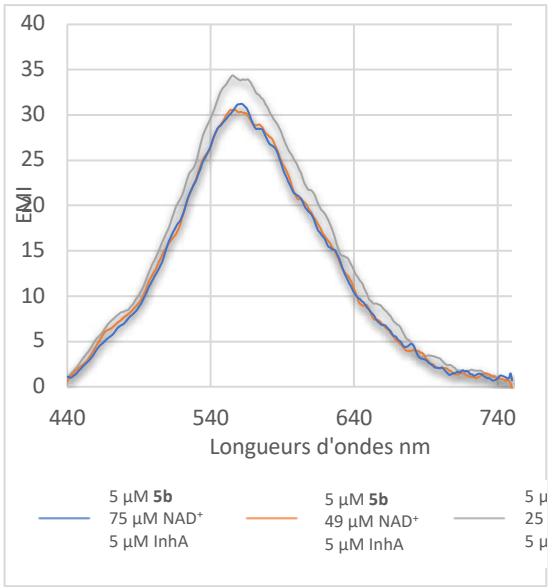


Figure 58 : courbes d'émission corrigées de **5b** à 5 µM et variation de la concentration du cofacteur NAD+ de 25 à 75 µM et [InhA] = 5 µM

L'augmentation de la concentration en protéine et en cofacteur n'a entrainé qu'une faible diminution de l'intensité d'émission (environ 15% pour la protéine et 5% pour le cofacteur). La formation d'un point quasiment isoémissif autour de 500 nm (Figure 58) semble indiquer une interaction entre la sonde et la protéine. Cependant, comme aucune exaltation de fluorescence n'est observée, on peut dire que la sonde ne se trouve pas dans la poche hydrophobe du site actif de la protéine, ou, si elle s'y trouve qu'elle reste au contact de molécules d'eau. Visuellement, lors des analyses, une agrégation a été observée dans la cuve contenant le composé **5b**, la protéine et le cofacteur NAD^+ dans le tampon PIPES. Ces agrégats fluorescents sont mis en évidence par illumination sous la lampe UV (365 nm) (Figure 59). Les agrégats étant souvent moins luminescents que les sondes dissoutes[221], et pouvant avoir un spectre différent, leur formation peut expliquer l'évolution du spectre de fluorescence. Ils indiquent qu'une interaction a bien lieu entre la sonde et la protéine.



Figure 59 : photo de la cuve contenant le composé **5b** (0,5 µM), la protéine InhA (5 µM) et le cofacteur NAD^+ (2 mM) dans le tampon PIPES.

Malheureusement, le comportement des molécules testées, **5b**, **5j** et **5k**, n'est pas celui recherché pour des sondes fluorescentes off/on.

II.B.3 Inhibition de la croissance mycobactérienne

L'activité antimycobactérienne des composés a été déterminée dans le cadre d'une collaboration locale avec l'équipe de la Docteure Hédia Marrakchi de l'IPBS. Elle rend compte de l'activité inhibitrice de la croissance mycobactérienne des composés. La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la concentration la plus faible d'un agent antibactérien exprimée en mg/L ou µM qui empêche complètement la croissance visible de la souche testée d'un organisme[222]. La ciprofloxacine a été utilisée comme référence (CMI = 2,5 µM).

D'une façon générale, les CMI sont comprises entre 1,25 µM pour les meilleurs composés et des valeurs supérieures à 100 µM pour les plus mauvais. Les composés les plus actifs sur la croissance mycobactérienne sont **5g** et **5i**, avec une CMI de 1,25 µM. Le composé **5g** ayant la meilleure activité *in vitro* contre la protéine (IC_{50} = 54 nM), apparaît comme un bon hit ; **5i** a un IC_{50} de 205 nM. Par comparaison, les thionamides, antibiotiques commerciaux, ont des CMI de 1,5 et 2,7 µM. Les composés **5o** et **5m**, non actifs contre la protéine InhA, inhibent la mycobactérie à 2,5 µM, permettant de suggérer qu'InhA n'est pas leur cible. Les composés **5f** et **5h** ont une CMI de 5 µM. Enfin, les composés les moins actifs correspondent à **5a**, **5d**, **5j** et **5o** avec une CMI de 10 µM, et **5b**, **5c**, **5e**, **5k**, **5l** et **5n** qui ont des CMI supérieures à 10 µM, voire 100 µM. Les courbes des évaluations de la croissance mycobactérienne sont représentées dans la Figure 60 pour les meilleurs composés, **5g**, **5i** et **5o**.

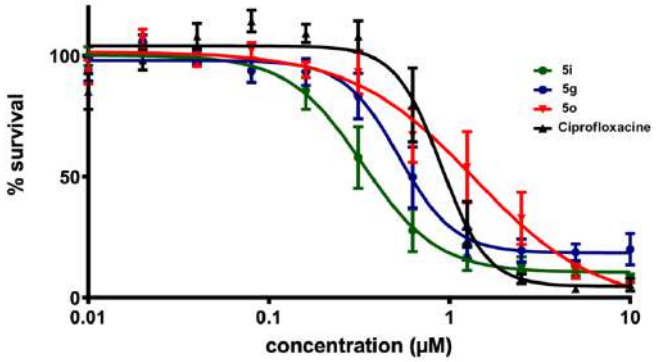


Figure 60 : courbes des évaluations antimycobactériennes des composés **5g**, **5i**, **5o** et du contrôle positif la ciprofloxacine.

En conclusion, les hydroxycoumarines, **5f-i,** constituent les ligands les plus puissants contre la mycobactérie avec des CMI comprises entre de 1,25 et 5 µM.

II.B.4 Inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques

Le mécanisme d'action des composés ayant présentés les meilleures activités a été investigué. Ainsi, pour les composés les plus actifs sur la mycobactérie, **5g**, **5i** et **5o**, l'évaluation de l'inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques a été étudiée par marquage métabolique des bactéries pathogènes Mtb H37Rv avec de l'acétate ^{14}C. Ce travail a été rendu possible grâce à une collaboration internationale avec l'équipe de la Professeure Jana Korduláková du département de biochimie de la faculté des sciences naturelles de l'Université Comenius de Bratislava en Slovaquie.

Le traitement de Mtb H37Rv à trois concentrations en inhibiteurs **5g** et **5i** correspondant à 1, 5 et 25 fois leur CMI a conduit à une diminution de la production des lipides contenant les acides mycoliques, les tréhaloses monomycolates (TMM) et les tréhaloses dimycolates (TDM) ainsi que tous les types d'acides mycoliques (alpha, méthoxy, céto) et à l'accumulation d'acides gras (FAME) (Figure 61). Ces résultats confirment le potentiel des ligands **5g** et **5i** à inhiber la production d'acides mycoliques et de leurs dérivés dans la mycobactérie. Le composé **5o,** qui inhibe faiblement la protéine InhA, présente un profil distinct. En effet, ce composé conduit à l'accumulation de tréhalose monomycolates et à une diminution de la production des tréhaloses dimycolates mais n'a montré aucun effet sur la production d'acides mycoliques. Ce déséquilibre TMM/TDM en faveur du TMM montre l'inhibition du transporteur du TMM, la protéine membranaire mycobactérienne large, MmpL3[223,224].

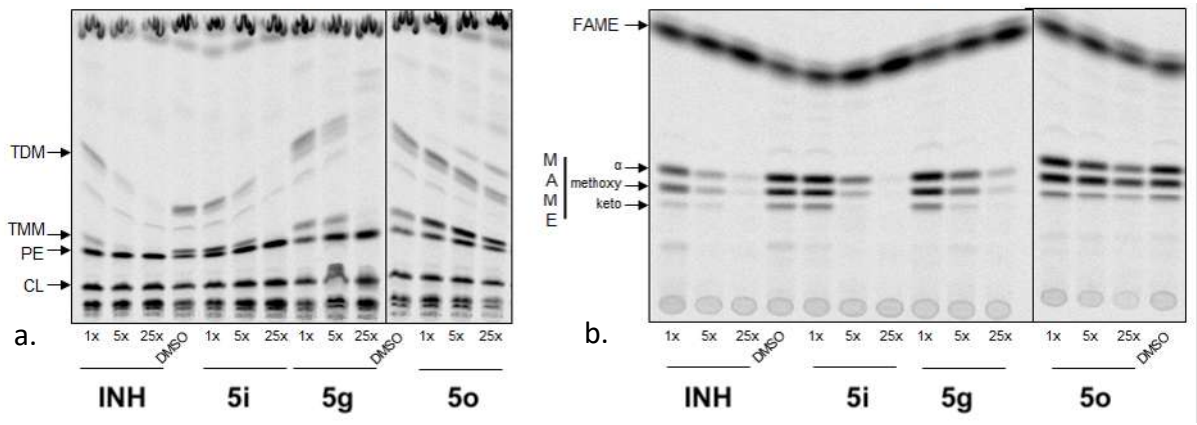


Figure 61 : marquage métabolique des mycobactéries traitées avec les composés **5i**, **5g** ou **5o**. a. Pour l'analyse de l'inhibition des lipides b. Pour l'analyse de l'inhibition des acides mycoliques. **5g** et **5i** : 1,25 µM (1x), 6,25 µM (5x), 31,25 µM (25x) et **5o** : 2,5 µM (1x), 12,5 µM (5x), 62,5 µM (25x). Abbréviations : FAME : Fatty Acid Methyl Esters, MAME : Mycolic Acid Methyl Esters, TDM : trehalose DiMycolates, TMM : Trehalose MonoMycolates, PE : PhosphotidylEthanolamine, CL : CadioLipin.

Le mécanisme d'action de ces composés a été étudié en utilisant des souches de Mtb H37Ra portant les constructions pVV16-*katG*$_{smeg}$, pMV261-*inhA* et pVV16-*had*ABC surexprimant respectivement la catalase peroxydase KatG, InhA et les déshydratases HadABC. Les souches H37Ra portant les vecteurs vides pMV261 et pVV2 ont été utilisées comme témoins. La même sensibilité des souches Mtb H37Ra surproduisant KatG et HadABC par rapport aux souches de contrôle signifie que la déshydratase HadABC du système FAS-II n'est pas la cible des composés et, comme prévu, ces composés ne sont pas activés par la protéine KatG (Tableau 6). En revanche, l'augmentation de la CMI en présence de **5g** et **5i** chez Mtb H37Ra surproduisant InhA confirme que cette enzyme est la cible spécifique. Cependant, les résultats identiques aux témoins suggèrent que le composé **5o** ne cible pas les protéines surexprimées.

Souches Mtb	CMI (µM) 5g	CMI (µM) 5i	CMI (µM) 5o
H37Ra pMV261	6.25	1.25-6.25	2.5-12.5
H37Ra pVV2	6.25	1.25-6.25	2.5-12.5
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ (2)	6.25	1.25-6.25	2.5-12.5
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ (4)	6.25	1.25-6.25	2.5-12.5
H37Ra pMV261-*inhA* (1)	>25	12.5	2.5-12.5
H37Ra pMV261-*inhA* (2)	>25	12.5	2.5-12.5
H37Ra pVV16-*had*ABC	6.25	1.25-6.25	2.5-12.5

Tableau 6 : sensibilité des souches de Mtb H37Ra surexprimant KatG, InhA et HadABC aux ligands **5g**, **5i** et **5o**.

II.B.5 Activité cytotoxique

L'activité cytotoxique des composés **5g**, **5i** et **5o** a été évaluée grâce à une collaboration locale avec l'équipe du Docteur Sébastien Britton de l'IPBS. Il nous a paru important de regarder ce point pour évaluer les toxicités des hits découverts.

La mesure se fait après 72h de traitement sur diverses lignées cellulaires humaines comprenant les lignées cellulaires du carcinome du côlon HCT116, d'hépatocarcinome HepG2 (qui peut reproduire la métabolisation de certains composés en métabolites secondaires toxiques), de carcinome colorectal

CACO2 (utilisée comme modèle de la barrière épithéliale intestinale) et WI38hTERT qui sont des fibroblastes pulmonaires normaux immortalisés par l'expression de la télomérase.

Les résultats, reportés dans le Tableau 7 et Figure 62 ci-dessous, montrent que le composé **5g** est cytotoxique sur toutes les lignées cellulaires alors que le composé **5i** n'est que faiblement cytotoxique, en particulier contre les fibroblastes pulmonaires (> 100 µM, indice de sélectivité > 80). Enfin, le composé **5o** a montré une cytotoxicité modérée vis-à-vis toutes les lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que la nature de la coumarine joue un rôle important dans la cytotoxicité de ces composés.

Composés	HCT116	CACO2	HepG2	WI38h TERT
5g (IC_{50} µM)	0.53	≃1.1	≃ 1.6	≃ 0.6
5i (IC_{50} µM)	23.88	≃ 25	≃ 31	>100
5o (IC_{50} µM)	8.70	26.14	26.94	52.94

Tableau 7 : résultats des activités de cytotoxicité des composés 5g, 5i et 5o.

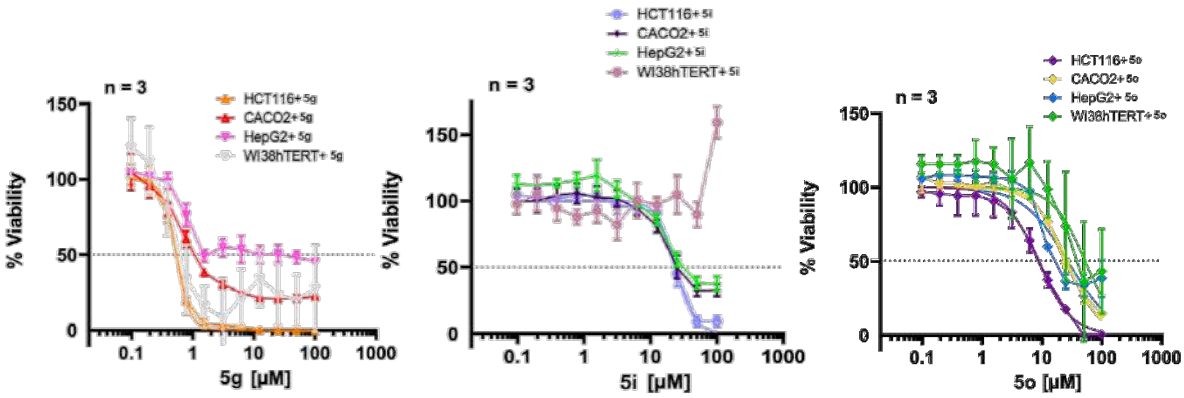


Figure 62 : courbes des activités de cytotoxicité des composés **5g**, **5i** et **5o**.

II.C Cristallographie aux rayons X

En parallèle de toutes ces évaluations biologiques, une campagne de cristallisation de tous les composés a été lancée afin d'étudier les interactions du ligand au sein du site actif de la protéine InhA. Les essais de cristallisation et les résolutions de structure ont été effectués par moi sous la supervision du Dr Lionel Mourey et du Pr Laurent Maveyraud à l'IBPS.

Seules, les structures avec les ligands **5a** et **5i** ont pu être résolues après incubation en présence du cofacteur NAD^+. Le complexe InhA/NAD^+/**5a** (PDB : 8OTM) a cristallisé en présence de PEG4000 dans un groupe d'espace $P2_12_12_1$ avec comme paramètres de maille a = 70.16 Å, b = 91.18 Å, c = 164.22 Å, α = 90.00°, β = 90.00°, γ = 90.00° et 4 molécules dans l'unité asymétrique. Quant au complexe InhA/NAD^+/**5i** (PDB : 8OTN), il a également cristallisé en présence de PEG4000 dans un groupe d'espace différent, $P2_1$ avec a = 90.59 Å, b = 92.78 Å, c = 90.75 Å, α = 90.00°, β = 119.20°, γ = 90.00° comme paramètres de maille et 4 molécules dans l'unité asymétrique.

Les deux structures cristallographiques ont pu être résolues à 1,6 Å et 1,96 Å de résolution. Elles sont quasi-complètes, dans toutes les chaînes, seuls un ou deux résidus au niveau des extrémités N- ou C-terminales sont manquants. En superposant, sur la base des Cα, les différentes molécules de l'unité asymétrique d'un même complexe ou des deux complexes entre eux, les valeurs RMSD calculées ne dépassent pas 0,3 Å, montrant que les structures tertiaires de la protéine dans les deux complexes sont quasi-identiques. Dans les deux structures, la SBL est en conformation fermée, le cofacteur NAD^+ occupe la place habituelle dans le fond du site en faisant différentes liaisons hydrogène et interactions de van der Waals avec les résidus du site actif. L'orientation des résidus Phe149 et Tyr158 est en position *out* et *in* respectivement. Les deux composés se positionnent, sans surprise, comme les composés biaryléthers analogues du **TCL** : le phénol fait une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du cofacteur et est engagé dans une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. La superposition des structures cristallographiques des complexes, **5a** et **5i**, et ceux de la PDB contenant un noyau triazole, a montré une parfaite similarité des motifs biaryléthers et triazoles indiquant que ces deux motifs forment une ancre au sein du site actif de la protéine. Les composés adoptent par ailleurs une forme de S avec le motif fluorophore flexible engagé dans des interactions dans le portail mineur (Figure 63).

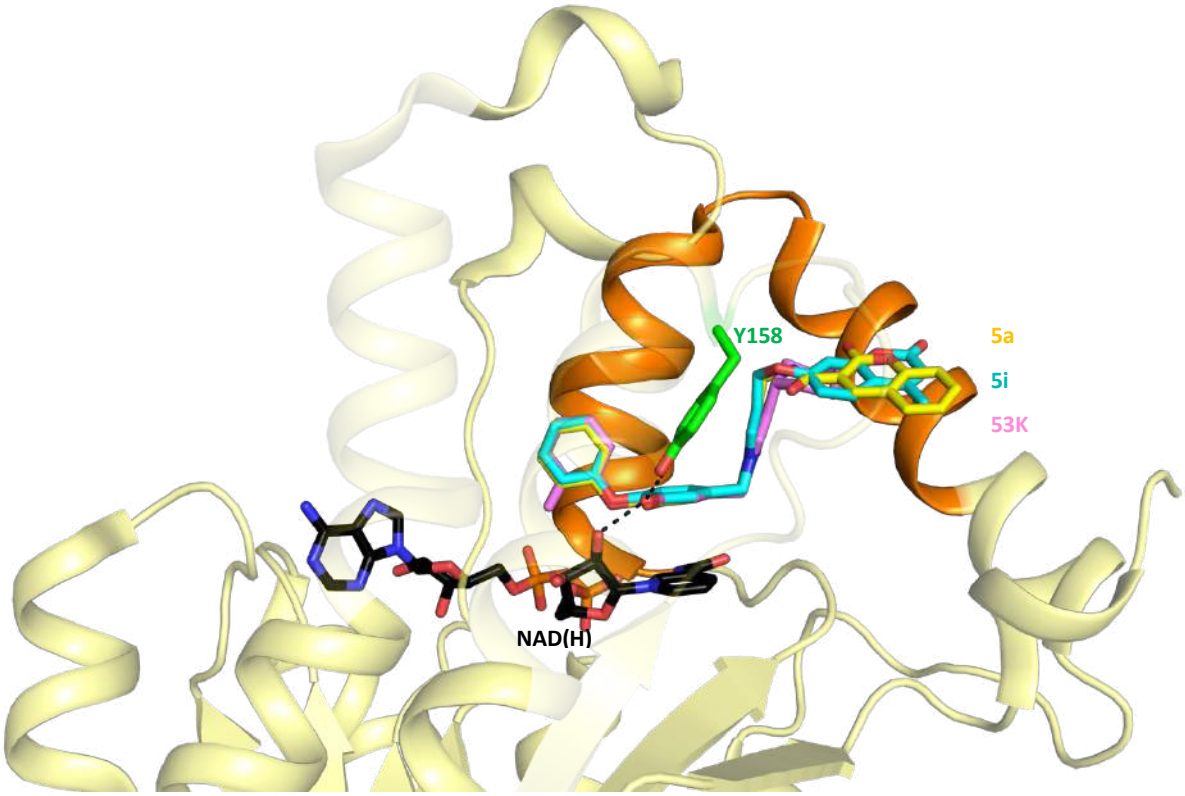


Figure 63 : structure de InhA en présence de composés **5a**, **5i** et **53K**. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/**5a** (8OTM-A et **5a** en jaune), InhA/NAD(H)/**5i** (8OTN-A, **5i** en cyan) et InhA/NAD(H)/**53K** (5MTP-A, **53K** en violet). Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir.

La flexibilité du fluorophore est très marquée dans le cas du ligand **5a**. Dans la chaîne A, le résidu Gln214 adopte deux conformations ; l'une d'elle permet de faire une liaison hydrogène entre le carbonyle de la lactone du ligand et l'azote du résidu Gln214. Dans la chaîne C, le ligand adopte deux conformations alternatives. La différence entre ces deux conformations se situe au niveau du carbonyle du lien amide qui pointe dans un cas, vers la SBL, ou qui est retourné de 180° pour pointer vers l'hélice α5. Le noyau de la coumarine est également inversé de 180° par rapport à la conformation de la chaîne A. Ces conformations indiquent une flexibilité de la partie coumarine dans le site actif et qu'une rotation au niveau de l'atome d'azote du lien amide a eu lieu. Ces conclusions peuvent suggérer des interactions faibles de la coumarine avec les résidus du portail mineur. En revanche, la flexibilité du ligand n'a pas empêché une inhibition correcte de la protéine, son IC_{50} étant de 598 nM (Figure 64).

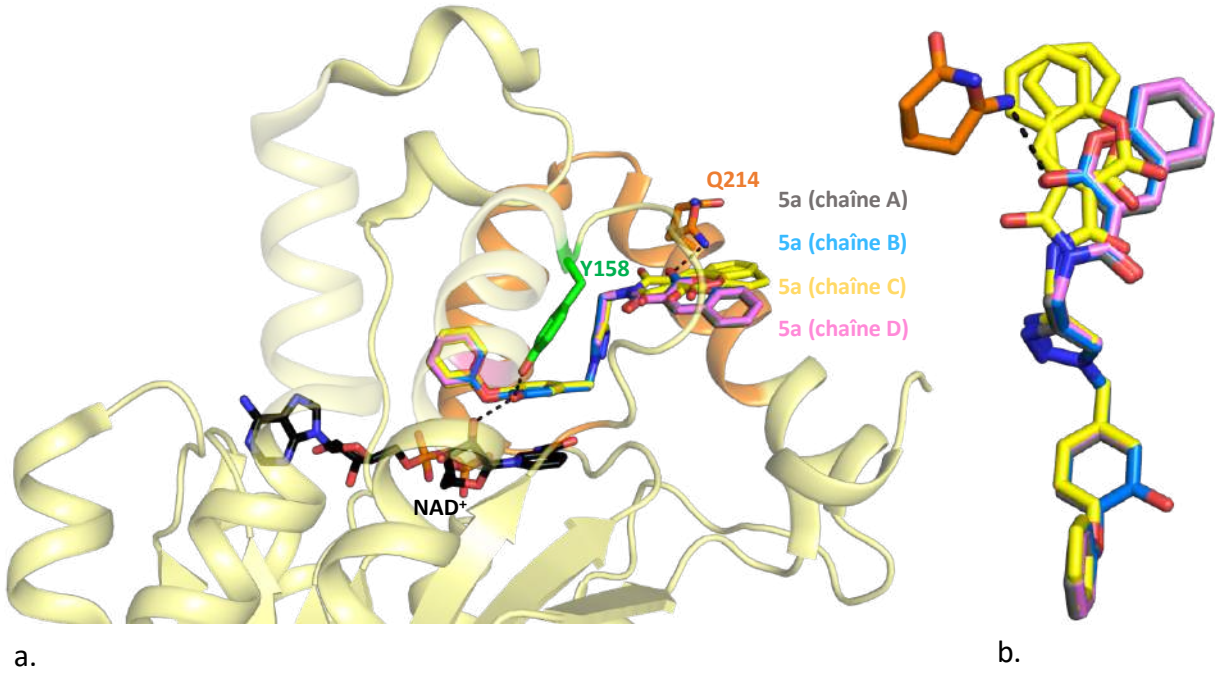


Figure 64 : structure de InhA en présence du composé **5a**. a. Superposition des 4 protomères de la structure. 8OTM-A en jaune, **5a** en gris, 8OTM-B, **5a** en marine, 8OTM-C, **5a** en jaune et 8OTM-D, **5a** en rose. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie coumarine des ligands dans les quatre molécules de l'unité asymétrique et interactions avec la Glu214.

La flexibilité du ligand **5i** est nettement moins importante, la même conformation est observée sur les 4 chaînes. L'inhibition est plus forte que pour le ligand **5a** (IC_{50} = 205 nM). Nous avons observé des interactions originales puisque les motifs fluorophores se sont liés au niveau du portail mineur, site de liaison faiblement exploité dans les structures cristallographiques de la PDB. Aussi, pour le ligand **5a**, les différentes conformations peuvent suggérer que ce portail mineur a une grande capacité d'accueil (Figure 65).

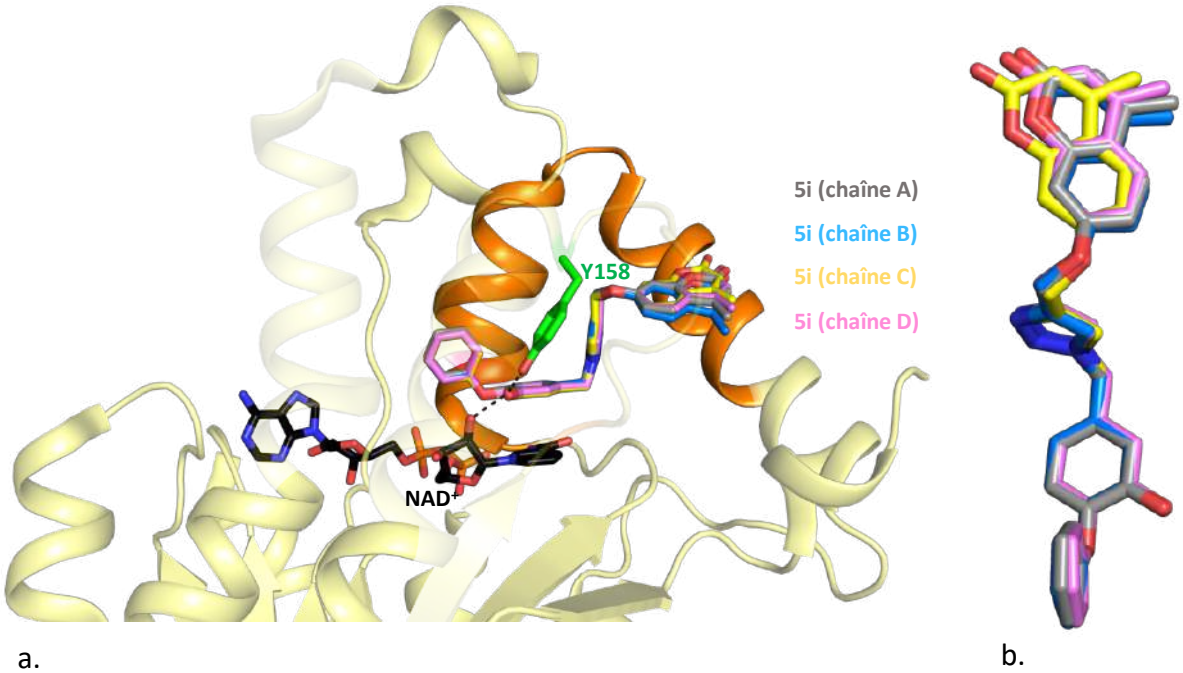


Figure 65 : structure de InhA en présence du composé **5i**. a. Superposition des 4 protomères de la structure. 8OTN-A en jaune, **5i** en gris, 8OTN-B, **5i** en marine, 8OTN-C, **5i** en jaune et 8OTN-D, **5i** en rose. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie coumarine des ligands dans les quatre molécules de l'unité asymétrique.

À la suite de cette étude, nous pouvons conclure que les motifs biaryléthers et triazoles adoptent une seule conformation en forme de « S » et qu'à priori, les ligands synthétisés de la série devraient prendre cette même conformation. Nous ne pouvons conclure sur la position exacte des motifs fluorophores des autres molécules de la série puisqu'ils auraient la place de se replier sur le noyau biaryléther pour une conformation similaire à celle du **THT**. Cependant, nous pensons qu'ils se lieraient au sein du portail mineur. En effet, tous les ligands biaryléthers portant un noyau triazole ont leur substituant allant vers le portail mineur.

III Conclusion et perspectives

La stratégie d'hybridation entre des molécules portant un motif biaryléther et des fluorophores a permis de concevoir une série de 18 composés dont plus de la moitié présentent des inhibitions de l'enzyme supérieures aux molécules du **TCL** et à celle du précurseur **1e**.

L'objectif principal, qui était de synthétiser des sondes fluorescentes de la protéine InhA, n'a pas été atteint. En effet, les essais des sondes on/off sur la protéine, réalisés avec les ligands **5b**, **5j** et **5k** n'ont montré aucune exaltation de fluorescence. La conception de ce type de sonde avait été imaginée pour des ligands qui seraient capables de rester dans le portail majeur, de prendre une conformation identique à celle de l'analogue du substrat **THT** et de faire des interactions avec la partie supérieure du site actif constituée de résidus hydrophobes. Au vu des structures cristallographiques obtenues pour les ligands **5a** et **5i**, nous pouvons imaginer que les ligands **5b**, **5j** et **5k** prennent la même conformation dans le portail mineur entraînant leur exposition au solvant ce qui empêcherait cette exaltation de

fluorescence. Au bilan, ce projet a tout de même conduit à la découverte de nouveaux inhibiteurs puissants de la protéine InhA capables d'explorer des régions sous-exploitées de cette enzyme.

L'étude complète des ligands **5g** et **5i** a permis de montrer une bonne inhibition *in vitro* (IC_{50} = 54 nM et 205 nM) et *in vivo* (CMI = 1,25 µM) et a confirmé que InhA était bien leur cible. La toxicité modérée du **5i** pourrait en faire un bon hit, cependant la cytotoxicité forte de **5g** sur toutes les lignées cellulaires humaines testées l'élimine comme un candidat médicament.

En perspective, nous pourrions concevoir de nouveaux inhibiteurs analogues des hydroxycoumarines **5f-i**, qui ont montré les meilleures activités *in vitro* et *in vivo* et. En cela, la faible toxicité du biaryléther **5i** est encourageante pour développer des dérivés analogues.

CHAPITRE 2 : MÉTHODE DE DÉCONSTRUCTION-RECONSTRUCTION POUR LA DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE FAMILLE D'INHIBITEURS DE LA PROTÉINE INHA

I Présentation du projet

I.A Objectif du projet

La méthode de déconstruction-reconstruction permet l'identification de différents fragments. En effet, les ligands connus sont déconstruits en plusieurs fragments susceptibles de servir de pharmacophores clés puis la deuxième étape consiste à reconstruire de nouveaux ligands à partir de ces fragments. La reconstruction est une étape subtile puisqu'il faut réussir à choisir les bons fragments et le bon espaceur pour les lier de façon à améliorer l'activité. Elle constitue une méthode très utile pour les protéines qui ont été explorées depuis de nombreuses années. La connaissance de leurs sites actifs et des différentes familles d'inhibiteurs permet de mieux visualiser la déconstruction[225]. La Figure 66 reprend le principe de la méthode déconstruction-reconstruction.

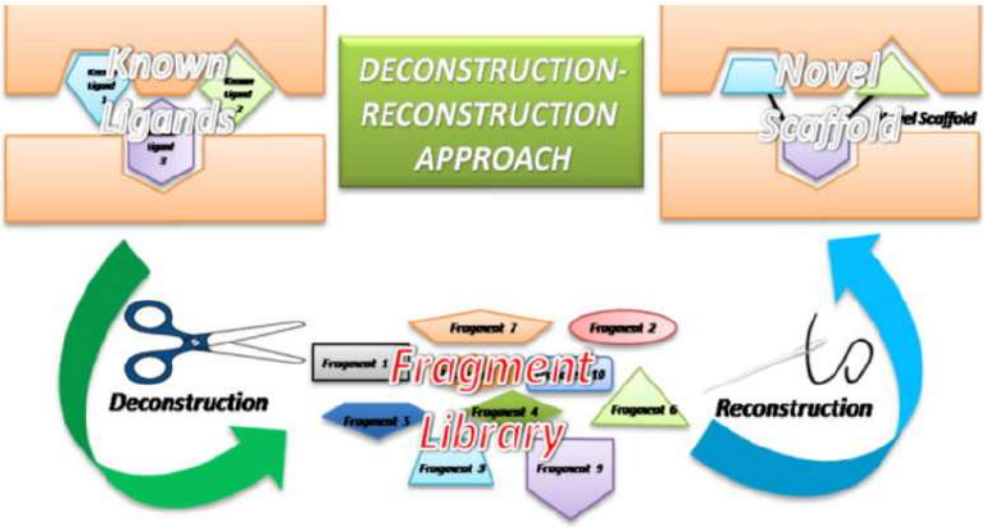


Figure 66 : représentation de la méthode déconstruction-reconstruction.
Source : Chen *et al*, *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 105–113.

L'objectif principal de ce projet consiste au développement d'une nouvelle série d'inhibiteurs de la protéine InhA possédant à la fois le motif biaryléther du **TCL** et le noyau fluorène du **GEQ** (Figure 67). La conception a été élaborée grâce à la méthode de déconstruction-reconstruction.

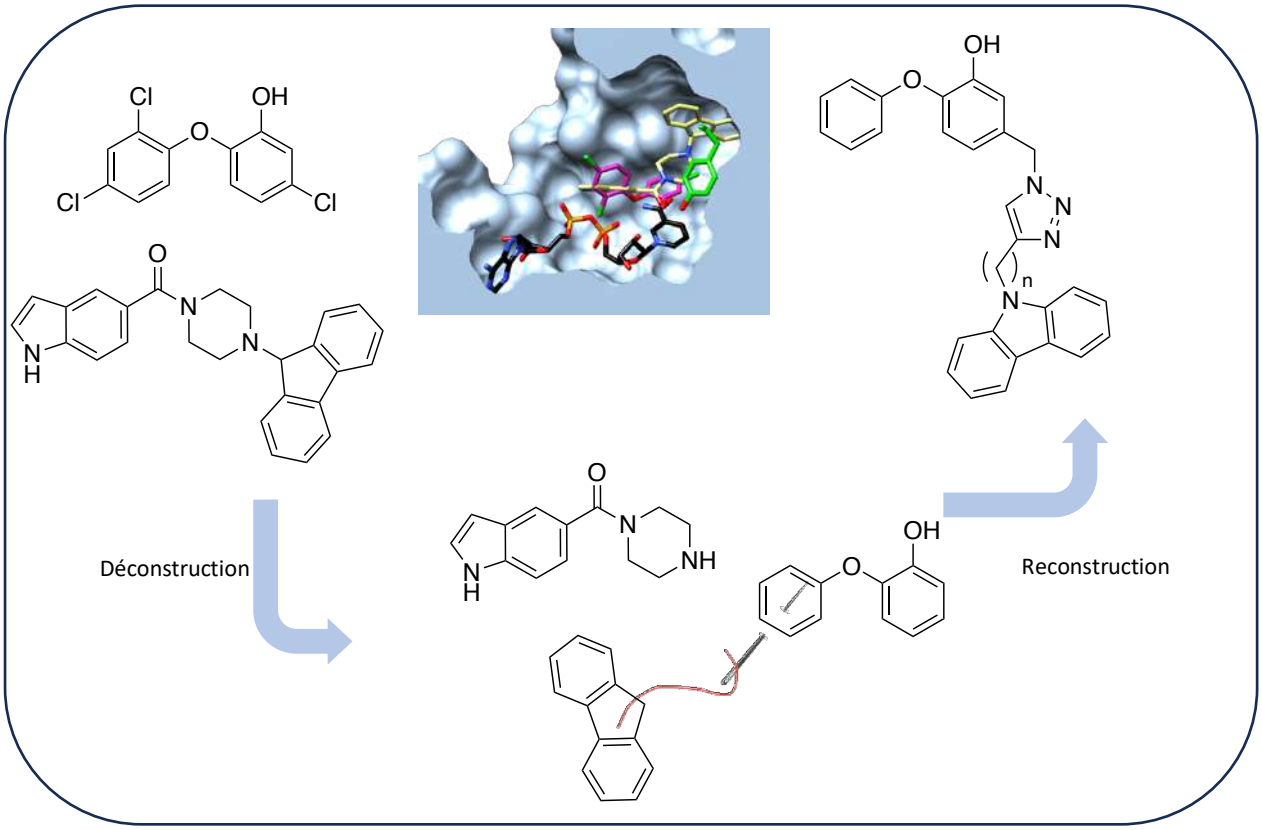


Figure 67 : objectifs de la méthode déconstruction-reconstruction. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/ **TCL** (1P45-B en gris, **TCL** en rose) et InhA/NAD(H)/**GEQ** (1P44-A, **GEQ** en jaune). Le cofacteur est représenté en noir et le résidu Tyr158 est en vert.

I.B Conception des molécules

Les travaux décrits dans le chapitre 1 ont permis l'identification du composé **1e**, dérivé du **TCL**, comme premier fragment. Ce composé a une activité *in vitro* convenable ayant un IC_{50} de 843 nM et va permettre de jouer le rôle d'ancre dans le site actif. Dans ce chapitre, l'apport du groupement phénol sera également étudié avec la synthèse d'un deuxième azoture gardant le noyau anisole (composé **1'e**). Les précurseurs azotures sont représentés ci-dessous (Figure 68).

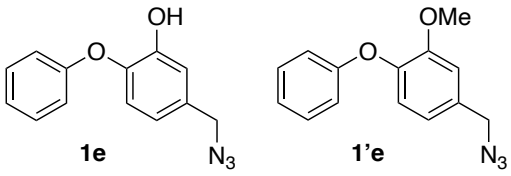
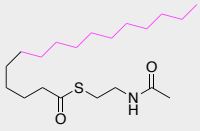
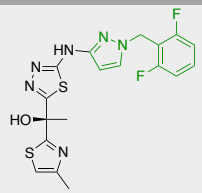
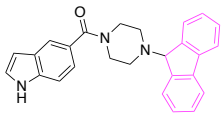
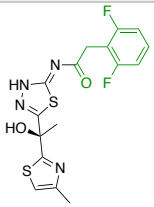
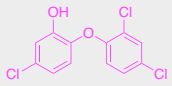
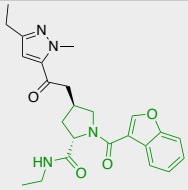
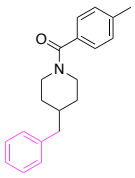
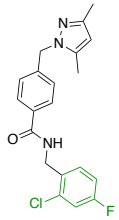
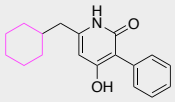
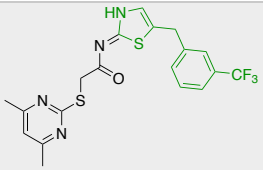
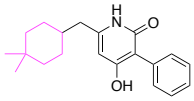
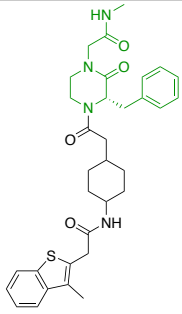


Figure 68 : structures chimiques des précurseurs **1e** et **1'e.**

Il est ensuite nécessaire de trouver des fragments originaux qui ne se lient pas dans le site de liaison du **TCL** de la protéine InhA pour éviter tout conflit stérique. L'étude des composés biaryléthers a montré que les substituants alkyles, aryles ou cycliques pouvaient permettre d'améliorer l'activité sur la protéine, validant ainsi ce type de fragment. Nous avons alors étudié les autres familles d'inhibiteurs.

Au total, 24 structures cristallographiques ont été recensées, dans le Tableau 8 ci-dessous, que l'on peut classer en deux groupes : celui des fragments qui se lient à l'entrée du portail mineur (11 structures, en rose) et celui de ceux qui se lient à l'entrée du portail majeur (12 structures, en vert), un fragment (5G0T, ligand **S72**) se lie à la fois à l'entrée du portail mineur et du portail majeur.

Code PDB	Ligand ID/ PDB se liant à l'entrée du portail mineur (fond du site)	Ligands	Code PDB	Ligand ID/ PDB se liant à l'entrée à l'entrée du portail majeur	Ligands
1BVR[119]	**THT**		4BQP[226]	**VMY**	
1P44[166]	**GEQ**		4BQR[226]	**IBH**	
1P45[166]	**TCL**		4COD[126]	**KV1**	
2NSD[123]	**4PI**		4QXM[227]	**713**	
4R9R[228]	**3KX**		4UVD (à publier)	**HRW**	
4R9S[228]	**3KY**		5G0S[229]	**EEH**	

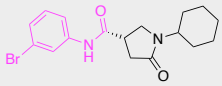
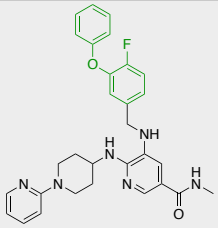
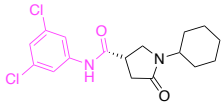
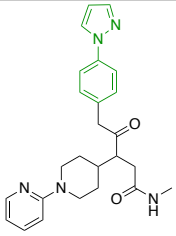
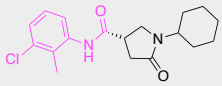
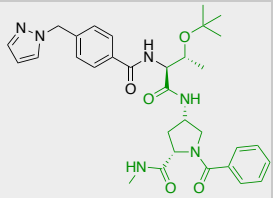
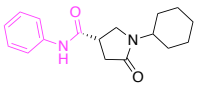
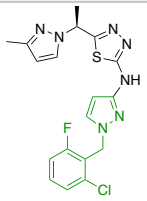
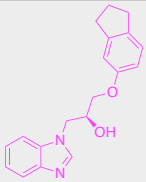
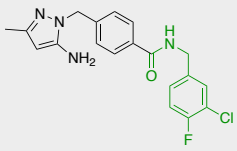
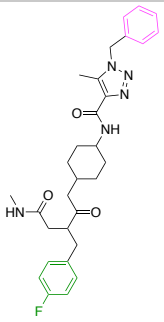
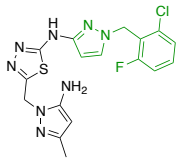
4TRJ[230]	**665**		5G0U[229]	**9CV**	
4TZK[230]	**641**		5G0V[229]	**JDD**	
4TZT[230]	**468**		5G0W[229]	**9NU**	
4U0J[230]	**566**		5JFO[231]	**6KA**	
6R9W[139]	**JVZ**		5OIS[128]	**9WK**	
5G0T[229]	**S72**		5OIT[128]	**9WH**	

Tableau 8 : codes PDB des structures de complexes avec des composés se liant dans un site de liaison différent du TCL. En rose, sont représentés les fragments se liant à l'entrée du portail mineur et en vert ceux qui se lient à l'entrée du portail majeur.

La fixation à l'entrée du portail majeur peut entraîner un encombrement du site et empêcher la fixation du fragment biaryléther. Le choix des fragments ciblant le fond du site a été effectué pour s'affranchir des problèmes d'encombrement. Les fragments aryles, alkyles et cycliques greffés sur une molécule biaryléther ont déjà fait l'objet d'étude, ainsi ils sont discriminés. Trois autres fragments se distinguent : le **TCL** qui occupe le deuxième site de liaison (1P45-A, **TCL**), le ligand **JVZ** (6R9W, **JVZ**) et le noyau fluorène du composé **GEQ** (1P44, **GEQ**). La Figure 69 montre la superposition de la molécule **TCL** et des trois fragments mis en valeur.

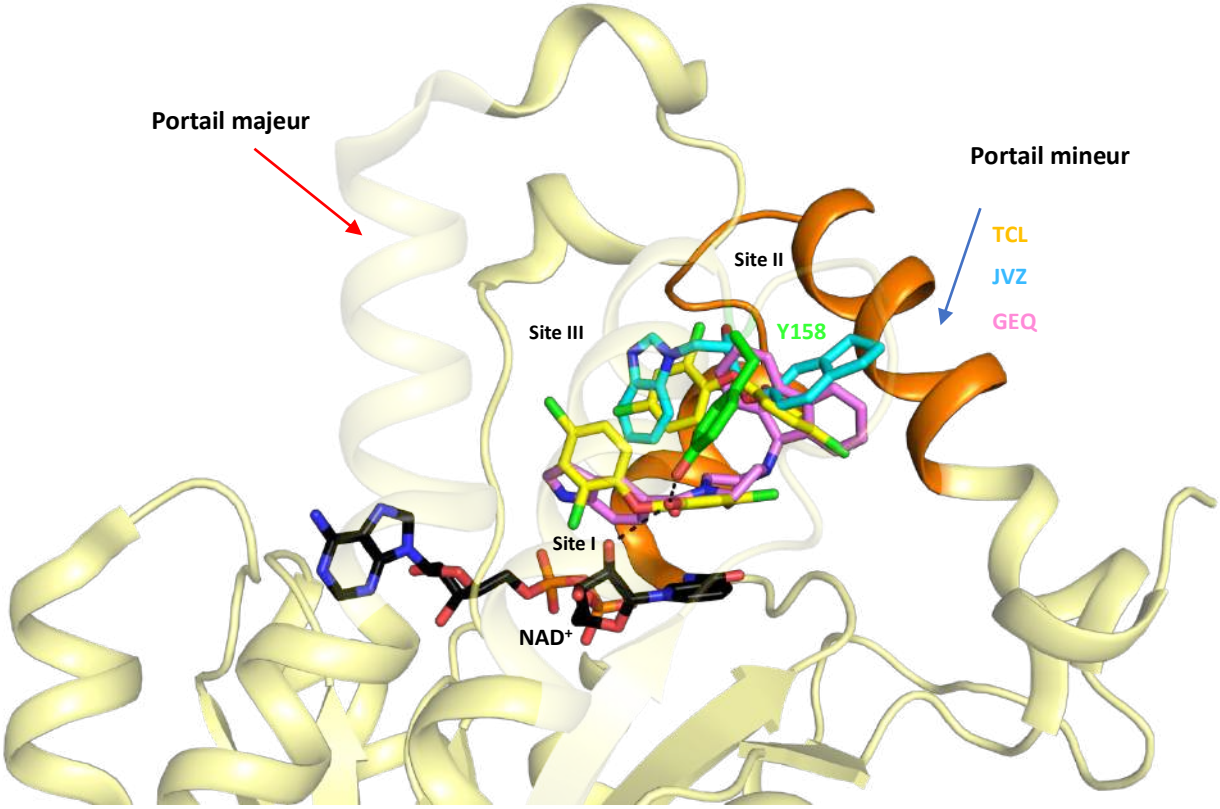


Figure 69 : superposition des structures cristallographiques des ligands les fragments se liant dans le site de liaison II. InhA/NAD(H)/**TCL** (1P45-A et **TCL** en jaune), InhA/NAD(H)/**JVZ** (6R9W-A, **JVZ** en cyan) et InhA/NAD(H)/**GEQ** (1P44-A, **GEQ** en rose). Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. Pour des raisons de clarté, le ligand **TCU** n'est pas représenté.

En 2020, une étude réalisée par Armstrong *et al*, portant sur deux composés bisbiaryléthers, représentés ci-dessous dans la Figure 70, a montré que le premier composé présentait une activité modeste contre la protéine InhA avec un IC_{50} de 5,6 µM et une faible inhibition sur la mycobactérie[232], quant au deuxième composé, il a une faible activité contre la protéine mais une bonne inhibition de la croissance mycobactérienne (H37Rv).

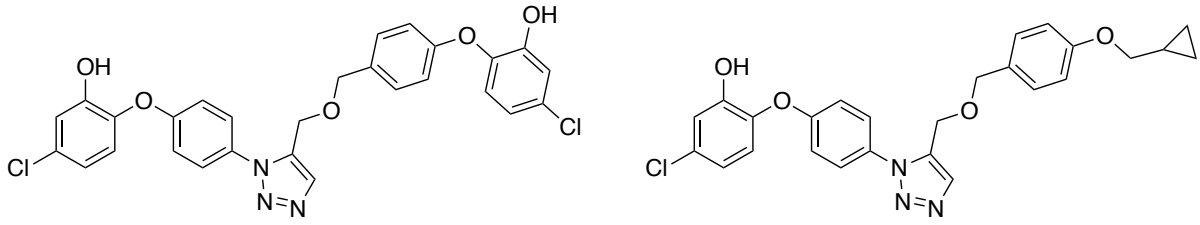


Figure 70 : structures chimiques des molécules bisbiaryléthers et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et sur InhA de Mtb.

Ce résultat ne nous a pas incités à choisir le motif biaryéther comme deuxième motif pour la reconstruction d'un inhibiteur potentiel, préférant ainsi la déconstruction de la molécule de **GEQ**

(**GENZ-10850**). Ce composé a montré un fort potentiel inhibiteur contre la protéine InhA (IC_{50} de 160 nM). Parmi les dérivés du **GEQ** étudiés, un composé portant une chaîne hexyloxy sur le motif fluorène a montré une meilleure activité contre l'enzyme InhA (IC_{50} = 102 nM) et l'inhibition sur la croissance de Mtb (CMI = 11 µM) (Figure 71)[233].

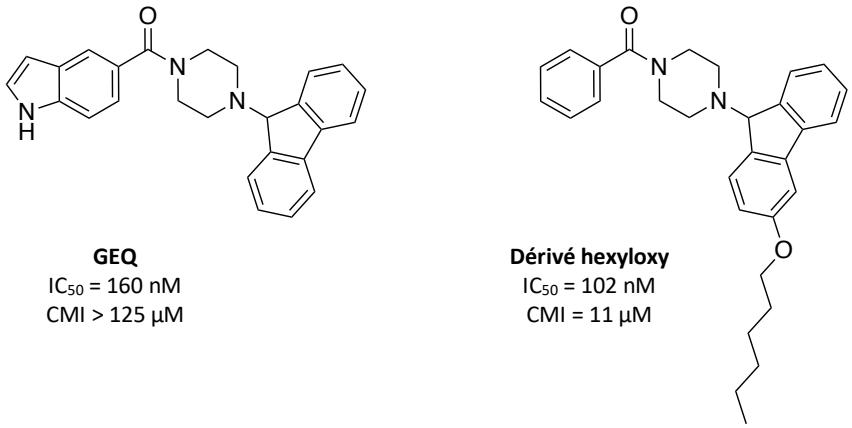


Figure 71 : structures chimiques du **GEQ GENZ-10850** et du dérivé du **GEQ** et activité inhibitrice sur InhA de Mtb et sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).

La structure cristallographique du complexe InhA/NAD/**GEQ** (**GENZ-10850**) montre que le groupe fluorène se positionne au fond de la cavité, au niveau du site de liaison II, de la chaîne alkyle de l'analogue du substrat, stabilisé par des interactions de van der Waals avec les résidus Phe149, Met155, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile215 et Leu218.

Notre parti-pris pour la reconstruction de l'inhibiteur potentiel a été de remplacer le groupe fluorène par un motif isostère de type carbazole, représenté dans la Figure 72, permettant, d'un point de vue synthétique, l'accès plus facile à des analogues. En effet, des réactions de type substitution nucléophile pourront être envisagées pour l'ajout d'une chaîne propargylique. Par analogie, des fonctions alcools permettront également par le même type de réaction l'ajout de divers substituants. D'autres composés avec un noyau indole et 1,2,3,4-tétracarbazole seront également synthétisés pour évaluer leur apport dans l'inhibition de la protéine.

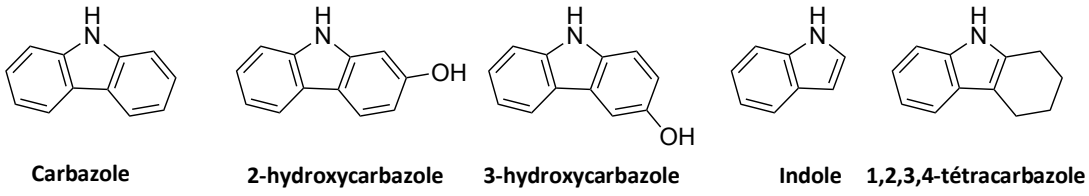


Figure 72 : structures chimiques des précurseurs **carbazole**, **2-hydroxycarbazole**, **3-hydroxycarbazole**, **indole** et **1,2,3,4-tétracarbazole**.

Comme pour le chapitre 1, les deux fragments seront assemblés par réaction de cycloaddition de Huisgen entre l'azoture et un alcyne pour former, comme espaceur, un pentacycle 1,2,3-triazole qui a précédemment montré de bons résultats.

II Résultats et discussion

II.A Synthèse chimique

Ce projet est le fruit d'un travail collectif impliquant Evelyne Delfourne et moi pour la synthèse chimique des différents composés et Saïda Danoun pour les purifications et les analyses de pureté des composés.

La stratégie de la synthèse chimique de ces molécules s'inspire du projet SCREEN-It décrites dans le chapitre 1. Les 17 composés finaux ont été obtenus par une cycloaddition de Huisgen entre les précurseurs azotures et alcynes. La réaction catalysée au cuivre (CuAAC) a permis de former spécifiquement les régioisomères *anti* tandis qu'une catalyse au ruthénium (RuAAC) a permis la formation des régioisomères *syn*.

II.A.1 Obtention des précurseurs azotures

La molécule **1e** a déjà été décrite dans le chapitre 1. Le précurseur **1'e** a été préparé par azoturation en présence d'azoture de sodium à partir du produit bromé **1c** (décrit dans le chapitre 1), le rendement global est de 91% (Schéma 13).

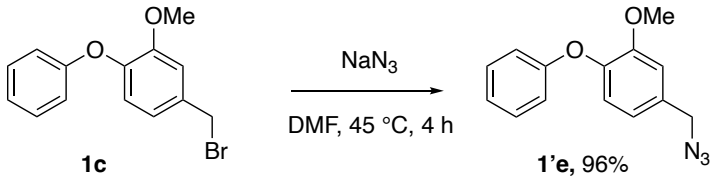


Schéma 13 : formation du précurseur biaryléther **1'e.**

II.A.2 Obtention des précurseurs alcynes

La synthèse des dérivés alcynes a été réalisée à partir des précurseurs 2-hydroxycarbazole (produit commercial) et 3-hydroxycarbazole **6d**. Ce dernier a été obtenu en trois étapes (Schéma 14) à partir du carbazole **6a** : i) bromation par le *N*-bromosuccinimide ii) substitution du brome par un groupement méthoxy et enfin iii) déméthylation par le tribromure de bore[234]. Ces étapes optimisées ont permis d'obtenir un rendement global de 64%.

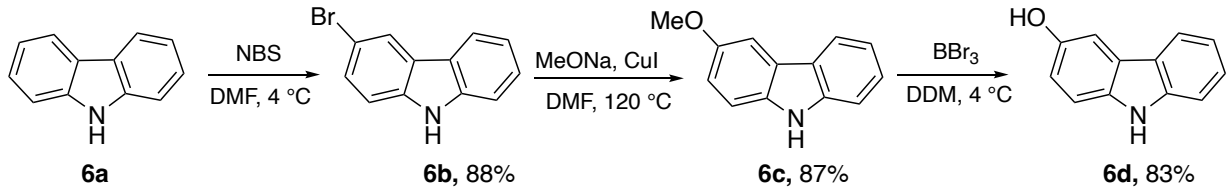
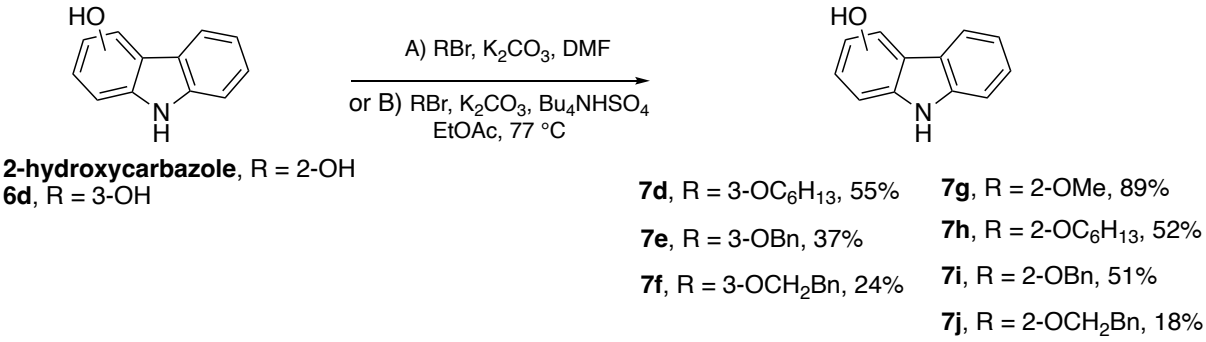


Schéma 14 : formation du **3-hydroxycarbazole**.

Les composés **2-hydroxycarbazole** et **6d** ont été alkylés par les bromures d'alkyles correspondants en présence de carbonate de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide pour donner **7d** et **7f** avec des rendements de 55 et 24%, et le produit déjà décrit **7g**[235]. Une procédure d'alkylation alternative a

également été mise au point impliquant les bromures d'alkyles, du carbonate de potassium et l'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium dans l'acétate d'éthyle à reflux. Elle a permis d'obtenir les précurseurs **7e**, **7h** et **7j** avec des rendements faibles à modérés, respectivement, 37%, 52% et 18%, et le composé **7i** déjà décrit[236]. Il est à noter qu'aucune optimisation des rendements de ces alkylations n'a été envisagée, ces produits ayant été obtenus en quantité suffisante pour pouvoir les engager dans les étapes suivantes (Schéma 15).

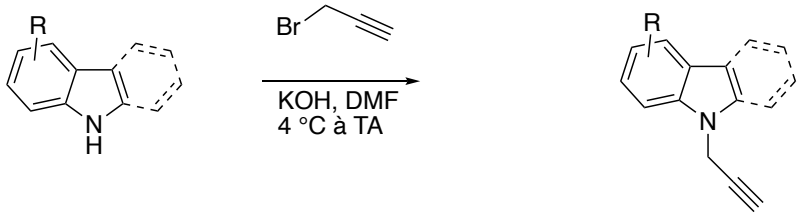


2-hydroxycarbazole, R = 2-OH
6d, R = 3-OH

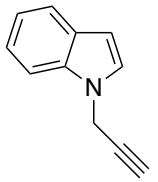
7d, R = 3-OC_6H_{13}, 55%
7e, R = 3-OBn, 37%
7f, R = 3-OCH_2Bn, 24%
7g, R = 2-OMe, 89%
7h, R = 2-OC_6H_{13}, 52%
7i, R = 2-OBn, 51%
7j, R = 2-OCH_2Bn, 18%

Schéma 15 : formation des précurseurs carbazoles **7d-j**.

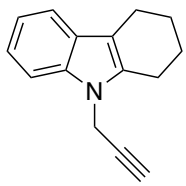
La fonction alcyne a été introduite par substitution nucléophile entre l'amine du dérivé carbazole et le bromure de propargyle, en présence d'hydroxyde de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide. Les produits **8a**[237], **8b**[238], **8l**[239] et **8m**[240] étaient déjà décrits dans la littérature. Les autres précurseurs, **8c-j** ont été obtenus avec de bons rendements, de 74% à 100% (Schéma 16).



8a, R = H, 86%
8b, R = 3-Br, 88%
8c, R = 3-OMe, 91%
8d, R = 3-OCH_6H_{13}, 78%
8e, R = 3-OBn, 100%
8f, R = 3-OCH_2Bn, 100%
8g, R = 2-OMe, 92%
8h, R = 2-OCH_6H_{13}, 79%
8i, R = 2-OBn, 100%
8j, R = 2-OCH_2Bn, 74%



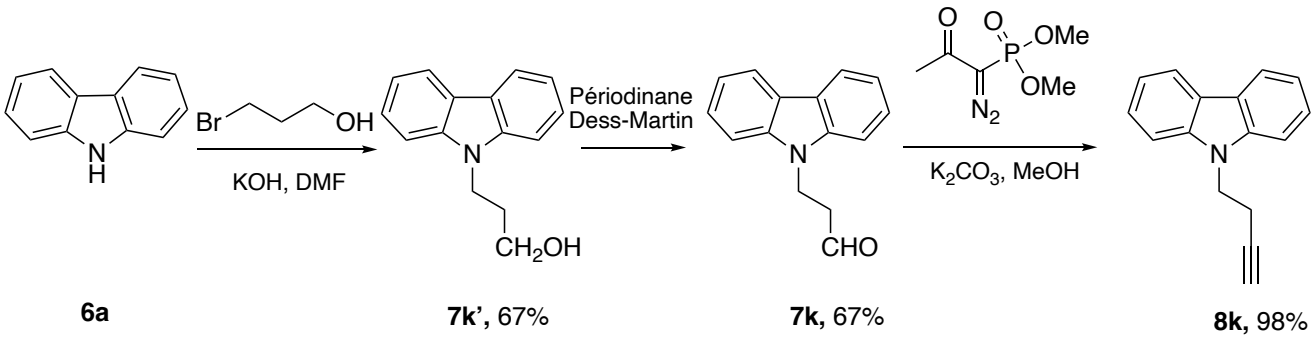
8l, 73%



8m, 35%

Schéma 16 : formation des précurseurs propargylcarbazole **8a-j**.

Le précurseur **8k**, homologue de **8a**, a également été préparé en trois étapes. L'alkylation du carbazole **6a** par le 3-bromo-1-propanol conduit au propargyl carbazole **7k'** avec un rendement de 67%. Ce dernier est mis en réaction avec le périodinane de Dess-Martin pour former l'aldéhyde correspondant **7k**[241,242] déjà décrit. L'homologation de Seyferth-Gilbert faisant intervenir le réactif d'Ohira-Bestmann, le diméthyle(1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate, est appliquée à l'aldéhyde **7k** pour former l'alcyne **8k** avec un excellent rendement (98%)[243]. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir un rendement global de 44% (Schéma 17).



6a **7k',** 67% **7k,** 67% **8k,** 98%

Schéma 17 : synthèse du précurseur homologue carbazole **8k**.

II.A.3 Cycloaddition de Huisgen

La cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC) entre les précurseurs azotures **1e** et **1'e** et les dérivés propargyliques, décrite dans le Schéma 18, a permis d'obtenir la série de 14 composés *anti* **9a-n** avec des rendements variant de 58% à 93%.

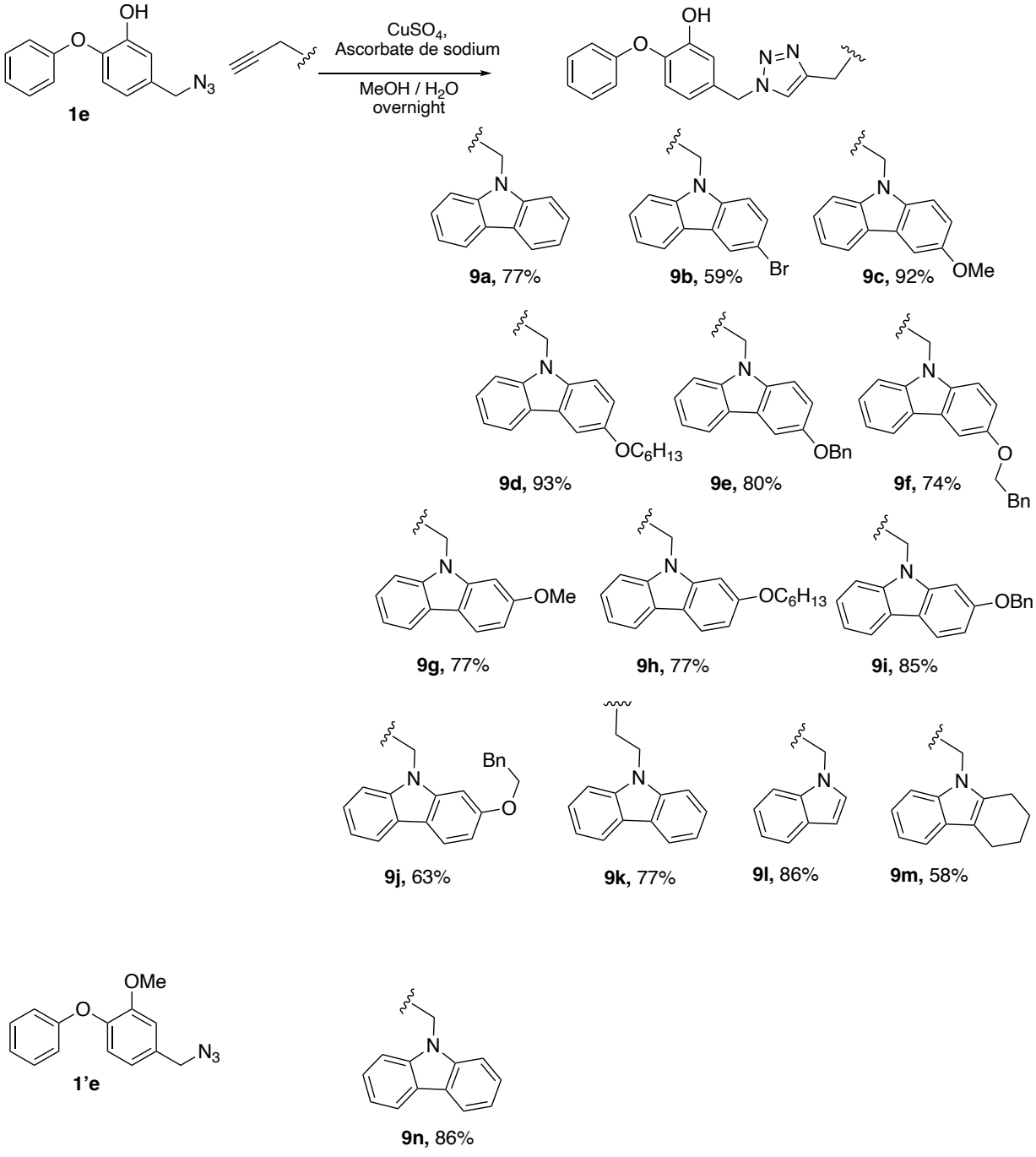


Schéma 18 : synthèse des composés *anti* par CuAAC.

La cycloaddition de Huisgen catalysée au ruthénium (RuAAC) a été effectuée pour trois composés finaux dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 1[220]. Les composés **9o**, **9p** et **9q** ont été synthétisés avec de bons rendements, 63 à 90% (Schéma 19).

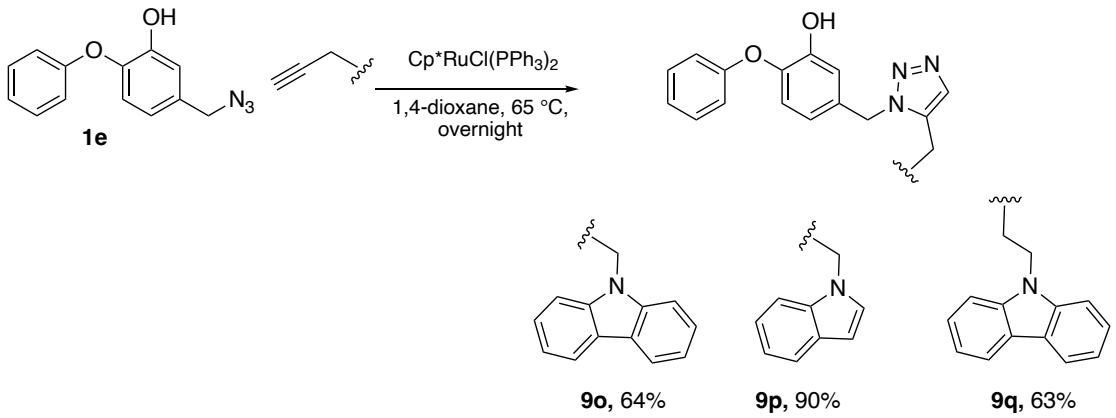


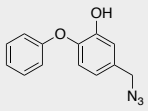
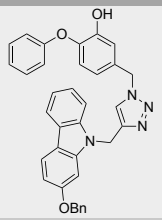
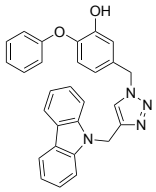
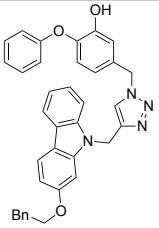
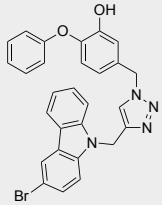
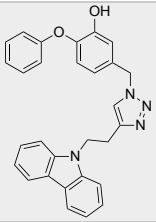
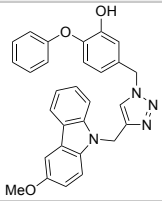
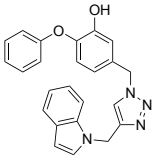
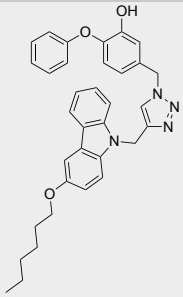
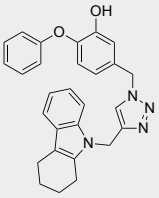
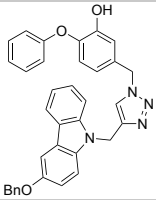
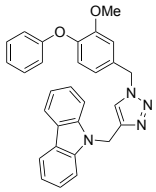
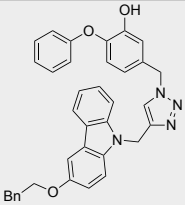
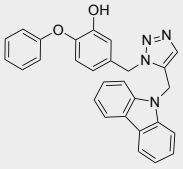
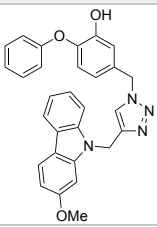
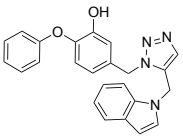
Schéma 19 : synthèse des composés *syn* par RuAAC.

II.B Tests biologiques

II.B.1 Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA

Une campagne de tests enzymatiques a été effectuée pour évaluer l'activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la protéine InhA. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 9 ci-dessous. La série comporte des inhibiteurs très puissants, plus de 50% des composés ont un IC_{50} compris entre 7 et 322 nM.

Les composés **9a** (sans substituant) et **9b** (substituant bromé) sont les deux plus puissants de la série avec des IC_{50} de 7 nM et 10 nM respectivement. Les composés **9c** et **9g** comportant le groupement méthoxy ont des IC_{50} similaires, respectivement de 32 et 39 nM. De meilleures inhibitions ont été obtenues avec les composés **9i** et **9j** comportant des substituants benzyloxy en position 2 sur le carbazole par rapport à ceux en position 3 (composés **9e**, **9f**). Ces deux séries ont permis d'observer que plus le carbazole est encombré, moins l'inhibition est forte indiquant que cet encombrement empêche une bonne liaison dans le site actif. Dans l'ordre nous observons les IC_{50} décroissants suivants : carbazole < carbazole-Br < carbazole-OMe < carbazole-OBn < carbazole-OCH_2Bn < carbazole-OC_6H_{13}. L'homologue **9k** a montré une bonne activité inhibitrice de 107 nM, néanmoins, l'ajout d'un carbone diminue l'activité d'un facteur 15. Les produits avec l'indole **9l** et celui avec le substituant 1,2,3,4-tétrahydroxycarbazole **9m** ont des activités inhibitrices respectives très proches de 32 nM et 24 nM. Le produit **9n** a permis de confirmer l'importance du noyau phénol du motif biaryléther car aucune inhibition n'a été observée sur la protéine InhA. Enfin, les régioisomères *syn* **9o**, **9p** et **9q** ont montré une faible activité sur InhA avec 50 % d'inhibition autour de 10 µM pour **9o** et **9q** et un IC_{50} de 1,5 µM pour **9p** qui est très inférieur en comparaison de **9l**.

Molécule	Structure	IC_{50} InhA (nM)	CMI (µM)	Molécule	Structure	IC_{50} InhA* (nM)	CMI (µM)
1e		843 ± 94	/	**9i**		**62 ± 22**	> 40
9a		**7 ± 2**	> 40	**9j**		**322 ± 94**	> 40
9b		**9,9 ± 0.9**	> 40	**9k**		**107 ± 11**	> 40
9c		**32 ± 2**	21	**9l**		**32 ± 7**	1,6
9d		7600 ± 115	> 40	**9m**		**24 ± 2**	> 40
9e		1000 ± 340	> 40	**9n**		50 µM : 5%	ND
9f		3120 ± 461	> 40	**9o**		10 µM : 50%	ND
9g		**39 ± 9**	> 40	**9p**		1500 ± 200	ND

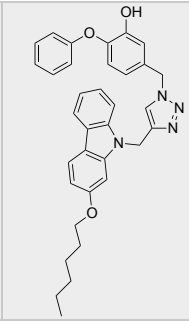
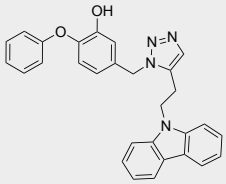
9h		4860 ± 1340	> 40	**9q**		10 µM : 55%	ND

Tableau 9 : récapitulatif des activités enzymatiques et antimycobactériennes des molécules finales de la série carbazole. * ou % à la concentration testée. ND : non déterminée. Les valeurs en gras représentent les meilleures activités.

II.B.2 Inhibition de la croissance mycobactérienne

L'inhibition de la croissance mycobactérienne a été déterminée grâce à une collaboration internationale avec l'équipe de la Professeure Maria Rosalia Pasca du département de biologie et biotechnologie « Lazzaro Spallanzani » de l'Université de Pavie en Italie.

La streptomycine a été utilisée comme référence (CMI = 0,43 µM). Les CMI varient entre 1,6 µM à plus de 40 µM. Les deux composés **9c** et **9l** ont montré une CMI inférieure à 40 µM et seul le composé **9l** a permis d'inhiber la croissance mycobactérienne avec une CMI de 1,6 µM.

II.B.3 Inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques

Comme pour la série étudiée dans le chapitre 1, l'évaluation de l'inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques, effectuée pour le composé **9l**, a été réalisée par l'équipe de la Professeure Jana Korduláková selon le protocole déjà décrit.

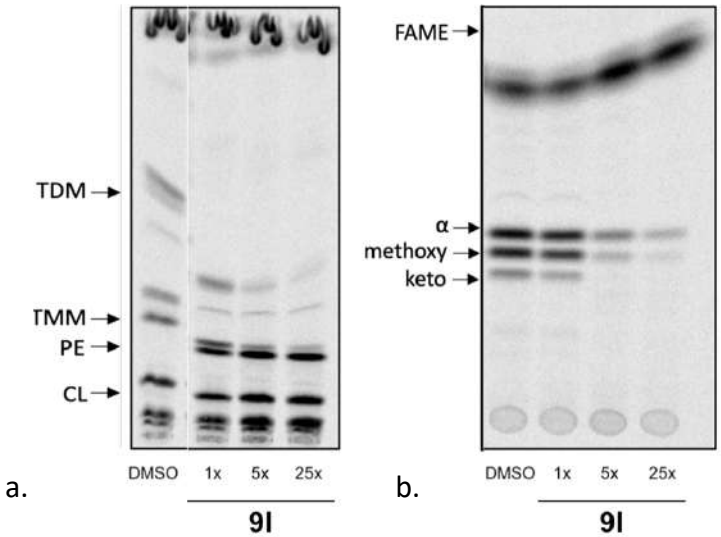


Figure 73 : marquage métabolique des mycobactéries traitées avec le composé **9l**. a. Analyse de la biosynthèse des lipides b. Analyse de la biosynthèse des acides mycoliques.
9l : 0,625 µM (1x), 3,125 µM (5x), 15,625 µM (25x). Abbréviations : FAME : Fatty Acid Methyl Esters, MAME : Mycolic Acid Methyl Esters, TDM : trehalose DiMycolates, TMM : Trehalose MonoMycolates, PE : PhosphotidylEthanolamine, CL : CadioLipin.

Les résultats ont confirmé que **9l** permettait l'inhibition de la production d'acides mycoliques et de leurs dérivés dans la mycobactérie. Les résultats sont représentés dans la Figure 73.

Le mécanisme d'action de ce composé a également été étudié en utilisant les souches H37Ra portant les constructions pVV16-*katG*$_{smeg}$, pMV261-*inhA* et pVV16-*had*ABC surexprimant respectivement la catalase peroxydase KatG de *M. segmatis*, InhA et les déshydratases HadABC. Les souches H37Ra portant les vecteurs vides pMV261 et pVV2 ont été utilisées comme témoins. La même sensibilité des souches Mtb H37Ra surproduisant KatG et HadABC par rapport aux souches de contrôle signifie que le système déshydratase HadABC du système FASII n'est pas la cible du composé et, comme prévu, le ligand n'est pas activé par la protéine KatG. En revanche, l'augmentation de la CMI de **9l** chez Mtb H37Ra surproduisant InhA confirme que cette enzyme en est bien la cible spécifique. Les CMI sont reportées dans le Tableau 10.

Souches Mtb H37Ra	CMI 9l (µM)
H37Ra pMV261	1,25
H37Ra pVV2	0,312
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ (2)	0,312
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ (4)	0,312
H37Ra pMV261-*inhA* (1)	3,125
H37Ra pMV261-*inhA* (2)	3,125
H37Ra pVV16-*had*ABC	0,312

Tableau 10 : sensibilité des souches Mtb H37Ra surexprimant KatG, InhA et HadABC au ligand 9l.

II.B.4 Activité cytotoxique

Pour ce composé, une évaluation de l'activité cytotoxique a également été effectuée par l'équipe du Docteur Sébastien Britton de l'IPBS.

L'activité cytotoxique du composé **9l** a été évaluée selon le protocole précédemment décrit. Les résultats (Figure 74) ont révélé que le composé **9l** était faiblement cytotoxique sur toutes les lignées cellulaires avec un IC_{50} de 38,10 µM pour les lignées HCT116, 36,10 µM pour CACO2, 38,31 µM pour HepG2 et 51,99 µM pour WI38h TERT.

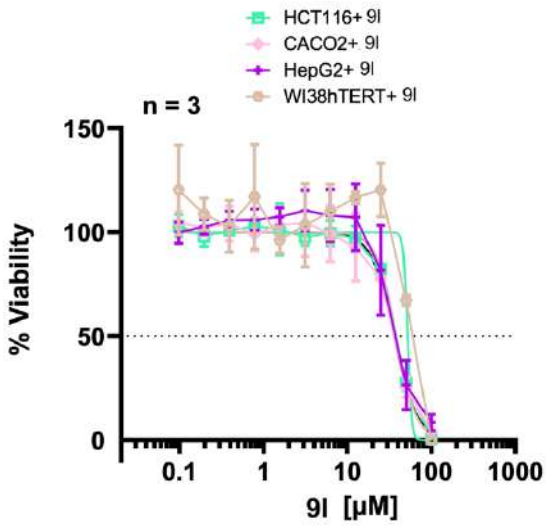


Figure 74 : courbe des activités de cytotoxicité du composé **9l.**

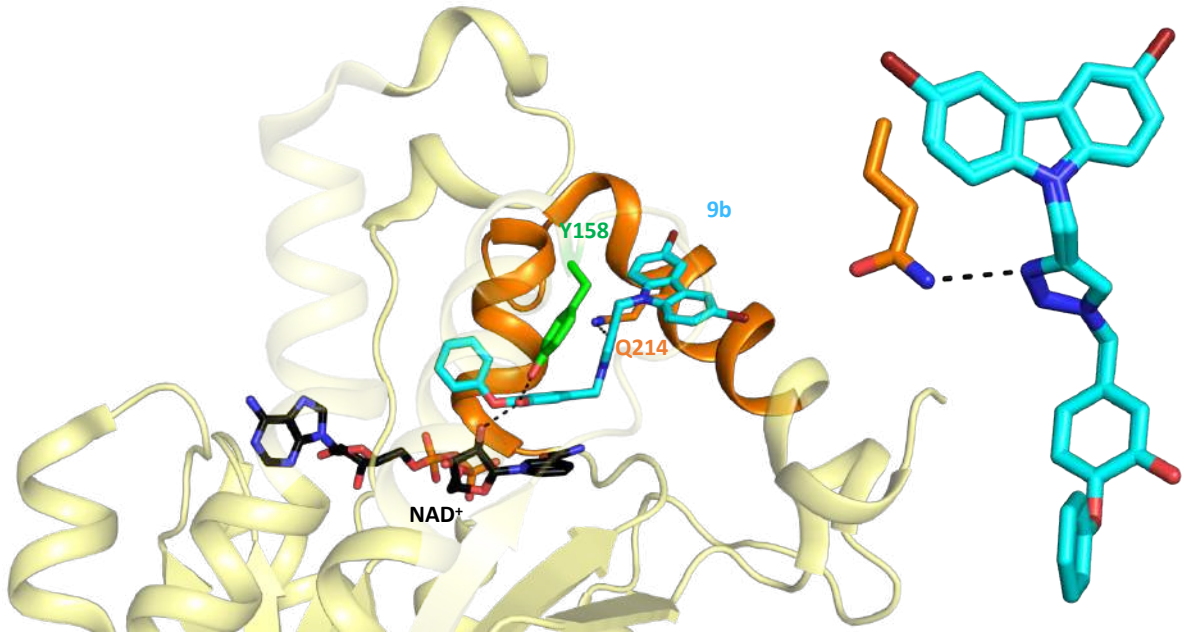
II.C Cristallographie aux rayons X

Une campagne de co-cristallisation de InhA avec tous les composés a été effectuée mais ces derniers étant très insolubles, des difficultés de cristallisation ont été rencontrées.

Seule la structure du complexe InhA/NAD^+/**9b** a été résolue après incubation en présence du cofacteur NAD^+ à la résolution de 1,8 Å. Le complexe cristallise en présence de PEG4000 dans le groupe d'espace $P6_222$ avec comme paramètres de maille a = b = 98.74 Å, c = 141.67 Å, α = 90.00°, β = 90.00°, γ = 120.00° et 1 molécule dans l'unité asymétrique.

La structure est quasi-complète, seuls un ou deux résidus au niveau des extrémités N- et C-terminales sont manquants. La SBL est en conformation fermée, le cofacteur NAD^+ occupe la place habituelle au fond du site en faisant différentes liaisons hydrogène et interactions de van des Waals avec les résidus du site actif. Les chaînes latérales des résidus Phe149 et la Tyr158 sont en position *out* et *in* respectivement. Le phénol du noyau biaryléther fait une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du cofacteur et est engagé dans une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. Le noyau triazole du composé **9b** se superpose exactement avec le triazole des autres ligands contenant ce groupement. Le groupement carbazole se lie dans le portail mineur, rappelant la structure des complexes avec les composés **5a** et **5i**. Néanmoins, une différence apparaît au niveau de la conformation du résidu Gln214 qui n'adopte pas les conformations observées pour **5a** et **5i**. Ce résidu ne pointe pas vers la partie carbazole mais plutôt vers le triazole formant une liaison hydrogène entre l'amine de la glutamine et l'azote du triazole. Ce carbazole a un substituant bromé, les cartes de densité obtenues lors de la résolution de la structure suggèrent une double conformation du noyau carbazole avec une rotation de 180°, le brome pointe soit vers la SBL, soit vers l'hélice α5 (Figure 75).

Cette étude a permis de montrer l'interaction originale de ce ligand avec la protéine InhA. Le groupement carbazole, bien qu'encombrant, se fixe dans le portail mineur. Ces interactions permettent une très bonne inhibition de l'activité enzymatique de InhA avec un IC_{50} de 9,9 nM.



a. b.

Figure 75 : structure de InhA en présence du composé **9b**. a. Structure en jaune, **9b** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie carbazole du ligand et les interactions avec la Glu214.

Cette structure cristallographique permet de suggérer que les composés de la série auraient la même conformation dans le site actif, ce qui peut justifier la diminution d'activité avec l'augmentation de l'encombrement stérique. Les composés **9e** et **9i** ne diffèrent que par la position de leur substituant benzyloxy et montrent une inhibition plus forte pour celui en position 2 d'un facteur 16, ce qui peut montrer une meilleure disponibilité dans le portail mineur en position 2.

III Conclusion et perspectives

L'utilisation dans notre projet de la méthode de déconstruction-reconstruction a permis la découverte d'une série de ligands très puissants sur la protéine InhA de l'ordre du nanomolaire. Ces composés obtenus par déconstruction du **TCL** (IC_{50} = 1 µM) et du **GEQ** (IC_{50} = 160 nM) ont permis d'augmenter l'activité inhibitrice d'un facteur 20 par rapport au **GEQ** pour le ligand le plus affin, **9a**.

Bien qu'une puissante activité de l'ordre du nanomolaire ait été observée sur la protéine InhA, l'inhibition de la croissance mycobactérienne s'est avérée très faible puisqu'un seul ligand, **9l,** permet une inhibition forte. Une étude du mécanisme a confirmé que le composé **9l** agit sur la biosynthèse des acides mycoliques en inhibant la protéine InhA.

L'interaction entre le composé **9b** et la protéine InhA montre la potentialisation du portail mineur et nos travaux démontrent que l'occupation de ce site permet d'atteindre des activités très fortes, comme dans la série SCREEN-It.

En perspective, il serait intéressant de concevoir de nouveaux inhibiteurs dérivés du ligand **9l** en substituant par exemple le noyau indole par différents substituants et de réaliser une étude de relation structure-activité sur la capacité des molécules à inhiber la protéine et la croissance des mycobactéries, tout en conservant une toxicité faible.

En observant la présence d'une deuxième molécule de **TCL** dans le site II du site actif, il est également possible d'étudier une nouvelle série de composés. En fait, dans ce projet, nous avons choisi de conserver la molécule de **TCL** pour une interaction dans le site I de la protéine. L'étude des structures cristallographiques, établies dans le Tableau 8, a permis de distinguer les fragments qui se lient dans les différents sites I, II et III, de sorte que seuls les fragments se liant dans le second site de liaison soient sélectionnés. Cette stratégie a montré une très bonne efficacité des nouveaux ligands synthétisés. Dans un projet futur, ces fragments pourraient être inversés reliant la molécule de **TCL** aux molécules se liant dans le site I de liaison. Ainsi, par la combinaison d'études de paramètre cinétiques et de cristallographie aux rayons X, il serait possible de déterminer le fragment ayant la plus forte affinité dans ce site de liaison.

CHAPITRE 3 : APPROCHE GUIDÉE PAR LA CIBLE, MISE AU POINT DE LA KTGS

I Présentation du projet

I.A Objectif du projet

Les techniques de recherche de nouveaux inhibiteurs d'InhA sont nombreuses. Les criblages à haut débit, la technologie de bibliothèques codées par ADN et l'approche basée sur la structure, présentées dans l'introduction, ont permis l'identification de nouvelles familles d'inhibiteurs potentiels de la protéine.

Les approches guidées par la cible (TGS, « Target Guided Synthesis ») consistent en un criblage basé sur les fragments (FBDD) exploitant la cible biologique pour assembler les inhibiteurs à partir d'une bibliothèque de fragments. Ces approches font partie des progrès de la chimie médicinale inspirée par la chimie bioorthogonale[244]. Ces approches permettent un assemblage des fragments *in situ* et nécessitent peu de synthèse chimique[245], combinant à la fois le criblage et les étapes de liaison des fragments, ce qui réduit considérablement la consommation de protéine par rapport aux méthodes traditionnelles de criblage[246]. Dans cette stratégie, deux approches se distinguent, la KTGS (« Kinetic-Target Guided Synthesis », synthèse cinétique guidée par la cible) et la DCC (« Dynamic Combinatorial Chemistry », Chimie Combinatoire Dynamique). Elles ont montré de bons résultats dans les stratégies de croissance et de fusion des fragments[247,248] et correspondent respectivement à une synthèse de ligands par une réaction irréversible pour la KTGS ou réversible pour la DCC[249]. Dans la DCC, il y a une interconversion continue entre les réactifs et les produits finaux. La cible déplace l'équilibre thermodynamique entre les produits et les réactifs vers les ligands qui ont la plus grande affinité pour la cible[248,250]. Dans la KTGS, des fragments affins avec deux fonctions réactives sont confinés par la protéine de telle sorte qu'ils réagissent de manière irréversible[251–253]. C'est une méthode puissante pour concevoir des ligands très affins puisqu'ils auront été « moulés » à la topographie du site actif. La Figure 76 permet d'illustrer le principe de deux approches.

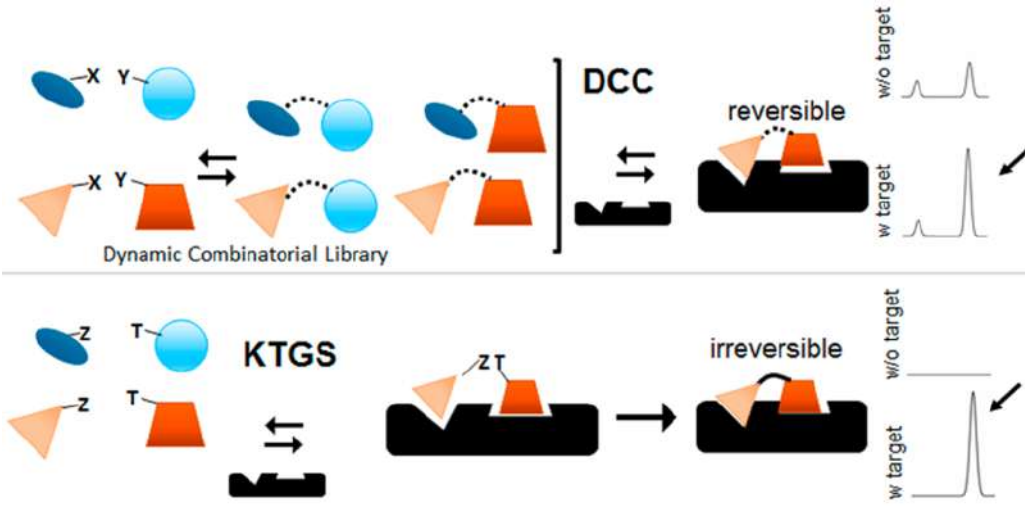


Figure 76 : principe des approches guidées par la cible, la DCC et la KTGS.
Source : Bosc *et al*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 3817–3833.

La KTGS décrite pour la première fois dans les années 2000 a permis la découverte de ligands pour 26 cibles différentes[254] notamment des enzymes, des facteurs de transcription[255,256], des canaux[257] ou des interactions protéine-protéine[246]. Leur formation se fait *via* des réactions chimiques irréversibles, par

exemple, des réactions d'alkylation d'amine par des halogènes, d'aldolisation, d'amidation et la plus utilisée (à 76%), la cycloaddition de Huisgen[185]. L'avantage de la chimie click *in situ* (Figure 77) est une synthèse de dérivés 1,2,3-triazoles à partir des fragments azotures et alcynes sans formation de sous-produits. Lors de cette réaction, il est donc exclu de travailler avec des métaux (cuivre ou ruthénium) car ceux-ci ne permettraient pas de favoriser ou discriminer les fragments qui réagiront ensemble.

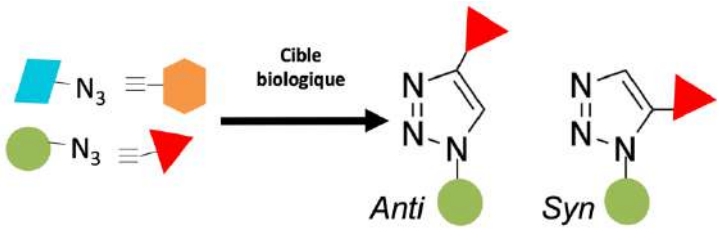


Figure 77 : principe de la chimie click *in situ*.

Une bibliothèque de fragments, réactifs entre eux, est mise en solution avec la cible biologique, la réaction est souvent chauffée à 37 °C sur plusieurs heures, voire des jours. Les méthodes de détection sont nombreuses, ce sont, majoritairement, des méthodes basées sur la spectrométrie de masse, notamment celles couplées avec la chromatographie liquide avec un détecteur UV qui sont utilisées. Généralement, ces méthodes de détection demandent une mise au point pour permettre d'obtenir des résultats reproductibles attestant de la faisabilité de la KTGS[258]. La topographie du site actif de la cible biologique pourra favoriser un des deux isomères (*syn* ou *anti*). On peut donc dire que c'est la protéine qui « choisit » le ligand.

La première expérience de chimie click *in situ* a été mise au point par Sharpless et son équipe sur la protéine acétylcholinestérase (AchE), une enzyme qui joue un rôle dans l'hydrolyse des neurotransmetteurs dans les systèmes nerveux central et périphérique[259,260]. La structure cristallographique de l'AchE de *Torpedo cafornica* a été décrite en 1991 à une résolution de 2,8 Å[261]. L'AchE contient une zone étroite d'environ 20 Å de profondeur, bordée de chaînes latérales aromatiques. Le centre actif, composé des sites d'acylation et de liaison à la choline, est situé à la base de la zone étroite et un site périphérique se trouve sur son bord. Les auteurs ont ainsi sélectionné des inhibiteurs spécifiques basés sur les motifs tacrine et phénanthridinium décorés d'azotures et d'alcynes avec une longueur de chaîne alkyle variable. Ils ont alors mis au contact les différents fragments, 98 molécules pouvaient théoriquement être observées (Figure 78).

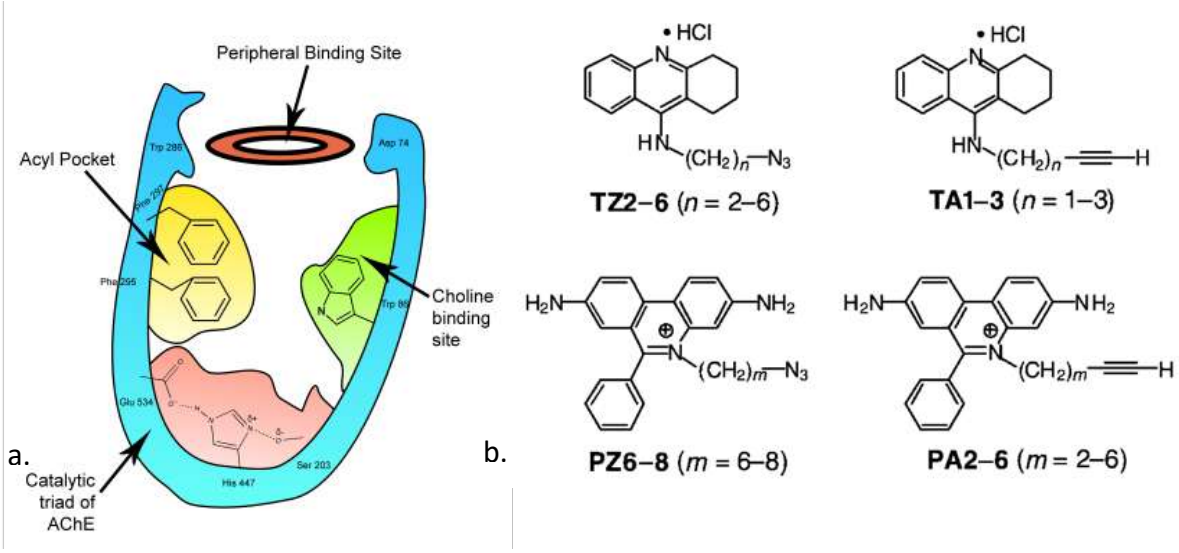


Figure 78 : a. Représentation schématique du site actif de l'acétylcholinestérase. b. Fragments azoture et alcyne synthétisés.
Source : https://www.bosterbio.com/acetylcholinesterase-activity-assay-kit-100-assays-ar4001-boster.html.
Lewis *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41* (6).

Dans tous leurs essais, un composé majoritaire s'est formé. Les analyses par spectrométrie de masse permettent de mesurer la masse molaire du produit formé, cependant, sa structure chimique est inconnue. L'équipe de Sharpless en a effectué la synthèse au laboratoire pour identifier le régioisomère obtenu, et déterminer les paramètres cinétiques. Cette étude a permis de valider un inhibiteur puissant de l'AchE. L'affinité du ligand, avec un K_d de 77 fM, est nettement supérieure à celles des fragments avec des K_d compris entre 10 nM et 100 µM[262]. Les auteurs ont aussi montré par docking moléculaire que le ligand possédant le motif tacrine se positionnerait dans le fond du site alors que celui portant le motif phénanthridinium se fixerait à la surface, ainsi la proximité des fonctions azoture et alcyne a permis une réaction intermoléculaire. La protéine possède donc deux sites de liaisons favorisant une réaction *in situ* entre deux fragments (Figure 79).

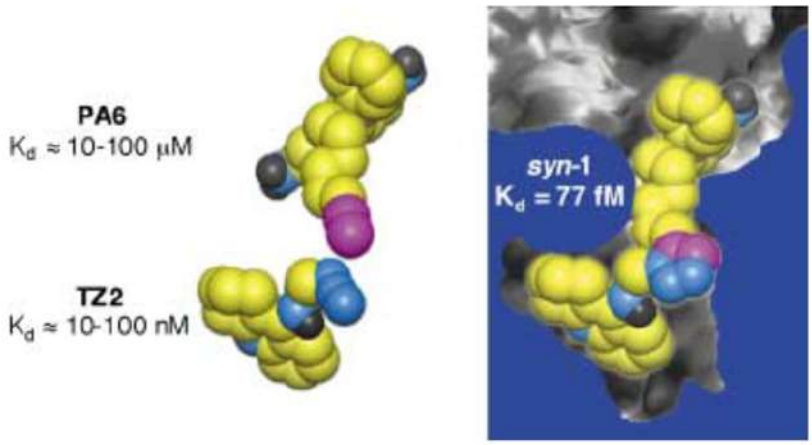


Figure 79 : fragments azoture et alcyne (à gauche) et représentation du composé conçue par chimie click *in situ* dans le site actif (à droite).
Source : Lewis *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41* (6).

Depuis cette première preuve de concept, la KTGS a été étudiée sur d'autres protéines mettant en jeu d'autres réactions chimiques dont l'une des plus récentes correspond à la ligation de Mannich publiée en 2019[256]. La ligation de Mannich est une réaction multi composante impliquant le formaldéhyde, une amine et des azahétérocycles. Cette réaction (Figure 80) a été mise à profit pour la découverte d'inhibiteurs de STAT5b, un facteur de transcription catalysant la réaction multi composante d'un mimétique de phosphate, du formaldéhyde et des 1H-tétrazoles pour produire des ligands protéiques.

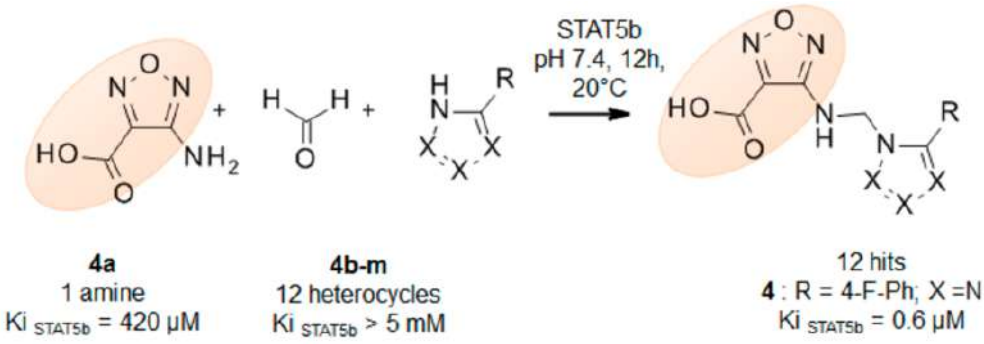


Figure 80 : premier exemple de la ligation de Mannich par STAT5b.
Source : Bosc *et al*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 3817–3833.

La dernière étude de chimie click *in situ* reportée à ce jour a été effectuée sur l'aminopeptidase du réticulum endoplasmique 2 (ERAP2), une enzyme clé impliquée dans le découpage des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité[263]. Pour définir de nouveaux inhibiteurs, les auteurs ont utilisé la KTGS, notamment la chimie click *in situ* comme méthode de criblage. Ainsi, ils ont sélectionné une bibliothèque de 6 azotures et de 175 alcynes qu'ils ont mis en présence de l'enzyme ce qui pouvait potentiellement générer 2100 produits (Figure 81). La sélection du hit a été la résultante d'une série d'analyses complémentaires. L'analyse par chromatographie liquide a permis d'observer 19 composés formés lors de la chimie click *in situ* puis l'évaluation de l'activité inhibitrice de ces 19 composés a permis de sélectionner 9 produits dont l'IC_{50} était inférieur à 25 µM. Les expériences de co-cristallisation en présence de la protéine ont révélé le mode de liaison d'inhibiteurs présentant une sélectivité croissante par rapport à l'enzyme apparentée. Des études supplémentaires notamment des tests *in vivo* leur ont permis au final de proposer les premiers inhibiteurs sélectifs d'ordre du nanomolaire d'ERAP2.



Figure 81 : représentation du criblage par chimie click *in situ* effectué sur l'enzyme ERAP2.
Source : Camberlein *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, *61* (39), e202203560.

En nous inspirant de ces études, nous avons voulu étudier la chimie click *in situ* au sein du site actif de la protéine InhA entre des fragments ciblant deux sites de liaison différents afin de développer une nouvelle méthode de criblage.

I.B Conception des molécules

La stratégie de conception des molécules est identique à celle de la déconstruction, décrite dans le chapitre 2. Pour favoriser la KTGS, il est nécessaire d'identifier des fragments se liant dans des sites de liaison différents de la protéine. L'analyse des structures cristallographiques des différentes familles d'inhibiteurs de la protéine InhA, effectuée dans le chapitre 2 (Tableau 8), a permis de cibler différents fragments notamment des chaînes alkyles mimant l'analogue de substrat, **THT** (Figure 82), des noyaux aryles et cycliques, le motif fluorène ou encore un fragment biaryléther.

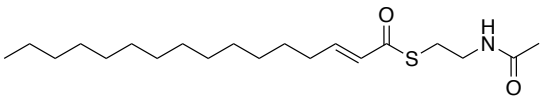


Figure 82 : structure du **THT** (*trans*-2-hexadécénoyl-(N-acétylcystéamine)-thioester).

La KTGS n'ayant jamais été développée sur la protéine InhA, une mise au point préalable s'est avérée nécessaire. L'étude menée dans les chapitres 1 et 2 a permis le développement de deux nouvelles familles d'inhibiteurs analogues du **TCL**. Pour cette mise au point, nous avons trouvé judicieux de tester une possible reconstruction de ces ligands directement dans le site actif de l'enzyme, permettant ainsi de montrer une potentielle réaction *in situ* et de prouver le concept.

Le précurseur azoture **1e,** décrit dans les chapitres 1 et 2, a montré une bonne activité avec un IC_{50} de 843 nM. Ce fragment sera le seul azoture utilisé pour la mise au point. Les fragments alcynes choisis pour cette mise au point seront soit les cinq alcynes commerciaux **3-phényl-1-propyne**, **4-pentyl-1-ol**, **1-décyne** et **1-hexyne** et le **4-phényl-1-butyne**, soit les cinq précurseurs alcynes, ayant conduit aux composés finaux les plus actifs **5h**, **5i**, **9a**, **9k**, **9l**, décrits dans ces mêmes chapitres. La Figure 83 permet d'illustrer le concept de KTGS sur la protéine InhA.

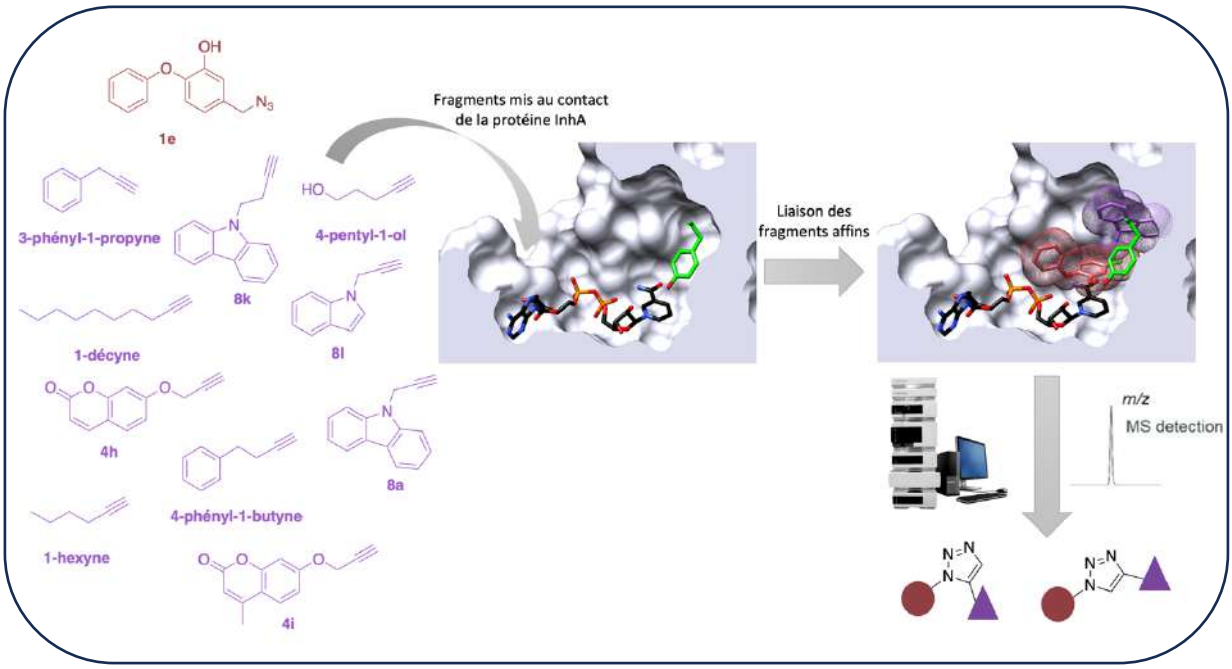


Figure 83 : représentation du principe de la chimie click *in situ* au sein de la protéine InhA et objectif principal du projet.

II Résultats et discussion

Ce projet a été le fruit d'un travail collectif impliquant Saïda Danoun pour toutes les analyses par chromatographie liquide et moi.

II.A Mise au point de la KTGS

Un important travail de mise au point a été effectué, les nombreux essais que nous avons réalisés sont décrits de façon chronologique ci-dessous.

La méthode de détection pour l'analyse des essais devait être optimisée avant de lancer les premiers essais de KTGS. La chromatographie liquide avec un détecteur UV couplée à la spectrométrie de masse a été le choix de prédilection car c'est la méthode majoritairement utilisée dans les publications. La recherche des conditions de séparation a été effectuée avec les composés issus de la CuAAC entre **1e** et les alcynes linéaires C_6, C_8 et C_{10} pour déterminer le type de colonne chromatographique, les solvants et la durée d'analyse. Cette étude a montré une bonne séparation des produits en phase inverse avec une phase stationnaire C_{18} greffée par des phényles et une phase mobile composée d'un mélange eau acidifiée / acétonitrile acidifié et sur un temps d'analyse de 16 min.

Les concentrations des fragments, de la protéine et du cofacteur, la température et le temps de réaction sont des paramètres importants à considérer dans les essais de KTGS. Pour cela, nous nous sommes inspirés des publications sur la chimie click *in situ*, des essais de cristallisation et des tests enzymatiques, préalablement effectués sur InhA. Nous avons fait le choix de travailler avec une concentration en protéine InhA de 5 µM, similaire à celle utilisée dans les tests enzymatiques. Les rapports utilisés de cofacteur et de composés ont été copiés des essais de cristallisation, soit InhA/NADH/ligand 1:10:100 ; la concentration finale en cofacteur est de 50 µM et celle en ligands de 500 µM pour l'azoture et 2000 µM pour les alcynes.

Les premiers essais de chimie click *in situ* ont été lancés avec les alcynes linéaires commerciaux en C_6, C_8 et C_{10}, mimant la chaîne alkyle du **THT**, à 37 °C pendant 7 jours. Aucun des produits de départ ou de ceux attendus après réaction n'a pu être observé après analyse. La méthode de détection et la dégradation de ces produits peuvent être à l'origine de ces observations. Également, la question du type de cofacteur sous sa forme réduite NADH ou sous sa forme oxydée NAD^+ s'est posée. Lorsque nos premières structures cristallographiques des complexes InhA/NAD(H)/ligand ont été résolues en présence du cofacteur NAD^+, nous avons confirmé qu'il valait mieux travailler avec le cofacteur sous sa forme oxydée. En effet, le NAD^+, de structure aromatique, adopte une conformation plane, ce qui favorise les interactions de type π-stacking avec les composés biaryléthers.

De nouveaux essais faisant intervenir l'azoture **1e** et deux fragments alcynes comportant un motif carbazole, les composés **8a**, et son homologue, **8k**, ont été lancés à 37 °C et à 20 °C pendant 4 jours (Schéma 20). À l'issue de la réaction, les analyses ont permis d'observer les deux régioisomères **9a** et **9o**, formés par chimie click *in situ* à partir de **1e** et **8a** en quantité plus importante avec la protéine que dans le blanc mais aucun des régioisomères qui aurait pu résulter de la combinaison de **1e** avec **8k** n'a été observé, que ce soit avec ou sans protéine. Il se peut que le manque de sensibilité du système de détection chromatographique utilisé n'ait pas permis de mettre en évidence le produit composé du

fragment **8k** et de l'azoture **1e**. Il semble donc difficile de conclure sur l'issue de la KTGS avec ce composé.

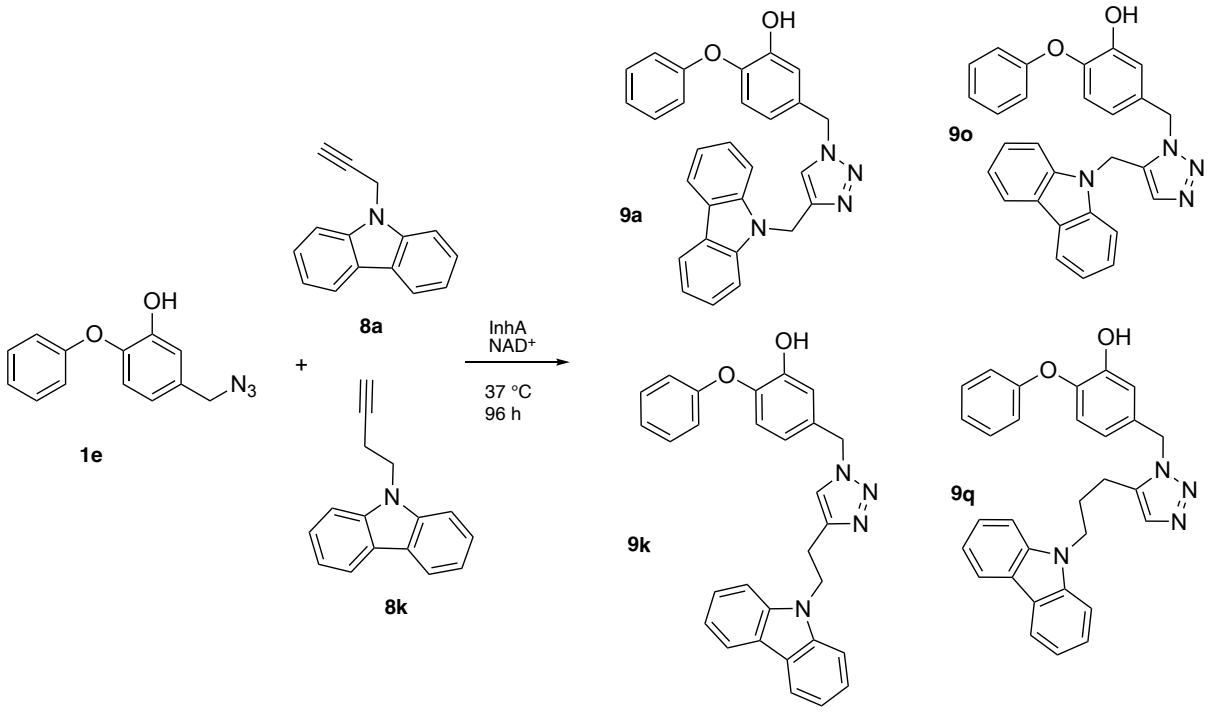


Schéma 20 : représentation des fragments azoture et alcynes carbazoles et les produits potentiellement formés dans la KTGS.

Les résultats positifs obtenus avec le fragment **8a** montrent une possibilité de KTGS au sein de la protéine InhA, ce protocole doit cependant être validé. Pour cela, une étude du temps de réaction et de la température a été entreprise. Des essais (Schéma 21) dans lesquels seuls l'azoture **1e** et l'alcyne **8a** ont été mis en réaction avec la protéine pendant 24 h, 48 h et 72 h à 20 °C, 30 °C et 37 °C. Les résultats sont compilés sous forme d'histogrammes donnés ci-dessous (Figure 84, Figure 85). L'échelle n'est pas à prendre en compte car les essais sont indépendants, seule une comparaison entre les contrôles et la protéine peut être faite. Ces analyses ont été effectuées avec la participation de la plateforme de spectrométrie de masse de l'ICT nous permettant des analyses de meilleure qualité.

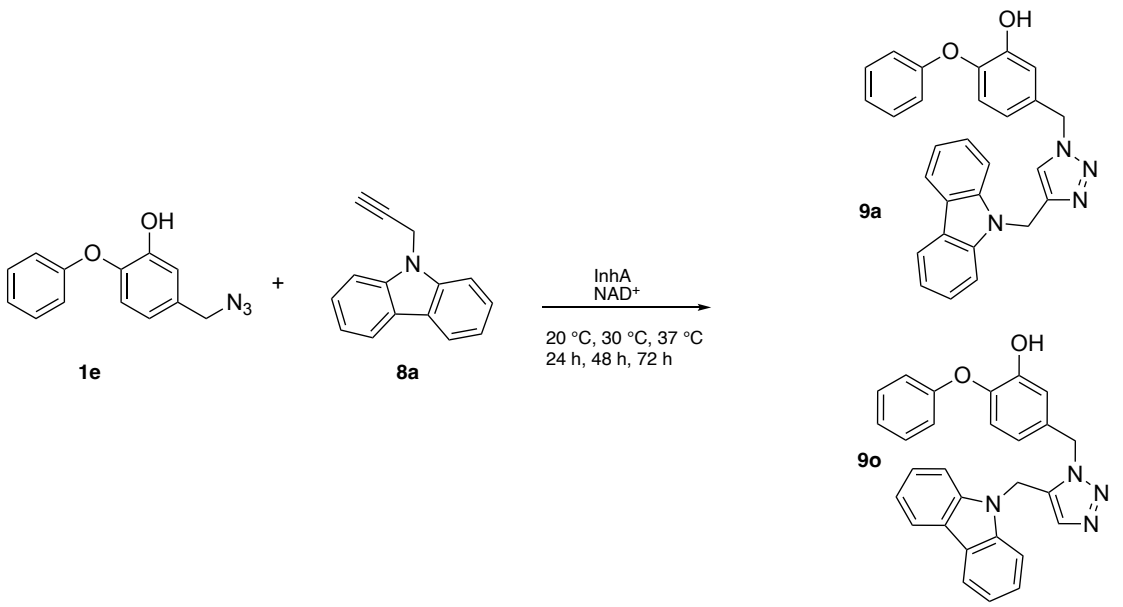


Schéma 21 : représentation des fragments et des composés formés lors de la KTGS.

L'obtention du régioisomère 1,4-disubstitué est majoritaire par rapport au régioisomère 1,5-disubstitué dans le contrôle et avec la protéine. Cette observation n'a trouvé aucune explication si ce n'est que la cinétique de la formation du produit *anti* doit être plus rapide. Nous observons qu'à 20 °C, indépendamment de la durée de réaction, la formation de produit est supérieure dans le blanc par rapport à la réaction en présence d'InhA. À 30 °C, nous observons une légère inversion de tendance au bout de 48 h mais cela paraît peu significatif. Enfin, à 37 °C, nous pouvons observer la cinétique de la réaction : à 24 h, la réaction se fait beaucoup plus rapidement dans le blanc qu'avec la protéine, à 48 h, il y a une légère inversion et au bout de 72 h, il se forme plus de produit avec la protéine que dans le contrôle.

Ces tests ont permis de valider le protocole de KTGS sur la protéine InhA. Pour obtenir des résultats concluants, il faut travailler à 37 °C pendant 72 h. Ce protocole a été vérifié à deux reprises et les résultats sont reproductibles, un contrôle avec la protéine dénaturée a également été fait et montre des résultats similaires au blanc, validant ainsi que la protéine dénaturée ne favorise pas la réaction.

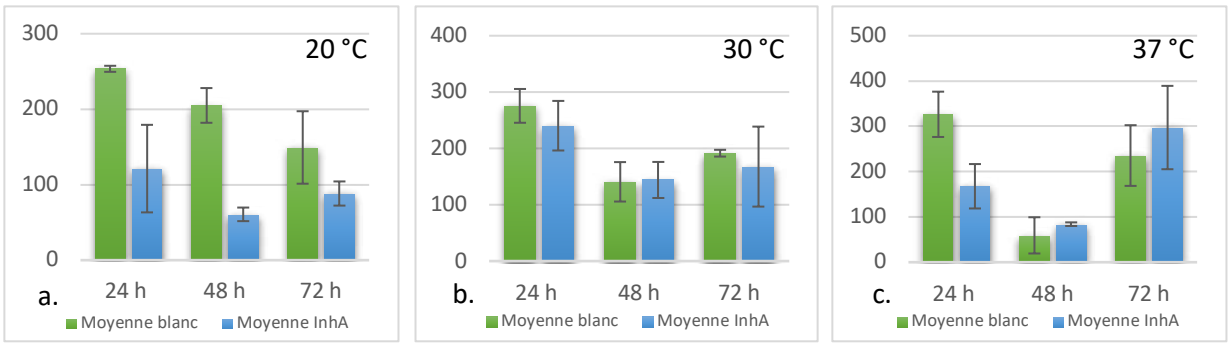


Figure 84 : proportion du régioisomère 1,5-disubstitué a. à 20 °C b. à 30 °C c. à 37 °C aux différents temps : 24 h, 48 h et 72 h.

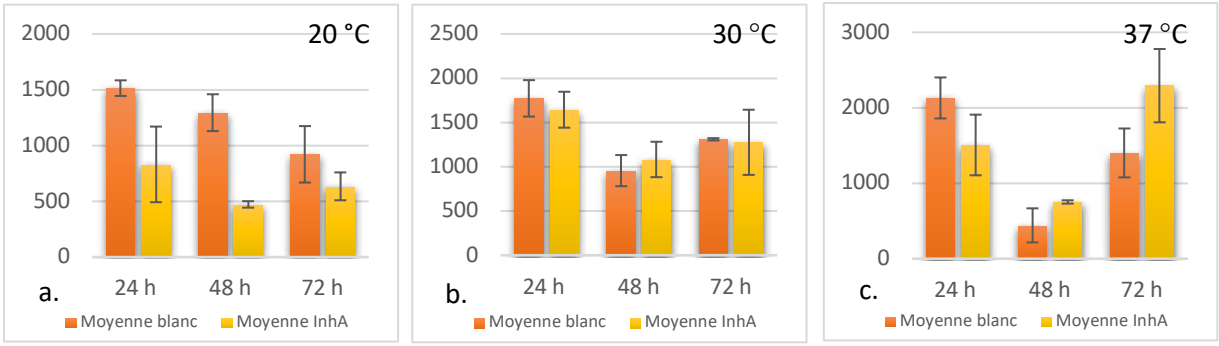


Figure 85 : proportion du régioisomère 1,4-disubstitué a. à 20 °C b. à 30 °C c. à 37 °C aux différents temps : 24 h, 48 h et 72 h.

II.B Essais de KTGS

Une fois le protocole ci-dessus établi et validé, nous avons lancé des essais de KTGS. Six conditions différentes dans lesquelles l'azoture **1e** et cinq alcynes différents ont été testées pendant 72 h à 37 °C. Au total, dix alcynes ont été évalués dont cinq commerciaux et cinq synthétisés. Les composés testés sont représentés dans les tableaux et les histogrammes représentent les composés observés lors des analyses du blanc, de la protéine et de la protéine dénaturée. Ces essais ont été lancés en triplicatas.

L'azoture **1e** a une bonne activité sur la protéine InhA, permettant ainsi sa liaison dans le site actif. Seuls quelques fragments alcynes de type carbazole et coumarines ont été testés. Ils ont montré des inhibitions médiocres sur la protéine, seule une concentration à 500 µM permet d'observer une inhibition forte pour certains fragments (Tableau 11). La concentration (2 mM) à laquelle le ligand alcyne dans les essais de KTGS est introduit doivent être assez élevées pour favoriser une liaison dans le site actif pour permettre une réaction *in situ*. Les études de KTGS de la littérature montrent qu'en général, les fragments se lient à la cible biologique à des concentrations de l'ordre du millimolaire ce qui est observé dans notre étude[254].

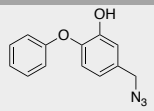
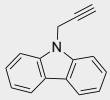
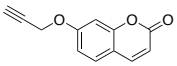
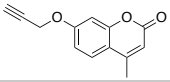
Molécule	Structure	IC_{50} InhA* (nM)	Molécule	Structure	IC_{50} InhA* (nM)
1e		843 ± 94	9a		400 µM : 54%
4h		200 µM : 99% 100 µM : 30%	**4i**		500 µM : 90% 200 µM : 37%

Tableau 11 : récapitulatif des activités enzymatiques des fragments utilisés pour la KTGS.
*** ou % à la concentration testée.**

Les conditions I et IV, quasi-identiques (Tableau 12), ont permis de tester l'azoture **1e** et trois alcynes commerciaux, les **3-phényl-1-propyne**, **4-pentyl-1-ol** et **1-décyne** ainsi que le fragment carbazole **8k**. La différence des conditions I et IV vient du fragment coumarine introduit, le fragment **4h** dans la condition I et **4i** dans la condition IV.

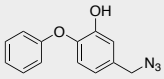
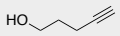
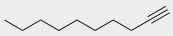
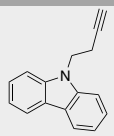
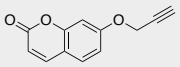
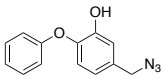
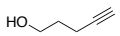
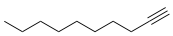
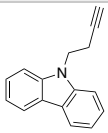
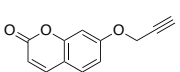
Condition	Azoture	Alcynes				
I	 1e	 3-phényl-1-propyne MM_{exacte} = 357,2481	 4-pentyl-1-ol MM_{exacte} = 325,2031	 1-décyne MM_{exacte} = 379,2260	 8k MM_{exacte} = 460,1899	 4h MM_{exacte} = 441,1324
IV	 1e	 3-phényl-1-propyne MM_{exacte} = 357,2481	 4-pentyl-1-ol MM_{exacte} = 325,2031	 1-décyne MM_{exacte} = 379,2260	 8k MM_{exacte} = 460,1899	 4i MM_{exacte} = 455,1481

Tableau 12 : fragments mis en jeu lors des conditions I et IV de KTGS.
Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ».

Dans les deux conditions (Figure 86, Figure 87), nous observons la formation de trois produits majoritaires, que ce soit dans les contrôles ou avec la protéine : le composé **9k**, le composé **5h** et son régioisomère *syn* **5q** pour la condition I et **5i** et son régioisomère **5r** pour la condition IV. Dans ces conditions, les résultats paraissent peu significatifs car les quantités dans les contrôles et avec la protéine sont assez proches, ce qui montre que la protéine ne favorise pas ou très peu la réaction. Néanmoins, nous observons la formation des deux régioisomères avec les fragments coumarines alors que le fragment carbazole ne conduit qu'à la forme 1,4-disubstituée.

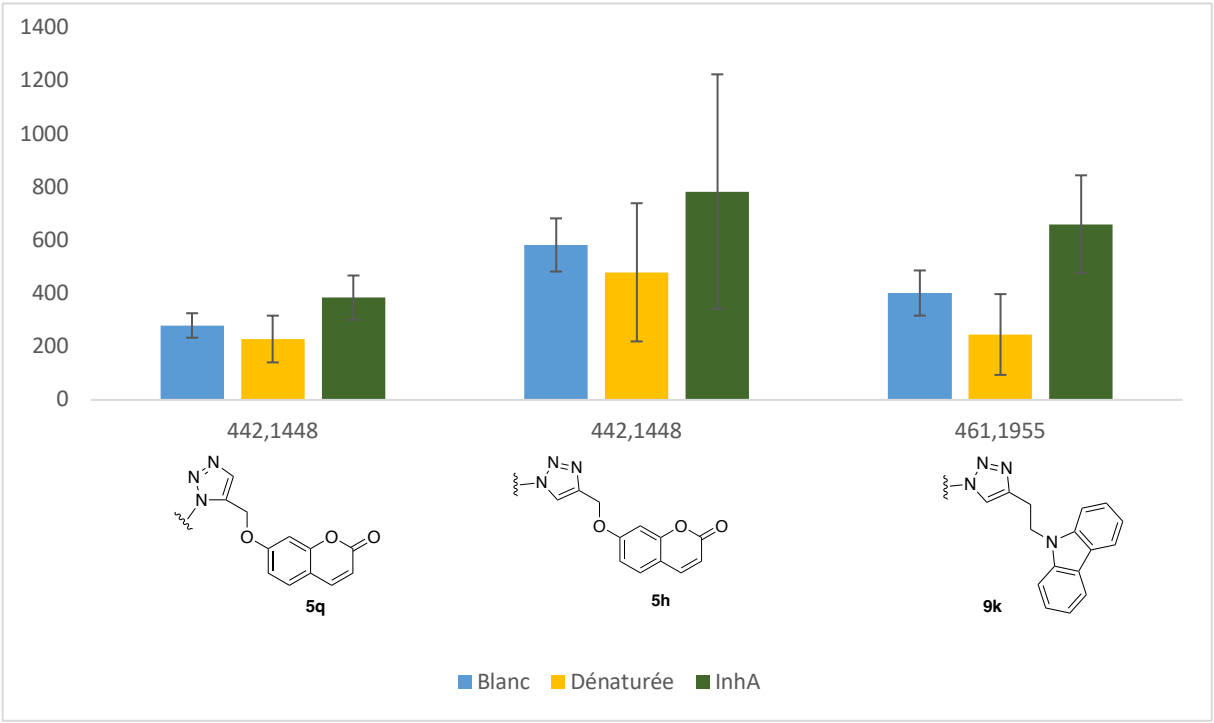


Figure 86 : histogramme représentant les résultats de la condition I. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

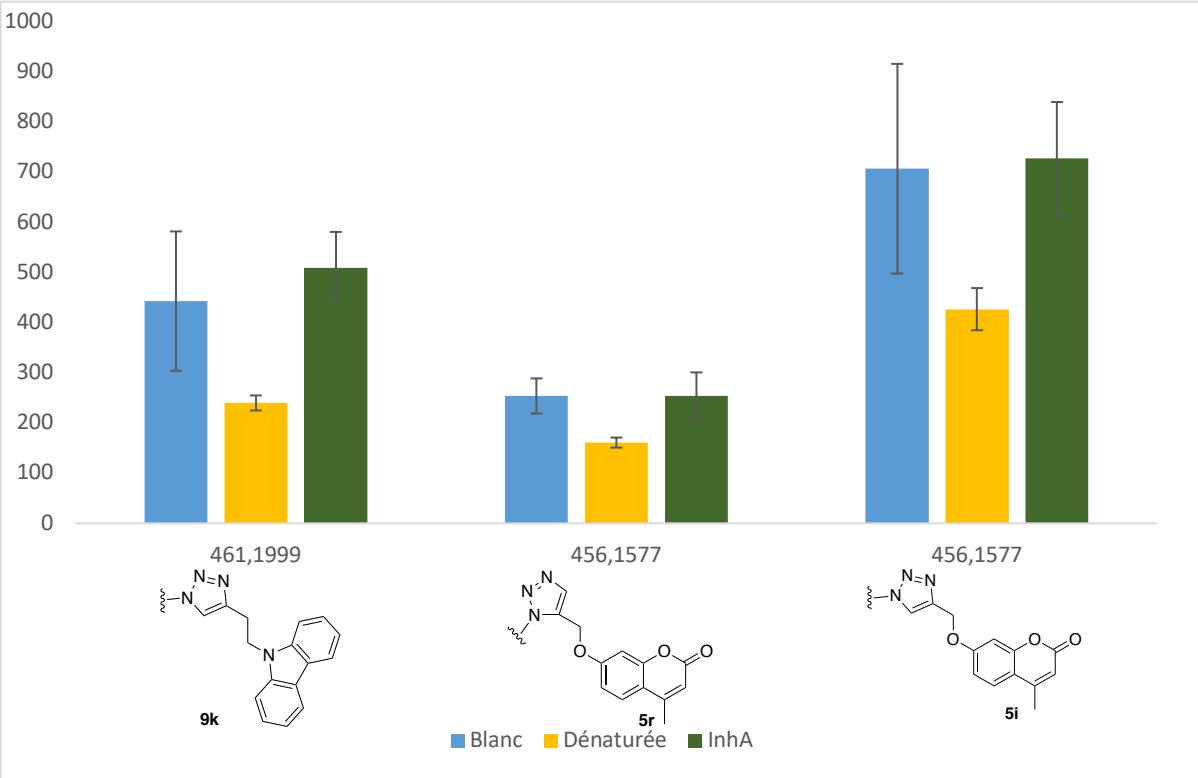


Figure 87 : histogramme représentant les résultats de la condition IV. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

La condition II (Tableau 13) a été lancée avec l'azoture **1e** et cinq alcynes dont 3 commerciaux : le **3-phényl-1-propyne**, le **1-hexyne** et le **4-phényl-1-butyne** et deux composés synthétisés, le carbazole **8a** et l'indole **8l**.

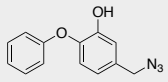
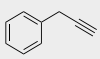
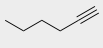
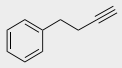
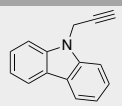
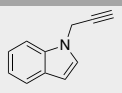
Condition	Azoture	Alcynes				
II	 **1e**	 **3-phényl-1-propyne** MM_{exacte} = 357,2481	 **1-hexyne** MM_{exacte} = 323,1634	 **4-phényl-1-butyne** MM_{exacte} = 371,1634	 **8a** MM_{exacte} = 446,1742	 **8l** MM_{exacte} = 396,1586

Tableau 13 : fragments mis en jeu lors de la condition II de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ».

La condition II (Figure 88) a permis d'observer la formation de 5 produits dans des proportions différentes entre les contrôles et la protéine. Les composés *anti* **9a** et **9l** sont majoritaires comparativement à leur régioisomère *syn* **9o** et **9p**. Le produit issu de la chimie click *in situ* entre **1e** et le **4-phényl-1-butyne** a également été observé mais de façon très minoritaire, la régioisomérie n'a pas été déterminée. Le composé **9a** est le produit majoritaire dans cette condition de chimie click *in situ*.

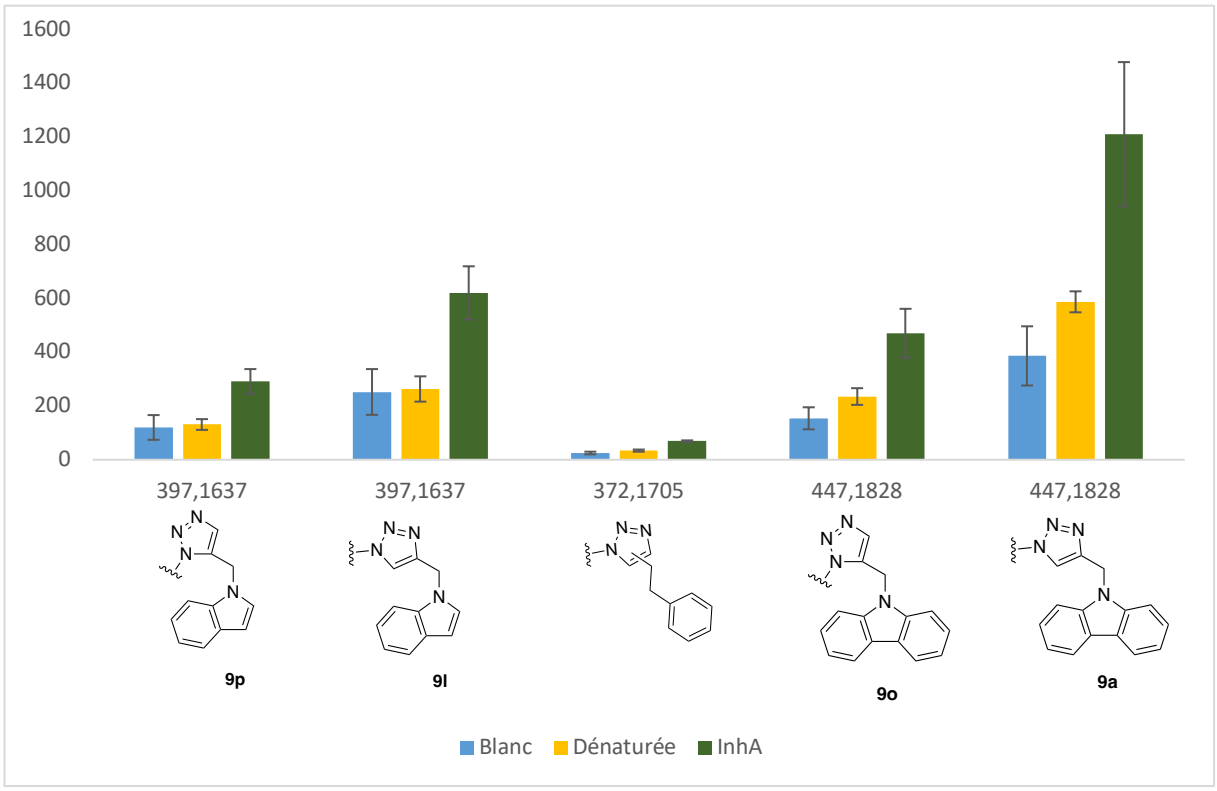


Figure 88 : histogramme représentant les résultats de la condition II. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

Les conditions III et V (Tableau 14) sont également très proches et ont permis d'évaluer la réaction entre l'azoture **1e** et cinq alcynes dont deux commerciaux, les **4-pentyl-1-ol** et **1-hexyne** et trois alcynes synthétisés, le carbazole **8a**, l'homologue carbazole **8k** et la coumarine **4h** (pour la condition III) ou **4i** (pour la condition V).

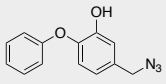
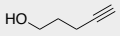
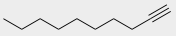
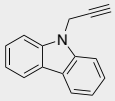
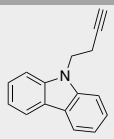
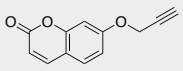
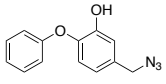
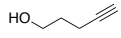
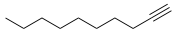
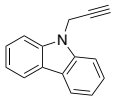
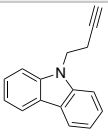
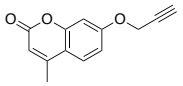
Condition	Azoture	Alcynes				
III	 **1e**	 **4-pentyl-1-ol** MM_{exacte} = 325,2031	 **1-décyne** MM_{exacte} = 379,2260	 **8a** MM_{exacte} = 446,1742	 **8k** MM_{exacte} = 460,1899	 **4h** MM_{exacte} = 441,1324
V	 **1e**	 **4-pentyl-1-ol** MM_{exacte} = 325,2031	 **1-décyne** MM_{exacte} = 379,2260	 **8a** MM_{exacte} = 446,1742	 **8k** MM_{exacte} = 460,1899	 **4i** MM_{exacte} = 455,1481

Tableau 14 : fragments mis en jeu lors des conditions III et V de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ».

Ces deux conditions (Figure 90, Figure 89) ont permis la formation de 5 produits, les produits **9a**, **9o**, **9k** issus des fragments carbazoles et les produits **5q** et **5h** ou **5r** et **5i** issus des fragments coumarines. Dans la condition III, le produit majoritaire est le **5h** alors que dans la condition V ; les composés **5i** et **9a** sont ceux qui ont été obtenus en plus grande quantité.

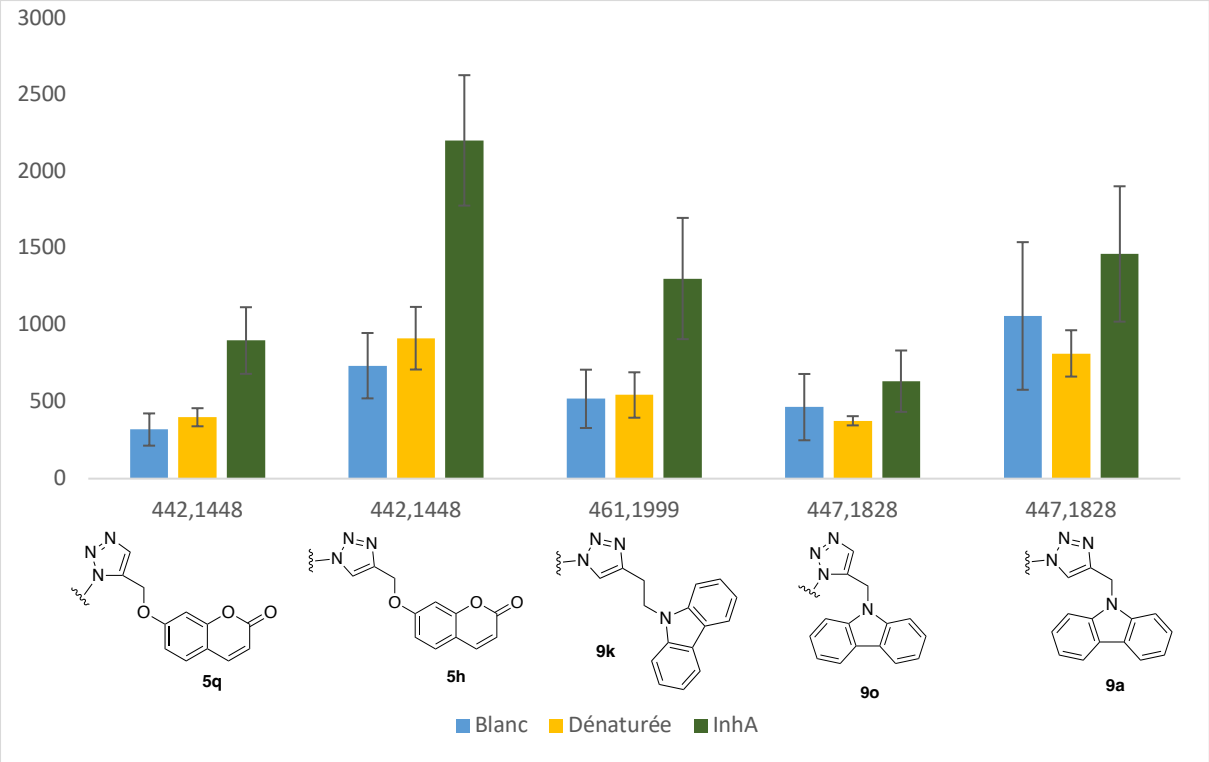


Figure 90 : histogramme représentant les résultats de la condition III. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

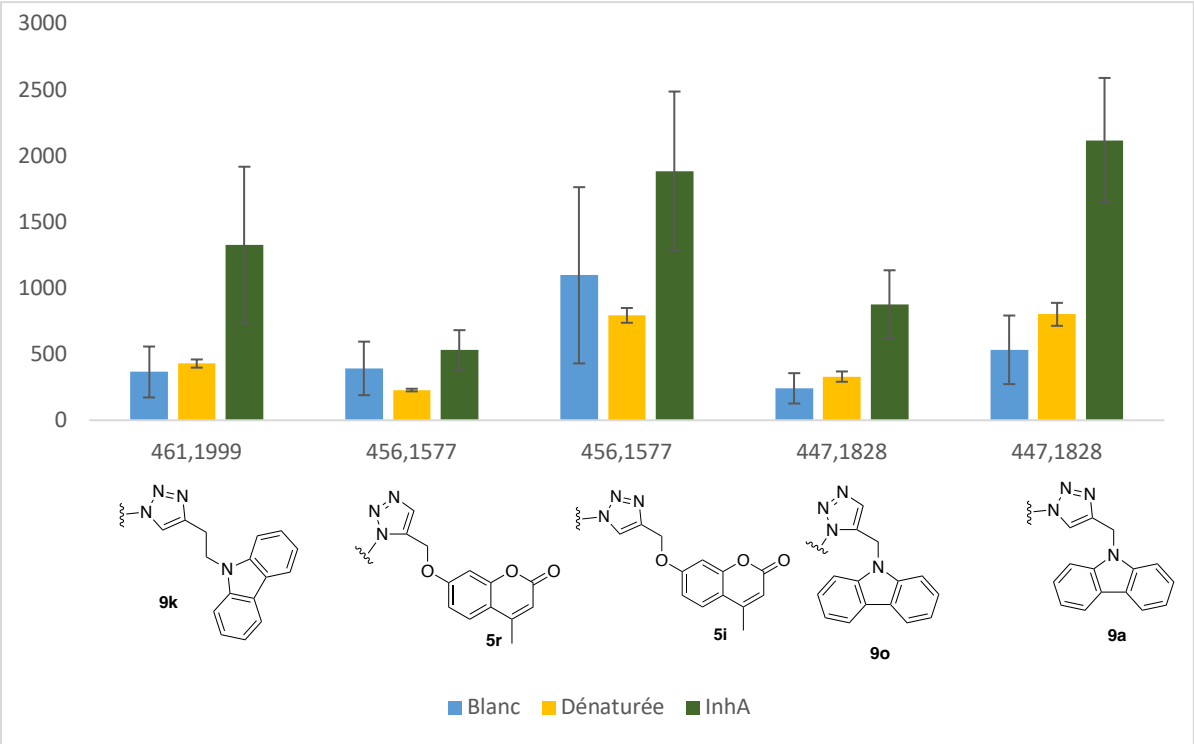


Figure 89 : histogramme représentant les résultats de la condition V. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

La dernière condition VI (Tableau 15) a mis en évidence les réactions entre l'azoture et tous les fragments carbazoles et coumarines.

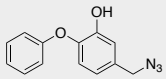
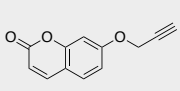
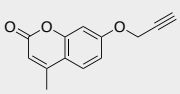
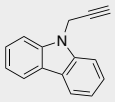
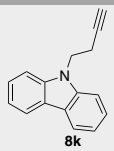
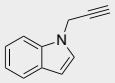
Condition	Azoture	Alcynes				
VI	 1e	 4h MM_{exacte} = 441,1324	 4i MM_{exacte} = 455,1481	 8a MM_{exacte} = 446,1742	 8k MM_{exacte} = 460,1899	 8l MM_{exacte} = 396,1586

Tableau 15 : fragments mis en jeu lors de la condition IV de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ».

Ainsi, nous observons la formation de chaque produit avec principalement la production des produits *anti* **5i**, **5h**, **9k** et **9a**. Les produits *syn* se forment également mais en plus petite quantité. Seul le produit *syn* avec le fragment **8k** ne s'est jamais formé dans aucune des conditions, suggérant que la conformation du site actif n'est pas adaptée pour cette réaction (Figure 91).

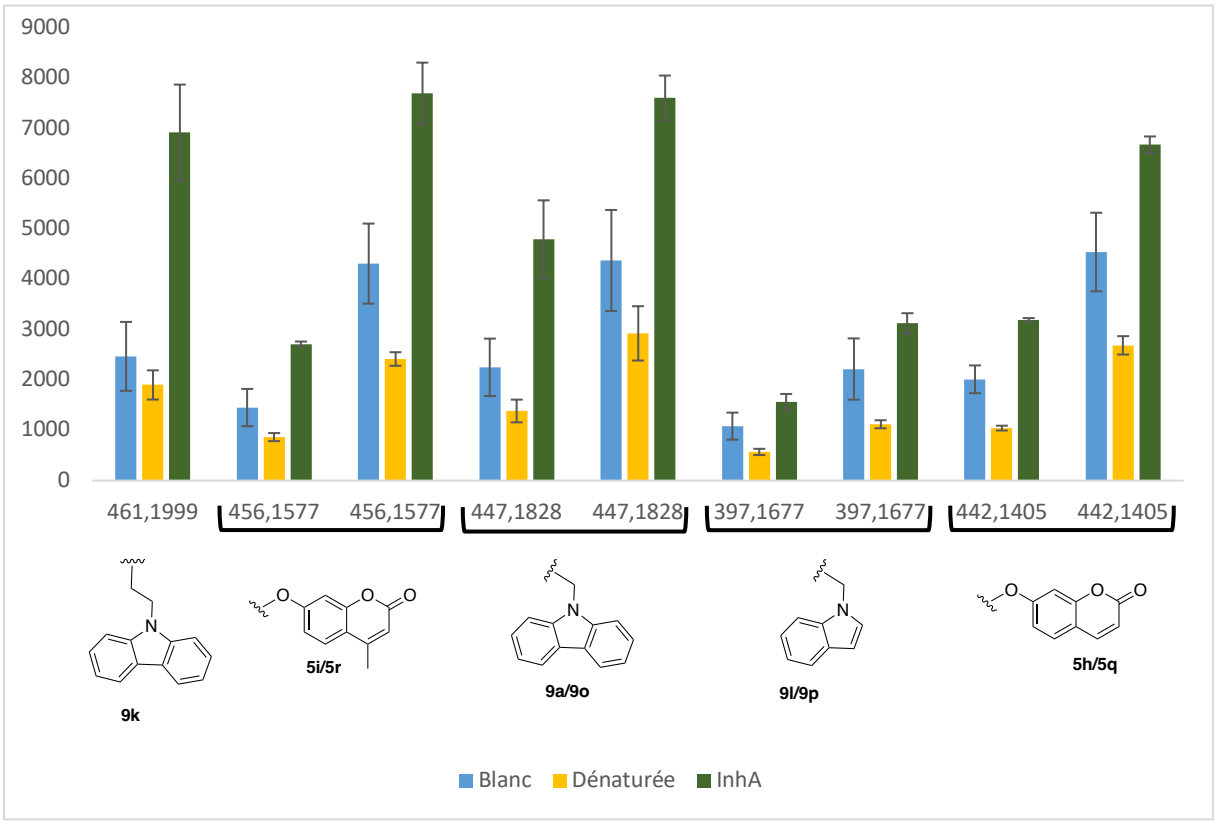


Figure 91 : histogramme représentant les résultats de la condition VI avec les écart-types. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée).

Un exemple des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse, dans le cas des composés **9a** et **9o**, est reporté dans la Figure 92. Dans tous les cas, la conformation *anti* est majoritaire. Nous observons une différence significative de la quantité de produits *syn* et *anti* entre les essais avec la protéine et les contrôles, ce qui permet de confirmer le concept de KTGS sur la protéine InhA.

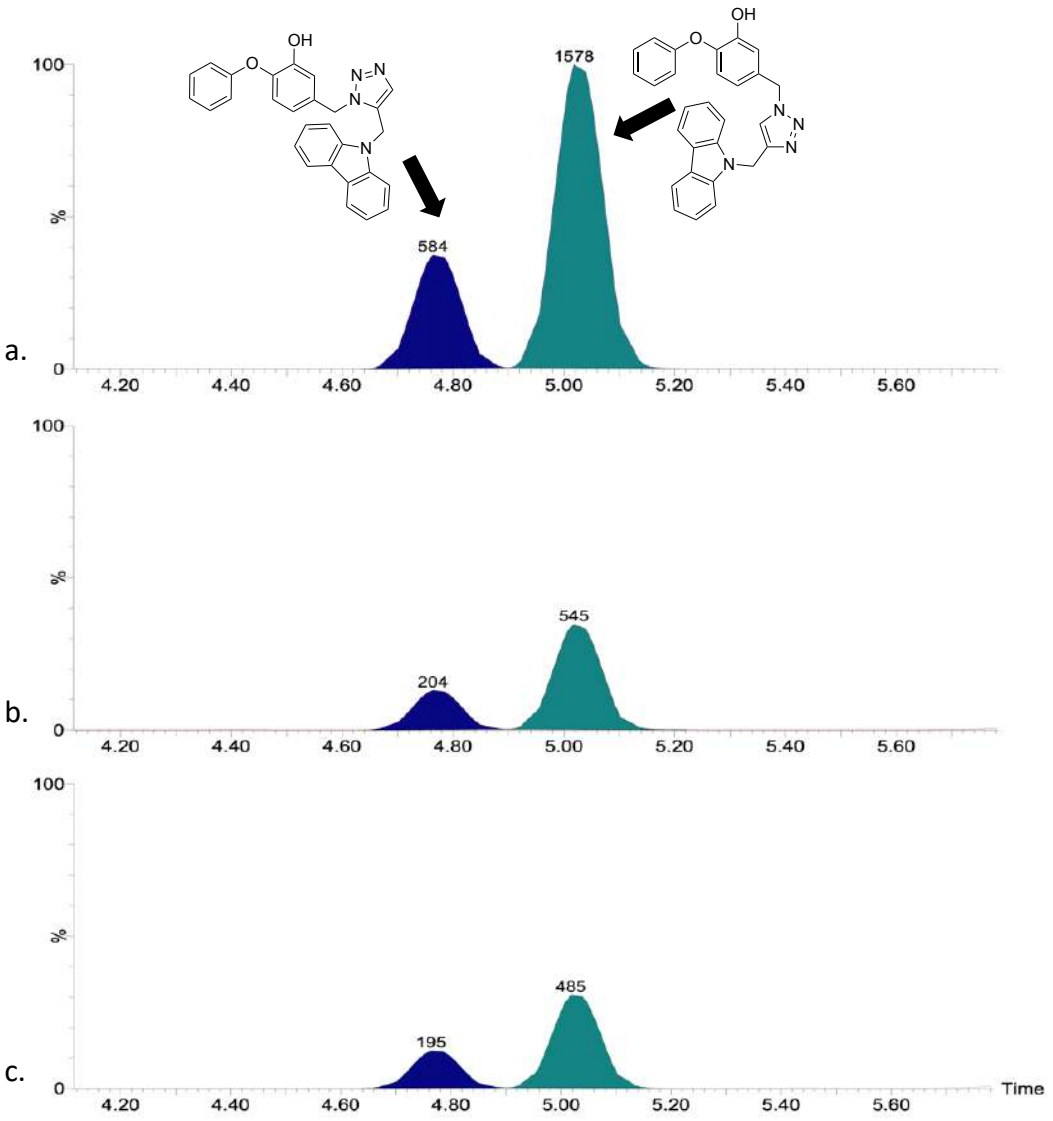


Figure 92 : exemple de chromatogrammes obtenus lors des analyses de KTGS par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. a. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais avec la protéine. b. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais du blanc. c. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais avec la protéine dénaturée. Les chiffres indiqués au-dessus des pics correspondent aux intégrations. Le premier pic observé (en bleu) représente la proportion du produit *syn* **9o** et le deuxième pic correspond au produit *anti* **9a**.

Des résultats prometteurs ont été observés dans ces essais KTGS dans toutes les conditions de test. En effet, quatre conditions (II, III, V et VI) ont montré des différences significatives entre les contrôles et avec la présence de la protéine InhA. Ces essais ont permis d'observer des réactions plus favorables pour les fragments carbazoles ou coumarines, indiquant ainsi que ces fragments se lient mieux dans le site actif et se trouvent à proximité de l'azoture pour pouvoir réagir.

Les activités inhibitrices des composés obtenus par CuAAC et RuAAC décrits dans les chapitres 1 et 2 sont rappelées dans le Tableau 16.

De manière générale, tous les produits *anti* ont montré une très bonne inhibition de la protéine InhA alors que l'inhibition des produits *syn* est dépendante des substituants.

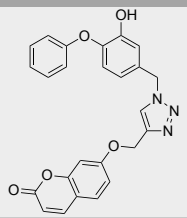
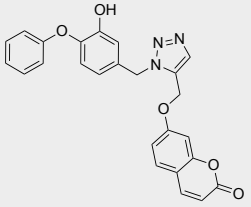
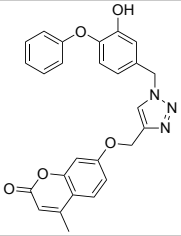
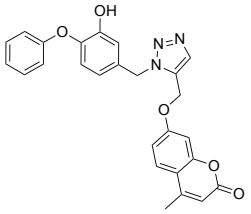
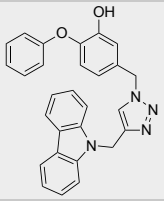
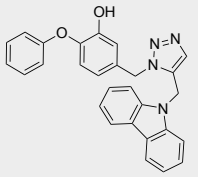
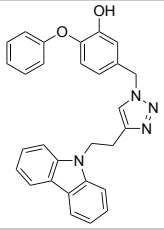
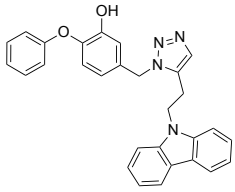
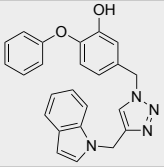
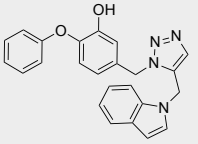
Molécule	Structure	IC_{50} InhA* (nM)	Molécule	Structure	IC_{50} InhA* (nM)
5h (*anti*)		163 ± 17 nM	**5q (*syn*)**		630 ± 50 nM
5i (*anti*)		205 ± 12 nM	**5r (*syn*)**		510 ± 60 nM
9a (*anti*)		7 ± 2 nM	**9o (*syn*)**		10 µM : 50%
9k (*anti*)		107 ± 11.4 nM	**9q (*syn*)**		10 µM : 55%
9l (*anti*)		32 ± 7 nM	**9p (*syn*)**		1500 ± 200

Tableau 16 : récapitulatif des activités enzymatiques des fragments et molécules finales obtenues par KTGS. * ou % à la concentration testée.

III Conclusion et perspectives

Ces travaux ont permis d'aborder le concept de KTGS sur la protéine InhA. Afin de développer le protocole de KTGS, nous avons travaillé avec des fragments déjà étudiés dans les chapitres 1 et 2. Ces essais préliminaires ont confirmé que l'approche guidée par la cible, notamment par chimie click *in situ,* pouvait être une méthode de criblage de ligands de la protéine InhA. Ces résultats ont montré une sélection de la protéine pour certains fragments notamment ceux comportant des motifs carbazoles et coumarines, qui sont les seuls à avoir réagi avec l'azoture *in situ*. Nous observons, de plus, la formation majoritaire des produits *anti* qui sont de meilleurs inhibiteurs de la protéine.

Dans cette étude, nous avons également essayé d'utiliser la cristallographie aux rayons X comme outil de détection de la KTGS. La mise en présence, dans la goutte de cristallisation de l'azoture **1e** et de l'alcyne carbazole **8a** n'a malheureusement pas permis l'obtention d'un cristal. Ces essais de cristallisation ont été effectués lors des premiers résultats obtenus de KTGS avec l'alcyne **8a**. Par la suite des essais d'optimisation des conditions ont été entrepris, mais aucun autre alcyne n'a été testé. De la même manière, des études biophysiques ont été entreprises pour déterminer des températures de dénaturation de la protéine avec et sans les composés pour évaluer une stabilité et également pour déterminer des constantes de dissociation mais les composés testés ont montré un réel problème de solubilité durant ces analyses et aucune conclusion n'a pu être édictée.

Cette mise au point a été ralentie par le manque d'appareils de détection (la chromatographie liquide avec détecteur UV couplée à la spectrométrie de masse). En effet, des pannes récurrentes nous ont privé de l'analyse des essais de KTGS. De plus, les seuils de détection étaient trop hauts pour l'évaluation de l'obtention de nos composés. L'utilisation d'équipement plus performants lors des derniers mois de la thèse a permis une réelle avancée dans la détection des composés, confirmant ainsi le concept de KTGS sur la protéine InhA.

En perspective, cette méthode de criblage pourrait être utilisée sur une bibliothèque plus conséquente de fragments. L'étude des structures cristallographiques des différentes familles d'inhibiteurs (Tableau 8), effectuée dans le chapitre 2, montre que plusieurs fragments se lient dans les sites I, II et III de la protéine. Ainsi, nous pourrions déconstruire ces familles d'inhibiteurs et favoriser la reconstruction de ces fragments par l'approche guidée par la cible. Tous les sites de liaison de la protéine pourraient être ciblés.

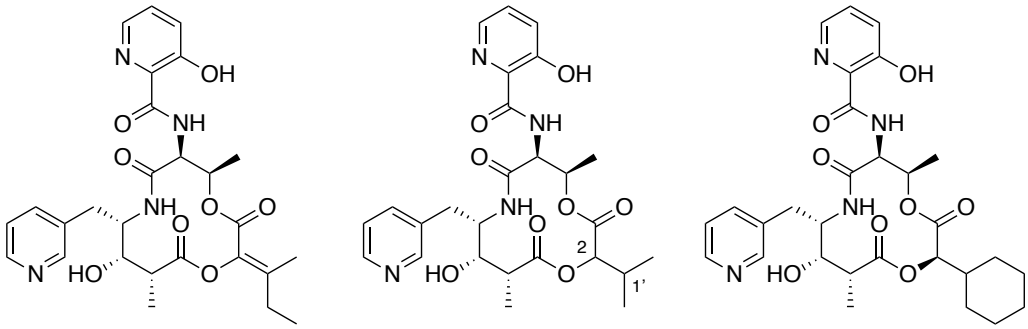
CHAPITRE 4 : MACROCYCLISATION *IN SITU*

I Présentation du projet

I.A Objectif du projet

Ce dernier chapitre repose sur un concept novateur pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de la protéine InhA, celui de la macrocyclisation intramoléculaire *in situ*.

En chimie médicinale, la famille des macrocycles représente une classe moléculaire sous-exploitée dans la découverte de médicaments qui mérite une plus grande attention[264]. Souvent inspirés de produits naturels, ils ont des structures chimiques complexes rendant leur synthèse chimique parfois laborieuse. Les macrocycles, par définition, sont des composés cycliques de 12 atomes ou plus[265]. Les traitements antituberculeux ne comportent qu'un seul médicament macrocyclique, la rifampicine, agissant sur la synthèse d'ARN. Les études d'inhibiteurs macrocycliques sont très limitées sur la protéine InhA. Découverte en 2012, la pyridomycine **PYW**, produit naturel isolé de la bactérie *Streptomyces pyridomyceticus*[176], s'est révélée être un puissant inhibiteur contre Mtb H37Rv (CMI = 0,56-1,48 µM). Cette molécule constitue à ce jour le seul ligand macrocyclique co-cristallisé avec la protéine InhA. Cette structure cristallographique du complexe InhA/**PYW** (4BII, **PYW**) montre une liaison originale à la fois dans le site de liaison du cofacteur et celui de liaison du substrat. La synthèse chimique de la **PYW** est un réel challenge, et à ce jour, une seule stratégie de synthèse a été reportée dans la littérature en 2014[266,267]. En 2020, une série de dérivés de la **PYW** a montré une insensibilité à la surexpression d'InhA de Mtb, suggérant que leur mode d'action global peut différer de celui du produit naturel d'origine. Les activités sur la croissance mycobactérienne demeurent cependant proches (Figure 93)[177].



PYW
CMI = 0,55-3,05 µM
IC_{50} InhA (S94A) = 3,4 µM

2R CMI = 3,2 µM
IC_{50} InhA (S94A) = 32,8 µM

2S CMI = 26,0 µM

CMI = 1,3 µM
IC_{50} InhA (S94A) = 11,1 µM

Figure 93 : structure chimique de la pyridomycine et des 2,1'-dihydropyridomycines et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et InhA (S94A), mutant conférant une résistance à l'**INH**.
Source : Horlacher *et al*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (2), 264–268.
Kienle *et al*, *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (3), 1105–1131.

Également en 2020, notre équipe a étudié une nouvelle classe de macrocycles bisbiaryléthers mimant les deux molécules de **TCL**. La Figure 94 représente schématiquement la structure RX des deux molécules de **TCL** situées dans le site actif (1P45-A, **TCL**) superposées à un macrocycle bisbiaryléther (représenté en bleu) afin d'observer l'enveloppe du macrocycle.

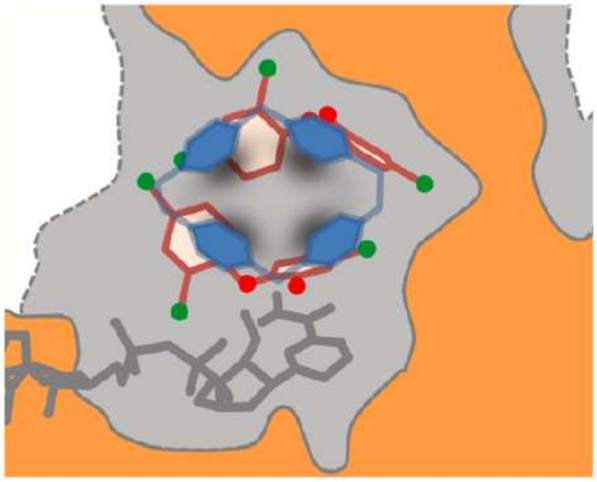
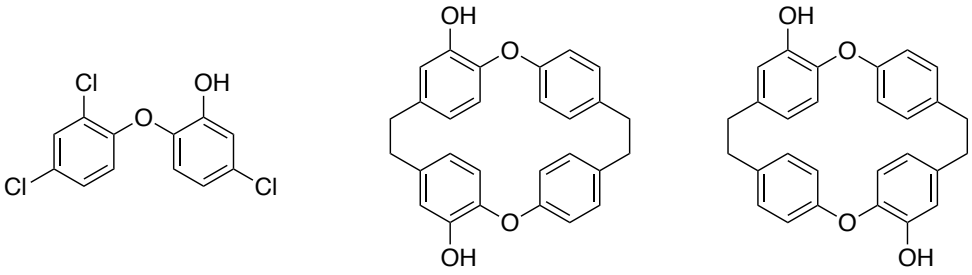


Figure 94 : schéma basé sur la structure RX de InhA en complexe avec deux molécules de **TCL** (en rouge) (1P45-A, **TCL**) en présence du NAD(H) (gris). Représentation de l'enveloppe des macrocycles (en bleu). Source : Rodriguez *et al*, *Bioorg Chem.* **2020**, *95*, 103498.

D'après le design, deux macrocycles ont ainsi été synthétisés dont les phénols sont soit en position *cis* soit en position *trans* (Figure 95). La molécule en position *cis* a une activité *in vivo* comparable à celle du **TCL** (CMI = 47 µM) et une activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme très faible (52% d'inhibition à 50 µM). L'activité *in vitro* du macrocycle en position *trans* est du même ordre de grandeur que celle du **TCL** (IC_{50} = 4,7 µM), cependant son activité sur la croissance mycobactérienne est diminuée d'un facteur 2. Ces résultats semblent toutefois indiquer que ces macrocycles se lient dans le site actif.



CMI = 47 µM
IC_{50} = 1 µM

CMI = 47 µM
52% d'inhibition à 50 µM

CMI = 94 µM
IC_{50} = 4,7 µM

Figure 95 : structures chimiques de la molécule de **TCL** et macrocycles bisbiaryléthers et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et contre InhA de Mtb.

Dans le chapitre précédent, la chimie click *in situ* intermoléculaire a été employée pour la découverte de nouveaux inhibiteurs d'InhA. Dans ce projet, nous avons voulu appliquer la réactivité de la chimie click *in situ* pour une réaction intramoléculaire. Le site de liaison du substrat de la protéine serait plus accessible à une molécule acyclique, moins rigide et plus flexible qu'un macrocycle. Cette molécule décorée à la fois des fonctions alcyne et azoture, aurait donc plus de facilité à se lier à la protéine et

son confinement induit par la topographie du site actif favoriserait une chimie click *in situ* formant ainsi un macrocycle. Ces macrocycles formés *in situ*, étant plus rigides et plus encombrants pourraient hypothétiquement avoir un temps de résidence plus long dans le site de liaison du substrat de la protéine et présenter une inhibition « irréversible » sans lien covalent entre l'inhibiteur et la protéine (Figure 96).

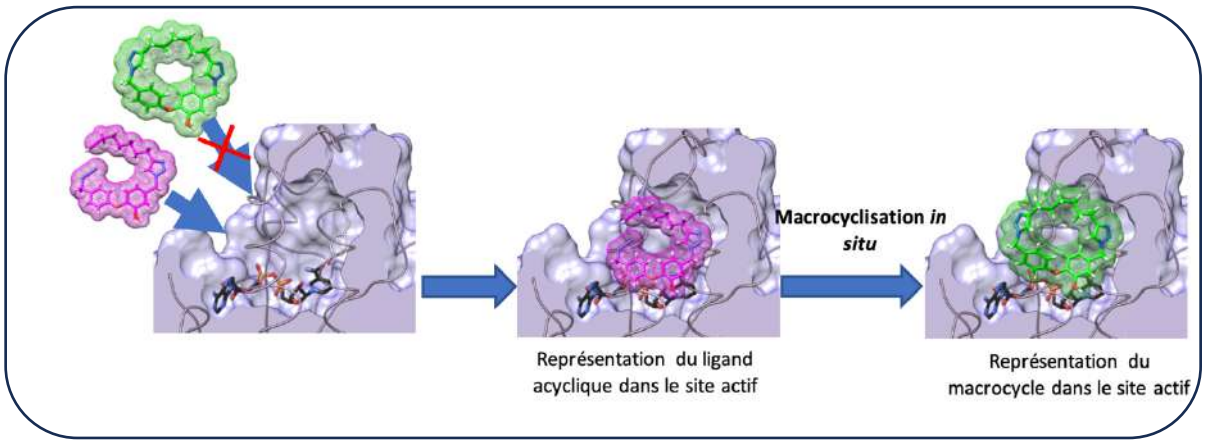


Figure 96 : principe de la chimie click *in situ* intramoléculaire au sein du site actif de la protéine InhA.

Lors du démarrage de ce travail, aucun exemple de réaction macrocyclique *in situ* n'était connu. Très récemment, en 2022, deux équipes chinoises ont proposé des sondes d'imagerie pour la détection non invasive de cellules cancéreuses. Ces sondes ont été conçues par autoassemblage de petites molécules en supramolécules déclenché par une enzyme. Une première réaction de condensation entre la molécule de 2-cyano-benzothiazole (CBT) et une chaîne latérale d'une cystéine libre donne un composé portant les groupes CBT et Cys qui permettent ensuite la condensation intracellulaire pour former des supramolécules[268,269]. En 2023, Chaudhuri *et al*, ont montré l'apport de la macrocyclisation *in situ* par approche guidée par la cible. Les auteurs de l'étude ont décrit la *macrocyclisation directe ciblée* de blocs de construction bi-fonctionnels pour générer une nouvelle classe de macrocycles peptidomimétiques utilisant les G-quadruplexes de l'ADN/ARN comme cibles[270]. Une série de ligands bis-alcynes et bis-azotures a été préparée et mise en présence de la cible ce qui leur a permis d'observer une macrocyclisation intermoléculaire *in situ.*

I.B Conception des molécules

Les chapitres précédents ont montré que les ligands biaryléthers permettent de jouer le rôle d'ancre dans le site actif. L'ajout des fonctions alcyne et azoture sur une dérivé biaryléther pourrait favoriser une chimie click *in situ* intramoléculaire. Ainsi, la molécule analogue du **TCL**, déjà étudiée, générera une première série de ligands acycliques et dans la deuxième série, nous nous proposons d'étudier l'apport d'un deuxième groupement hydroxyle (Schéma 22). Différents espaceurs R entre le pentacycle triazole et la fonction alcyne ont été envisagés. Tout d'abord, nous avons travaillé avec un substituant alkyle, contenant 10 carbones. Cette chaîne pourrait se fixer au niveau du site de liaison II, celui de la chaîne alkyle de l'analogue du substrat **THT** favorisant le repliement de la molécule acyclique qui pourrait rapprocher les fonctions réactives pour une réaction intramoléculaire. Les motifs carbazole et aryle, moins encombrés que le carbazole, ont aussi été retenus pour la conception de ces ligands acycliques. Afin de favoriser la réaction, nous avons également étudié la position de la fonction azoture,

d'abord introduite en position *para* puis *méta* et *ortho*. Les analogues macrocycliques ont également été synthétisés pour comparer les activités enzymatiques et avoir une référence en chromatographie liquide dans l'analyse des résultats de macrocyclisation *in situ*. Il est à noter que dans ce chapitre, la nomenclature **C** fait référence aux ligands acycliques et **M** a été utilisée pour les macrocycles. Le numéro correspond au dérivé alcyne utilisé, c'est-à-dire que le composé **C01** correspondra au produit ouvert et **M01** sera son macrocycle associé

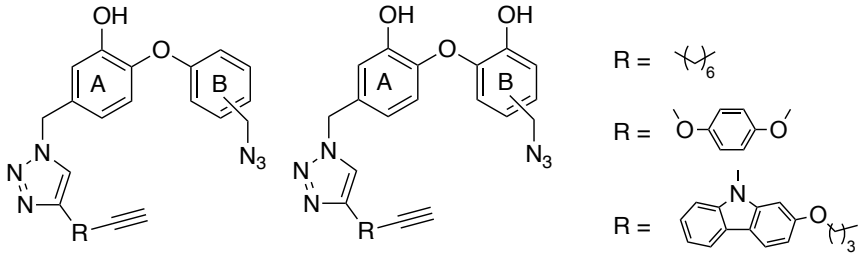


Schéma 22 : structures chimiques de la première et deuxième série des ligands acycliques étudiés.

II Résultats et discussion

Ce projet a été le fruit d'un travail collectif impliquant Evelyne Delfourne et moi pour la synthèse chimique et Saida Danoun pour toutes les purifications et analyses par chromatographie liquide.

II.A Synthèse chimique

La synthèse des différents ligands acycliques intervenant dans les réactions click nous a amenés à étudier différents schémas de rétrosynthèse. Le premier schéma de rétrosynthèse (Schéma 23) procède en une étape et met en jeu une molécule bis-azoture et une autre bis-alcyne.

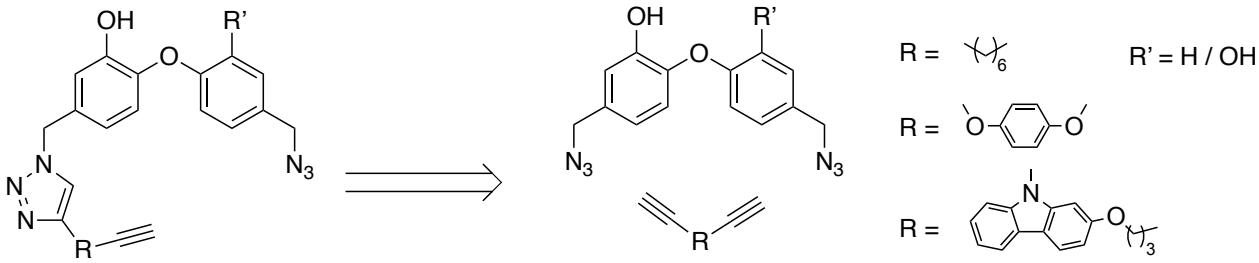


Schéma 23 : rétrosynthèse des ligands acycliques par mono chimie click.

II.A.1 Synthèse des précurseurs bis-azotures

Trois précurseurs bis-azotures, **10e**, **11e** et **11'e** ont été synthétisés à partir des composés dialdéhydiques **10a** et **11a** précédemment décrits, issus des réactions de condensation entre la vanilline et le 4-fluorobenzaldéhde ou le 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde, respectivement. La série d'étapes de synthèse est identique à celle décrite dans le chapitre 1 pour les précurseurs **1e, 2e et 3e** (Schéma 24).

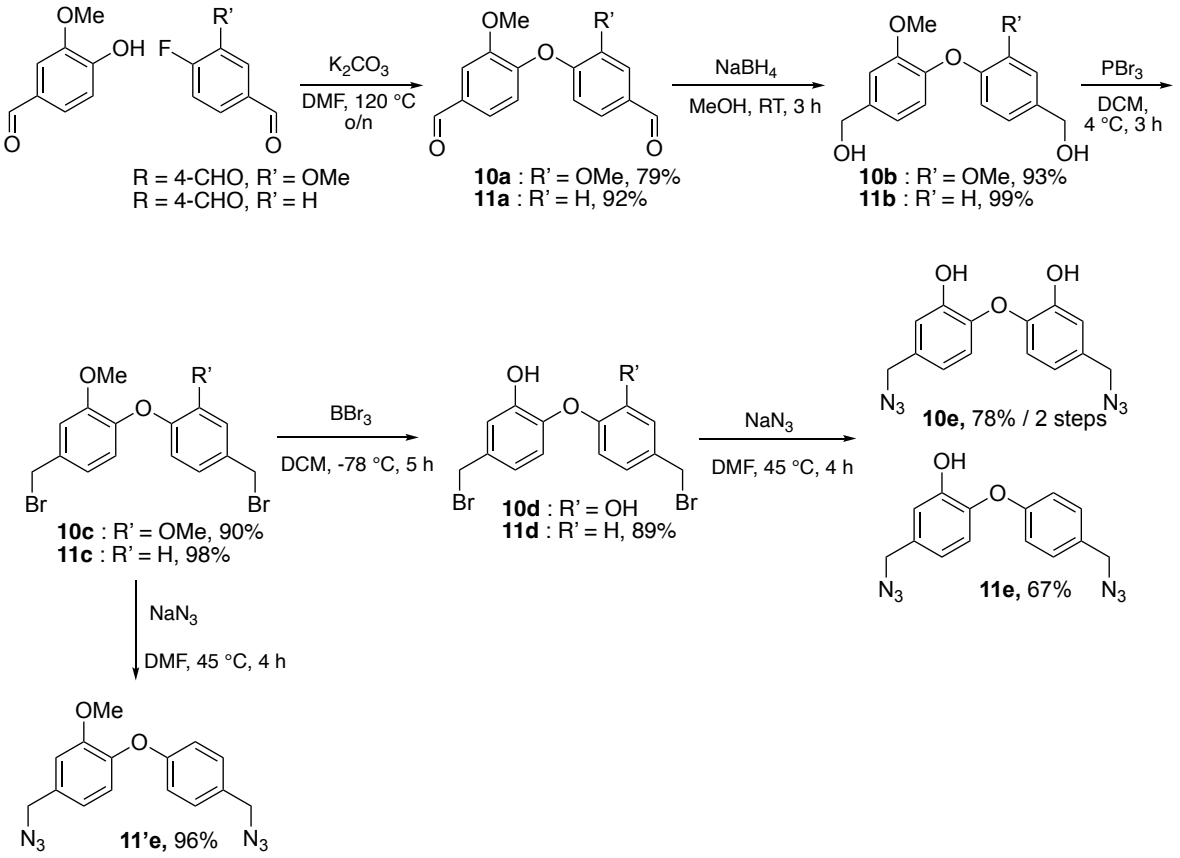


Schéma 24 : synthèse des précurseurs bis-azotures **10e**, **11e** et **11'e**.

La réduction des composés **10a** et **11a** par le borotétrahydrure de sodium a conduit aux composés dialcools **10b** et **11b**[271], eux aussi déjà décrits. La bromation par le tribromure de phosphore a conduit aux produits **10c** et **11c** avec de très bons rendements, 90 et 98%, respectivement. Les produits bromés ont été déprotégés par l'acide de Lewis, le tribromure de bore. Ainsi, le composé **10d** issu de **10c** a été obtenu avec 89% de rendement. De même, le produit **11c** a donné **11d**. Il est à noter que compte tenu de son instabilité, ce dernier composé a été directement engagé dans la dernière étape. Les composés bis-azotures **10e** et **11e** ont été obtenus par action de l'azoture de sodium. Le produit **11'e**, comporte un groupement méthoxy. Au bilan, les rendements globaux pour **10e**, **11e et 11'e** sont respectivement de 52%, 53% et 86%.

II.A.2 Réaction de chimie click entre bis-azotures et bis-alcynes

Les précurseurs bis-azotures ont été mis en réaction avec le **1,9-décadiyne** commercial. Malheureusement, cette réaction n'a donné de bons résultats que pour les molécules diphénols qui sont symétriques. Avec les précurseurs monophénol ou monométhoxy, la réaction de chimie click a procédé sur chacune des fonctions azotures formant ainsi deux produits ouverts. Ces régioisomères ouverts n'ont jamais pu être séparés malgré diverses tentatives de purification. Il est à noter que les macrocycles correspondants qui seront traités plus loin sont aussi formés par cette réaction.

Le deuxième schéma de rétrosynthèse (Schéma 25) dit « non symétrique » a donc été étudié afin d'obtenir les ligands monohydroxylés ouverts comportant un motif monoazide.

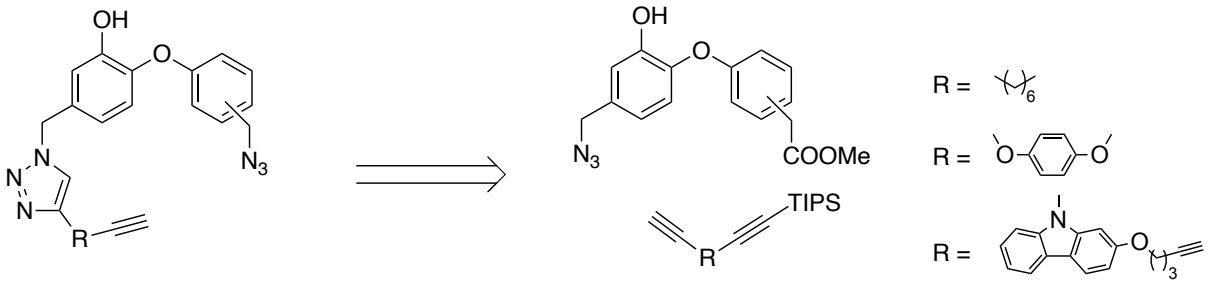


Schéma 25 : deuxième voie de rétrosynthèse des ligands acycliques par voie « non symétrique ».

II.A.3 Synthèse des précurseurs mono-azotures

Deux précurseurs mono-azotures **12e** et **13e** ont été synthétisés en cinq étapes (Schéma 26). La série d'étapes de synthèse est identique à celle décrite pour les bis-azotures **10e**, **11e** et **11'e**.

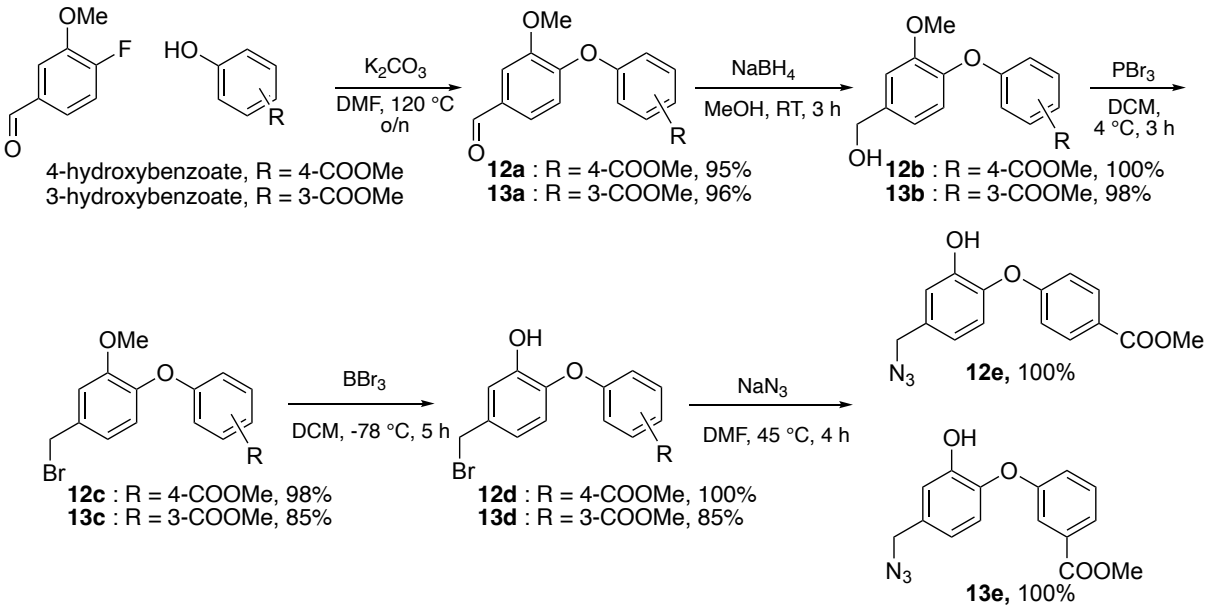


Schéma 26 : synthèse des précurseurs monoazotures **12e** et **13e**.

La première étape consiste en la formation du lien éther entre un dérivé phénolique et un dérivé fluoré par substitution nucléophile aromatique (SnAr) en présence de carbonate de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide permettant l'obtention des produits **12a** et **13a** avec de très bons rendements de 95 et 96%.

La synthèse du biaryléther **12a** a nécessité une mise au point, représentée dans le Schéma 27 ; la première réaction de SnAr effectuée a mis en jeu la vanilline utilisée comme nucléophile grâce au doublet non liant de l'oxygène du phénol et le 4-fluorobenzoate de méthyle comme électrophile partenaire dans le *N,N*-diméthylformamide à 120 °C. Le rendement de cette transformation s'avérant décevant (3%), nous avons opté pour l'utilisation du 4-hydroxybenzoate de méthyle comme

nucléophile que nous avons mis en réaction avec le 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde pour conduire dans les mêmes conditions de solvant et de température au biaryléther désiré **12a** avec un excellent rendement (95%). Cette différence de réactivité peut s'expliquer d'une part par l'effet mésomère attracteur plus fort du groupement aldéhyde du 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde (*vs* l'effet du groupement ester) qui renforce le déficit d'électrons sur le carbone portant l'atome de fluor et d'autre part par la meilleure disponibilité du doublet non liant de l'oxygène phénolique dans le 4-hydroxybenzoate de méthyle (*vs* vanilline) due à l'effet mésomère plus faible du groupement COOMe. À partir de ces observations, la synthèse de **13a** a été effectuée, avec un rendement de 95%, en faisant réagir le 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde comme électrophile et le 3-hydroxybenzoate de méthyle comme nucléophile.

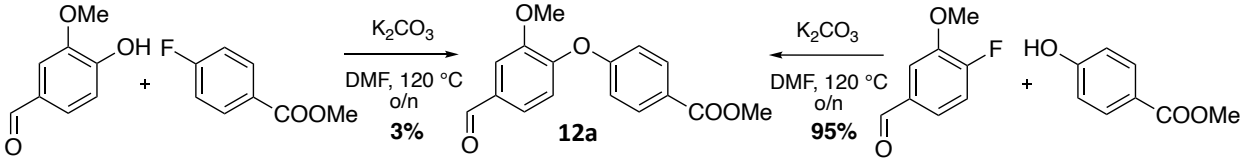


Schéma 27 : mise au point de la substitution nucléophile aromatique pour la formation de **12a**.

Les aldéhydes ont été réduits par le tétrahydruroborate de sodium pour donner **12b**[272] et **13b** avec des rendements élevés de 98% et 100%. Les produits réduits ont ensuite été i) bromés par le tribromure de phosphore conduisant aux produits **12c** et **13c** avec de bons rendements, 85% et 98%, ii) déprotégés par action du tribromure de bore pour former les composés **12d** et **13d** puis iii) transformés avec de bons rendements en composés azotures correspondants, **12e** et **13e**, en présence d'azoture de sodium. Au bilan, la voie de synthèse des précurseurs après optimisation a été effectuée avec des rendements globaux pour **12e** et **13e** de 93% et 68% respectivement.

La synthèse d'un précurseur analogue à **12e** et **13e** comportant l'azoture en position *ortho* a aussi été envisagée. Elle n'a pu aboutir car elle s'est heurtée à la dégradation du composé majoritaire obtenu dans l'étape de déprotection de l'anisole (Schéma 28). Par manque de temps, nous avons fait le choix d'abandonner la synthèse de ce précurseur.

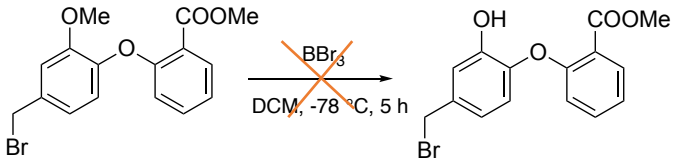


Schéma 28 : étape limitante de la préparation du monoazoture en position *ortho*.

II.A.4 Synthèse des précurseurs dialcynes

Notre stratégie de synthèse des ligands acycliques a été de travailler avec un bis-alcyne monoprotégé afin d'éviter toutes réactions secondaires, notamment la dégradation possible de l'alcyne libre.

La monoprotection du 1,9-décadiyne avec le chlorotriisopropylsilane en présence de bis(triméthylsilylamidure) de lithium (LiHMDS) conduit au composé **14a** (Schéma 29).

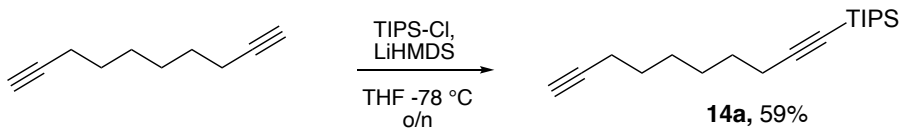


Schéma 29 : monoprotection du 1,9-décadiyne pour former **14a**.

L'optimisation de cette réaction, utilisant les conditions expérimentales reportées dans le Tableau 17 ci-dessous, a été effectuée pour conduire au meilleur rendement de 59%. En effet, nous avons dans un premier temps mis en œuvre sans succès le protocole de Toutov[273]. Ce protocole fait intervenir le 1,9-décadiyne, et le méthylphénylsilane en présence d'hydroxyde de potassium dans le diméthoxyéthane à 65 °C pendant 48 heures. Dans un deuxième essai, le méthylphénylsilane a été remplacé par le triisopropylsilane mais seul le produit de départ a été récupéré en fin de manipulation. Nous avons ensuite opté pour le n-butyllithium comme base dans le tétrahydrofurane. Ce protocole a permis l'obtention d'un mélange comportant le produit de départ et le produit désiré **14a**, ce dernier se dégradant lors de la purification. Par la suite, nous avons changé de groupement protecteur. Ainsi, le dernier protocole a été reproduit avec le chlorotriisopropylsilane mais là aussi, seul le produit de départ était récupéré. Enfin, nous avons utilisé le protocole de Kral[274] permettant la monoprotection d'un dialcyne par le chlorotriméthylsilane en présence de bis(triméthylsilylamidure) de lithium dans le tétrahydrofurane. Ces conditions testées en remplaçant le chlorotriméthylsilane par le chlorotriisopropylsilane ont abouti au composé désiré. Il est à noter que le composé monoprotégé majoritaire est associé au produit diprotégé dans un ratio 78:22 qui nous a paru convenable.

Groupement protecteur	Conditions	Résultats
$PhMe_2SiH$ / TIPS-H	KOH (10% mol) DME, argon, 65 °C	Produit de départ
TIPS-H	nBuLi, THF, argon, -78 °C	Mélange produit de départ et produit final, dégradé sur colonne de purification
TMS-Cl	LiHMDS THF, argon, -78 °C	30% de produit désiré
TIPS-Cl	LiHMDS THF, argon, -78 °C	51% de produit désiré **14a** 14% de produit diprotégé

Tableau 17 : récapitulatif des essais de monoprotection du dialcyne 14a.

La préparation des précurseurs avec un noyau carbazole a été faite en 2 étapes à partir du 2-hydroxycarbazole (Schéma 30).

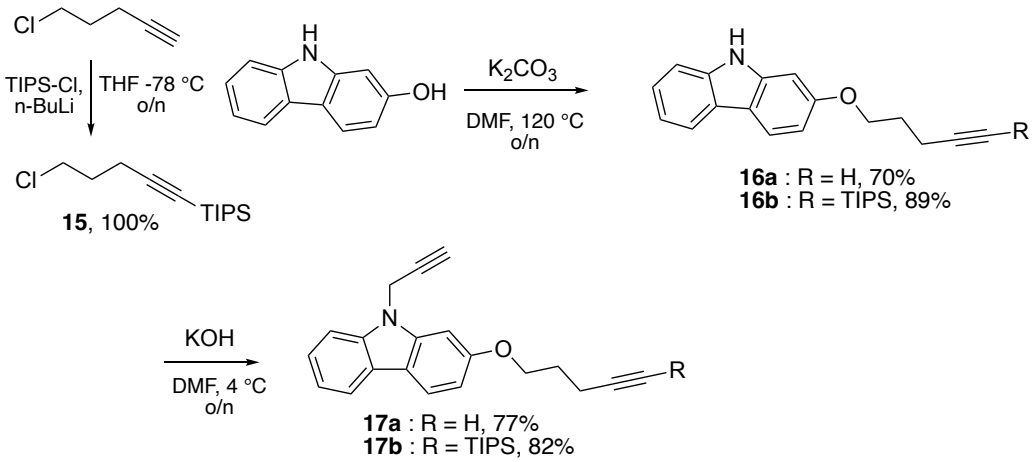


Schéma 30 : schéma réactionnel de formation des précurseurs bis-alcyne **17a** et monoprotégé **17b**.

Dans la première étape, ce composé est mis en réaction avec le 5-chloro-1-pentyne ou avec le composé **15** résultant lui-même de la protection quantitative du 5-chloro-1-pentyne par le chlorotriisopropylsilane en présence de n-butyllithium. La réaction réalisée en présence de carbonate de potassium dans le *N,N*-diméthylformamide à 120 °C conduit aux alcynyl carbazoles correspondants **16a** et **16b** avec des rendements respectifs de 70 et 89%.

Cette étape d'alkylation entre le 2-hydroxycarbazole et les composés chlorés a été optimisée, les différentes conditions sont décrites dans le Tableau 18. Seules les dernières conditions étudiées impliquant le carbonate de potassium dans le *N,N*- diméthylformamide à 80 °C ont conduit au produit désiré avec 89% de rendement.

Conditions	Résultats
Bu_4NHSO_4, 0.01 eq, dérivé chloré K_2CO_3, AcOEt, 77 °C	Produit de départ
Dérivé chloré K_2CO_3, DMF, TA	Produit de départ
Dérivé chloré K_2CO_3, DMF, 80 °C	89% de produit désiré

Tableau 18 : récapitulatif des essais d'alkylation du 2-hydrocarbazole.

La deuxième étape consiste à introduire la deuxième fonction alcyne par une substitution nucléophile avec le bromure de propargyle. Elle a conduit aux précurseurs **17a** et **17b**.

Les derniers précurseurs composés d'un noyau aromatique **18a** et **18b** ont été préparés en reprenant un protocole déjà décrit pour la formation de **18a** et par la monoprotection de celui-ci pour conduire à l'obtention de **18b**. Pour cette monoprotection, le protocole optimisé pour **14a** a permis la formation du produit **18b** avec un rendement de 47%. Au bilan, les précurseurs alcynes **14a**, **17a**, **17b** et **18b** ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs de 59%, 54%, 54% et 47% (Schéma 31).

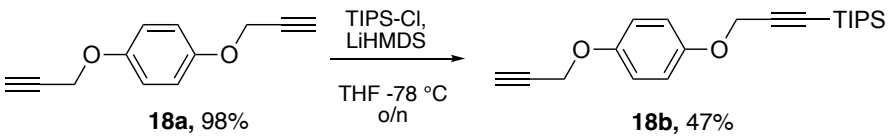


Schéma 31 : synthèse des précurseurs bis-alcyne **18a** et monoprotégé **18b.**

II.A.5 Synthèse des ligands acycliques monophénols

Les six ligands acycliques monophénols synthétisés par voie « non symétrique » ont été préparés en cinq étapes (Schéma 32). La cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC) entre les monoazotures **12e** et **13e** et les dialcynes monoprotégés **14a**, **16b** et **18b** a permis la formation des régioisomères *anti* **19a-f** avec des rendements satisfaisants variant de 76% à 92%**.** L'étape de réduction de l'ester en alcool a été optimisée. En effet, dans un premier temps, nous avons essayé de réduire cet ester en présence de tétrahydruroaluminate de lithium ($LiAlH_4$) mais soit le produit de départ était récupéré, soit les rendements étaient très faibles (de l'ordre de 10%). Différents essais d'optimisation qui ont consisté à faire varier les quantités et la nature du réducteur et la température de réaction se sont révélés vains. Finalement, nous avons opté pour l'hydrure de diisobutylaluminium comme agent réducteur, ce qui a permis l'obtention des produits réduits **20a-f** avec de meilleurs rendements, 82-98%, excepté pour le produit **20d**. Les produits ainsi réduits ont été bromés en présence de tétrabromure de carbone et de triphénylphosphine. Cette réaction constitue l'étape limitante de la séquence car les rendements obtenus sont très variables et une dégradation des produits a été observée. Pour éviter toute perte de produit, le produit bromé purifié a été engagé directement dans l'étape d'azoturation selon le protocole précédemment cité pour former les produits **21a-f** avec des rendements compris entre 32% et 78%. La dernière étape consiste en la déprotection de l'alcyne par le fluorure de tétrabutylammonium qui a conduit aux produits ouverts **C01**, **C02**, **C04**, **C05**, **C07** et **C08** avec des rendements globaux respectifs de 18%, 28%, 27%, 3%, 25% et 10% sur les dix étapes de synthèse.

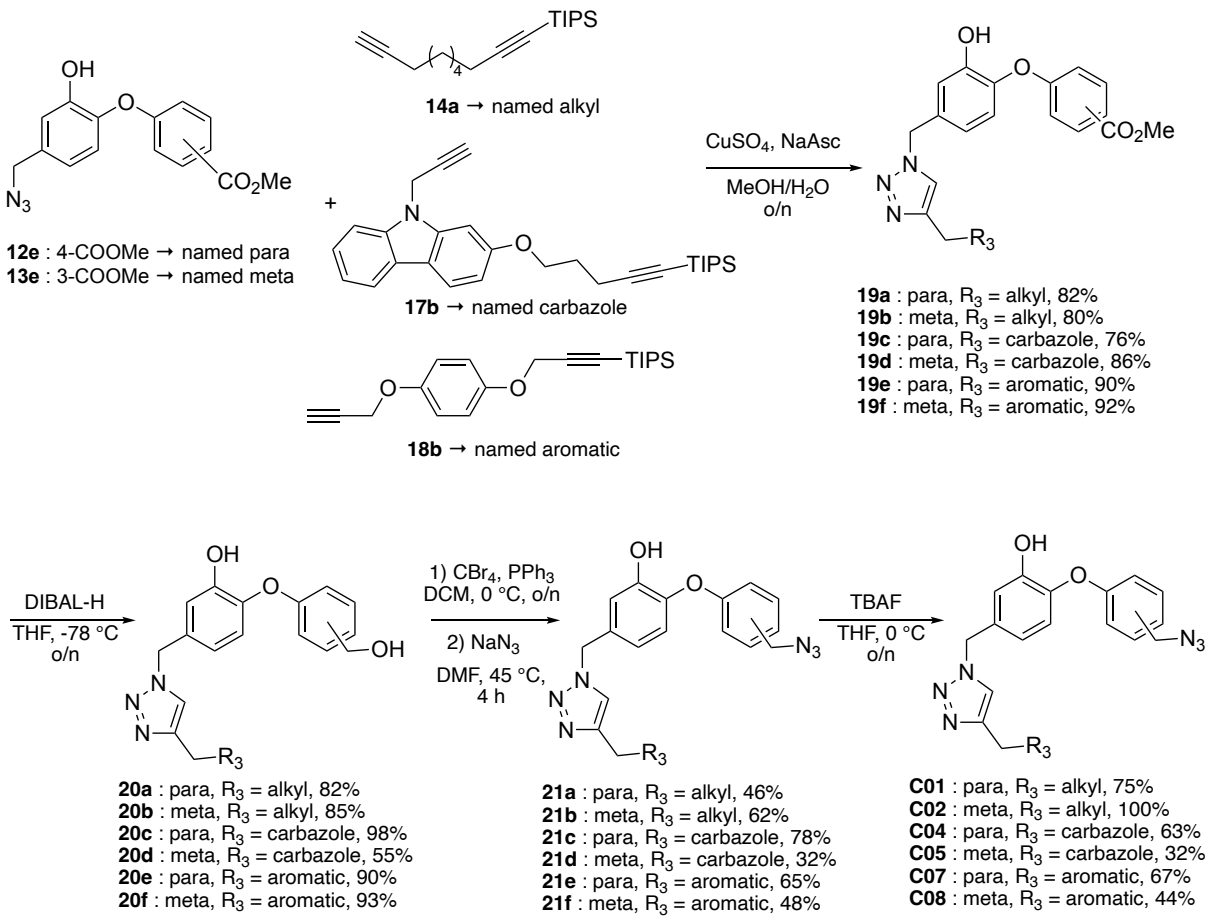


Schéma 32 : synthèse des ligands acycliques **C01**, **C02**, **C04**, **C05**, **C07** et **C08**.

II.A.6 Synthèse des ligands acycliques diphénols et des macrocycles

Deux protocoles alternatifs étaient possibles pour la formation des macrocycles, d'une part une cyclisation intramoléculaire des précurseurs ouverts précédemment décrits et, d'autre part, une cyclisation par double chimie click, plus intéressante car une seule étape suffit pour former les macrocycles. Nous avons indiqué plus haut que nous avions observé la formation de macrocycles lors de la synthèse des précurseurs bis-azotures. Quelques publications traitent des réactions de double click, notamment celle de Cruz-Lopez *et al* dans laquelle est décrit un protocole utilisant l'iodure de cuivre, l'ascorbate de sodium et la triéthylamine dans un mélange dioxane eau, permettant d'obtenir un macrocycle avec 23% de rendement[275]. Dans un premier temps, nous avons appliqué ces conditions pour la macrocyclisation de nos composés mais les résultats se sont révélés décevants car seuls les produits de départ étaient récupérés. Nous nous sommes ensuite intéressés au travail de Chouhan et James[276] qui ont étudié une cyclisation intramoléculaire par CuAAC en testant différentes sources de cuivre, de solvants et de ligands. Nous avons repris les conditions optimales décrites par ces auteurs : ligand acyclique à une concentration de 0,02 M, $Cu(ACN)_4BF_4$ ou $Cu(ACN)_4PF_6$ (5 mol%), TBTA (5 mol%) dans le dichlorométhane à 55 °C, que nous avons appliquées au diazoture **11e** et aux dialcynes : **1,9-décadiyne** et **18a** pour former respectivement **M01,** avec un rendement de 70%, et **M07**, avec un rendement beaucoup plus faible (16%). L'analogue méthoxy **M10** a, quant à lui, été obtenu avec un

rendement de 35% en faisant intervenir dans la réaction le composé **11'e** et le **1,9-décadiyne** (Schéma 33).

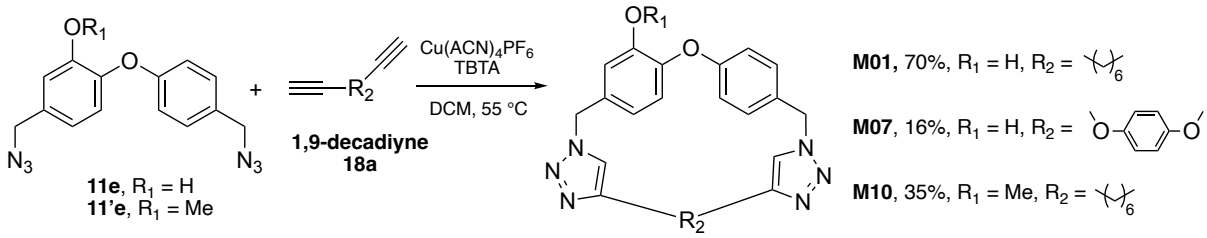


Schéma 33 : synthèse des macrocycles **M01**, **M07** et **M10**.

Il est à noter que lors de cette double click, les produits de départ n'ayant pas réagi et les produits mono-clickés ouverts sont aussi récupérés en fin de réaction, en plus des macrocycles attendus. Dans le cas du diazoture diphénol, qui est symétrique, cela nous a permis d'obtenir en « *one pot* » le produit mono-clické ouvert et le macrocycle.

Les additions entre le diazoture **10e** et les alcynes **1,9-décadiyne** et **18a** ont permis l'obtention des macrocycles **M03** et **M09** avec des rendements respectifs de 28% et de 33% et les ligands acycliques **C03** et **C09** avec de faibles rendements (10% et 15%, respectivement). La réaction mettant en jeu le diazoture **10e** et l'alcyne carbazole **17a** conduit au macrocycle **M06** avec un rendement de 23% (Schéma 34).

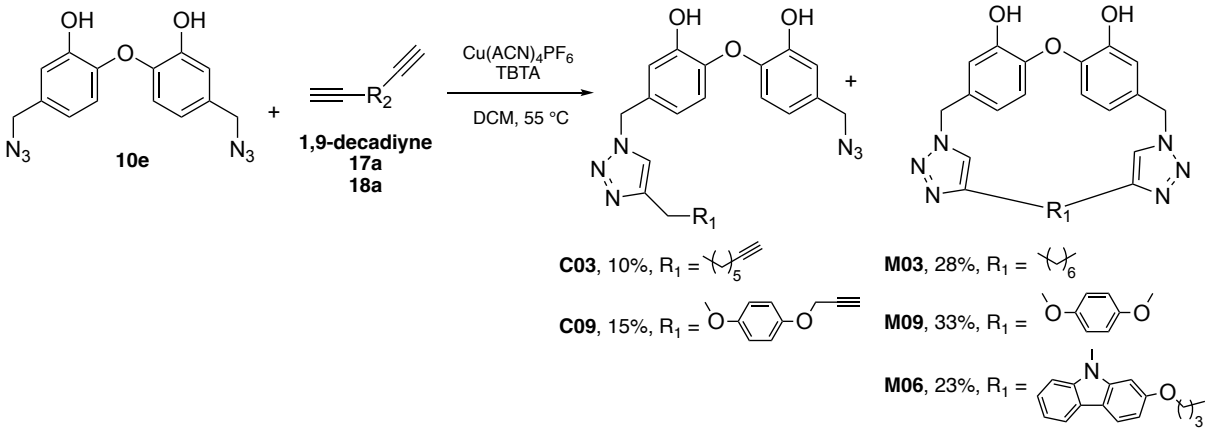


Schéma 34 : synthèse des ligands acycliques **C03** et **C09** et des macrocycles **M03**, **M06** et **M09**.

L'alcyne **17a** n'étant pas symétrique, les deux isomères ouverts non séparables sont formés (Figure 97). Une étape intermédiaire de monoclick entre le diazoture **10e** et l'alcyne monoprotégé **17b** était donc nécessaire pour former le ligand ouvert **21g** dont la fonction alcyne a ensuite été déprotégée pour former le composé **C06** avec un rendement global de 32% pour ces deux étapes (Schéma 35).

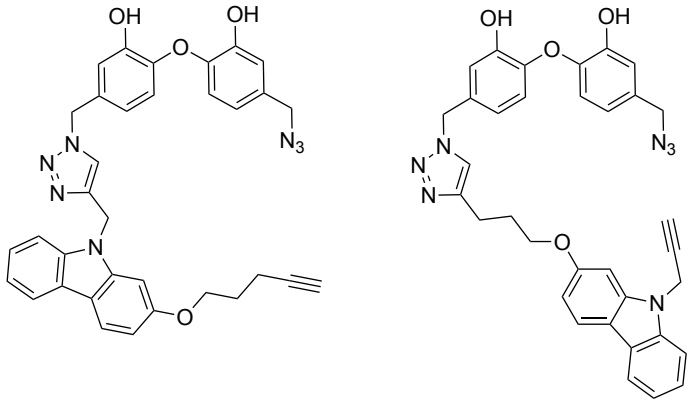


Figure 97 : structures chimiques des isomères obtenus lors de la réaction entre le diazoture **10e** et le dialcyne **17a**.

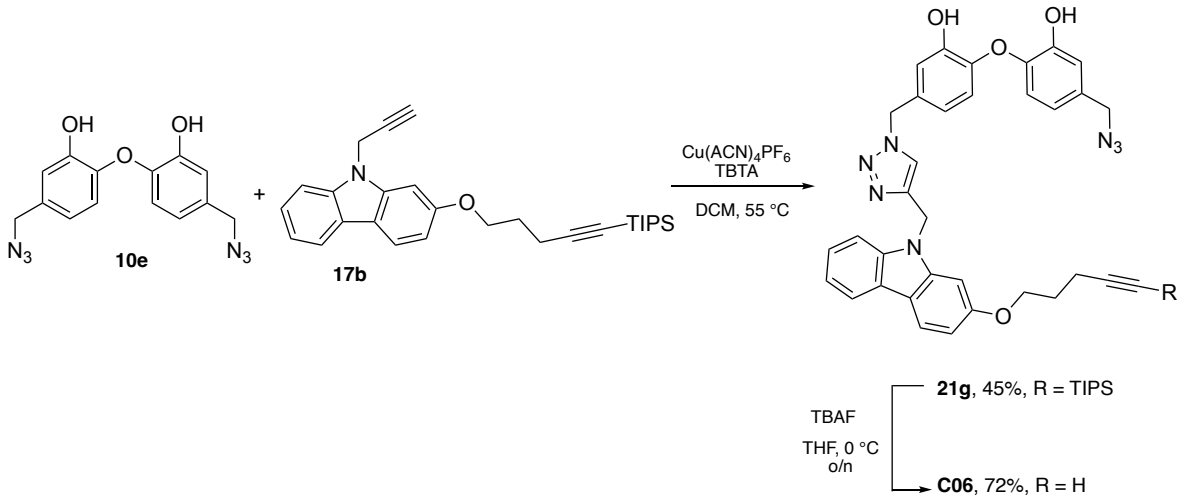


Schéma 35 : synthèse du ligand acyclique **C06**.

Le dernier macrocycle **M02** a été obtenu à partir du ligand acyclique **C02** par CuAAC intramoléculaire avec un très bon rendement (83%) (Schéma 36). Aucune synthèse de diazoture en *méta* n'a été entreprise, par manque de temps.

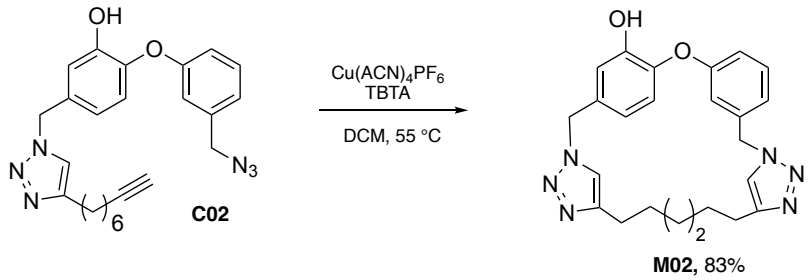


Schéma 36 : synthèse de **M02** par CuAAC intramoléculaire de **C02**.

Le macrocycle dérivé de **C04** n'a pas été synthétisé car en suivant le protocole de double click entre le diazoture **13e** et **17a**, nous avons obtenu un mélange d'isomères impossibles à séparer (Figure 98), le ligand acyclique **C04** n'était pas disponible en grande quantité, nous avons préféré en garder pour des tests ultérieurs.

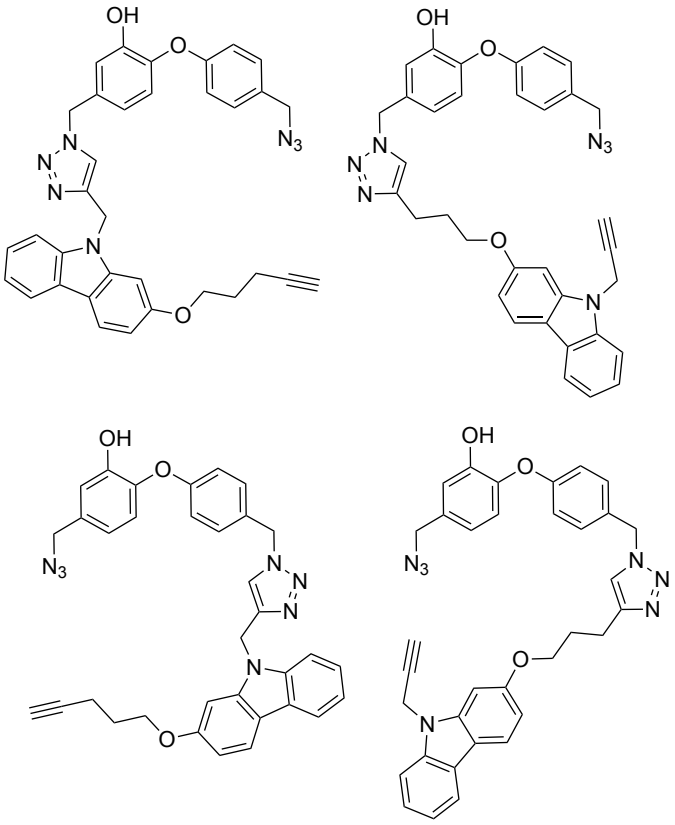


Figure 98 : structures chimiques des isomères possibles obtenus lors de la réaction entre le diazoture **13e** et le dialcyne **17a**.

Dans le tableau suivant (Tableau 19) sont répertoriées toutes les molécules acycliques et macrocycliques synthétisées dans ce projet.

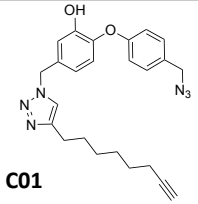
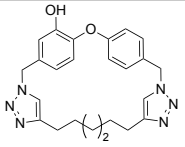
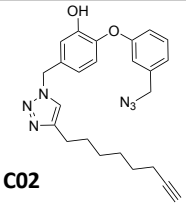
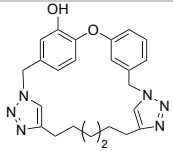
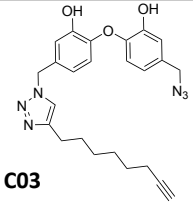
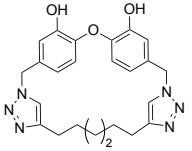
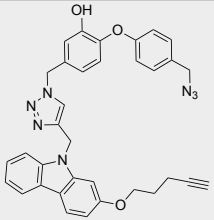
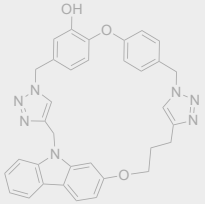
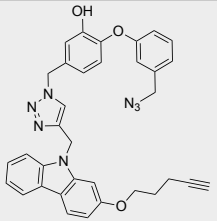
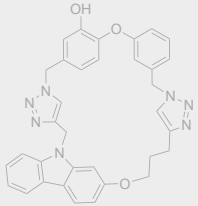
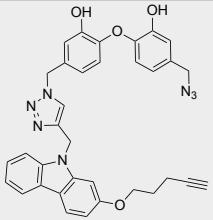
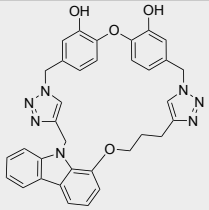
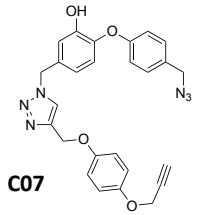
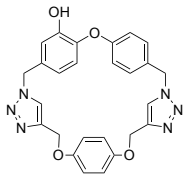
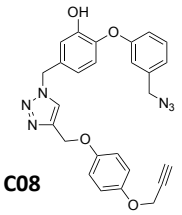
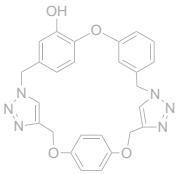
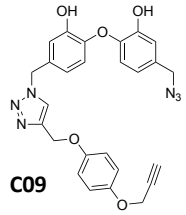
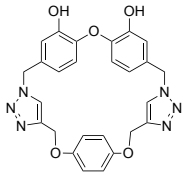
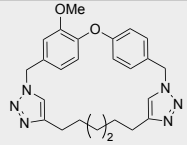
Ligand acyclique	Macrocycle	Ligand acyclique	Macrocycle	Ligand acyclique	Macrocycle
Position *para*		**Position *méta***		**Position para / diphényl**	
 **C01**	 **M01**	 **C02**	 **M02**	 **C03**	 **M03**
 **C04**	 Analogue non synthétisé	 **C05**	 Analogue non synthétisé	 **C06**	 **M06**
 **C07**	 **M07**	 **C08**	 Analogue non synthétisé	 **C09**	 **M09**
	 **M10**				

Tableau 19 : structures chimiques des ligands acycliques et macrocycliques synthétisés dans le projet.

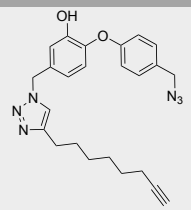
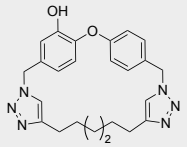
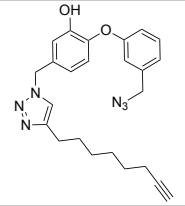
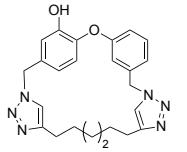
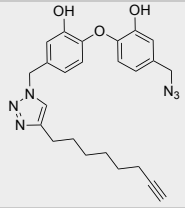
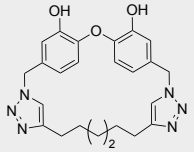
II.B Inhibition de l'activité enzymatique d'InhA

Une campagne de tests enzymatiques a été effectuée afin d'évaluer le potentiel inhibiteur des composés acycliques et des analogues macrocycliques vis-à-vis de la protéine InhA. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant (Tableau 20).

Les composés acycliques **C01-9** ont montré une bonne inhibition avec des IC_{50} compris entre 114 nM pour le plus actif et 3 µM pour le moins actif. Les composés acycliques peuvent être divisés en trois séries, la série comprenant la chaîne alkyle (**C01**, **C02** et **C03**), celle avec le noyau carbazole avec les ligands **C04**, **C05** et **C06** et la troisième correspondant au noyau aromatique. La première série est la plus inhibitrice notamment avec les composés **C01** et **C02** montrant des IC_{50} de 250 et 114 nM respectivement. L'activité de la deuxième série a été difficile à déterminer car les composés sont très peu solubles expliquant les grandes marges d'erreur. Le composé diphénol **C06** est le meilleur de cette série avec un IC_{50} de 384 nM ce qui le rend meilleur que **C03**. Enfin la troisième série composée de **C07**, **C08** et **C09** montre une disparité dans les activités inhibitrices, le ligand **C07** a un IC_{50} de 279 nM alors que les valeurs d'IC_{50} de **C08** et **C09** sont de 3,0 µM et 2,6 µM, respectivement, ce qui en fait les moins bons de la série totale des ligands acycliques. Nous n'observons pas de corrélation entre les structures chimiques et les activités vis-à-vis de la protéine InhA.

Les analogues macrocycliques ont montré une inhibition faible. À 50 µM, un maximum de 50% d'inhibition est obtenu pour les composé **M01** et **M02** et une inhibition autour de 30% pour **M03**, **M06**, **M07** et **M09**. L'activité du macrocycle **M10** n'a pas pu être déterminée en raison de problème de solubilité.

L'hypothèse formulée en introduction que les ligands acycliques pourraient mieux se lier dans le site actif de InhA que leurs analogues macrocycliques semble être confirmée par ces résultats.

Ligand acyclique	Structure	IC_{50} InhA (nM)*	Macrocycle	Structure	% inhibition sur InhA à la concentration testée
C01		250 ± 30 nM	**M01**		54% d'inhibition à 50 µM
C02		114 ± 37 nM	**M02**		52% d'inhibition à 50 µM
C03		540 ± 50 nM	**M03**		24% d'inhibition à 50 µM

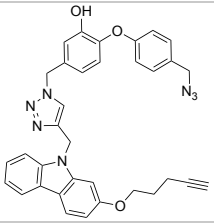
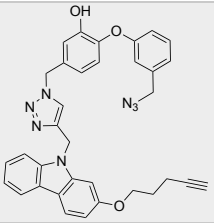
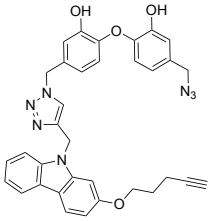
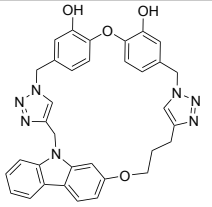
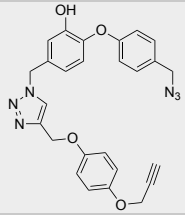
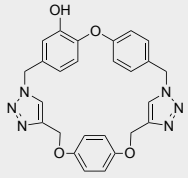
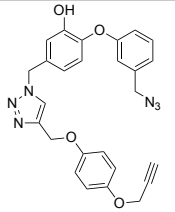
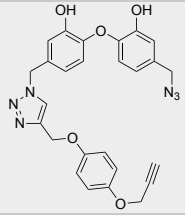
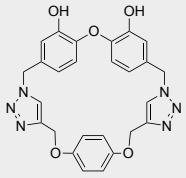
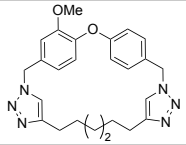
C04		826 ± 600 nM	**/**		
C05		60% d'inhibition à 1 µM	**/**		
C06		384 ± 158 nM	**M06**		27% d'inhibition à 50 µM
C07		279 ± 70 nM	**M07**		32% d'inhibition à 50 µM
C08		3000 ± 700 nM	**/**		
C09		2600 ± 200 nM	**M09**		38% d'inhibition à 50 µM
			M10		Non soluble

Tableau 20 : récapitulatif des activités inhibitrices des molécules acycliques et macrocycliques.
*** ou % à la concentration testée.**

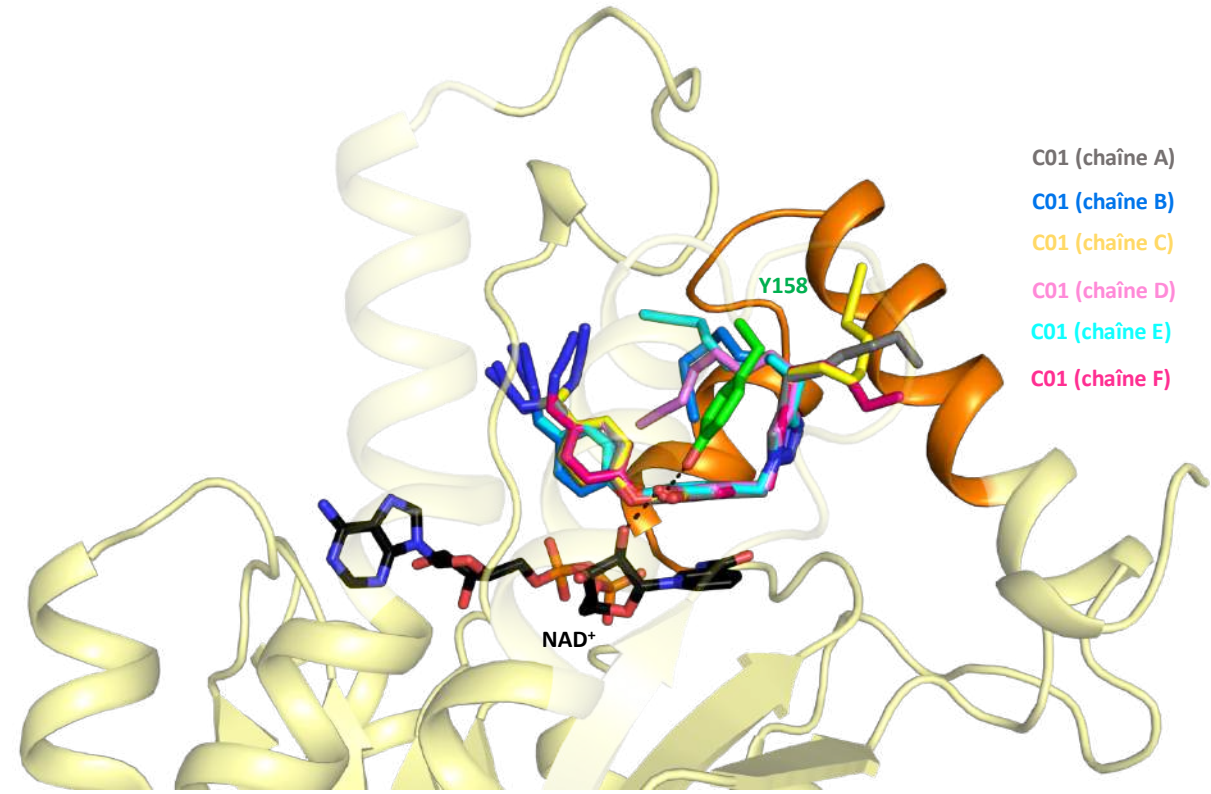
II.C Cristallographie aux rayons X

Dans le concept de macrocyclisation *in situ*, la cristallographie aux rayons X est un outil potentiellement intéressant puisqu'elle va permettre, par la description de la position du ligand dans le site actif, d'évaluer la possibilité de réaction *in situ*. Une campagne de cristallisation a été effectuée sur toutes les molécules de la série. La faible solubilité des composés a rendu la cristallisation difficile. Des cristaux ont été obtenus par co-cristallisation en présence du cofacteur NAD^+ et des ligands **C01**, **C02** et **C04** avec le PEG4000 comme agent précipitant.

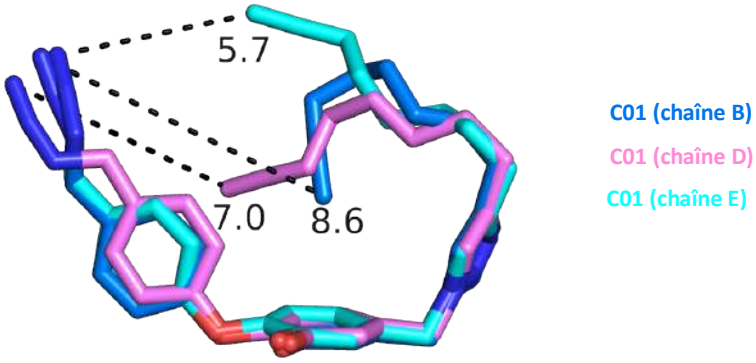
Les structures cristallographiques des complexes InhA/NAD^+/**C01**, InhA/NAD^+/**C02** et InhA/NAD^+/**C04** ont été résolues après incubation en présence du cofacteur NAD^+ aux résolutions de 1,7 Å, 1,6 Å et 1,9 Å respectivement. Le complexe InhA/NAD^+/**C01** cristallise dans le groupe d'espace $C222_1$ avec comme paramètres de maille a = 81.731 Å, b = 100.285 Å, c = 374.815 Å, α = 90.00°, β = 90.00°, γ = 90.00°. Quant aux complexes InhA/NAD^+/**C02** et InhA/NAD^+/**C04**, ils cristallisent dans le groupe d'espace *C*2 avec comme paramètres a = 100.7 Å, b = 82.5 Å, c = 190.3 Å, α = 90.00°, β = 95.5°, γ = 90.00° et a = 99.4 Å, b = 82.1 Å, c = 188.6 Å, α = 90.00°, β = 95.5°, γ = 90.00° respectivement. Les trois formes cristallines présentent 6 chaînes dans l'unité asymétrique.

Pour les trois ligands co-cristallisés, le noyau biaryléther adopte une conformation identique à celle canoniquement observée. On observe une interaction de type π-stacking avec le noyau nicotinamide et une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158. Le noyau triazole se superpose exactement aux autres molécules contenant un triazole décrites dans la PDB pour InhA et se positionne à 90° du phénol du biaryléther. Les structures ont montré du désordre au niveau de la SBL qui n'est pas complète.

Le ligand **C01** montre des résultats encourageants quant à la possibilité de macrocyclisation *in situ*. Le ligand est observé dans les six chaînes de l'unité asymétrique. Nous observons plusieurs conformations du ligand acyclique dues à la flexibilité de la chaîne alkyle. Sur trois des chaînes protéiques, la chaîne alkyle se lie principalement dans le portail mineur et est engagée dans des interactions avec les résidus Leu217 et Leu218 et la SBL est en conformation fermée. Dans ce cas, il paraît difficile de prévoir une macrocyclisation *in situ* car les fonctions alcyne et azoture sont trop éloignées pour réagir (Figure 99). En revanche, nous pouvons observer que pour les trois autres chaînes de l'unité asymétrique, la chaîne alkyle se replie en adoptant une conformation similaire à celle de l'analogue du substrat **THT** et la SBL est en position ouverte. Les fonctions alcynes et azoture se trouvent au mieux à une distance de 7,8 Å ; ainsi une macrocyclisation peut être difficilement envisageable (Figure 100).



a.



b.

Figure 99 : structure de InhA en présence du composé **C01**. a. Superposition des 6 protomères de la structure. Chaîne A, **C01** en gris, chaîne B, **C01** en marine, chaîne C, **C01** en jaune, chaîne D en jaune, **C01** en rose, chaîne E, **C01** en cyan et chaîne F, **C01** en hotpink. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 3 molécules de l'unité asymétrique.

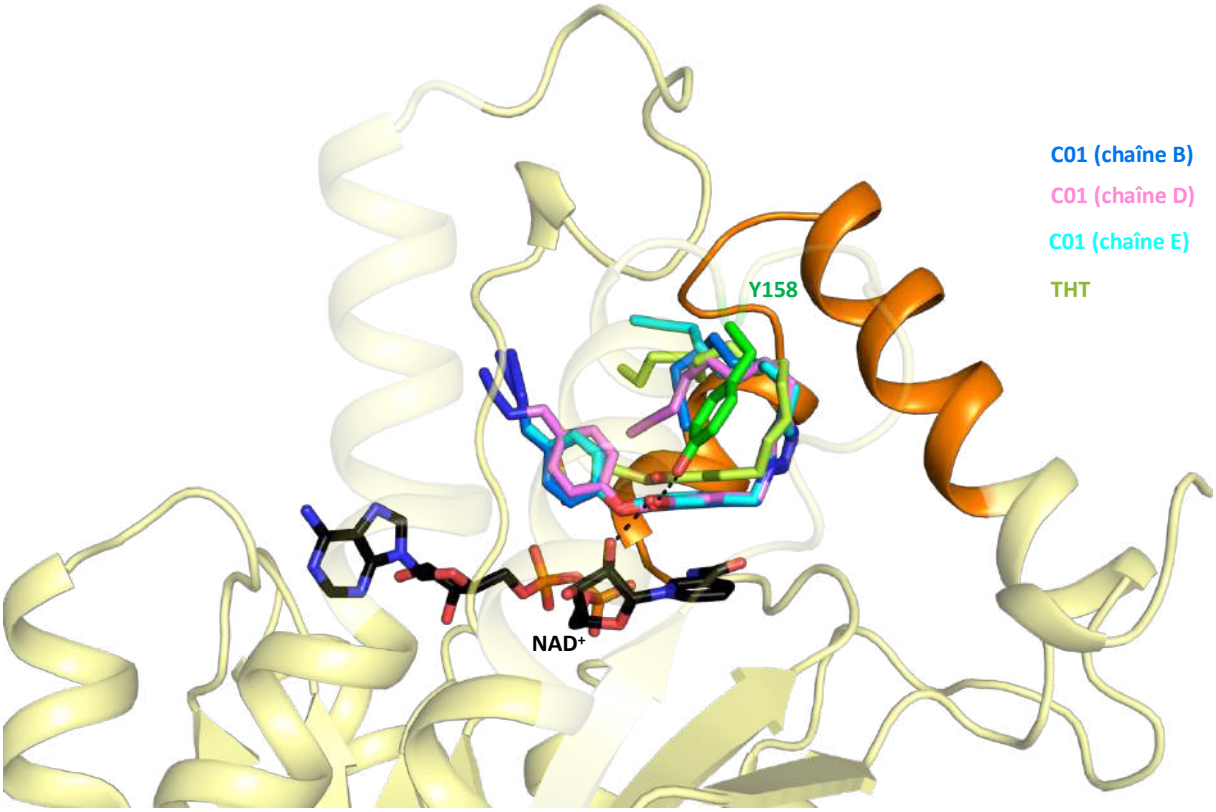


Figure 100 : superposition de 3 protomères de la structure et de la molécule de **THT**. Chaîne B, **C01** en marine, chaîne C, **C01** en jaune, chaîne E, **C01** en cyan et InhA/NAD(H)/**THT** (1BVR-A, **THT** en vert). Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

Le ligand **C02** a pu être reconstruit complètement dans cinq chaînes de l'unité asymétrique et adopte les conformations assez proches de **C01** (Figure 101). Dans une chaîne de l'unité asymétrique, la chaîne alkyle se lie dans le portail mineur et est engagée dans des interactions de van de Waals avec les résidus Leu217 et Leu218, cette conformation rappelle la chaîne C du complexe InhA/NAD^+/**C01**. En revanche, nous observons que la chaîne carbonée des quatre autres chaînes protéiques se replie dans le portail majeur adoptant une conformation similaire à le chaîne D du complexe InhA/NAD^+/**C01**. Néanmoins, nous observons de la flexibilité de cette chaîne, ce qui suggère une dynamique dans le site actif. Cette flexibilité permet de rapprocher l'alcyne de la fonction azoture positionnée en *méta* ; les deux fonctions se trouvent au mieux à 4,7 Å de distance. La superposition des ligands des chaînes A, B, C et F permet de montrer que potentiellement les fonctions alcyne et azoture peuvent se rapprocher un peu plus et nous pouvons alors envisager une macrocyclisation *in situ* avec ce ligand acyclique (Figure 102).

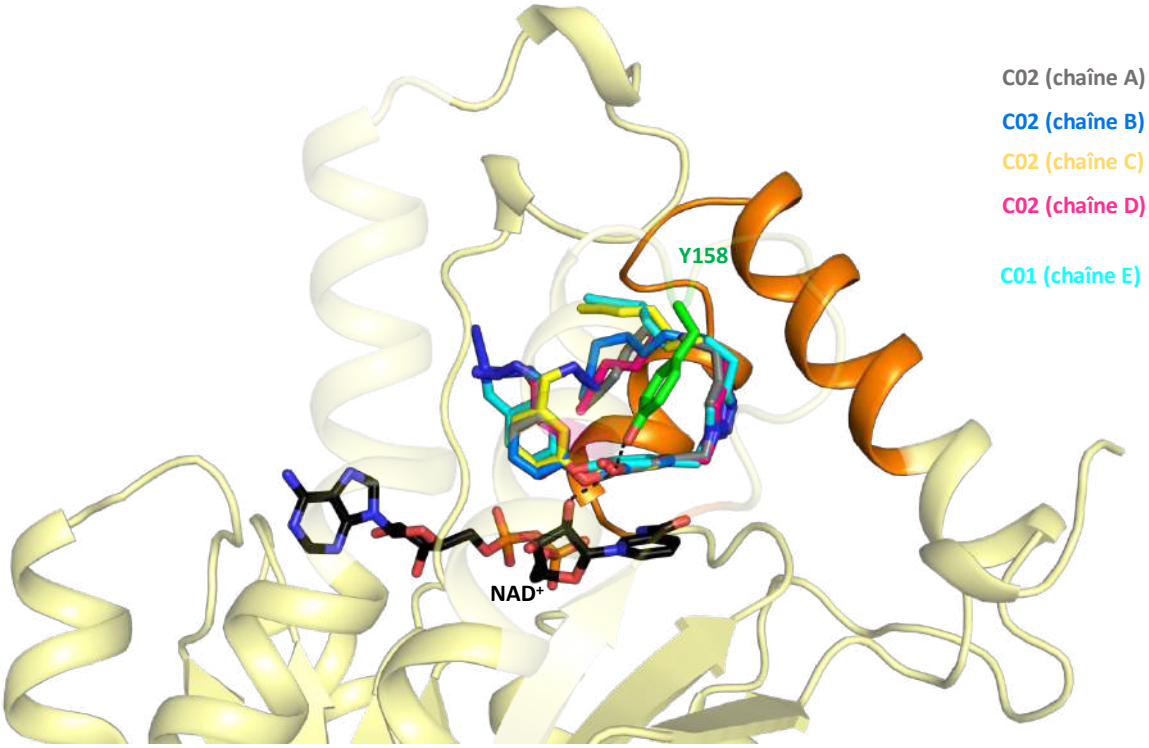


Figure 101 : superposition de 4 protomères de la structure de **C02** et de la molécule de **C01**. Chaîne A, **C02** en gris, chaîne B, **C02** en marine, chaîne C, **C02** en jaune, chaine D, **C02** en hotpink et chaîne E, **C01** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.

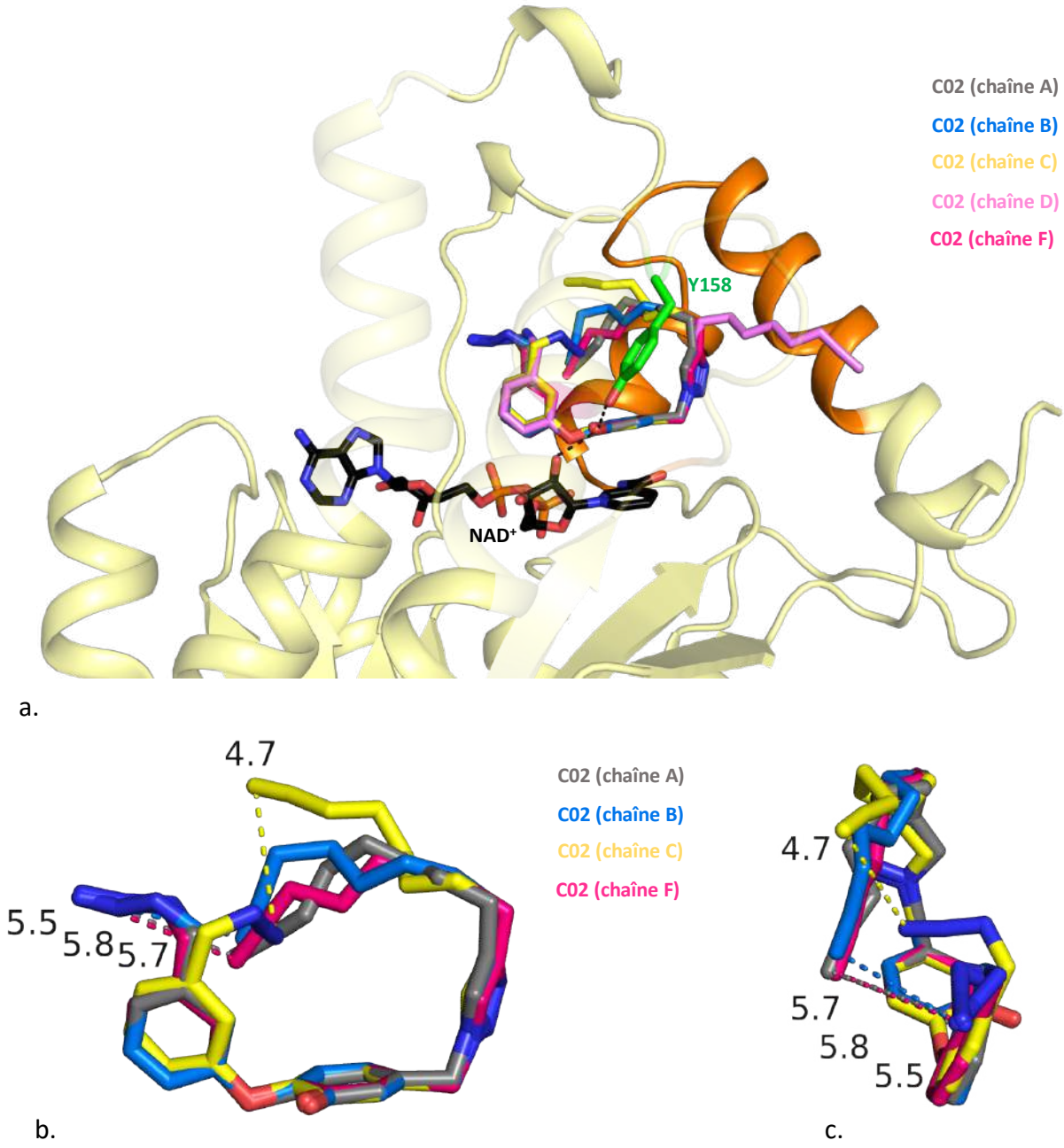


Figure 102 : structure de InhA en présence du composé **C02**. a. Superposition des 5 protomères de la structure. Chaîne A, **C02** en gris, chaîne B, **C02** en marine, chaîne C, **C02** en jaune, chaîne D en jaune, **C02** en rose et chaîne F, **C02** en hotpink. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 3 molécules de l'unité asymétrique. c. rotation de 45° de l'image b.

Enfin, le ligand **C04** contenant le motif carbazole est observé dans deux des six chaînes de l'unité asymétrique. La SBL est incomplète. Le motif carbazole se superpose exactement avec le carbazole du composé **9b**, décrit dans le chapitre 2 et interagit avec le résidu Leu215. La chaîne alkyle greffée sur le groupe carbazole adopte deux conformations. Dans l'une d'entre elles, elle pointe vers le haut du site actif au niveau des résidus du portail mineur et fait une interaction de van der Waals avec l'alanine 157. Une autre conformation montre un repliement de la chaîne alkyle au niveau du site actif, se rapprochant ainsi de la conformation du **THT**. Cependant, dans cette conformation la distance entre l'azoture et l'alcyne serait beaucoup trop longue (8 Å) pour envisager une macrocyclisation *in situ* (Figure 103).

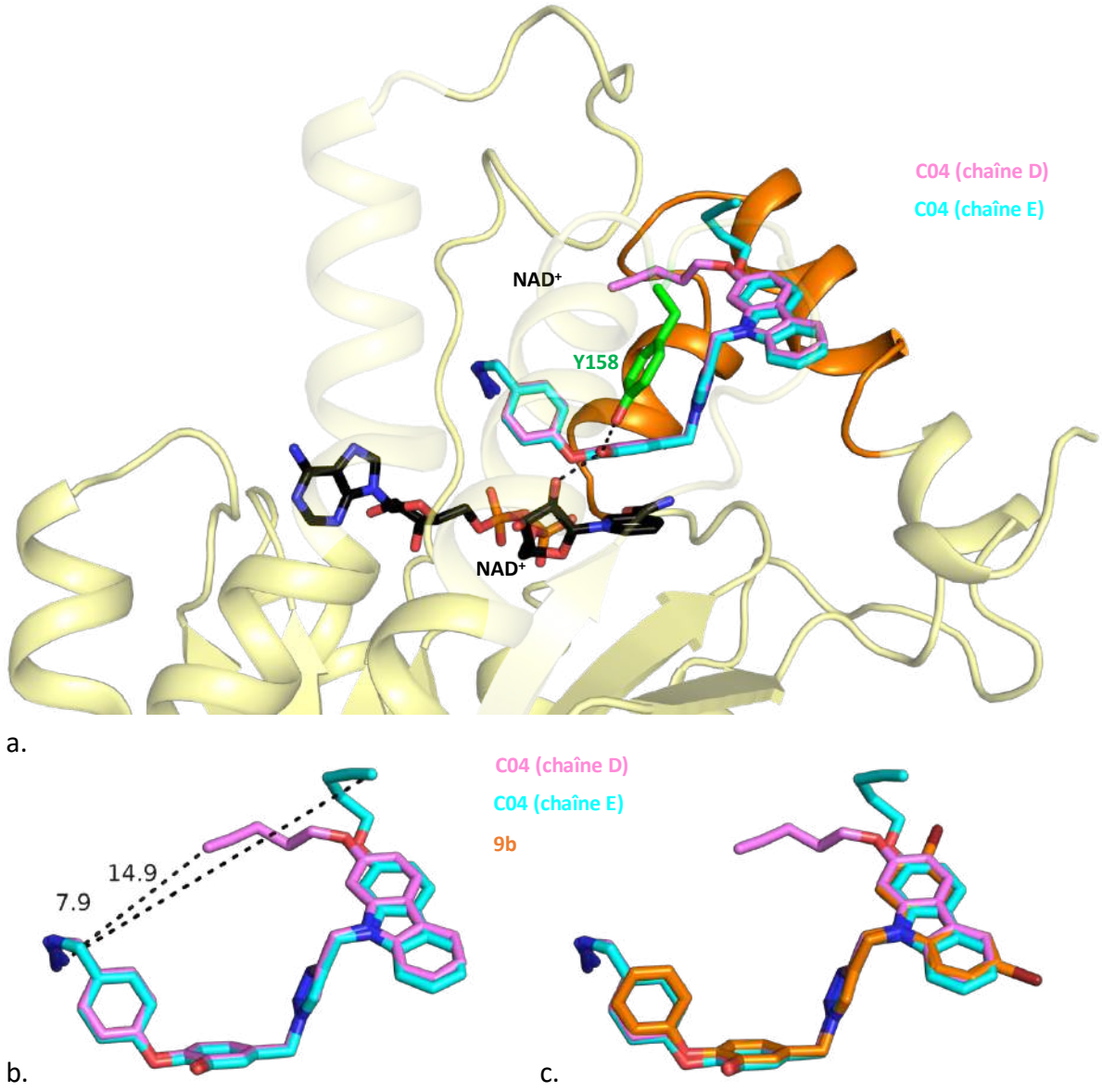
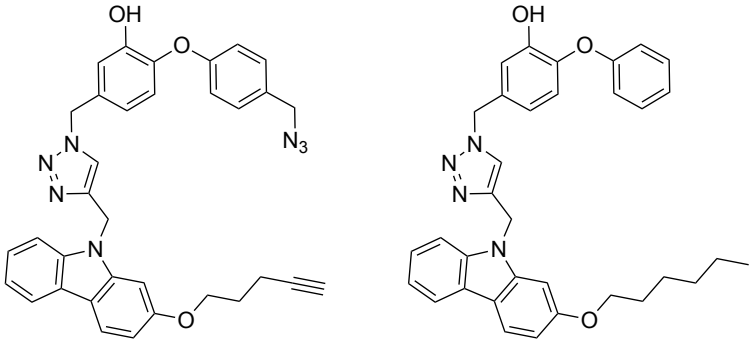


Figure 103 : structure de InhA en présence du composé **C04**. a. Superposition des 2 protomères de la structure. Chaîne D, **C04** en rose et chaîne E, **C04** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 2 molécules de l'unité asymétrique. c. Vues avec zoom montrant la superposition des ligands **C04** et **9b**.

Les trois structures à haute résolution obtenues ont permis d'étudier le mode de liaison de ces ligands acycliques au sein du site actif de InhA et ainsi donnent des indications sur la faisabilité de la macrocyclisation *in situ*. Nous avons remarqué que les chaînes alkyles adoptent plusieurs conformations, démontrant une certaine flexibilité. Le noyau carbazole du ligand **C04** présente une conformation similaire à celle du composé **9b** (voir le chapitre 2) suggérant une seule conformation de ce noyau. La chaîne comportant l'alcyne se replie dans le site actif, cependant elle est bien trop courte pour permettre la réaction *in situ*. Pour envisager une macrocyclisation, il est donc impératif d'augmenter la taille des chaînes alkyles et la position *méta* de l'azoture peut être favorisée. Le composé **9h** (Figure 104), étudié dans le chapitre 2, est un analogue du ligand acyclique **C04** avec un carbone supplémentaire sur la chaîne alkyle, ce composé s'est révélé être beaucoup moins bon inhibiteur que **C04** (IC_{50} = 4860 nM *vs* 826 nM) (Figure 104). Il faudra veiller à vérifier l'activité inhibitrice des ligands comportant une chaîne plus longue avant d'étendre cette famille à une bibliothèque d'analogues plus conséquente.



C04
IC_{50} = 826 nM

9h
IC_{50} = 4860 nM

Figure 104 : structures chimiques des composés **C04** et **9h** et les activités inhibitrices contre InhA de Mtb.

Les ligands comportant le noyau aromatique (**C07**, **C08** et **C09**) n'ayant pas conduit à la formation de cristaux, il est difficile – sans information structurale – d'émettre une hypothèse quant à la faisabilité d'une macrocyclisation *in situ*.

III Conclusion et perspectives

Ce projet, inspiré de l'approche guidée par la cible, en particulier de la KTGS, repose sur un concept novateur de chimie click *in situ* intramoléculaire pour la formation de macrocycles. La littérature fait référence, pour ce concept, à une étude de macrocyclisation intermoléculaire *in situ* à partir de fragments bis-azotures et bis-alcynes[270]. Dans notre étude, les fonctions alcyne et azoture se situent sur la même molécule favorisant ainsi une réaction intramoléculaire.

Au total, neuf ligands acycliques ont été synthétisés montrant des IC_{50} vis-à-vis de l'enzyme InhA variant de 114 nM à 3 µM. Les structures cristallographiques des complexes InhA/NAD^+/**C01**, InhA/NAD^+/**C02** et InhA/NAD^+/**C04** ont permis de visualiser les interactions des ligands avec les résidus du site actif de l'enzyme confirmant le potentiel de la réaction intramoléculaire. Nous observons pour le ligand **C02**

composé d'une chaîne alkyle et de l'azoture en position *méta* qu'une réaction de chimie click *in situ* pourrait avoir lieu dans le site actif. Les chaînes alkyles des composés **C01** et **C02** montrent des flexibilités et un repliement dans le portail majeur, cette conformation permet de rapprocher les fonctions alcyne et azoture suggérant une possible réaction de chimie click *in situ*. L'analyse de la structure cristallographique obtenue avec le ligand **C04** ne permet pas les mêmes conclusions. Le ligand **C04** composé d'un motif carbazole adopte la même conformation que le ligand **9b**, étudié dans le chapitre 2, le noyau carbazole se positionne dans le portail mineur, montrant ainsi une chaîne trop courte pour une réaction intramoléculaire.

Les sept macrocycles synthétisés grâce à une voie de synthèse chimique originale par double click à partir de précurseurs bis-azotures et bis-alcynes ont montré de très faibles inhibitions contre l'enzyme InhA (autour de 30 ou 50% à 50 µM). Dans le cas de la protéine InhA, il vaut mieux travailler avec des précurseurs acycliques moins rigides et plus flexibles.

Enfin, un seul essai de macrocyclisation *in situ* a été lancé dans les mêmes conditions que la KTGS mais n'a montré aucun résultat prometteur, seuls les composés de départ ont été observés. Une réaction intramoléculaire aura lieu plus rapidement qu'une réaction intermoléculaire dans certaines conditions de réaction notamment dans un milieu dilué. Les conditions de la KTGS mettant en pratique une réaction intermoléculaire peuvent être difficilement transposables pour la macrocyclisation *in situ*. Une optimisation de la méthode, notamment les concentrations en ligand et en protéine, pourrait être nécessaire pour évaluer la faisabilité de macrocyclisation de nouveaux composés.

Les perspectives de ce projet sont nombreuses. Les observations effectuées par radiocristallographie aux rayons X suggèrent d'augmenter la taille de la chaîne alkyle pour favoriser un meilleur repliement de cette chaîne et un rapprochement des fonctions alcyne et azoture dans le portail majeur. La voie de synthèse chimique des ligands acycliques monophénols se montre très longue avec un minimum de 11 étapes dont certaines très limitantes. Pour un travail futur, cette voie de synthèse pourrait être améliorée afin de gagner du temps et ainsi pouvoir évaluer plus rapidement la macrocyclisation.

Le docking moléculaire pourrait permettre de modéliser les composés non cristallisés/cristallisables au sein du site actif. Dans ce projet, aucune modélisation n'avait été préalablement effectuée. Les plus de cent structures cristallographiques de InhA déposées dans la PDB montrent que la protéine possède un polymorphisme conformationnel conséquent. De ce fait, il est assez difficile de déterminer avec quelle structure cristallographique de la protéine les calculs de modélisation devraient être effectués. En effet, des premières modélisations avaient été effectuées dans le cadre du projet SCREEN-It et les structures cristallographiques obtenues ont montré des résultats assez différents quant au mode de fixation. Ces résultats suggéraient qu'il était nécessaire d'effectuer cette modélisation sur un plus grand panel de structures cristallographiques existantes, ce qui augmenterait de façon conséquente les temps de calculs et l'analyse des résultats. Dans un projet futur, il peut être envisagé d'effectuer du docking moléculaire avec comme référentiel les structures cristallographiques résolues dans ce projet afin d'avoir une première idée de la taille de la chaîne alkyle à choisir pour optimiser la réaction de macrocyclisation *in situ*. Il serait très informatif d'obtenir les structures cristallographiques des complexes de InhA en présence des composés **C07** et **C08,** et également celles d'au moins une molécule diphénol **C03**, **C06** ou **C09,** afin d'évaluer l'apport du deuxième phénol dans la liaison des composés dans le site actif.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

La tuberculose provoque 10 millions de cas et 1,4 million de décès chaque année. Depuis 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé et tous les États membres de l'ONU se sont engagés à mettre fin à l'épidémie mondiale de tuberculose d'ici 2035. Les cas de résistance aux traitements actuels se sont multipliés, rendant la chimiothérapie souvent inefficace. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pour concevoir de nouvelles familles de molécules actives contre Mtb.

Ce projet de thèse pluridisciplinaire a porté sur la protéine InhA comme cible pour la conception de nouveaux antituberculeux. Cette protéine constitue une cible privilégiée du fait de son rôle spécifique dans le système FAS-II qui permet l'élongation des acides gras au cours de la biosynthèse des acides mycoliques. Les quatre projets présentés ont permis la synthèse et l'évaluation de nouvelles séries de molécules et d'étudier le mode de liaison de ces nouvelles molécules dans le site actif de la protéine par radiocristallographie aux rayons X. Ces molécules sont dérivées du TCL. L'étude des structures cristallographiques correspondantes a confirmé que le noyau biaryléther adoptait une seule conformation dans le site actif de l'enzyme. Le groupement phénol est engagé dans une liaison hydrogène avec le résidu Tyr158 et fait des interactions de type π-stacking avec le noyau nicotinamide du cofacteur NAD(H). Ces informations structurales nous ont guidés dans le développement des nouvelles séries de molécules dérivées du TCL.

La méthode d'hybridation a permis l'étude d'une première famille de molécules fluorescentes ciblant la protéine InhA. Deux composés ressortent de cette étude, le ligand **5i** présentant une bonne inhibition *in vitro* (IC_{50} = 205 nM) et *in vivo* (CMI = 1,25 µM) et dont on a confirmé que InhA était bien sa cible et le ligand **5g** qui est l'inhibiteur le plus puissant de la série à la fois sur la protéine (IC_{50} = 54 nM) et sur la mycobactérie (CMI = 1,25 µM). Par rapport à l'objectif initial, nous n'avons pas pu montrer un potentiel de sondes on/off pour ces composés. Cependant, les structures cristallographiques de InhA en complexe avec ces ligands montrent un mode de liaison original. Au lieu d'adopter une conformation en U permettant d'atteindre le portail majeur, au niveau de la zone hydrophobe (site de liaison II), ces composés adoptent une conformation en S et le fluorophore fait des interactions dans le portail mineur plus exposé au solvant. Cette exposition aux solvants rend incompatible son utilisation en tant que sonde on/off. La méthode de déconstruction-reconstruction nous a conduit à assembler un fragment de la molécule de **TCL** avec celui du **GEQ** et ainsi d'obtenir une deuxième série d'inhibiteurs très puissants de l'ordre du nanomolaire. Le composé **9l** présentant une activité inhibitrice *in vitro* de 32 nM et une CMI de 1,6 µM, est ressorti de cette étude ; InhA a été confirmée comme étant sa cible principale. L'analyse des structures cristallographiques des complexes avec ces ligands révèle qu'ils sont capables d'explorer des régions sous-exploitées du site actif, en particulier le portail mineur. Seulement trois structures cristallographiques d'InhA de la PDB, représentant 3% de toutes les structures déposées sur InhA dans la PDB, montrent une interaction des ligands dans cette cavité. Dans des projets futurs, il pourrait être intéressant de développer des séries de molécules analogues aux hydroxycoumarines **5f-i** et à l'indole **9l** afin d'augmenter l'activité *in vitro* et *in vivo.*

Dans le chapitre 3, des essais préliminaires ont permis de mettre au point les conditions optimales pour une éventuelle chimie click *in situ* permettant de confirmer une reconstruction dans le site actif de la protéine de certains inhibiteurs étudiés précédemment. Nous avons ainsi établi pour la première fois la preuve de concept de la KTGS appliquée à la protéine InhA.

Pour la suite de ces travaux, la KTGS pourrait être utilisée comme méthode de criblage pour la découverte de nouveaux inhibiteurs potentiels de la protéine InhA. Pour cela, l'étude d'une bibliothèque de fragments plus conséquente est nécessaire. Ainsi, il serait possible d'envisager de synthétiser les fragments qui ciblent les différents sites de liaison I, II et III (Tableau 8, Figure 105) notamment un dérivé du ligand **JVZ** ou des dérivés biaryléthers. Ces études suivies par radiocristallographie aux rayons X permettraient de suivre les interactions de ces nouveaux inhibiteurs.

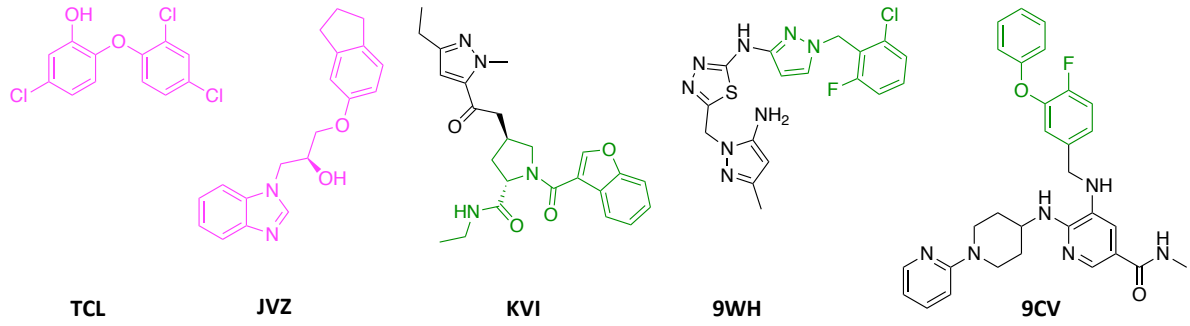


Figure 105 : exemple de dérivés ciblant les sites de liaison I, II et III de la protéine InhA. En noir, les fragments qui ciblent le site I, en rose, ceux ciblant le site II et en vert, les fragments qui ciblent le site III.

L'extension de la chimie click *in situ* « inter-fragments » à la macrocyclisation *in situ*, étudiée dans le chapitre 4, a montré des résultats encourageants. Des ligands acycliques pourraient interagir avec la protéine pour former des macrocycles, plus rigides et moins flexibles, au sein de la protéine et pourraient engendrer des inhibitions qui pourraient être qualifiées d'irréversibles théoriquement.
En effet, l'analyse par radiocristallographie aux rayons X a confirmé un repliement des molécules dans le portail majeur et le rapprochement des fonctions alcyne et azoture. Les observations effectuées permettent de confirmer que l'augmentation de la taille de la chaîne alcynique est primordiale. Dans un premier temps, il pourrait être envisagé d'augmenter la chaîne alkyle de deux ou trois carbones.
Des études de docking moléculaire pourraient guider le choix de ces ligands acycliques les plus judicieux pour une macrocyclisation. Il sera également nécessaire de poursuivre les efforts de cristallisation de la protéine InhA en complexe avec ces ligands pour faire évoluer et valider ce concept novateur.

Au bilan, tous les composés, présentés dans ce manuscrit, ont été obtenus par cycloaddition de Huisgen, catalysée au cuivre ou au ruthénium pour former des pentacycles 1,2,3-triazole. Les structures cristallographiques résolues dans ce projet de thèse et dans la PDB montrent que les groupements biaryléther et triazole n'adoptent qu'une seule conformation dans le site actif. Le triazole se positionne à un angle de 90° par rapport au phénol. Le substituant greffé au noyau triazole peut être flexible et se lier dans le portail majeur et/ou dans le portail mineur. Malgré cette flexibilité, ces ligands montrent des inhibitions puissantes de la protéine.

ASPECTS METHODOLOGIQUES

I. Production et purification de la protéine InhA

La production et la purification de la protéine ont été effectuées au sein de l'équipe de biophysique structurale à l'IPBS.

A. La transformation

La transformation bactérienne est une étape clé dans le clonage moléculaire, son but est de produire des copies multiples d'une molécule d'ADN recombinant. Lors de la transformation, l'ADN (généralement sous la forme d'un plasmide) est introduit dans une souche bactérienne compétente, de sorte que les bactéries puissent ensuite surexprimer la protéine d'intérêt. Les chercheurs utilisent les plasmides pour y insérer le fragment d'ADN d'intérêt, grâce aux cassettes de clonage. Ils peuvent ainsi cloner des gènes afin d'exprimer les protéines ou les ARN et les analyser. Il existe différents vecteurs d'expression pour exprimer le gène souhaité. Durant notre projet de thèse, nous avons utilisé le plasmide pET15b dans lequel la séquence du gène *inhA* est introduite entre les sites Nde1 et BamH1. Ce vecteur contient une partie codant six histidines suivie d'un site de coupure à la thrombine et trois sites de clonages. Il contient également un gène de résistance à l'ampicilline ce qui va permettre de sélectionner les colonies qui auront intégré le plasmide. Le plasmide utilisé a été commandé à la société Genscript. Les plasmides sont représentés dans la Figure 106.

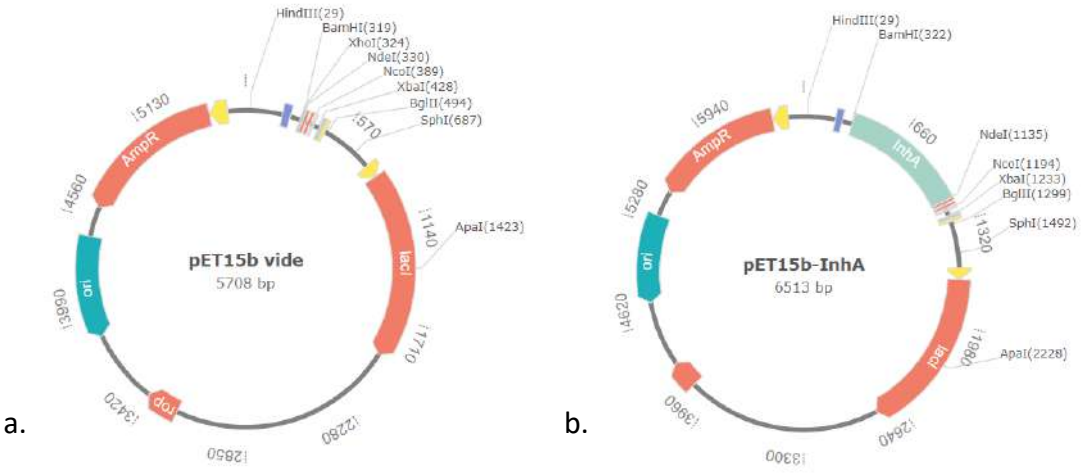


Figure 106 : représentation des plasmides. a. Plasmide vide. b. Plasmide contenant le gène codant pour InhA. Source : Genscript

La bactérie *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne la plus couramment utilisée dans l'étape de transformation lors d'un processus de clonage. La compétence naturelle d'*E. coli* est très faible, voire inexistante, les cellules doivent donc être rendues compétentes (capacité à incorporer de l'ADN). Durant la thèse, les souches bactériennes que nous avons utilisées sont les BL21(DE3) et les DH5α. Ces souches possèdent des caractéristiques différentes et le choix va donc dépendre de leur utilisation. Les cellules BL21(E3) favorisent l'expression de la protéine recombinante et les DH5α vont être utilisés pour la réplication du plasmide[277].

Il existe deux grandes méthodes de transformation bactérienne : i) le choc thermique des cellules compétentes préparées chimiquement et ii) l'électroporation des cellules électrocompétentes. Le choix dépend de l'efficacité de transformation requise, des objectifs expérimentaux et des ressources

disponibles. Les cellules compétentes doivent être décongelées et manipulées sur la glace avec précaution pour conserver leur viabilité. Les cellules peuvent être mélangées en les secouant doucement, en les tapotant ou en les pipettant, mais il faut éviter de les faire tourbillonner. Le choc thermique consiste à mélanger les cellules compétentes avec l'ADN plasmidique et à les exposer à une brève élévation de température ce qui va permettre le passage de l'ADN plasmidique au travers des pores de la cellule compétente. Ce choc thermique se fait généralement entre 37 et 42 °C pendant 25 à 45 secondes. L'électroporation consiste à utiliser une électroporateur pour exposer les cellules compétences et l'ADN à une brève impulsion électrique à haute tension. On pense que ce traitement induit des pores transitoires dans les membranes cellulaires, ce qui va permettre à l'ADN de pénétrer dans les cellules (Figure 107).

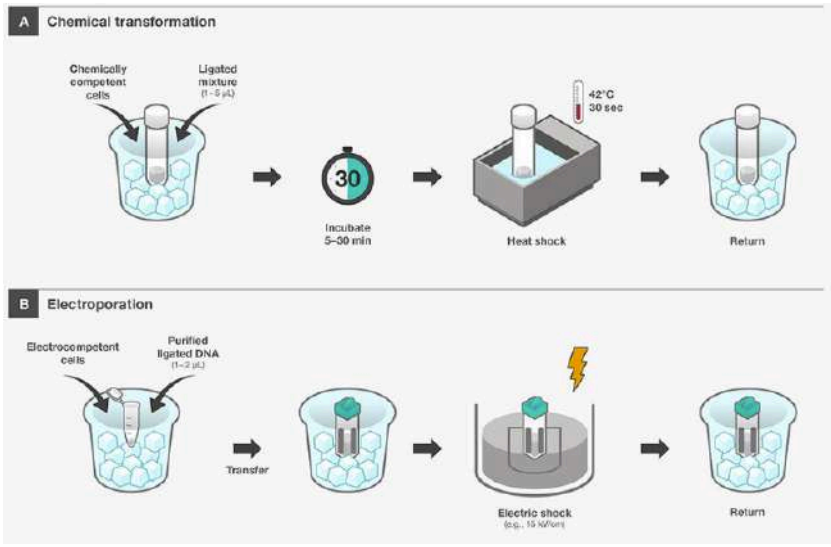


Figure 107 : représentation des techniques de transformation bactérienne a. le choc thermique b. L'électroporation. Source : https://moodle2.units.it/pluginfile.php/327420/mod_resource/content/0/TEC_CELL_SCHEDA_07_bacteria%20transformation.pdf

Après refroidissement, les cellules sont mises en culture dans un milieu appelé SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) pendant une heure à 37 °C, ce qui va permettre d'augmenter l'efficacité de la transformation. Le milieu SOC est un milieu riche en nutriments. Son utilisation améliore l'absorption moléculaire tout en stabilisant les cellules rapidement et en maximisant ainsi l'efficacité des cellules compétentes[278]. Le milieu est, ensuite, étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé LB agar en présence d'ampicilline. Le plasmide contient une cassette de résistance à l'ampicilline et les colonies qui vont pousser auront donc intégré le plasmide. Les bactéries qui n'auront pas intégré le plasmide seront détruites par l'ampicilline. Les boites de culture sont ensuite mises à incuber pendant une nuit à 37 °C.

B. Préculture et culture bactérienne

Après incubation durant la nuit, la réussite de la transformation est validée par la présence de colonies sur la boite. Une préculture est alors effectuée à partir d'une colonie mise en suspension dans le milieu de culture nutritif LB en présence d'ampicilline. Les bactéries sont agitées à 37 °C pendant une nuit à 260-280 tr/min. La culture se fait après cette étape de préculture. Pour cela, la croissance cellulaire est évaluée par une mesure de densité optique (DO) à 595 nm. Une dilution est effectuée au centième et

les bactéries sont de nouveau agitées à 37 °C à 260 tr/min jusqu'à obtenir une DO_{595nm} comprise entre 0,6 et 0,8 (soit pendant environ 3-4 h).

C. Expression

La densité optique (DO) permet de mesurer transparence du milieu. Plus il y aura de bactéries dans le milieu, plus la DO sera élevée du fait de la turbidité du milieu. Lors de cette étape, la DO_{595nm} doit être comprise entre 0,6 et 0,8, valeur qui correspond à la phase de croissance exponentielle de bactéries. À ce stade, les bactéries sont dans un bon état physiologique et il y a aucune carence en oxygène et en nutriments. La protéine InhA est alors exprimée par induction avec l'isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) qui agit comme un analogue de l'allolactose et se lie au répresseur de l'opéron lactose, empêchant ainsi sa liaison à l'opérateur et de fait l'induction de l'expression. Une fois, la DO_{595nm} comprise entre 0,6 et 0,8, l'IPTG peut être ajouté dans la culture bactérienne qui est mise à incuber à 37 °C pendant 4 h à 175 tr/min. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation (15000xg pendant 30 min), le culot bactérien ainsi récupéré peut être conservé à -80 °C pendant plusieurs mois.

D. Purification de la protéine

Le culot bactérien est récupéré dans un tampon aqueux et les bactéries sont lysées par sonication ou disruption. Le surnageant contient la protéine d'intérêt mais également d'autres protéines ainsi que de l'ADN. Une étape de purification par chromatographie d'affinité est nécessaire pour séparer InhA des autres protéines indésirables.

1. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité sur les ions métalliques immobilisés (IMAC) est la méthode la plus populaire de purification des protéines. Son principe a été décrit pour la première fois par Porath *et al*[279] en 1975. Il est basé sur l'affinité des métaux de transition tels que les ions Zn(II), Cu(II), Ni(II) ou encore Co(II) pour la cystéine, l'histidine et le tryptophane dans des solutions aqueuses. Pour cela, différents supports sont utilisés et traditionnellement, il s'agit d'une matrice constituée d'une gel de polysaccharides sur laquelle est immobilisé un groupe chélatant[280]. Cette méthode est très couramment utilisée pour la purification de protéines recombinantes dans les séquences desquelles a été insérée une étiquette poly-histidine. Il suffit alors d'une étape de chromatographie pour obtenir la protéine purifiée[281]. Durant cette thèse, des colonnes HisTrap High Performance ont été utilisées. Ces colonnes sont constituées d'un gel de sépharose dont les particules font 34 µm de diamètre sur lequel sont greffés des ions Ni^{2+}, pouvant retenir des motifs imidazole de l'étiquette hexa-histidine de la protéine.

Le surnageant est passé au travers de la colonne et en général, seules les protéines étiquetées hexa-histidine sont retenues, ce qui permet d'éluer dans un premier temps toutes les protéines indésirables et les autres contaminants. Ensuite, la protéine d'intérêt est éluée grâce à un tampon aqueux concentré en imidazole (de 10mM à 300 mM) générant une compétition avec l'étiquette hexahistidine de la protéine. La colonne est ensuite régénérée par le passage d'une solution aqueuse (Figure 108).

2. Colonne de dessalage

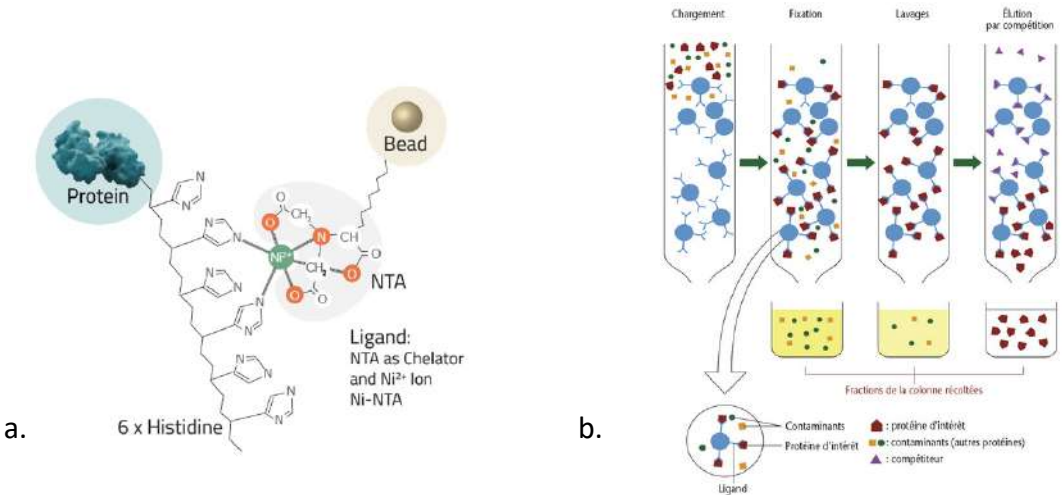


Figure 108 : a. Principe de la rétention de l'étiquette hexahistidine par les ions nickel b. Principe de la chromatographie d'affinité.
Source : https://cube-biotech.com/knowledge/protein-purification/his-tag/
https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=116376&demande=desc

À l'issue du de la chromatographie d'affinité, la protéine est récupérée dans un tampon riche en imidazole. La grande concentration en imidazole peut affecter le clivage de l'étiquette hexa-histidine et également perturber la deuxième chromatographie d'affinité. Pour cela, il est primordial de procéder à une étape de dessalage. Les colonnes PD-10 (GE healthcare) permettent un échange de tampon, un dessalage ainsi que l'élimination de composés de faible poids moléculaire. Ce sont des colonnes garnies de Séphadex, le dessalage se fait soit par gravité, soit par centrifugation. La dialyse est également une autre méthode de dessalage.

3. Clivage de l'étiquette hexahistidine et deuxième étape de chromatographie d'affinité

Bien que l'étiquette hexahistidine n'a aucun effet sur la fonction et l'activité de la protéine, InhA ne cristallise pas en présence de cette étiquette. Pour utiliser la protéine dans les essais de cristallisation, le clivage de l'étiquette est donc nécessaire. Ce clivage se fait par digestion enzymatique avec de la thrombine. À la suite du clivage, la protéine est de nouveau purifiée par chromatographie d'affinité. La protéine, n'ayant plus son étiquette hexahistidine, n'est plus retenue sur la colonne, elle sera donc récupérée rapidement après l'injection. Il se peut que la totalité de la protéine n'ait pas été clivée, cette protéine non clivée sera éluée grâce à un gradient d'imidazole, comme indiqué dans la première étape d'affinité.

4. Chromatographie d'exclusion de taille

Pour s'assurer de la pureté de la protéine, il est également effectué une chromatographie d'exclusion de taille. Comme son nom l'indique, cette chromatographie est basée sur la taille des protéines à purifier sur une colonne composée de billes de taille similaire. Les grosses molécules ont un volume accessible plus petit que les petites molécules, elles sortiront donc en premier. Cette purification a été réalisée sur une colonne HiLoadSuperdex 200 16/60. La matrice de cette colonne est un composite de dextran et d'agarose, la taille moyenne des particules est de 34 µM. À l'issue de cette purification la protéine a un très grand degré de pureté. Les stocks de protéine sont congelés par congélation rapide (flash freezing) dans un bain d'azote liquide et conservés au congélateur à - 80 °C.

II. Évaluation de l'activité de la protéine InhA

L'évaluation biologique de InhA a été effectuée au SPCMIB. La protéine utilisée est celle avec l'étiquette hexa-histidine, qui est plus active que la forme dont l'étiquette est clivée.

La protéine InhA joue un rôle essentiel dans la survie de la mycobactérie et en particulier dans la biosynthèse des acides mycoliques, comme expliqué dans le chapitre introduction. InhA catalyse la réduction de la double liaison du substrat énoyl *via* le transfert d'hydrure par le cofacteur NADH (Schéma 37).

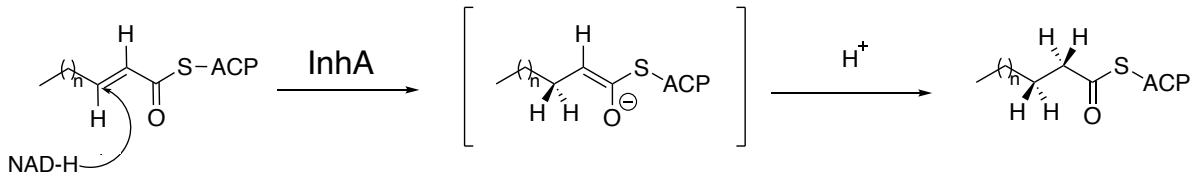


Schéma 37 : réduction du substrat 2-*trans*-énoyl-ACP catalysée par InhA en présence du cofacteur NADH.

Lors de la réduction catalytique, le NADH subit une oxydation et forme le NAD^+. Les deux espèces, NADH et NAD^+, absorbent fortement la lumière UV avec un maximum d'absorption à 260 nm. Le NADH possède également un second pic d'absorption à 340 nm, ce qui le différencie du NAD^+ ; cette différence va permettre de suivre l'oxydation du NADH en NAD^+ et donc de suivre l'activité catalytique d'InhA (Figure 109).

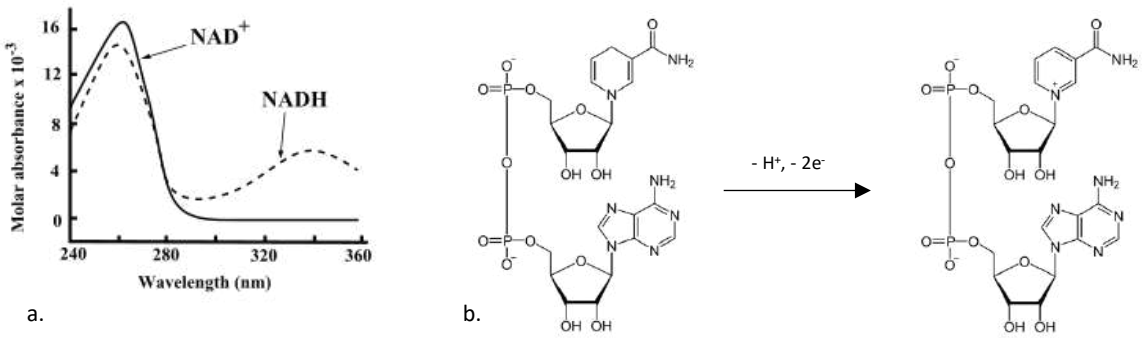


Figure 109 : a. Spectre d'absorption UV de NADH et NAD^+. b. Réaction d'oxydo-réduction entre le NADH et le NAD^+.

La compétition directe entre le substrat et l'inhibiteur est effectuée en plaçant tous les constituants dans la cuve (tampon, substrat, cofacteur et composé). La lecture de l'absorbance à 340 nm débute dès que la protéine InhA est ajoutée et ce pendant 2 minutes 30. Une expérience préliminaire est effectuée en mesurant seulement l'activité d'InhA en présence seulement du cofacteur et du substrat afin d'avoir la valeur de référence. L'activité du composé se calcule en faisant le rapport des valeurs obtenues avec et sans ligand. Ainsi plus la pente sera droite, plus l'inhibition sera forte.

$$\%\ activité = \frac{pente\ de\ référence - pente\ avec\ le\ composé}{pente\ de\ référence}\ \text{x}\ 100$$

Le substrat utilisé pour les tests enzymatiques est le 2-*trans*-dodécénoyl-CoA dont la synthèse chimique est connue et relativement facile. En fait, le substrat naturel est un dérivé ACP. Néanmoins, en 1995, Quémard *et al*[115] ont synthétisé trois dérivés du substrat et ont comparé les paramètres cinétiques par rapport à la molécule de référence, le 2-*trans*-octénoyl-ACP dont le K_m est de 2,0 µM. Le dérivé 2-*trans*-octénoyl-CoA s'est révélé être un substrat alternatif présentant une valeur de K_m supérieure d'environ 2 ordres de grandeur (K_m = 467 µM). Afin d'évaluer l'influence de la longueur de la chaîne du substrat, deux autres dérivés ont été synthétisés avec une chaîne en C_{12}, le 2-*trans*-dodécénoyl-CoA et en C_{16}, le 2-*trans*-hexadécénoyl-CoA. Parmi ces deux molécules, le meilleur substrat est celui possédant la chaîne en C_{16} (Figure 110), avec un K_m de 1,5 µM. Le 2-*trans*-dodécénoyl-CoA est un substrat intermédiaire avec un K_m de 48 µM. Pour des commodités de synthèse, nous avons effectué les tests enzymatiques avec le substrat 2-*trans*-dodécénoyl-CoA.

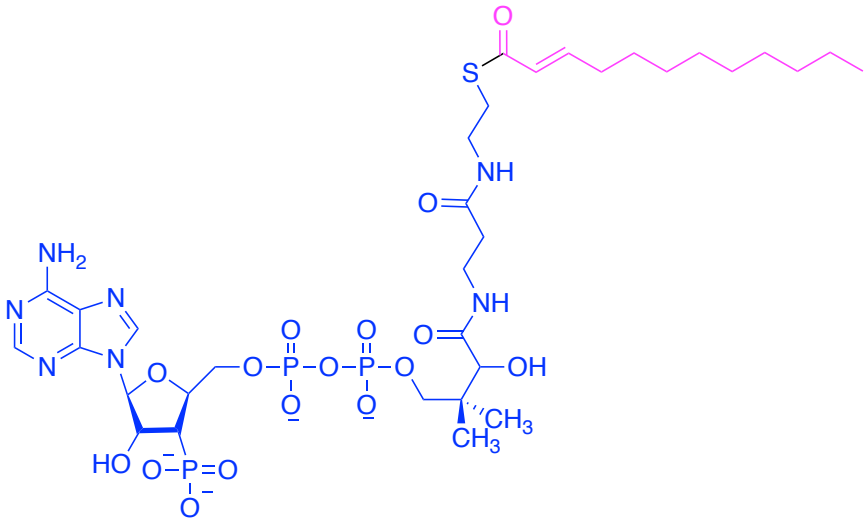


Figure 110 : structure du substrat 2-*trans*-dodécénoyl-CoA. Représentation en bleu la partie coenzyme A et en rose la partie acide 2-*trans*-dodécénoïque.

La concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) a été déterminée en mesurant l'inhibition à plusieurs concentrations, en partant d'une concentration haute qui inhibe à environ 100% l'enzyme et une concentration basse qui n'inhibe pas ou très peu la protéine. La courbe correspondante est une fonction dont l'équation est composée de quatre paramètres dont la formule est :

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

y = % d'inhibition du composé
x = concentration en composé
A = valeur minimale de *y* (ici 0)
B = valeur maximale de *y* (ici 100)
C = valeur de l'IC_{50}
D = pente

La résolution de l'équation *via* le logiciel SciDAVis permet de déterminer la valeur de l'IC_{50}.

III. Évaluation de l'inhibition de la croissance mycobactérienne

En raison de leur pathogénicité, l'évaluation de l'activité sur les souches mycobactériennes de type Mtb H37Rv doit être réalisée dans des laboratoires de type P3. Ces tests ont été effectués grâce à deux collaborations : à l'IPBS, avec l'équipe de la docteure Hédia Marrakchi et au travers d'une collaboration internationale avec l'équipe de la Professeure Maria Rosalia Pasca du département de biologie et biotechnologie « Lazzaro Spallanzani à Pavie en Italie.

IV. Cristallisation

Toutes les étapes liées à la cristallisation et à la résolution des structures cristallographiques des complexes de InhA présentées dans ce mémoire ont été réalisées dans l'équipe de biophysique structurale en utilisant les équipements du plateau de bio-cristallographie et de biophysique de la plateforme PICT (Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse).

L'obtention de cristaux de protéine est souvent une étape limitante en cristallographie des rayons X.

A. Principe de la cristallogenèse

Au sens large, la cristallisation est un procédé de création de réseaux structurés et ordonnés de molécules. S'agissant de macromolécules complexes comme les protéines, ces dernières interagissent spontanément et au hasard conduisant à la formation d'agrégats non spécifiques et éventuellement à la précipitation. Dans certaines conditions, plus favorables, des interactions plus spécifiques se mettent en place en formant des agrégats ordonnés qui peuvent évoluer vers ce que l'on appelle le germe cristallin ou germe critique : c'est l'étape de nucléation. Lorsque la barrière énergétique associée à la formation du germe critique peut être franchie, l'étape de croissance cristalline débute.

Le diagramme de phase représentatif de la cristallisation de protéine montre différentes voies aboutissant à la formation d'un cristal (Figure 111). La cristallisation ne peut se faire qu'à des valeurs particulières de concentrations en protéine et en précipitant. Différentes régions existent[282] :

- La zone de solubilité correspond à une solution sous-saturée en protéine, aucune cristallisation n'est possible.
- La zone métastable qui se trouve entre la zone de solubilité et la zone de précipitation. C'est dans cette zone que la phase de nucléation et de croissance d'un cristal s'effectue. La solution est dite « sursaturée ».
- La zone de précipitation représente la zone dans laquelle la protéine risque de précipiter. Il n'y a pas de cristallisation possible.

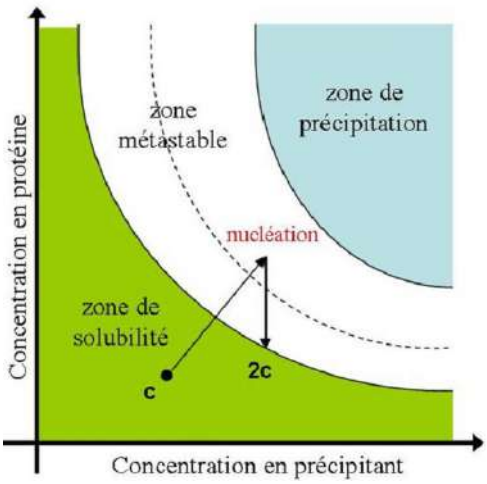


Figure 111 : diagramme de phases du processus de cristallogenèse.
Source : Lafaye, C. Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : Les Trois Homologues à l'oxydoréductase de Thiol-Disulfure DsbA chez *Neisseria Meningitidis*. 2009.

Pour obtenir un cristal solide, ordonné et homogène, les molécules doivent être identiques sur le plan de la composition chimique, des propriétés physico-chimiques et de la conformation. Il est essentiel d'avoir une solution protéique d'une grande pureté. La solubilité de la protéine dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la température, la composition du tampon, la présence de sel et la nature et la concentration des agents précipitants.
La température doit être constante et régulée, l'utilisation de chambre froide thermorégulée est conseillée. Les agents précipitants ou cristallisants agissent sur la solubilité de la protéine :

- Les sels affectent la force ionique du milieu
- Les solvants organiques tels que les alcools ou les éthers diminuent l'activité chimique de l'eau et réduisent les propriétés diélectriques du milieu. Ils affectent aussi la densité, la viscosité et la vitesse de diffusion dans la solution. Dans le cas d'InhA, l'utilisation du 2-méthyl-2,4-pentane diol (MPD) montre l'obtention de cristaux homogènes.
- Les polymères induisent une déshydratation et réduisent les propriétés diélectriques du milieu. Ils affectent également la densité, la viscosité, la vitesse de diffusion dans la solution de cristallisation. La famille des polyéthylènes glycols (PEG) est largement utilisée. Également, les PEG4000 ont montré de bons résultats quant à la cristallisation de la protéine InhA.

B. Techniques de cristallisation

Il existe plusieurs méthodes pour cristalliser les protéines, nous en verrons ci-dessous les deux principales.

1. La dialyse

La dialyse est une méthode bien connue des biochimistes. Elle permet d'amener progressivement l'agent de cristallisation en contact avec l'échantillon protéique sans faire varier sa concentration dans la solution. La solution de cristallisation et celle de la protéine sont séparées par une membrane semi-perméable. Un échange se fait entre les sels et autres agents de cristallisation qui diffusent progressivement dans le compartiment de la protéine. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne

peut être automatisée et dans le cas d'une campagne de criblage, sa mise en place peut être fastidieuse[283].

2. La diffusion de vapeur

Cette méthode consiste à mettre en contact l'échantillon et l'agent de cristallisation dès le début de l'expérience et à concentrer progressivement la solution. Deux méthodes sont largement utilisées, la méthode de la goutte assise et la méthode de la goutte suspendue. Sur une lamelle ou une cupule est déposée une microgoutte d'un mélange de solutions de cristallisation et de protéine. La lamelle est ensuite retournée dans le cas de goutte suspendue, le système est ensuite scellé de manière hermétique. Le volume du réservoir, très grand et plus concentré en agent de cristallisation que la goutte, dicte les échanges et l'espèce la plus volatile (en général l'eau) va alors diffuser jusqu'à atteinte de l'équilibre des tensions de vapeur, ce qui implique que la concentration en protéine dans la goutte augmente et permet d'atteindre la zone de nucléation (Figure 112)[284].

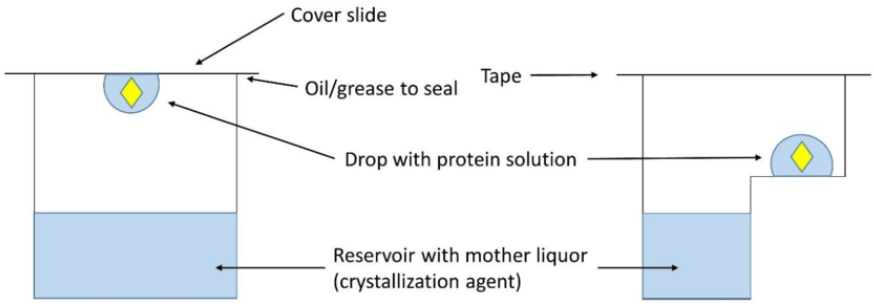


Figure 112 : techniques de diffusion de vapeur, méthode de la goutte suspendue à gauche et méthode de la goutte assise à droite. Source : Gajdos, L. Neutron Diffraction for Deciphering Protein-carbohydrate Interactions Involved in Bacterial Infection, 2021.

Durant la thèse, la méthode de la goutte assise a été effectuée dans des microplaques 96 puits (Figure 113) avec 2 cupules, ainsi plusieurs conditions protéiques pouvaient être étudiées. Cette méthode est plus facile à mettre en place et peut être automatisé notamment par l'utilisation d'un robot de cristallisation qui permet le pipetage de la solution de protéine dans les cupules puis l'ajout de la solution de cristallisation. La robotisation (Figure 113) est très pratique car les volumes mis en jeu sont faibles (200 nL) et les temps d'exécution très courts. Nous avons utilisé un robot mosquito (SPT Labtech) qui met environ 10 minutes pour préparer une plaque. Une fois les plaques effectuées, elles sont incubées dans une pièce à température régulée, à 20 °C dans le cas d'InhA, pendant environ une semaine avant que les premiers cristaux n'apparaissent.

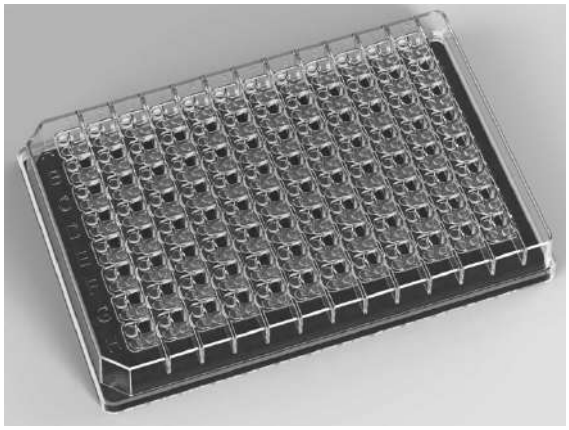
a.  b. 

Figure 113 : a. Photo du robot de cristallisation. b. Représentation d'une plaque 96 puits avec 2 cupules.

Les premiers essais cristallographiques ont été réalisés avec la condition MPD en utilisant le triclosan comme ligand. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de voir une densité complète pour cette molécule en cristallographie, bien qu'il ait été démontré précédemment qu'elle cristallisait avec InhA. Les analyses de données aux rayons X ont révélé un déplacement de la molécule de triclosan dans le site de liaison du substrat de InhA. Ce déplacement est dû à deux facteurs principaux : l'utilisation du NADH comme cofacteur et la présence d'une molécule MPD à l'intérieur de la protéine. Contrairement au NAD^+, le cycle nicotinamide du NADH n'est pas totalement aromatique, ce qui empêche l'interaction de type π-stacking entre le cycle nicotinamide du cofacteur et le phénol du triclosan. De plus, une molécule de MPD proche du cofacteur empêche le cofacteur et le triclosan de se rapprocher. Comme tous les ligands sont des dérivés du triclosan et peuvent avoir les mêmes interactions que le triclosan, nous avons décidé de modifier les conditions de cristallisation. Dans la littérature, diverses conditions avec du polyéthylène glycol comme agent précipitant ont été rapportées. Sur cette base, nous avons ajusté les conditions et utilisé la solution de cristallisation PEG4000 avec NAD^+ comme cofacteur, pour obtenir les structures de InhA en complexe avec des dérivés de diphényléther.

Les cristaux obtenus dans l'agent de cristallisation MPD sont plutôt de forme bi-pyramidale alors que ceux obtenus dans le PEG sont sous forme de bâtonnets ou de pavés (Figure 114).

Figure 114 : photos des cristaux de InhA en complexe avec les ligands a. Condition de cristallisation en MPD. b et c. Condition de cristallisation en PEG4000.

C. Cristallisation de complexes protéine-cofacteur-ligand

Trois méthodes peuvent être utilisées pour former des complexes protéine-cofacteur-ligand. Il s'agit du trempage, de la co-cristallisation et du coating.

Le trempage consiste à préparer en amont des cristaux de la forme holo d'InhA, c'est-à-dire en présence du cofacteur, qui seront ensuite mis à tremper dans une solution de ligand. La durée de trempage est un paramètre important qu'il est difficile d'anticiper. Ainsi, il peut être réalisé des trempages longs (de plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours) ou des trempages courts (de quelques minutes à quelques heures). La fragilité du cristal est l'élément limitant car il peut se détériorer dans la solution du ligand ou avec le temps, ce qui rend les manipulations difficiles. De plus, un cristal qui se maintient d'un point de vue macroscopique peut voir ses propriétés de diffraction dégradées du fait du trempage et ceci ne peut être évalué qu'après irradiation.

La méthode de prédilection pour l'obtention de complexes d'InhA est la co-cristallisation. La protéine et le cofacteur sont mis à incuber pendant environ 1 h dans un bain de glace, une solution de ligand est ensuite ajoutée. Les solutions sont, de nouveau, mises à incuber pendant encore 1 h avant de préparer les plaques de cristallisation.

Le coating consiste à déposer un volume connu d'une solution de ligand dilué dans son solvant (le plus souvent le DMSO) sur les cupules de cristallisation et de le mettre à évaporer environ 1 semaine avant de réaliser les essais de cristallisation. Le fait de déposer le ligand en amont de la solution peut éviter une précipitation de la protéine.

D. Congélation des cristaux

Les cristaux sont observés à l'aide d'une loupe binoculaire et une fois que leur taille n'évolue plus, ils peuvent être prélevés et conditionnés pour analyse sur les différents synchrotrons auxquels nous avons accès.

Les cristaux sont de nature fragile et doivent être manipulés avec délicatesse et précision. Pour éviter leur dégradation lors du transport ou de l'irradiation, ceux-ci sont cryocongelés dans l'azote liquide. Lors de cette étape, de la glace peut apparaître autour du cristal. Cette formation de glace peut être évitée par l'utilisation d'un agent cryoprotectant qui sera soit directement intégré à la solution de cristallisation, soit ajouté au moment de la cryocongélation. La manipulation des cristaux se fait à l'aide de boucles (Figure 115), qui peuvent être en différents matériaux transparents aux rayons X comme par exemple le nylon. Une fois le cristal « pêché », il est soit directement cryocongelé, soit trempé dans une solution d'agent cryoprotectant (huile de paraffine, glycérol, éthylène glycol, etc.) et est plongé dans un bain d'azote liquide puis stocké dans des supports commerciaux appelés UniPucks (Figure 115).



a. b.

Figure 115 : a. Exemple de boucles utilisées (Actiloops commercialisées par la société Molecular Dimensions). b. Unipuck. Source : https://www.mitegen.com/product/universal-pucks-and-tools/.

V. Cristallographie des rayons X

Étudier la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique est un grand enjeu. Cela permet d'en déterminer/préciser le mécanisme, voire d'identifier sa fonction et de comprendre les interactions entre des molécules effectrices et leurs cibles[285]. Trois méthodes expérimentales permettent d'accéder à ces informations à l'échelle atomique : la cryo-microscopie électronique (cryo-EM), la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients.

Développée depuis les années 1970, la cryo-EM est fondée sur l'utilisation d'un microscope électronique à transmission. Celui-ci comprend une source d'émission d'électrons accélérés dans une colonne sous vide et sous haut voltage, d'une série de lentilles électromagnétiques et enfin d'un système d'acquisition d'images. Cette technique est de plus en plus utilisée depuis les années 2000[286].

La RMN permet de travailler avec la protéine en solution et ainsi de fournir les informations sur la dynamique de la macromolécule. Son principe est basé sur l'interaction des spins des noyaux dans un champ magnétique. La quantité de matériel pur nécessaire et la limitation de taille de la protéine sont les principaux points faibles de cette technique[287].

Enfin, la cristallographie aux rayons X est la technique la plus utilisée (Figure 116). Le principe est basé sur l'interaction entre les rayons X et les électrons des atomes de la protéine[288] et il sera donné plus de détails dans la suite. C'est une technique très utilisée en chimie médicinale et notamment dans la découverte de nouveaux médicaments.

Ces trois techniques sont évidemment complémentaires et permettent de valider la structure de la macromolécule et les interactions.

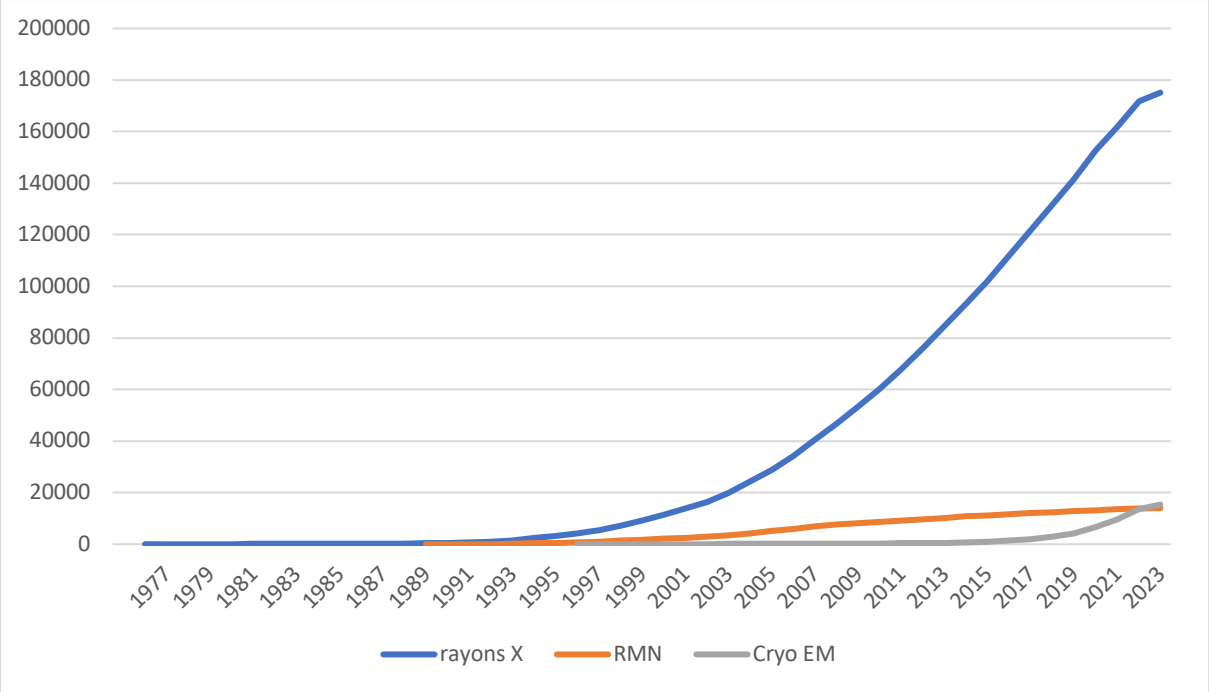


Figure 116 : courbe du nombre de structures résolues dans la PDB par les différentes techniques : cryo-EM, RMN ou cristallographie des rayons X.
Source : https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures.

Durant la thèse, seule la cristallographie aux rayons X a été utilisée afin d'étudier la structure d'InhA en complexe avec les ligands.

A. Un petit peu d'histoire sur la cristallographie aux rayons X

Les rayons X furent découverts en 1895 par le professeur de physique Wilhelm Röntgen. Il travaillait sur le tube de Crookes, un des premiers tubes à décharge électrique dans lequel sont insérées deux électrodes : une cathode et une anode. En appliquant une tension élevée entre ces électrodes, des rayons colorés passant de la cathode à l'anode apparaissaient et furent appelés rayons cathodiques. En réalité, c'étaient des rayons X mais personne n'en connaissait la nature. Ce n'est qu'en 1912 que le physicien théoricien allemand, Arnold Sommerfeld, fit l'hypothèse que ces rayons se comportaient comme des ondes électromagnétiques et il déduisit de ses expériences que celles-ci avaient des longueurs d'onde d'environ 0,4 Å.

La cristallographie est née avant la découverte des rayons X. Dès la fin du XVIIIe siècle, le minéralogiste français, René-Just Haüy fit l'hypothèse qu'un cristal était formé de petites briques qu'il appelle « molécules intégrantes » et qui s'empilent périodiquement dans les trois directions de l'espace. En 1897, les cristallographes William Barlow et William Pope prédirent correctement les structures du chlorure de sodium, du chlorure de césium ou encore celle du diamant en raisonnant simplement sur la taille de petites billes.

En janvier 1912, Max Von Laue, théoricien, travaillant dans l'équipe de Sommerfeld, apprend par Paul Ewald, doctorant dans la même équipe que les cristaux sont comme des réseaux qui auraient des

périodes de quelques dixièmes de nanomètres. Ils voulurent essayer de faire diffracter les rayons X par des cristaux. Après des tentatives infructueuses, ils virent apparaître les tâches de diffraction, ce premier cliché a pour nom « diagramme de Laue » (Figure 117)[289].

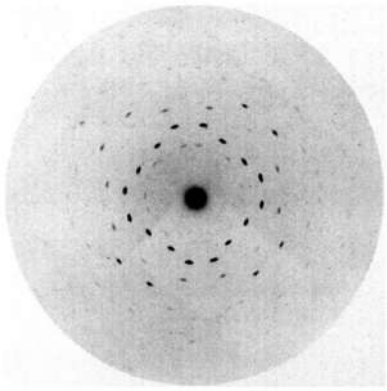


Figure 117 : diagramme de Laue. Cristal de blende, ZnS, faisceau de rayons X parallèle à un axe d'ordre 4, d'après Friedrich, Knipping et Laue (*Sitzungsberichte der Kgl. Bayer. Akad. Der Wiss*. 1912).

C'est la famille Bragg qui va comprendre ce qu'il se passe lors de la diffraction, le fils de Sir William Henry Bragg, Lawrence Bragg décrit les rayons X comme des ondes et comprend que la diffraction permet de déterminer les structures cristallines en analysant les positions et les intensités des taches de diffraction. En 1912, il établit la célèbre « loi de Bragg » avec d : la distance interréticulaire, θ : l'angle de Bragg et λ : la longueur d'onde des rayons X.

$$2dsin\theta = \lambda$$

Par la suite, en 1915, Sir William Henry Bragg fait le lien entre les mathématiques du français Joseph Fourier et la diffraction rendant plus facile la résolution de structure cristallographique. À partir des années 1925-1930, les premières résolutions de structures apparaissent. Pour résoudre les structures cristallographiques, la condition primordiale est de réussir à obtenir des cristaux de protéine. La première observation de cristallisation remonte à 1840, par Friedrich Ludwig Hünefeld qui a accidentellement découvert la formation de matière cristalline dans des échantillons de sang desséchés. Il en a ainsi déduit que des cristaux de protéine pouvaient être obtenus par évaporation contrôlée. Les premières résolutions de structures d'une macromolécule biologique sont apparues dans les années 1950, avec la résolution de la structure de l'hémoglobine par Max Perutz puis en 1957 John Kendrew résout la structure de la myoglobine. Tous deux ont partagé le prix **Nobel** de chimie en 1962 pour l'étude des structures de protéines globulaires. Enfin, la diffraction des cristaux a permis de résoudre la structure de l'ADN et notamment grâce au fameux cliché 51 qui a été pris le 1er mai 1952 après 60 h de pose par Raymond Gosling et Rosalind Franklin (Figure 118)[290,291]. Ces données ont permis de prouver la forme hélicoïdale de l'ADN. Malheureusement pour Rosalind, James Watson et Francis Crick s'attribuèrent les mérites de cette avancée et reçurent le prix **Nobel** de médecine en 1962 pour les découvertes concernant la structure moléculaire des acides nucléiques et son importance pour le transfert d'informations dans le matériel vivant.

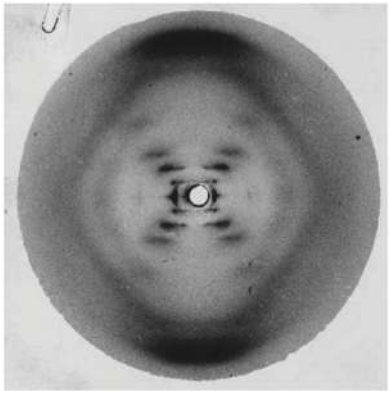


Figure 118 : cliché 51 de la forme B de l'ADN obtenu par Rosalind Franklin et Raymond Gosling en 1952

La diffraction des rayons X a permis de grandes avancées et notamment dans l'observation de la structure de la matière, à l'échelon atomique ou moléculaire. Différents domaines sont concernés : la science des matériaux avec les semi-conducteurs et les supraconducteurs, les superalliages et les super-aimants, les nanotechnologies, la biochimie et la biotechnologie avec l'étude des protéines et la conception de nouveaux médicaments[290].

L'attribution de plus d'une vingtaine de Prix **Nobel** permet de rendre hommage aux différents acteurs de ces découvertes.

B. La caractérisation d'un cristal

Un cristal peut être vu comme un assemblage d'atomes distribués périodiquement dans les trois directions de l'espace. Ainsi est définie une maille cristalline à partir de laquelle le cristal est construit, par simple copie le long de chacune des directions[292]. Ces paramètres de maille, caractérisés par trois longueurs a, b, c et trois angles α, β, γ, permettent de décrire sept systèmes cristallins (Figure 119) pouvant être contraints selon les différentes symétries présentes dans le cristal. Dans un réseau cristallin, les opérations de symétrie sont des rotations autour d'un axe, des réflexions par rapport à un plan, des translations ou des combinaisons des trois, toutes ces opérations forment les groupes d'espace. Les groupes d'espace sont référencés dans les tables internationales de cristallographie (IUCr) et sont au nombre de 230. En cristallographie des protéines, seulement 65 groupes d'espace sont possibles du fait de la chiralité des acides aminés. Il existe un nombre limité de réseaux possibles, ce sont les réseaux de Bravais (Tableau 21).

Système cristallin	Paramètre de maille	Axe de symétrie	Réseaux de Bravais
Triclinique	$a \neq b \neq c$; $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	Aucun	aP
Monoclinique	$a \neq b \neq c$; $\beta \neq 90°$, $\alpha = \gamma = 90°$	1 axe de rotation de 180° (axe 2)	mP, mC
Orthorombique	$a \neq b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90°$	3 axes 2	oP, oI, oF, oC
Tétragonal	$a = b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90°$	1 axe de rotation de 90° (axe 4)	tP, tI

Trigonal	a ≠ b ≠c ; α = β = γ ≠ 90°	1 axe de rotation de 120° (axe 3)	hR (rhomboédrique)
Hexagonal	a = b ≠c ; α = β = 90°, γ = 120°	1 axe de rotation de 60° (axe 6)	hP
Cubique	a = b = c ; α = β = γ = 90°	1 axe 4 et axes 3	cP, cI, cF

Tableau 21 : description des sept systèmes cristallins et des 14 réseaux de Bravais.

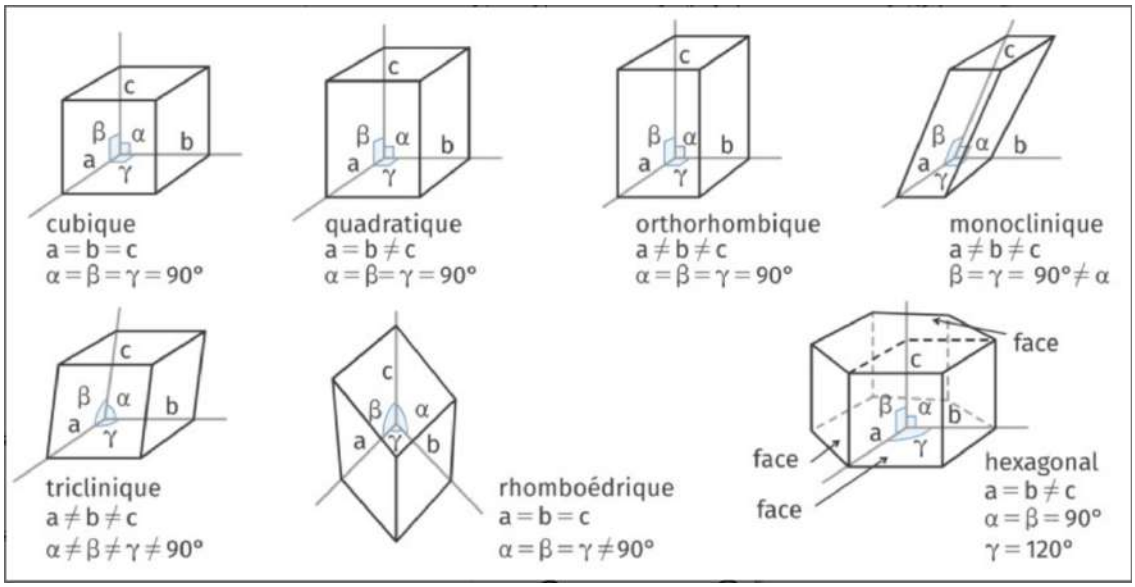


Figure 119 : représentation des sept systèmes cristallins.
Adapté des cours de 1ère, https://www.pichegru.net/es101_2#id_auto_10.

C. La diffraction des rayons X par les cristaux

La lumière est caractérisée par sa fréquence *v* et sa longueur d'onde λ qui sont reliées par la formule λ = c/v (avec c correspondant à la vitesse de propagation de l'onde). Pour éclairer un objet, on peut utiliser de la lumière naturelle (soleil) ou de la lumière artificielle et en fonction de la lumière choisie, on ne voit pas la même chose, d'où l'importance de choisir la bonne lumière et donc la bonne longueur d'onde pour visualiser un objet. Plus les objets sont petits, plus la longueur de la lumière utilisée doit être courte (Figure 120).

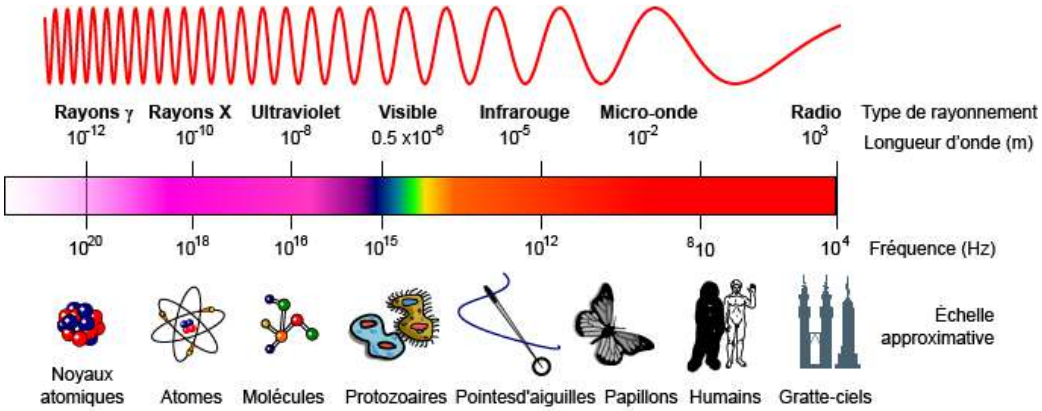


Figure 120 : spectre électromagnétique.
Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_Spectrum_Properties_reflected.svg.

Au sein d'un cristal, nous cherchons à visualiser les atomes et les distances associées aux liaisons chimiques, de l'ordre de 1,0 à 1,8 Å. Par conséquent, la longueur d'onde idéale pour visualiser ces informations correspond aux rayons X. Évidemment, l'œil humain est incapable de voir les objets après éclairage par rayons X, nous utilisons donc des équipements dédiés notamment des caméras et des détecteurs spécifiques, mis au point durant les dernières décennies.

Lorsqu'on envoie un faisceau de rayons X sur un réseau de molécules (cristal), des milliers d'ondes interfèrent les unes avec les autres et dans certaines directions les ondes diffusées se superposent et sont en phase. L'image observée sur le détecteur permet de reconstruire le réseau régulier de points correspondant aux interférences constructives, les taches de Bragg qui forment le réseau réciproque. Ces taches de Bragg de par leur position et leur intensité contiennent une partie de l'information sur l'ensemble de la structure tridimensionnelle (Figure 121).

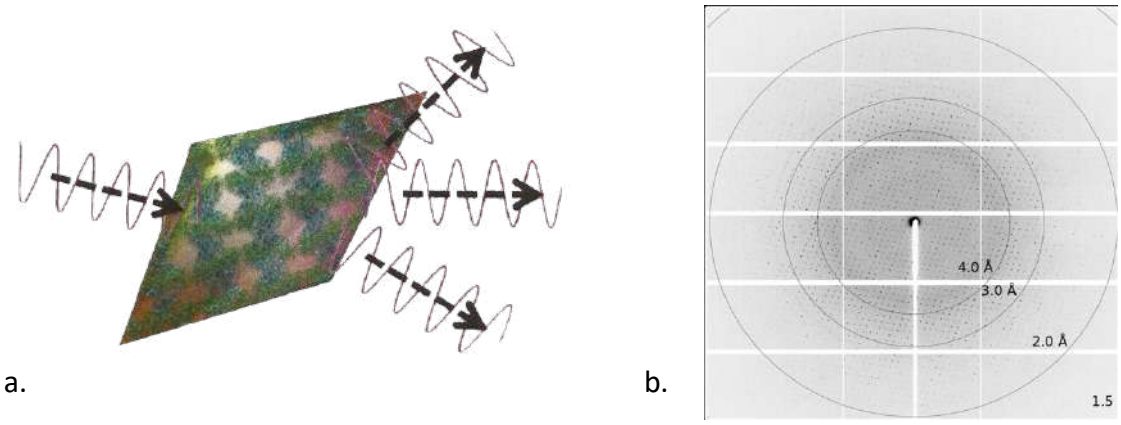


Figure 121 : a. Les interférences constructives suite à la diffraction des rayons X b. Cliché de diffraction.

L'empilement des atomes dans le cristal forme des plans appelés plans réticulaires. La diffraction a lieu après la réflexion du faisceau de rayons X sur ces plans réticulaires. Ces plans réticulaires sont définis par trois nombres entiers (*h, k, l*) appelés indices de Miller. La loi de Bragg permet de décrire ce phénomène et montre que les interférences constructives se produiront seulement à des valeurs d'angle θ particulières :

$$2d_{hkl}sin\theta = n\lambda, \text{avec n un nombre entier}$$

Cette formule est utilisée en permanence à toutes les étapes de la résolution d'une structure cristallographique. Chaque paramètre est associé à un élément important de l'expérience :

- λ : la longueur d'onde des rayons X
- *d* : la distance inter-réticulaire
- θ : l'angle de Bragg, demi-angle de déviation

La longueur d'onde des rayons X est une valeur connue pendant l'expérience de diffraction. L'angle de Bragg peut être déterminé car la distance entre le cristal et le détecteur et celle entre le faisceau et les limites du détecteur sont connues. La loi de Bragg permet ainsi de déterminer la distance inter-réticulaire qui correspond à la plus petite distance que l'on sera capable de visualiser et détermine ainsi la résolution maximale du diagramme de diffraction. La géométrie de la diffraction d'un cristal peut être visualisée facilement grâce à une construction géométrique appelée sphère d'Ewald (Figure 122).

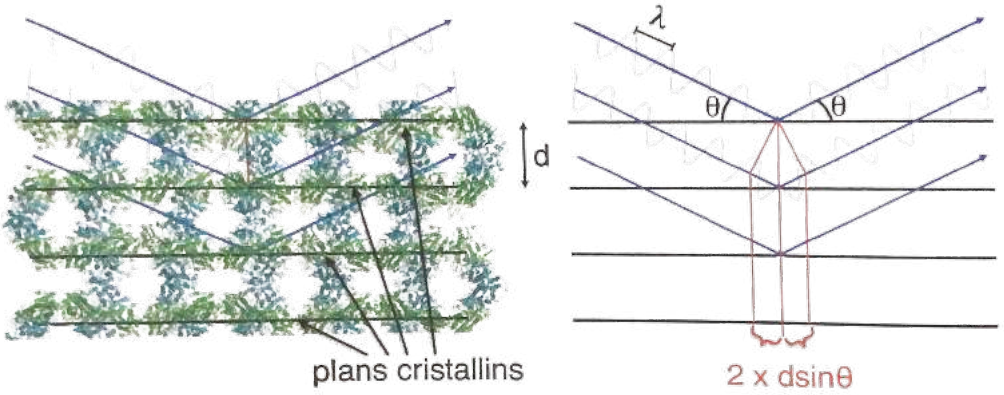


Figure 122 : schéma décrivant le phénomène de diffraction selon la loi de Bragg.

D. Enregistrement des données

Pour produire des rayons X, le moyen le plus utilisé de nos jours en bio-cristallographie est le rayonnement synchrotron. Un synchrotron est composé d'un canon à électrons dans lequel les électrons sont injectés dans un premier accélérateur linéaire appelé LINAC, puis dans un second accélérateur en forme d'anneau appelé Booster. Dans le booster, les électrons sont accélérés jusqu'à atteindre une vitesse proche de celle de la lumière puis ils sont injectés dans un anneau de stockage, un accélérateur circulaire, où ils continuent de tourner. Ces anneaux de stockage sont composés d'une succession d'éléments magnétiques (aimant de courbure) et de cavités radiofréquences qui redonnent aux électrons l'énergie perdue en rayonnant. Cette énergie perdue est récupérée dans un laboratoire appelé ligne de lumière, construit tangentiellement à l'anneau de stockage dans laquelle les expériences ont lieu (Figure 123).

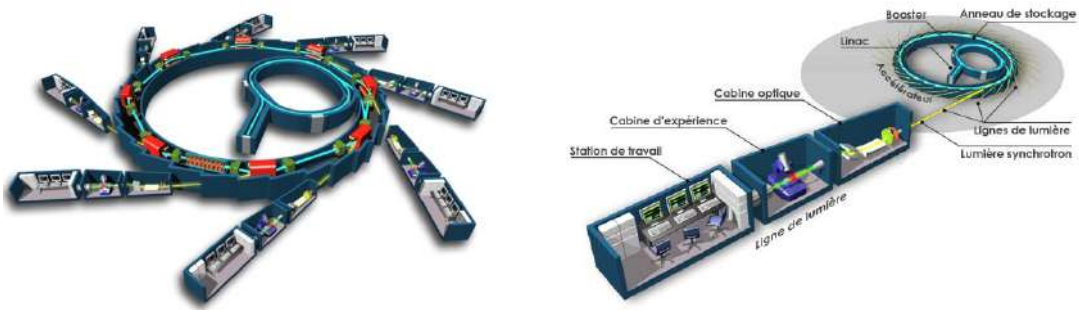


Figure 123 : schéma général du synchrotron SOLEIL et d'une ligne de lumière.
Source : https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/structure-dune-ligne-de-lumiere

En France, il existe deux centres synchrotrons. Sur le campus de Paris Saclay, le CNRS et le CEA ont construit SOLEIL en 2001 et à Grenoble, une collaboration européenne a permis la construction de l'ESRF « European Synchrotron Radiation Facility » en 1994. Durant cette thèse, nous avons également utilisé le synchrotron catalano-espagnol ALBA situé à Barcelone et ouvert en 2010.

Ces lignes synchrotron sont utilisées par différentes disciplines : la cristallographie, la physique des solides, la chimie, la médecine ou encore la science du patrimoine.

Depuis quelques années, et notamment avec la pandémie de COVID-19, les différents synchrotrons ont mis en place les expériences en mode « remote », c'est-à-dire que les cristaux sont envoyés sur place et que les expérimentateurs travaillent de leur laboratoire respectif. Nous pouvions donc piloter les expériences de diffraction des rayons X depuis Toulouse à distance.

Lors des expériences, les UniPucks contenant les cristaux sont maintenus à des températures cryogéniques dans un bain d'azote liquide. Le cristal choisi est positionné par le robot passeur d'échantillons sur le goniomètre. Les moteurs du goniomètre permettent de centrer et d'orienter le cristal, qui est maintenu à basse température avec un jet d'azote gazeux continu, en générale de l'ordre de 100 K. Pour avoir la structure tridimensionnelle, l'acquisition des données se fait par rotation du cristal (Figure 124).

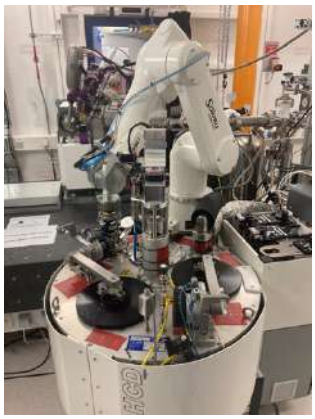
a.  b.  c. 

Figure 124 : photos prises sur la ligne ID30B ESRF a. Bain d'azote liquide avec emplacement des UniPucks. b. Robot de transfert des cristaux c. Goniomètre.

La salle de contrôle se constitue de différents écrans, à l'ESRF et à l'IPBS, nous travaillions sur deux écrans principaux :

- Un écran sur lequel se trouve l'interface pour contrôler le robot pour l'alignement du cristal.
- Un autre écran sur lequel se trouve l'interface pour visualiser les clichés de diffraction.

L'enregistrement des données de diffraction se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord le cristal est centré dans les 3 directions de l'espace pour que le faisceau de rayons X puisse irradier la partie du cristal sélectionnée. En cas de cristal gelé ou difficile à centrer, une option très pratique, qui existe sur la plupart des lignes utilisées, consiste à réaliser un scan de diffraction sur une « grille » sur laquelle l'intensité de diffraction sera analysée. Après centrage, une étape de caractérisation est effectuée en enregistrant 4 clichés de diffraction après rotation du cristal, par exemple tous les 90° pour la collecte. Différents paramètres sont à considérer :

- L'angle de départ.
- L'énergie du faisceau de rayons X (qui est, en fait, intrinsèque à la ligne de lumière).
- Le temps d'exposition.
- La position du détecteur à laquelle est reliée la résolution maximale qui peut être atteinte.
- La transmission qui permet de couper une part de l'intensité du faisceau incident.
- L'angle d'oscillation : l'écart d'angle entre 2 clichés.

Lors de l'étape de caractérisation, le détecteur est positionné à la limite habituelle – si elle est connue – de résolution des cristaux, ou si tel n'est pas le cas à une résolution moyenne, par exemple 2 Å. La transmission, qui dépend de la ligne de lumière, est mise à 100%. La caractérisation est très rapide, dure généralement entre 1 à 2 minutes. Les 4 clichés de diffraction obtenus, permettent d'évaluer la diffraction du cristal et s'il est bien centré dans les 3 directions. On peut ainsi déterminer la résolution maximale qui pourra être atteinte.

Sur la plupart des lignes, l'analyse cristallographique préliminaire des clichés de diffraction est réalisée de façon automatique et donne une stratégie d'enregistrement pour avoir un jeu de données complet. Cette analyse donne des informations (structurales) telles que le groupe d'espace et les paramètres de maille et propose des paramètres pour l'enregistrement des données de diffraction, telles que la résolution maximale qui pourra être atteinte, la transmission, l'angle d'oscillation et le nombre d'images à collecter. En fait, pour tous les enregistrements, peu importait le groupe d'espace, nous collections 360° du cristal afin d'être sûr d'avoir des jeux de données complets. Cette étape d'enregistrement est plus longue que la caractérisation et en fonction du nombre d'images et le la ligne de lumière utilisée, elle peut durer entre 4 et 10 minutes.

De même que pour l'étape de caractérisation, les jeux de données de diffraction sont le plus souvent traités en ligne, ce qui permet d'avoir très rapidement une information sur leur qualité.

E. Résolution de la structure cristallographique

La résolution de la structure se divise en deux parties, le traitement et l'analyse des données de diffraction et la résolution et l'affinement de structure.

1. Le traitement et analyse des données

Le traitement des données comprend l'analyse des images brutes afin de déterminer le groupe d'espace, les paramètres de maille et les intensités/amplitudes des ondes. Au laboratoire, ce traitement a été réalisé à l'aide de l'interface XDSGUI qui est constituée de plusieurs programmes (XDS.INP, XYCORR, INIT, COLSPOT, IDXREF, DEFPIX, INTEGRATE, CORRECT).

a) L'indexation

L'étape d'indexation consiste à déterminer les paramètres de maille et d'orientation du cristal, et d'assigner les indices *hkl* à chaque tache de diffraction. L'analyse des images se fait par étapes successives. Tout d'abord, l'évaluation du bruit de fond des images qui provient de la diffusion continue des rayons X. La deuxième étape consiste à rechercher des taches de diffraction, pour cela seules deux séries d'images enregistrées avec un écart d'orientation du cristal de 90° peuvent suffire. Et enfin, l'auto-indexation consiste à déterminer les types de réseaux de Bravais probables, les paramètres de maille et les groupes d'espace possibles. Cette étape est très souvent effectuée lors de la caractérisation afin d'établir le plan d'enregistrement. Elle est également répétée après l'enregistrement pour confirmer les paramètres de maille à partir d'un nombre plus important de clichés de diffraction. La connaissance des paramètres de maille est indispensable pour pouvoir indexer l'ensemble des taches, c'est-à-dire attribuer à chaque réflexion les indices de Miller *hkl* correspondants. La symétrie et le groupe d'espace seront finalisés par la suite.

b) L'intégration

L'intégration permet d'estimer l'intensité de diffraction et le bruit associés à chaque tache de diffraction. Elle permet d'en définir le profil tridimensionnel. Une tache de diffraction ne correspond pas qu'à un seul point ; elle occupe un volume tridimensionnel. Lors de l'enregistrement, plusieurs images comprennent des informations pour chaque tache de diffraction. Pour obtenir l'intensité d'une tache de diffraction à une position *hkl*, il faut donc faire la somme des intensités des différentes images. Cette étape est la plus longue puisqu'elle nécessite que le logiciel analyse les images une par une et additionne les intensités des pixels mesurés autour des positions *hkl.*

c) La mise à l'échelle

Cette étape consiste à appliquer les paramètres de correction pour prendre en compte des erreurs expérimentales et des paramètres associés à l'expérience notamment du fait de la dégradation au cours de l'irradiation ou de la variation d'intensité du rayonnement. Cette étape va permettre de valider l'hypothèse de symétrie choisie.

d) Choix du groupe d'espace

Le choix du groupe d'espace est la dernière étape de traitement de données. Elle permet de prendre en compte la présence éventuelle d'axes hélicoïdaux, par exemple de déterminer si le groupe d'espace est plutôt *P*222 ou $P222_1$.

Afin de pouvoir analyser les données de diffraction, il faut s'assurer que le traitement soit le plus juste possible. Un tableau récapitulatif des statistiques (Figure 125) permet d'évaluer la qualité des données qui fournit différentes valeurs de paramètres qu'il convient de bien vérifier.

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE >= -3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE	COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR expected	COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal Corr	SigAno	Nano
5.66	26305	8764	8879	98.7%	4.0%	4.6%	26017	20.57	4.9%	99.7*	-7	0.723	3897
4.02	47078	15770	15875	99.3%	5.6%	5.0%	46769	18.76	6.8%	99.2*	-6	0.833	7318
3.28	62793	20452	20571	99.4%	6.7%	6.0%	62376	15.35	8.2%	99.1*	-5	0.838	9580
2.85	69130	24153	24349	99.2%	10.6%	10.2%	68043	9.32	13.1%	98.2*	-1	0.813	10824
2.55	82447	27393	27530	99.5%	17.6%	17.9%	81485	6.26	21.5%	95.6*	-1	0.780	12578
2.33	93785	30449	30550	99.7%	27.4%	29.2%	92873	4.37	33.3%	90.2*	-2	0.759	14147
2.15	94683	32803	32937	99.6%	38.9%	42.4%	93175	3.01	47.9%	80.8*	-1	0.742	14740
2.01	102315	35393	35554	99.5%	63.4%	72.1%	100682	1.85	78.1%	61.6*	-2	0.709	15930
1.90	112072	37558	37939	99.0%	98.9%	118.9%	110293	1.15	120.6%	40.5*	-2	0.668	16949
total	690608	232735	234184	99.4%	10.7%	10.9%	681713	6.56	13.0%	99.4*	-2	0.754	105963

Figure 125 : exemple de tableau de statistiques d'évaluation de la qualité d'un jeu de données de diffraction.

La première colonne correspond à la limite supérieure de la résolution. Le nombre de réflexions mesurées (deuxième colonne) correspond au nombre total de réflexions enregistrées sans tenir compte des réflexions équivalentes, le nombre de réflexions uniques correspond au nombre de réflexions observées en prenant en compte les réflexions équivalentes et le nombre de réflexions possible est, lui, le nombre maximum de réflexions à une résolution donnée, ces dernières peuvent être calculées à partir des paramètres de maille, de la symétrie choisie et des limites de résolution.
La complétude se déduit du rapport entre le nombre de réflexions uniques mesurées et le nombre de réflexions possibles. Ce paramètre indique si le jeu de données est complet à la résolution choisie. Le but est d'avoir une complétude qui se rapproche de 100%. Le facteur R augmente avec la résolution ; à haute résolution, les intensités sont plus faibles et sont donc plus difficiles à mesurer avec précision. Pour valider la qualité d'un jeu de données, ce paramètre doit être inférieur à 10% à basse résolution sinon cela signifie que le groupe de Laue choisi est faux.
Le rapport I/*sigma* correspond au rapport signal sur bruit. En l'absence de dégradation du cristal, plus il y a de réflexions équivalentes, plus ce rapport doit augmenter ; ce qui reflète une meilleure fiabilité des données. Enfin, le coefficient de corrélation *CC(1/2*) correspond au pourcentage de corrélation entre les intensités de demi-ensembles de données aléatoires[293].

À la fin du traitement de données, nous obtenons un fichier contenant les intensités des réflexions *hkl* et les statistiques permettant d'évaluer leur qualité.

2. Résolution et affinement de la structure

Durant ce projet de thèse, la résolution et l'affinement des structures ont été effectués à l'aide des logiciels de la chaîne de programmes CCP4. Le projet CCP4 pour « Collaborative Computational Project No 4 » a été lancé en 1979 par le UK Science Research Council afin de mettre en place des collaborations pour optimiser l'utilisation des outils de calculs en cristallographie. Ainsi, CCP4 a permis de soutenir les collaborations entre les chercheurs travaillant sur les logiciels adaptés à la cristallographie des protéines afin d'établir une collection de logiciels visant à résoudre de manière rapide et efficace les structures cristallographiques des protéines[294].

Aujourd'hui, CCP4 est une référence internationale pour résoudre les structures cristallographiques.

a) La transformée de Fourier

Le résultat expérimental final de la cristallographie aux rayons X est une carte de densité électronique qui représente le nombre d'électrons par unité de volume en chaque point de l'unité asymétrique. Grâce à cette carte, un modèle tridimensionnel comprenant les coordonnées spatiales de chaque atome de l'entité cristallisée peut être construit, il se situe dans l'espace direct. Les données de diffraction sont dans l'espace réciproque. Pour passer d'un espace à l'autre, il faut appliquer l'opération mathématique appelée transformée de Fourier. Joseph Fourier a énoncé que toute fonction périodique (comme une densité électronique) peut s'exprimer comme la somme de fonctions périodiques simples comme des sinus ou cosinus. Le calcul de la densité électronique contraint de déterminer la phase et l'amplitude de chacune des ondes diffractées par le cristal. Les intensités des faisceaux diffractés sont connues lors de l'enregistrement des données mais la phase est inconnue, d'où ce que l'on appelle le problème de phase.

Ce problème peut être résolu de plusieurs façons :

- L'introduction d'atomes lourds dans le réseau cristallin ou remplacement isomorphe.
- La diffusion anomale.
- Le remplacement moléculaire.

Seule la méthode de remplacement moléculaire sera décrite ici car elle a été la seule utilisée durant cette thèse.

b) Le remplacement moléculaire

La méthode du remplacement moléculaire s'appuie sur le fait que la structure de la molécule étudiée est similaire à celle d'une molécule de structure connue. En effet, si deux protéines présentent plus de 25% d'identité de séquence, on estime que le repliement sera semblable. Dans le cas de la protéine InhA, de nombreuses structures ont été déposées dans la PDB dont la plupart correspondent à des complexes avec des ligands. Dans cette thèse, nous pouvons choisir une structure cristallographique existante avec le groupe d'espace et des paramètres de maille identiques ou très proche comme structure référente pour la positionner dans le système cristallin étudié. Le programme utilisé est Refmac5. Le remplacement moléculaire consiste à récupérer les coordonnées de chacun des atomes de la structure homologue, de nettoyer ce modèle pour ne conserver que ce qui est commun aux deux structures primaires. Ensuite, il faut générer un cristal virtuel ayant les mêmes paramètres de mailles que le cristal expérimental. Cela nécessite de placer d'abord en rotation puis en translation les molécules modèles comme celles du cristal expérimental. Connaissant alors les coordonnées spatiales (x, y, z) de l'ensemble des atomes présents dans la maille de ce cristal virtuel ; les ondes diffractées (amplitudes et phases) peuvent être calculées. Ensuite, il suffit d'appliquer aux amplitudes mesurées expérimentalement, les phases calculées. Cette méthode peut présenter un biais provenant de l'importance relative des phases (issues du modèle) par rapport aux amplitudes expérimentales. L'information présente dans les cartes de densités électroniques est celle issue du modèle utilisé. Il est donc nécessaire de vérifier les cartes de densité électroniques dans la phase de construction.

c) Visualisation de la carte de densité électronique et affinement de la structure

À l'issue du remplacement moléculaire, une carte de densité électronique peut être calculée et visualisée, dans cette étude avec le logiciel Coot. L'affinement du modèle est un processus itératif qui alterne entre des étapes dites de construction qui impliquent des corrections locales du modèle dans l'espace direct, et des étapes dites d'affinement qui visent à minimiser le désaccord entre les données calculées et les données expérimentales dans l'espace réciproque. Cette étape a été effectuée à l'aide du programme Refmac5.

La finalité de cet affinement est que le modèle issu de l'interprétation de la carte de densité électronique soit le plus juste possible. Les principaux paramètres optimisés au cours de ce processus sont, pour chaque atome, la position *x, y, z* et le facteur B, aussi appelé facteur de température, qui rend compte de l'agitation des atomes autour de leur position.

Au cours du processus d'affinement, l'amélioration du modèle est suivie à l'aide d'un facteur d'accord *R* qui mesure la différence entre les amplitudes des facteurs de structures obtenues expérimentalement (F_{obs}) et les amplitudes de facteurs de structures calculées (F_{calc}) à partir du modèle:

$$R = \frac{\sum_{hkl}\left||F_{obs}| - |F_{calc}|\right|}{\sum_{hkl}|F_{obs}|}$$

Au cours de l'affinement, le modèle s'améliore progressivement, l'écart entre les F_{obs} et F_{calc} diminue et le facteur *R* diminue donc également. Plus ce facteur est bas, plus l'accord entre le modèle et les données est bon. En fin d'affinement, il se situe généralement entre 0,15 et 0,25 selon la qualité et la résolution des données. Le risque de biais est important car les algorithmes utilisés par les logiciels d'affinement cherchent directement à minimiser ce facteur *R*. De ce fait, le facteur R_{free} est calculé sur une partie des facteurs de structure non pris en compte dans l'affinement et correspond donc à une procédure de validation croisée. La comparaison des facteurs *R* et du R_{free} permet de guider l'affinement et la reconstruction. En fin d'affinement, le facteur R_{free} se situe en général entre 0,20 et 0,30 et l'écart entre le R_{free} et le *R* se situe autour de 0,05 et ne doit pas dépasser 0,1.

Un deuxième aspect essentiel vient de la géométrie du modèle moléculaire. La position *x, y, z* de chaque atome évolue au cours de l'affinement et une vérification de ces positions atomiques est effectuée afin de s'assurer que la carte de densité électronique correspond au modèle en respectant les règles stéréochimiques. Les molécules de solvant, ou les ions liés à la macromolécule ne sont pas nécessairement présents dans toutes les mailles. De la même manière, certaines chaînes latérales ou les ligands peuvent adopter différentes conformations, nous pouvons optimiser leur taux d'occupation qui peut être inférieur à 1.

À chaque cycle d'affinement du modèle, de nouvelles cartes de densité électronique sont calculées. Ainsi, nous travaillons essentiellement avec deux cartes de densités électroniques appelées *2Fo-Fc* et *Fo-Fc*. La carte de densité *2Fo-Fc* contient en chaque point *x, y, z* une densité d'électrons qui doit correspondre à celle de la molécule cristallisée (représentée en bleu dans la figure), elle permet d'observer la densité électronique de la molécule et de corriger le modèle. La carte *Fo-Fc* contient des pics, positifs quand il manque des parties dans le modèle moléculaire (représentée en vert dans la

figure), ou négatifs quand ils correspondent à des parties sur-modélisées (représentée en rouge dans la figure, c'est-à-dire qu'un/des atome a/ont été positionné/s là où il ne devrait pas y en avoir (Figure 126).

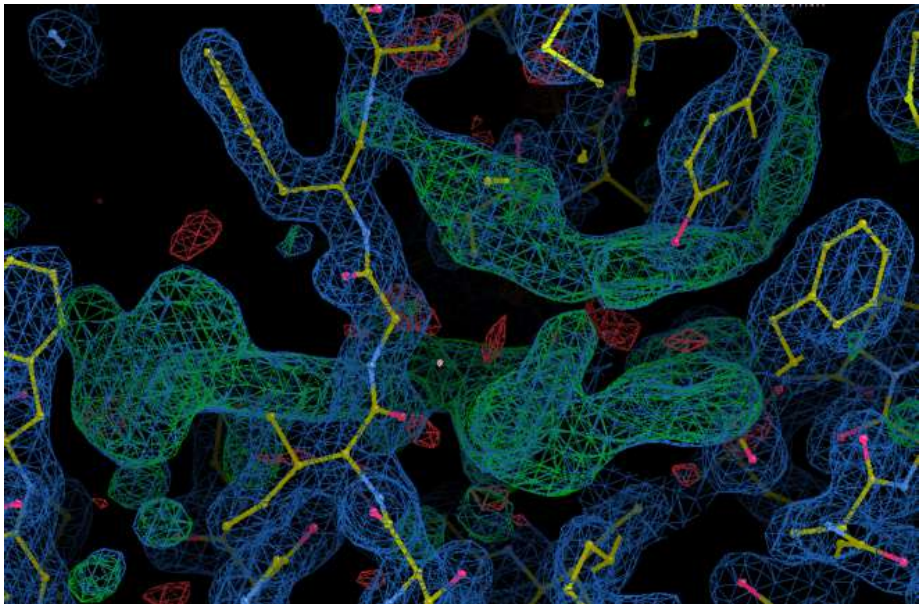


Figure 126 : cartes de densité électronique : *2Fo-Fc* (en bleu) et *Fo-Fc* (en vert et en rouge) qui ont permis de construire le modèle.

d) Validation de la structure tridimensionnelle

Quand la valeur du *R-facteur* se situe entre 0,15 et 0,25, celle du R_{free} entre 0,20 et 0,30, qu'ils n'évoluent plus et que le carte Fo-Fc ne montre plus de pics significatifs de densité positive et négative alors la convergence de l'affinement est atteinte. Le tableau de statistiques qui permet d'évaluer la structure peut être établi. Il synthétise l'ensemble des paramètres cristallographiques et géométriques qui évaluent l'accord entre le modèle atomique et les données expérimentales et également la qualité du modèle atomique par comparaison à des standards établis par la communauté scientifique.

La première partie du tableau renseigne sur les données expérimentales et leurs conditions d'acquisition : la longueur d'onde d'enregistrement, le groupe d'espace, les paramètres de maille, les limites de diffraction, le facteur d'accord des données de diffraction, le nombre de réflexions, le rapport signal sur bruit, la complétude des données et leur multiplicité. Dans la deuxième partie du tableau, se trouvent les statistiques associées à la qualité du modèle.

Les tableaux de statistiques des structures cristallographiques résolues par remplacement moléculaire durant la thèse sont donnés ci-dessous.

Composé Code PDB	7e 8OTN		7b 8OTM		9b non déposé		C01 non déposé	
Ligne de faisceaux	ESRF, ID30b		ALBA, XALOC		ESRF, ID30b		ESRF, ID23eh1	
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$		$P2_1$		$P6_222$		$C222_1$	
Paramètres de maille *a*, *b*, *c* (Å) **α, β, γ(°)**	70,16, 91,18, 164,22 90,00, 90,00, 90,00		90,59, 92,78, 90,75 90,00, 119,20, 90,00		98,743 98,743 141,670 90,0 90,0 120,0		81,731 100,285 374,815 90,0 90,0 90,0	
Gamme de résolution (Å)	82,11-1,96	2,10-1,96	79,07-1,60	1,65-1,60	85,51-1,80	1,95-1,80	93,70-1,70	1,75-1,70
Nombre d'observations	256 508	9 995	892 498	36 991	235 565	16 819	1 654 463	92 612
Nombre de réflexions	55 847	2 774	157 530	7 876	29 256	1 463	129 492	6 476
Multiplicité	4,6	3,6	5,7	4,7	8,1	11,5	12,8	14,3
Complétude (sphérique, %)	72,9	20,3	91,3	50,2	76,5	17,9	76,6	50,9
Complétude (ellipsoïdal, %)	89,1	47,5	96,8	83,3	95,5	73,5	83,1	92,8
$\langle I/\sigma \rangle$	8,5	1,8	13,5	2,0	11,0	1,9	15,8	1,9
R_{merge}	0,137	1,022	0,072	0,647	0,095	1,050	0,083	1,035
R_{pim}	0,070	0,604	0,033	0,330	0,035	0,321	0,035	0,397
CC(1/2)	0,995	0,468	0,999	0,716	0,998	0,814	0,998	0,752
Gamme de résolution (Å)	28,72-1,96		79,10-1,60		22,56-1,80		24,88-1,70	
Nombre de réflexions (work/test)	52 609/2 855		149 218/8 312		27 727/1 501		122 802/6 630	
Rwork/Rfree	0,1933/0,2330		0,1587/0,1777		0,1788/0,1960		0,1834/0,2146	
Nombre d'atomes non-H								
Protéine	7 859		7 885		1 991		11 613	
Cofacteur	176		176		44		264	
Ligand	136		175		40		309	
Solvant	326		1108		186		623	
Moyenne facteurs B (Å²)								
Globalement	29,25		21,91		33,58		34,71	
Protéine	28,95		19,63		31,68		35,59	
Cofacteur	23,40		15,70		25,30		28,55	
Ligand	34,68		23,64		27,40		36,51	
Solvant	37,61		36,60		45,15		37,10	
Déviation RMS								
Longueurs de liaison (Å)	0,0078		0,0092		0,0081		0,0089	
Angles de liaison (°)	0,96		0,95		0,85		1,00	
Diagramme de Ramachandran								
Les plus favorisés (%)	96,1		96,0		95,5		95,6	
Autorisés/absents (%)	3,7/0,2		4,0/0,0		4,5/0,0		4,4/0,0	

Composé	C02	C04
Ligne de faisceaux	ESRF, ID30B	SOLEIL, PX1
Structure cristallographique de référence pour le remplacement moléculaire	1P44	2B35
Longueur d'onde (Å)	0.873128	0.978565
Groupe d'espace	*C*121	*C*121
Paramètres de maille a, b, c	100,677 82,457 190,301	99.385 82.113 188.629
α, β, γ	90,0 95,5 90,0	90.0 95.5 90.0
Limite de diffraction	189,44 – 1.63	46,94-1.93
R-meas	0,056	0,140
CC(1/2)	0.999	0.997
Nombre unique de réflexions	203651	113061
I/σ	14,8	8,5
Complétude	99,9	99.85
Multiplicité	5,6	5,8
Résolution	1.6	1.9
R-factor	0,184	0.18656
R-free	0,215	0.22946
Nombre d'atomes de protéine	11,756	12450
Nombre de molécule d'eau	808	515
RMSD bond lengths (Å)	0,0094	0.007
RMSD bond angles (°)	1,844	1.525

Tableau 22 : statistiques des structures cristallographiques des complexes de InhA avec le NAD+ et les ligands 5a, 5i, 9l, C01, C02 et C04.

L'analyse des structures cristallographiques de InhA en complexe avec **7e**, **7b**, **9b** et **C01** a été effectuée avec le programme AutoProc, celles en présence de **C02** et **C04** ont été effectuée par XDS.

PARTIES EXPERIMENTALES

I Chemistry

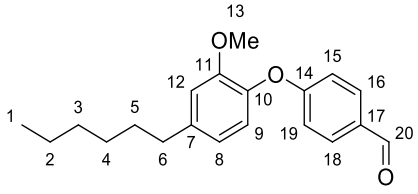
All commercially available chemical solvents and reagents were used without further purification. ^{1}H and ^{13}C were recorded on a Bruker Avance 600 (600 MHz and 151 MHz respectively); Bruker Avance 500 (500 MHz and 125 MHz, respectively) or a Bruker Avance 300 spectrometer (300 MHz and 75 MHz, respectively). The chemical shift values are reported in ppm and the coupling constants (*J*) are in Hz, while multiplicities are abbreviated by s (singlet); bs (broad singlet); d (doublet); dd (doublet of doublets); t (triplet); q (quadruplet); quint (quintuplet); td (triplet of doublets); tt (triplet of triplets); m (multiplet). * = the multiplicity of the signal is more complex as it is part of an AA'XX' system. Chemical shifts (δ) were reported in ppm, using the solvent residual peak as internal reference: $CDCl_3$ δ = 7.26 ppm/77.0 ppm, DMSO-d_6 δ = 2.50 ppm/39.52 ppm. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a GCT Premier spectrometer upon electron spray ionization (ESI) or chemical ionization (DCI, CH_4). Follow up of the reaction outcome by thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated Merck silica gel 60F-254 plates using an appropriate solvent system and the different spots were detected under UV lamp (λ 254 nm or 360 nm). Flash chromatography were performed using a Puriflash®300 with silica columns.

All the compounds were dissolved in acetonitrile before analysis by a Waters Acquity UHPLC-DAD-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector). The separations were achieved on a Waters Acquity BEH Phenyl (100 mm x 2.1 mm, particle size 1.7 µm) column. The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B) at a flow rate of 0.4 mL min^{-1}. The temperature of the column oven was set at 30 °C. The chromatographic analysis consisted in a linear gradient program from 60% A/40% B to 0% A/100% B between 1 and 12 min. After each run, the percentage of solvents ramped to their initial composition in 2 min and then the column was re-equilibrated for 2 min. The UV detection were performed at Lambda max of each compound and UV-Vis spectra were recorded within a range of 200-800 nm. The presence of possible impurities was evaluated at different wavelengths. The data acquisition and processing were done with the Empower 2 software. All tested compounds were more than 95% pure, as established by HPLC.

I.A Chemical synthesis of chapter 1

I.A.1 Azide precursors

4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (3a):



$C_{20}H_{24}O_3$
312,17

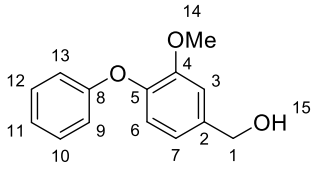
To a solution of **4-Hexyl-2-methoxyphenol**[169] (0.300 g, 1.44 mmol, 1 eq) and **4-fluorobenzaldehyde** (0.430 g, 3.46 mmol, 2.4 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (10 mL) under argon was added cesium carbonate (1.400 g, 4.3 mmol, 3.0 eq). After 24 h at 120 °C, *N,N*-dimethylformamide was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added and aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Ethyl acetate phase was washed with brine and water. Combined organic

phases were dried on magnesium sulfate, filtrated and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 80/20) to afford compound **3a** as a colorless oil (81%, 365 mg). R_f = 0.83 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.88 (s, 1H (H_{20})); 7.79 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 6.98-6.95 (m, 3H ($H_{9,15,19}$)); 6.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_{12})); 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H_8)); 3.76 (s, 3H (H_{13})); 2.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H_6)); 1.67-1.62 (m, 2H (H_5)); 1.42-1.29 (m, 6H ($H_{2,3,4}$); 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 190.7 (C_{20}); 163.7 (C_{14}); 151.2 (C_{11}); 141.5 (C_{10}); 140.5 (C_7); 131.7 (C_{17}); 130.6 (2C, $C_{16,18}$); 122.1 (C_8); 120.9 (C_9); 115.9 (2C, $C_{15,19}$); 113.0 (C_{12}); 55.6 (C_{13}); 35.8 (C_6); 31.6 (C_3); 31.4 (C_5); 28.9 (C_4); 22.5 (C_2); 14.0 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H^+]$) calculated for $C_{20}H_{25}O_3$ 312.1725, found 312.1732.

General procedure for the reduction (1b, 2b, 3b):

To a solution of aldehyde (1 eq) in methanol was added portion wise sodium borohydride (5 eq). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and water was added. After concentration over vacuum, the mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

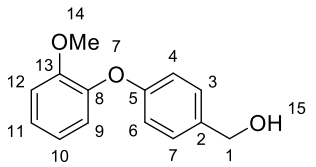
(4-Benzyl-3-methoxyphenyl)methanol (1b):



$C_{14}H_{14}O_3$
230,09

Procedure involving aldehyde **1a**[201,202] (860 mg, 3.8 mmol), methanol (43 mL) and sodium borohydride (728 mg, 18.9 mmol). Water (50 mL) and dichloromethane (3 x 50 mL). No purification was necessary to afford compound **1b** as a white solid (100%, 0.874 g), R_f = 0.34 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.33-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.07-7.02 (m, 2H ($H_{6,11}$)); 6.97-6.92 (m, 3H ($H_{3,9,13}$)); 6.89 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H_7)); 4.69 (s, 2H (H_1)); 3.85 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.8 (C_8); 151.3 (C_4); 144.2 (C_5); 137.6 (C_2); 129.4 (2C, $C_{10,12}$); 122.4 (C_{11}); 120.8 (C_7); 119.3 (C_6); 117.0 (2C, $C_{9,13}$); 111.5 (C_3); 64.8 (C_1); 55.8 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}O_3$ 230.0943, found 230.0937.

(4-(2-Methoxyphenoxy)phenyl)methanol (2b):

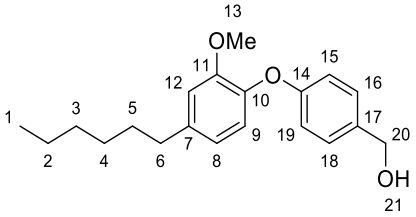


$C_{14}H_{14}O_3$
230,09

Procedure involving aldehyde **2a**[203] (340 mg, 1.49 mmol), methanol (17 mL), sodium borohydride (290 mg, 7.45 mmol). Water 30 mL and dichloromethane (3 x 30 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 80/20) gave compound **2b** as a colourless oil (94%, 320 mg), R_f = 0.08 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.29 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{3,7}$)); 7.14 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 2.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.03-6.89 (m, 5H ($H_{4,6,9,10,12}$)); 4.65 (s, 2H (H_1)); 3.84 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.5 (C_5); 151.4 (C_{13}); 144.9 (C_8); 134.9 (C_2); 128.5 (2C, $C_{3,7}$); 129.9 (C_{11});

121.1 (C_9); 121.1 (C_{10}); 117.1 (2C, $C_{4,6}$); 112.8 (C_{12}); 64.9(C1); 55.9 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}O_3$ 230.0943, found 230.0954.

(4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)phenyl)methanol (3b):



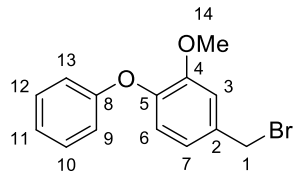
$C_{20}H_{26}O_3$
314,19

Procedure involving aldehyde **3a** (645 mg, 2.09 mmol), methanol (30 mL), sodium borohydride (397 mg, 10.5 mmol). Water 30 mL and dichloromethane (3 x 30 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate 100/0 to 90/10) gave compound **3b** as a white solid (90%, 608 mg), R_f = 0.60 (dichloromethane/ethyl acetate = 90/10). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.26 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 6.93-6.87 (m, 3H ($H_{9,15,19}$)); 6.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_{12})); 6.74 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H (H_8)); 4.60 (s, 2H (H_{20})); 3.81 (s, 3H (H_{13})); 2.61 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H (H_6)); 1.96 (bs, 1H (H_{21})); 1.67-1.62 (m, 2H (H_5)); 1.42-1.30 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.8 (C_{14}); 151.1 (C_{11}); 142.4 (C_{10}); 140.0 (C_7); 134.6 (C_{17}); 128.4 (2C, $C_{16,18}$); 121.0 (C_8); 120.7 (C_9); 116.8 (2C, $C_{15,19}$); 113.0 (C_{12}); 64.8 (C_{20}); 55.9 (C_{13}); 35.8 (C_6); 31.7 (C_3); 31.5 (C_5); 29.0 (C_4); 22.6 (C_2); 14.0 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{20}H_{27}O_3$ 315.1960, found 315.1960.

General procedure for the bromation (1c, 2c):

To a solution of alcohol (1 eq) and triphenylphosphine (2.6 eq) in dry dichloromethane was added portion wise *N*-bromosuccinimide (2.6 eq). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

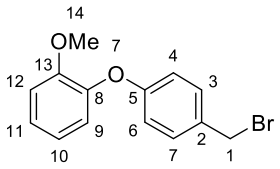
4-(Bromomethyl)-2-methoxy-1-phenoxybenzene (1c):



$C_{14}H_{13}BrO_2$
292,01

Procedure involving alcohol **1b** (140 mg, 0.609 mmol), triphenylphosphine (416 mg, 1.58 mmol), dichloromethane (7 mL) and *N*-bromosuccinimide (282 mg, 1.58 mmol, 2.6 eq). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 70/30) gave compound **1c** as a white solid (95%, 169 mg), R_f = 0.62 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.34-7.28 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.07 (tt, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H (H_{11})); 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.98-6.92 (m, 3H, ($H_{7,9,13}$)); 6.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 4.51 (s, 2H (H_1)); 3.87 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.3 (C_8); 151.2 (C_4); 145.6 (C_5); 134.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 122.9 (C_{11}); 121.7 (C_7); 120.3 (C_6); 117.7 (2C, $C_{9,13}$); 113.4 (C_3); 56.0 (C_{14}); 33.6 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}BrO_2$ 293.0177, found 293.0167.

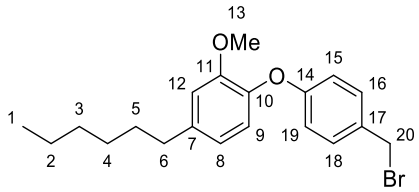
1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (2c):



$C_{14}H_{13}BrO_2$
292,01

Procedure involving alcohol **2b** (290 mg, 1.26 mmol), triphenylphosphine (860 mg, 3.27 mmol), dichloromethane (15 mL) and *N*-bromosuccinimide (583 mg, 3.27 mmol, 2.6 eq). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 90/10) gave compound **2c** as a white solid (76%, 280 mg), R_f = 0.55 ((petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.31 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{3,7}$)); 7.16 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.01 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 2H ($H_{9,12}$)); 6.94 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.8 Hz, 1H (H_{10})); 6.88 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{4,6}$)); 4.50 (s, 2H (H_1)); 3.82 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.2 (C_5); 151.6 (C_{13}); 144.3 (C_8); 131.5 (C_2); 130.4 (2C, $C_{3,7}$); 125.3 (C_{11}); 121.6 (C_9); 121.2 (C_{10}); 116.9 (2C, $C_{4,6}$); 112.8 (C_{12}); 55.9 (C_{14}); 33.6 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}BrO_2$ 293.0177, found 293.0170.

1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-4-hexyl-2-methoxybenzene (3c):



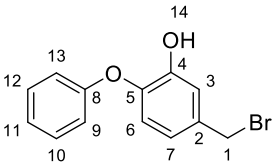
$C_{20}H_{25}BrO_2$
376,10

To a solution of alcohol **3b** (489 mg, 1.56 mmol, 1 eq) in dry dichloromethane (10 mL) at 4 °C under argon, was added phosphorous tribromide (549 mg, 2.03 mmol, 1.3 eq). After 3h, methanol (5 mL) was added. The solvent was removed in vacuo and the crude product was dissolved in dichloromethane. The organic mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/dichloromethane 90/10 to 75/25) gave compound **3c** as a yellow oil (47%, 282 mg), R_f = 0.35 (petroleum ether/dichloromethane = 90/10). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.30 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 6.92 (d *J* = 8.0 Hz, 1H (H_9),); 6.87 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{15,19}$)); 6.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_{12})); 6.75 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H (H_8)); 4.50 (s, 2H (H_{20})); 3.81 (s, 3H (H_{13})); 2.62 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_6)); 1.67-1.62 (m, 2H (H_5)); 1.42-1.27 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.5 (C_{14}); 151.2 (C_{11}); 141.7 (C_{10}); 140.5 (C_7); 131.1 (C_{17}); 130.3 (2C, $C_{16,18}$); 121.5 (C_8); 120.7 (C_9); 116.5 (2C, $C_{15,19}$); 112.9 (C_{12}); 55.9 (C_{13}); 35.8 (C_6); 33.6 (C_{20}); 31.6 (C_3); 31.4 (C_5); 28.9 (C_4); 22.5 (C_2); 14.0 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{20}H_{25}BrO_2$ 376.1038, found 376.1042.

General procedure for the deprotection (1d, 2d, 3d):

To a solution of bromide (1 eq) in dry dichloromethane was added dropwise under argon atmosphere, boron tribromide (1M solution in dichloromethane). The mixture was stirred at 4 °C for 4 h. Methanol was added to quench the reaction. The solvent was removed in vacuo and the crude product was dissolved in dichloromethane. The organic mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo to give the crude product. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

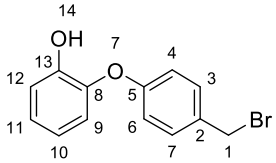
5-(Bromomethyl)-2-phenoxyphenol (1d):



$C_{13}H_{11}BrO_2$
277,99

Procedure involving bromide **1c** (70 mg, 0.24 mmol, 1 eq), dichloromethane (30 mL) and boron tribromide (1M solution in dichloromethane), (3 mL, 3.0 mmol, 12.5 eq). Dichloromethane (2 x 40 mL) and methanol (40 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 90/10) gave compound **1d** as a clear yellow oil (94%, 63 mg), R_f = 0.57 (dichloromethane = 100). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40-7.33 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.18-7.13 (m, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H (H_{11})); 7.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 7.06-7.02 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.87 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 6.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 4.46 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.2 (C_8); 147.2 (C_4); 143.9 (C_5); 134.1 (C_2); 129.9 (2C, $C_{10,12}$); 124.0 (C_{11}); 121.3 (C_7); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 118.3 (C_6); 116.8 (C_3); 33.3 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}BrO_2$ 277.9942, found 277.9937.

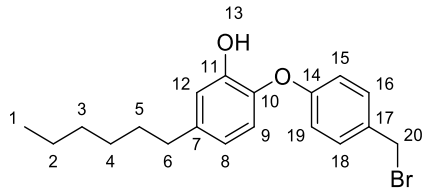
2-(4-(Bromomethyl)phenoxy)phenol (2d):



$C_{13}H_{11}BrO_2$
277,99

Procedure involving bromide **2c** (140 mg, 0.48 mmol, 1 eq), dichloromethane (60 mL), boron tribromide (1M solution in dichloromethane), (6 mL, 6.0 mmol, 12.5 eq). Methanol (40 mL) and dichloromethane (2 x 80 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 90/10) gave compound **2d** as a white solid (38%, 51 mg), R_f = 0.49 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz) δ 7.36 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{3,7}$)); 7.11-7.04 (m, 2H ($H_{10,11}$)); 6.98 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{4,6}$)); 6.93-6.83 (m, 2H ($H_{9,12}$)); 5.57 (bs, 1H (H_{14})); 4.50 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.9 (C_5); 147.5 (C_{13}); 142.9 (C_8); 132.9 (C_2); 130.7 (2C, $C_{3,7}$); 125.2 (C_{11}); 120.7 (C_{10}); 119.4 (C_9); 117.9 (2C, $C_{4,6}$); 116.4 (C_{12}); 33.0 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{13}H_{12}BrO_2$ 279.0021, found 279.0023.

2-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-5-hexylphenol (3d):



$C_{19}H_{23}BrO_2$
362,09

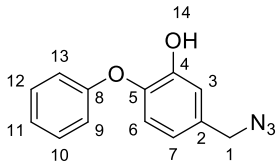
Procedure involving bromide **3c** (103 mg, 0.27 mmol, 1 eq), dichloromethane (5 mL), boron tribromide (1M solution in dichloromethane), (1.08 mL, 1.08 mmol, 4 eq). Methanol (40 mL) and dichloromethane (2 x 30 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/dichloromethane 70/30 to 50/50) gave compound **3d** as a white solid (27%, 27 mg), R_f = 0.33 (petroleum ether/dichloromethane = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.34 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 6.96 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{15,19}$)); 6.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{12})); 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_9)); 6.67 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_8)); 5.37 (bs, 1H (H_{13})); 4.49 (s, 2H (H_{20})); 2.56 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_6)); 1.63-1.56 (m, 2H (H_5)); 1.39-1.26 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.4 (C_{14}); 147.3 (C_{11}); 140.6 (C_{10}); 140.4 (C_7);

132.6 (C_{17}); 130.7 (2C, $C_{16,18}$); 120.6 (C_8); 119.4 (C_9); 117.5 (2C, $C_{15,19}$); 116.2 (C_{12}); 35.5 (C_6); 33.1 (C_{20}); 31.7 (C_3); 31.3 (C_5); 28.9 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{19}H_{23}BrO_2$ 362.0881, found 362.0883.

General procedure for azidation (1e, 2e, 3e):

To a solution of bromide (1 eq) in dry *N,N*-Dimethylformamide was added sodium azide. The mixture was stirred at 45 °C for 4 h. Ethyl acetate and water were added, the aqueous layer was washed with water. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

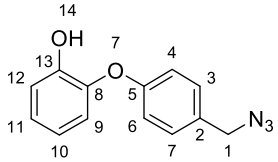
5-(Azidomethyl)-2-phenoxyphenol (1e):



$C_{13}H_{11}N_3O_2$
241,09

Procedure involving bromide **1d** (170 mg, 0.61 mmol, 1 eq), *N,N*-dimethylformamide (2 mL) and sodium azide (97 mg, 1.48 mmol, 2.4 eq). Ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL, 3 x 20 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 80/20) gave compound **1e** as a colourless oil (86%, 125 mg), R_f = 0.60 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40-7.33 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.17-7.12 (tt, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H (H_{11})); 7.06-7.02 (m, 3H ($H_{3,9,13}$)); 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.79 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H (H_7)); 5.64 (s, 1H (H_{14})); 4.28 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.3 (C_8); 147.4 (C_4); 143.5 (C_5); 131.7 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 123.7 (C_{11}); 120.3 (C_7); 118.6 (C_6); 118.1 (2C, $C_{9,13}$); 116.0 (C_3); 54.2 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}N_3O_2$ 241.0851, found 241.0845.

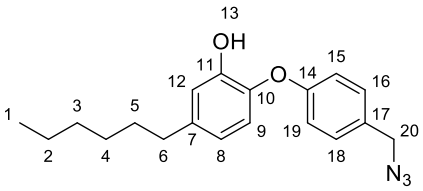
2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)phenol (2e):



$C_{13}H_{11}N_3O_2$
241,09

Procedure involving bromide **2d** (50 mg, 0.18 mmol, 1 eq), *N,N*-dimethylformamide (5 mL), sodium azide (13 mg, 0.2 mmol, 1.1 eq). Ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL, 3 x 20 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 80/20) gave compound **2e** as a colourless oil (100%, 43.4 mg), R_f = 0.46 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.28 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{3,7}$)); 7.15-7.00 (m, 4H ($H_{4,6,10,11}$)); 6.93-6.83 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 4.31 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.9 (C_5), 147.5 (C_{13}), 143.1 (C_8), 130.4 (C_2), 129.9 (2C, $C_{3,7}$), 125.1 (C_{11}), 120.7 (C_{10}), 119.2 (C_9), 118.0 (2C, $C_{4,6}$), 116.4 (C_{12}), 54.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}N_3O_2$ 241.0851, found 241.0869.

2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-hexylphenol (3e):



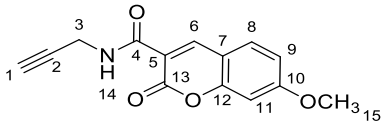
$C_{19}H_{23}N_3O_2$
325,18

Procedure involving bromide **3d** (27 mg, 0.074 mmol, 1 eq), *N,N*-dimethylformamide (2 mL), sodium azide (190 mg, 0.9 mmol, 4 eq). Ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL, 3 x 20 mL). No purification was necessary to give compound **3e** as a colorless oil (100%, 24 mg), R_f = 0.35 (petroleum ether/dichloromethane = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.27 (d*, *J* = 8.6 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 7.01 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{15,19}$)); 6.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{12})); 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_9)); 6.67 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_8)); 5.42 (bs, 1H (H_{13})); 4.31 (s, 2H (H_{20})); 2.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H_6)); 1.66-1.56 (m, 2H (H_5)); 1.37-1.26 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.3 (C_{14}); 147.3 (C_{11}); 140.6 (C_{10}); 140.5 (C_7); 130.2 (C_{17}); 129.9 (2C, $C_{16,18}$); 120.6 (C_8); 119.2 (C_9); 117.7 (2C, $C_{15,19}$); 116.2 (C_{12}); 54.2 (C_{20}); 35.5 (C_6); 31.7 (C_3); 31.3 (C_5); 28.9 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M-N_2-H]^+$) calculated for $C_{19}H_{22}NO_2$ 296.1651, found 296.1649.

I.A.2 Alkyne precursors

General procedure for 4c, 4e:
To a solution of **coumarin-3-carboxylic acid** (0.5 mmol, 1 eq) in dichloromethane (6 mL) was added a solution of carbonydiimidazole (0.6 mmol, 97 mg, 1.2 eq.) in dichloromethane (1 mL), and the solution was stirred at room temperature for 20 h. The reaction mixture was then washed with brine (2 x 10 mL) and water (2 x 10 mL), and the organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness.

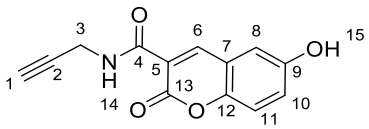
7-Methoxy-2-oxo-N-(prop-2-yn-1-yl)-2H-chromene-3-carboxamide (4c):



$C_{14}H_{11}NO_4$
257,07

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 8.88 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{14})); 8.85 (s, 1H (H_6)); 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H (H_8)); 7.12 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{11})); 7.05 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H (H_9)); 4.12 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 2H (H_3)); 3.90 (s, 3H (H_{15})); 3.16 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_1)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 125 MHz) δ 164.5 (C_{10}); 161.3 (C_4); 160.7 (C_{13}); 156.3 (C_{12}); 148.2 (C_6); 131.6 (C_8); 114.4 (C_5); 113.7 (C_9); 112.2 (C_7); 100.3 (C_{11}); 80.8 (C_2); 73.2 (C_1); 56.3 (C_{15}); 28.6 (C_3). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{12}NO_4$ 258.0766, found 258.0758.

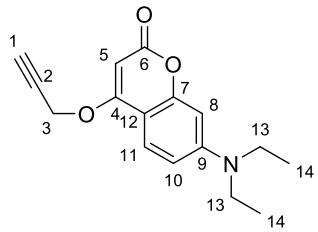
6-Hydroxy-2-oxo-N-(prop-2-yn-1-yl)-2H-chromene-3-carboxamide (4e):



$C_{13}H_9NO_4$
243,05

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 8.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{14})); 8.74 (s, 1H (H_6)); 7.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H (H_{11})); 7.24 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H (H_8)); 7.17 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H (H_{10})); 4.10 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 2H (H_3)); 3.10 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_1)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 125 MHz) δ 161.6 (C_4); 160.7 (C_{13}); 154.5 (C_9); 148.1 (C_6); 147.7 (C_{12}); 122.9 (C_{11}); 119.2 (C_7); 118.6 (C_5); 117.5 (C_{10}); 114.1 (C_8); 81.0 (C_2); 73.5 (C_1); 29.0 (C_3). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{13}H_{10}NO_4$ 244.0610, found 244.0607.

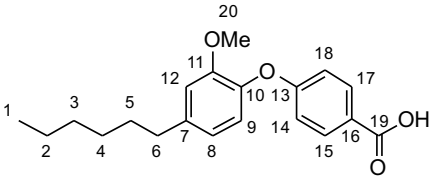
7-(Diethylamino)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one (4g):



$C_{16}H_{17}NO_3$
271,12

To a solution of **7-(diethylamino)-4-hydroxycoumarin**[295] (0.100 g, 0.429 mmol, 1 eq) in *N,N*-dimethylformamide, were added **propargyl bromide** (0.058 mL, 0.515 mmol, 1.2 eq) and potassium carbonate (0.858 mmol, 2 eq) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 100 °C for overnight and then concentrated. The crude material was dissolved in ethyl acetate and washed with water and brine. The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) to afford compound **4g** as a brown powder (33%, 38 mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.55 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H (H_{10})); 6.45 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_8)); 5.52 (s, 1H (H_5)); 4.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_3)); 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H (H_{13})); 2.63 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_1)); 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 165.3 (C_4); 163.9 (C_6); 155.8 (C_7); 151.1 (C_9); 123.9 (C_{11}); 108.3 (C_{10}); 103.4 (C_{12}); 97.1 (C_5); 86.4 (C_8); 77.2 (C_2); 76.3 (C_1); 56.4 (C_3); 44.7 (2C, C_{13}); 12.4 (2C, C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{16}H_{17}NO_3$ 271.1208, found 271.1211.

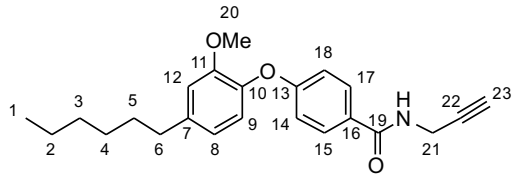
4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)benzoic acid (4p'):



$C_{20}H_{24}O_4$
328,17

To a solution of **cyanide** (482 mg, 1.56 mmol, 1 eq) in a mixture methanol (1 mL) and ethanol (4 mL) was added potassium hydroxide (1.6 g, 28.02 mmol, 18 eq). The mixture was put at 0 °C and 30% of solution hydrogen peroxide was added dropwise. The mixture was then refluxed for 5 h. 2N HCl was added until pH 1 and the mixture was extracted with dichloromethane (2x 40 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 80/20) to give compound **4p'** as a white solid (90%, 460 mg), R_f = 0.14 (petroleum ether/ethyl acetate 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.03 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{15,17}$)); 6.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_9)); 6.92 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{14,18}$)); 6.83 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_{12})); 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H (H_8)); 3.78 (s, 3H (H_{20})); 2.62 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_6)); 1.64 (quint, *J* = 7.8 Hz, 2H (H_5)); 1.42-1.24 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 171.9 (C_{19}); 163.3 (C_{13}); 151.3 (C_{11}); 141.4 (C_{10}); 140.8 (C_7); 132.2 (2C, $C_{15,17}$); 122.6 (C_{16}); 122.1 (C_8); 120.9 (C_9); 115.6 (2C, $C_{14,18}$); 113.1 (C_{12}); 55.8 (C_{20}); 35.9 (C_6); 31.7 (C_3); 31.5 (C_5); 29.0 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{20}H_{25}O_4$ 329.1753, found 329.1750.

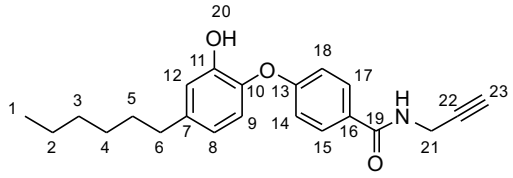
4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (4p''):



$C_{23}H_{27}NO_3$
365,20

To a solution of acid **4p''** (238 mg, 0.76 mmol, 1 eq) in dichloromethane (7 mL) was added carbodiimide (150 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq) in dichloromethane (1.5 mL). The mixture was stirred for 6h and **propargylamine** (209 mg, 3.8 mmol, 5 eq) in dichloromethane (0.5 mL) was added. The mixture was stirred for additional 4 h. After filtration, the filtrate was washed first with brine and after with water. After drying over magnesium sulfate and concentration under vacuum, **4p''** was obtained as a white solid (93%, 260 mg), R_f = 0.60 (dichloromethane/methanol = 98/02). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.71 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{15,17}$)); 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_9)); 6.91 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{14,18}$)); 6.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_{12})); 6.77 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H (H_8)); 6.17 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H (H_{24})); 4.24 (dd, *J* = 5.3, 2.7 Hz, 2H (H_{21})); 3.78 (s, 3H (H_{20})); 2.61 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_6)); 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H (H_{23})); 1.69-1.59 (m, 2H (H_5)); 1.36-1.32 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75MHz) δ 166.6 (C_{19}); 161.5 (C_{13}); 151.2 (C_{11}); 141.1 (2C, $C_{7,10}$); 128.7 (2C, $C_{15,17}$); 127.1 (C_{16}); 121.9 (C_8); 120.9 (C_9); 115.9 (2C, $C_{14,18}$); 113.1 (C_{12}); 79.6 (C_{22}); 71.7 (C_{23}); 55.8 (C_{20}); 35.9 (C_6); 31.7 (C_3); 31.5 (C_5); 29.7 (C_{21}); 29.0 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{23}H_{28}NO_3$ 366.2069, found 366.2068.

4-(4-Hexyl-2-hydroxyphenoxy)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (4p):



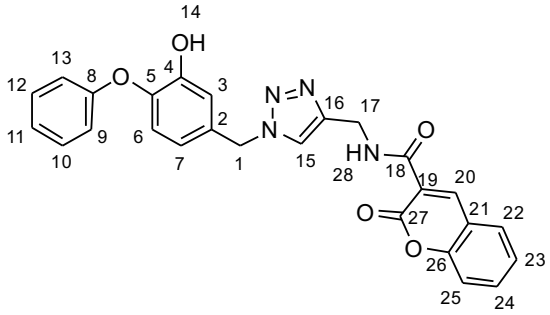
$C_{22}H_{25}NO_3$
351,18

To a solution of alkyne **4p'** (100 mg, 0.272 mmol, 1 eq) in dichloromethane (8 mL) was added dropwise at -78 °C under argon atmosphere, boron tribromide (1M solution in dichloromethane), (2.8 mL, 2.8 mmol, 10 eq). The mixture was stirred at -78 °C for 1 h and the mixture was warmed up to room temperature for an additional 4 h. Methanol (10 mL) and water (10 mL) were added. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 x 30 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/02) to give compound **4p** as a white solid (84%, 80 mg), R_f = 0.19 (dichloromethane/methanol = 98/02). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.70 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{15,17}$)); 6.95 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{14,18}$)); 6.90 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_{12})); 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_9)); 6.69 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_8)); 6.33 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H (H_{24})); 5.89 (s, 1H (H_{20})); 4.22 (dd, *J* = 5.2, 2.5 Hz, 2H (H_{21})); 2.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_6)); 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H (H_{23})); 1.66-1.61 (m, 2H (H_5)); 1.39-1.26 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.5 (C_{19}); 160.6 (C_{13}); 147.6 (C_{11}); 141.2 (C_7); 139.8 (C_{10}); 129.0 (2C, $C_{15,17}$); 128.0 (C_{16}); 120.7 (C_8); 120.1(C_9); 116.7 (C_{12}); 116.6 (2C, $C_{14,18}$); 79.4 (C_{22}); 71.9 (C_{23}); 35.5 (C_6); 31.7 (C_3); 31.3 (C_5); 29.8 (C_{21}); 28.9 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{22}H_{26}NO_3$ 352.1913, found 352.1920.

I.A.3 Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition

General procedure for the copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition CuAAC (5a-p):
A solution of azide (1.2 eq), alkyne (1 eq), cupric sulfate pentahydrate (0.1 eq) and sodium ascorbate (0.4 eq) in a mixture of methanol/water was stirred at room temperature overnight. Water and dichloromethane were added. The combined organic layers were washed with water and brine and dried over magnesium sulfate. After concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected product.

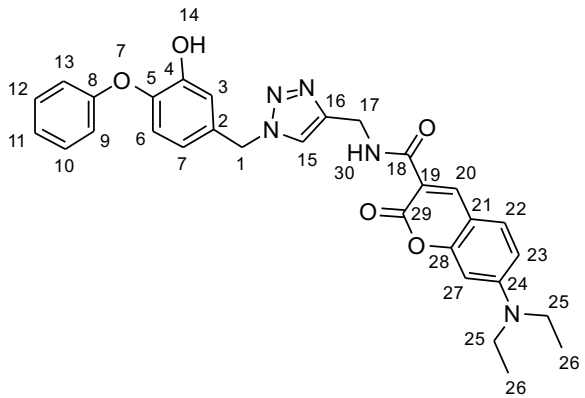
N-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-4-carboxamide (5a):



$C_{26}H_{20}N_4O_5$
468,14

General procedure for the CuAAC involving **1e** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **4a**[210] (40 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.070 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (2 mL/2 mL). Water (5 mL) and dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) gave compound **5a** as a white solid (86%, 70 mg), R_f = 0.28 (dichloromethane/methanol = 97/3). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.68 (s, 1H (H_{14})); 9.14 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{28})); 8.89 (s, 1H (H_{20})); 8.06 (s, 1H (H_{15})); 8.00 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H (H_{22})); 7.76 (ddd, *J* = 8.7, 7.0, 1.8 Hz, 1H (H_{24})); 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H (H_{25})); 7.45 (ddd, *J* = 8.7, 7.1, 1.1 Hz, 1H (H_{23})); 7.31-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.81 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.78 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.51 (s, 2H (H_1)); 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.1 (C_{18}); 160.3 (C_{27}); 157.7 (C_8); 153.9 (C_{26}); 149.4 (C_4); 147.7 (C_{20}); 144.4 (C_{16}); 142.4 (C_5); 134.2 (C_{24}); 133.1 (C_2); 130.3 (C_{22}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.1 (C_{23}); 123.1 (C_{15}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 118.8 (C_{21}); 118.4 (C_{19}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 116.2 (C_{25}); 52.3 (C_1); 34.9 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{21}N_4O_5$ 469.1512, found 469.1511. Purity (HPLC) > 99.9% at 300 nm (t_R = 2.886 min).

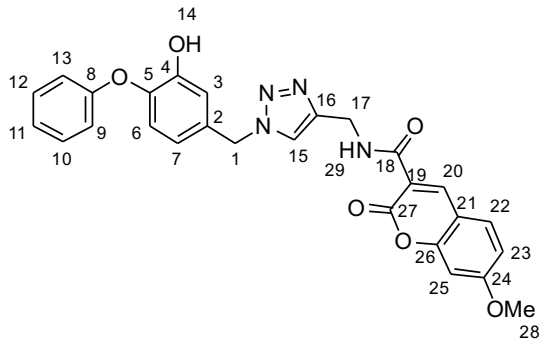
7-(Diethylamino)-N-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (5b):



$C_{30}H_{29}N_5O_5$
539,22

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (43 mg, 0.179 mmol), alkyne **4b**[211] (44.6 mg, 0.15 mmol), cupric sulfate pentahydrate (3.8 mg, 0.015 mmol) and sodium ascorbate (12 mg, 0.06 mmol) in a mixture methanol/water (2 mL/ 2 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) gave compound **5b** as a yellow solid (74%, 60 mg), R_f = 0.37 (dichloromethane/methanol = 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.69 (bs, 1H (H_{14})); 9.05 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{30})); 8.68 (s, 1H (H_{20})); 8.04 (s, 1H (H_{15})); 7.69 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H (H_{22})); 7.31-7.28 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.00 (tt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.81 (m, 3H ($H_{9,13,23}$)); 6.78 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H (H_7)); 6.61 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{27})); 5.50 (s, 2H (H_1)); 4.57 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H (H_{17})); 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H (H_{25})); 1.14 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H (H_{26})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 162.2 (C_{18}); 161.7 (C_{29}); 157.7 (C_8); 157.3 (C_{28}); 152.5 (C_{24}); 149.5 (C_4); 147.9 (C_{20}); 144.7 (C_{16}); 142.4 (C_5); 133.1 (C_2); 131.6 (C_{22}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 123.0 (C_{15}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.1 (C_7); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 110.2 (C_{23}); 109.1 (C_{19}); 107.6 (C_{21}); 95.9 (C_{27}); 52.3 (C_1); 44.3 (C_{25}); 34.7 (C_{17}); 12.3 (C_{26}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{30}H_{30}N_5O_5$ 540.2247, found 540.2240. Purity (HPLC) > 99.9% at 420 nm (t_R = 4.363 min).

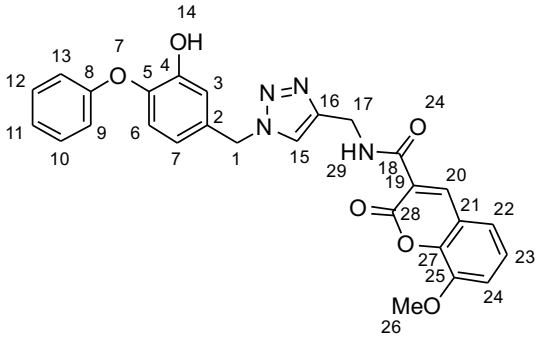
N-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (5c):



$C_{27}H_{22}N_4O_6$
498,15

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (9 mg, 0.037 mmol), alkyne **4c** (8 mg, 0.031 mmol), cupric sulfate pentahydrate (0.8 mg, 0.0031 mmol) and sodium ascorbate (2.5 mg, 0.0124 mmol) in a mixture methanol/water (0.5 mL/ 0.5 mL). Water (2 mL) and dichloromethane (2 x 3 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) gave compound **5c** as a pale yellow solid (84%, 13 mg), R_f = 0.14 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.67 (s, 1H (H_{14})); 9.08 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{29})); 8.86 (s, 1H (H_{20})); 8.05 (s, 1H (H_{15})); 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H (H_{25})); 7.31-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.12 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{22})); 7.05 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H (H_{23}); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.80 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.78 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.51 (s, 2H (H_1)); 4.59 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H (H_{17})); 3.90 (s, 3H (H_{28})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 164.5 (C_{24}); 161.4 (C_{18}); 160.8 (C_{27}); 157.7 (C_8); 156.2 (C_{26}); 149.4 (C_4); 148.0 (C_{20}); 144.5 (C_{16}); 142.4 (C_5); 133.1 (C_2); 131.6 (C_{22}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 123.0 (C_{15}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 114.6 (C_{19}); 113.7 (C_{23}); 112.1 (C_{21}); 100.3 (C_{25}); 56.3 (C_{28}); 52.3 (C_1); 34.9 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{27}H_{23}N_4O_6$ 499.1618, found 499.1626. Purity (HPLC): 95.4% at 350 nm (t_R = 3.367 min).

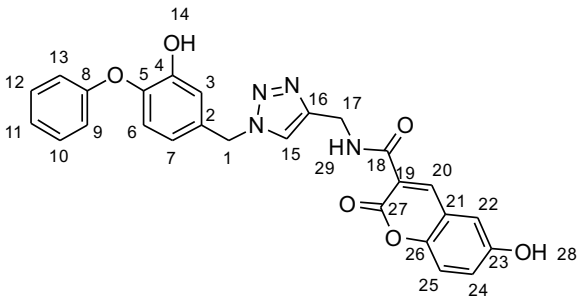
N-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-8-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (5d):



$C_{27}H_{22}N_4O_6$
498,15

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (21.5 mg, 0.09 mmol), alkyne **4d**[212] (19.3 mg, 0.075 mmol), cupric sulfate pentahydrate (1.9 mg, 0.0075 mmol) and sodium ascorbate (6 mg, 0.03 mmol) in a mixture methanol/water (1 mL/ 1 mL). Water (3mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) gave compound **5d** as a pale yellow solid (59%, 22 mg), R_f = 0.08 (dichloromethane/methanol = 98:2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.67 (s, 1H (H_{14})); 9.14 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H (H_{29})); 8.86 (s, 1H (H_{20})); 8.05 (s, 1H (H_{15})); 7.53 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H (H_{22})); 7.44 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H (H_{24})); 7.37 (dd, *J* = 8.2, 8.1 Hz, 1H (H_{23})); 7.31-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.81 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.78 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.51 (s, 2H (H_1)); 4.59 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H (H_{17})); 3.94 (s, 3H (H_{28})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.1 (C_{18}); 160.0 (C_{27}); 157.7 (C_8); 149.4 (C_{25}); 147.9 (C_{20}); 146.3 (C_4); 144.4 (C_{16}); 143.2 (C_{26}); 142.4 (C_5); 133.1 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.1 (C_{24}); 123.1 (C_{15}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 121.2 (C_{22}); 119.2 (C_7); 119.0 (C_{21}); 118.9 (C_{19}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 116.1 (C_{23}); 56.2 (C_{28}); 52.3 (C_1); 34.9 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{27}H_{23}N_4O_6$ 499.1618, found 499.1608. Purity (HPLC): 99.2% at 320 nm (t_R = 3.253 min).

6-Hydroxy-N-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-4-carboxamide (5e):

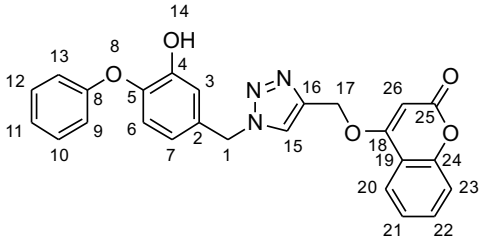


$C_{26}H_{20}N_4O_6$
484,14

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (27 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq), alkyne **4e** (25 mg, 0.096 mmol), cupric sulfate pentahydrate (2.4 mg, 0.0096 mmol) and sodium ascorbate (7.7 mg, 0.038 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (1.1 mL/ 1.1 mL). Water (5mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). The mixture was filtered to give compound **5e** as a pale yellow solid (58%, 27 mg), R_f = 0.08 (dichloromethane/methanol = 95/5). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.94 (s, 1H (H_{28})); 9.67 (s, 1H (H_{14})); 9.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{29})); 8.81 (s, 1H (H_{20})); 8.05 (s, 1H (H_{15})); 7.36 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H (H_{22})); 7.31-7.27 (m, 3H ($H_{10,12,26}$)); 7.18 (dd, *J* = 9.0, 2.8 Hz, 1H (H_{24})); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.81 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.77 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.50 (s, 2H (H_1)); 4.59 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.3 (C_{18}); 160.6 (C_{27}); 157.7 (C_8); 154.2 (C_{23}); 149.4 (C_4); 147.7 (C_{20}); 147.4 (C_{26}); 144.5 (C_{16}); 142.4 (C_5); 133.1 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 123.1 (C_{15}); 122.5 (C_{25}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 119.0 (C_{24}); 118.6 (C_{19}); 117.1 (C_{24});

116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.8 (C_{22}); 52.3 (C_1); 34.9 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{21}N_4O_6$ 485.1461, found 485.1449. Purity (HPLC): 96.5% at 290 nm (t_R = 2.108 min).

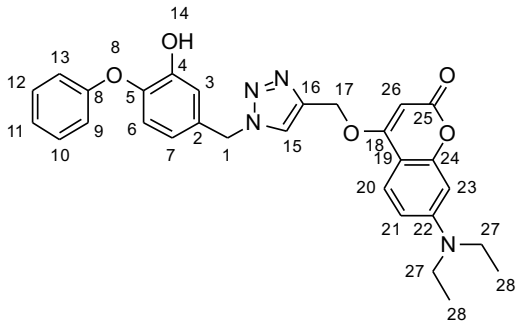
4-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (5f):



$C_{25}H_{19}N_3O_5$
441,13

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (56 mg, 0.233 mmol), alkyne **4f**[213] (39 mg, 0.195 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.9 mg, 0.0195 mmol) and sodium ascorbate (16 mg, 0.078 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (2.5 mL/ 2.5 mL). Water (5mL) and dichloromethane (2x 10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) gave compound **5f** as a white solid (72%, 62 mg), R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H (H_{14})); 8.45 (s, 1H (H_{15})); 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_{20})); 7.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H (H_{22})); 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_{23})); 7.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H (H_{11})); 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H (H_{21})); 6.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_1)); 6.92 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H (H_3)); 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.80 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H (H_7)); 6.17 (s, 1H (H_{26})); 5.58 (s, 2H (H_1)); 5.43 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 164.3 (C_{18}); 161.5 (C_{25}); 157.7 (C_8); 152.8 (C_{24}); 149.4 (C_4); 142.5 (C_5); 141.2 (C_{16}); 132.9 (C_2); 132.8 (C_{22}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.4 (C_{15}); 124.2 (C_{11}); 122.9 (C_{20}); 122.1 (C_{21}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 116.7 (C_3); 116.5 (C_{23}); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.1 (C_{20}); 91.3 (C_{26}); 62.8 (C_{17}); 52.5 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1400. Purity (HPLC): 95.3% at 280 nm (t_R = 3.330 min).

7-(Diethylamino)-4-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (5g):

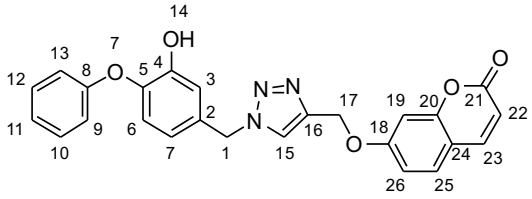


$C_{29}H_{28}N_4O_5$
512,21

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (38 mg, 0.158 mmol), alkyne **4g** (36 mg, 0.133 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4 mg, 0.00133 mmol) and sodium ascorbate (11 mg, 0.0052 mmol) in a mixture methanol/water (2 mL/ 2 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) gave compound **5g** as a pale yellow solid (81%, 55 mg), R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.63 (s, 1H (H_{15})); 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H (H_{20})); 7.40-7.33 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.16 (tt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 7.05-7.01 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.98 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.77 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.55 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H (H_{21})); 6.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{23})); 5.81 (s, 1H (H_{26})); 5.54 (s, 1H (H_{14})); 5.50 (s, 2H (H_1)); 5.28 (s, 2H (H_{17})); 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H (H_{27})); 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz);, 6H (H_{28}) ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.1 (C_{18}); 164.2 (C_{25}); 156.2 (C_8); 155.7 (C_{24}); 151.1 (C_{22}); 148.0 (C_4); 144.4 (C_5); 142.3 (C_{16}); 130.4 (C_2); 129.9 (2C, $C_{10,12}$); 124.0 (C_{20}); 123.8 (C_{15}); 123.2 (C_{11}); 120.2 (C_6); 119.0 (C_7); 118.3

(2C, $C_{9,13}$); 116.1 (C_3); 108.3 (C_{21}); 103.5 (C_{19}); 97.0 (C_{26}); 85.9 (C_{23}); 62.1 (C_{17}); 53.9 (C_1); 44.7 (2C, C_{27}); 12.3 (2C, C_{28}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{29}H_{29}N_4O_5$ 513.2138, found 513.2154. Purity (HPLC): 97.4% at 360 nm (t_R = 4.720 min).

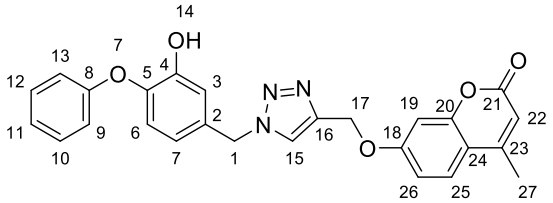
7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (5h):



$C_{25}H_{19}N_3O_5$
441,13

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **4h**[214] (35 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.3 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.0696 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (2 mL/ 2 mL), water (5 mL), dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 90/10) to give compound **5h** as a white solid (36%, 27.5 mg), R_f = 0.12 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.69 (s, 1H (H_{14})); 8.34 (s, 1H (H_{15})); 7.99 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H (H_{23})); 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_{25})); 7.31-7.28 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{19})); 7.03-7.00 (m, 2H ($H_{11,26}$)); 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.84-6.82 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.78 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 6.30 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H (H_{22})); 5.55 (s, 2H (H_1)); 5.27 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 161.1 (C_{18}); 160.2 (C_{21}); 157.7 (C_8); 155.3 (C_{20}); 149.4 (C_4); 144.3 (C_{23}); 142.5 (C_5); 142.2 (C_{16}); 133.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 129.5 (C_{25}); 125.0 (C_{15}); 122.1 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 112.9 (C_{26}); 112.7 (C_{22}); 112.6 (C_{24}); 101.6 (C_{19}); 61.7 (C_{17}); 52.4 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1405. Purity (HPLC): 96.3% at 320 nm (t_R = 3.012 min).

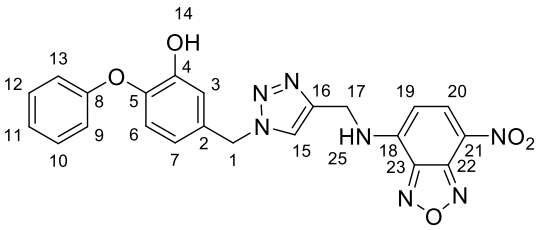
7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (5i):



$C_{26}H_{21}N_3O_5$
455,15

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (100 mg, 0.416 mmol), alkyne **4i**[215] (75 mg, 0.348 mmol), cupric sulfate pentahydrate (8.7 mg, 0.035 mmol) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (4 mL/ 4 mL). Water (5 mL) and dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) gave compound **5i** as a white solid (76%, 120 mg), R_f = 0.06 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H (H_{14})); 8.34 (s, 1H (H_{15})); 7.70 (d, 1H (H_{25}), *J* = 8.7 Hz); 7.32-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.16 (d, 1H (H_{19}), *J* = 2.5 Hz); 7.05 (dd, 1H (H_{26}), *J* = 8.8, 2.5 Hz); 7.01 (tt, 1H (H_{11}), *J* = 7.4, 1.1 Hz); 4.94 (d, 1H (H_6), *J* = 8.1 Hz); 6.90 (d, 1H (H_3), *J* = 2.1 Hz); 6.84-6.82 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.78 (dd, 1H (H_7), *J* = 8.2, 2.1 Hz); 6.23 (d, 1H (H_{22}), *J* = 1.3 Hz); 5.55 (s, 2H (H_1)) ; 5.27 (s, 2H (H_{17})); 2.40 (d, 2H (H_{27}), *J* = 1.3 Hz); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.0 (C_{18}); 160.1 (C_{21}); 157.7 (C_8); 154.6 (C_{20}); 153.4 (C_{23}); 149.4 (C_4); 142.5 (C_5); 142.2 (C_{16}); 133.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 126.5 (C_{25}); 125.0 (C_{15}); 122.1 (C_{11}); 121.9 (C_6); 119.2 (C_7); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.4 (C_{24}) 112.6 (C_{26}); 111.3 (C_{22}); 101.6 (C_{19}); 61.6 (C_{17}); 52.4 (C_1); 18.1 (C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{22}N_3O_5$ 456.1559, found 456.1554. Purity (HPLC) > 99.9% at 320 nm (t_R = 3.259 min).

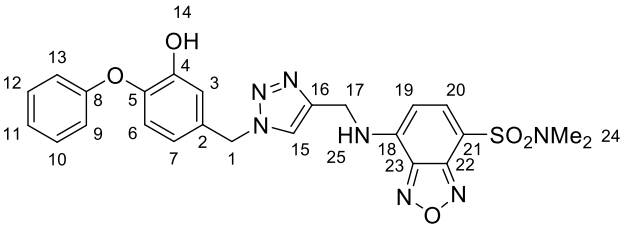
5-((4-(((7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (5j):



$C_{22}H_{17}N_7O_5$
459,13

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **4j** (38 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.070 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (2 mL/ 2 mL). Water (5 mL) and dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) to give compound **5j** as an orange solid (40%, 32 mg), R_f = 0.15 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.85 (bs, 1H (H_{25})); 9.66 (bs, 1H (H_{14})); 8.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H (H_{20})); 8.17 (s, 1H (H_{15})); 7.29 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H (H_{11})); 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.74 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 6.53 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H (H_{19})); 5.50 (s, 2H (H_1)); 4.77 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 149.0 (C_{18}); 143.8 (C_{22}); 142.9 (C_{16}); 141.8 (C_{23}); 137.7 (C_{20}); 142.5 (C_5); 133.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 123.6 (C_{15}); 122.1 (C_{11}); 121.8 (C_6); 119.2 (C_7); 116.7 (C_3); 116.3 (2C, $C_{9,13}$); 110.4 (C_{21}); 99.9 (C_{19}); 52.4 (C_1); 38.6 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{22}H_{18}N_7O_5$ 460.1369, found 460.1377. Purity (HPLC): 97.7% at 330 nm (t_R = 4.718 min).

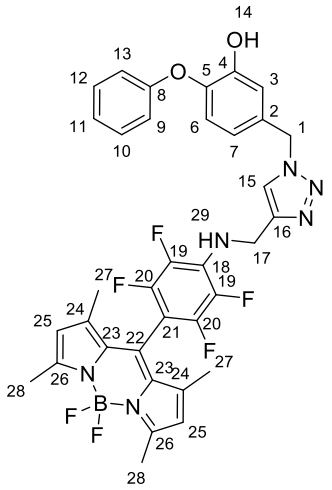
7-(((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-N,N-dimethylbenzo[c][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide (5k):



$C_{24}H_{23}N_7O_5S$
521,15

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (11.5 mg, 0.048 mmol), alkyne **4k**[216] (11 mg, 0.04 mmol), cupric sulfate pentahydrate (1.02 mg, 0.0041 mmol) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.0167 mmol) in a mixture methanol/water (1 mL/ 0.5 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) gave compound **5k** as a yellow solid (74%, 15.5 mg), R_f = 0.12 (dichloromethane/methanol 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.71 (s, 1H (H_{14})); 8.77 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{25})); 8.13 (s, 1H (H_{15})); 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_{20})); 7.30-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H (H_{11})); 6.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.87 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.73 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 6.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_{19})); 5.48 (s, 2H (H_1)); 4.66 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H (H_{17})); 2.67 (s, 6H (H_{24})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.8 (C_8); 149.4 (C_4) 146.6 (C_{18}); 144.5 (C_{16}); 143.8 (C_{22}); 142.6 (C_5); 140.9 (C_{23}); 140.4 (C_{20}); 133.2 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 123.6 (C_{15}); 122.3 (C_{11}); 122.0 (C_6); 119.3 (C_7); 116.8 (C_3); 116.4 (2C, $C_{9,13}$); 106.2 (C_{21}); 99.7 (C_{19}); 52.5 (C_1); 38.4 (C_{17}); 37.6 (2C, C_{24}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{24}H_{23}N_7O_5S$ 521.1481, found 521.1464. Purity (HPLC) > 99.9% at 420 nm (t_R = 3.235 min).

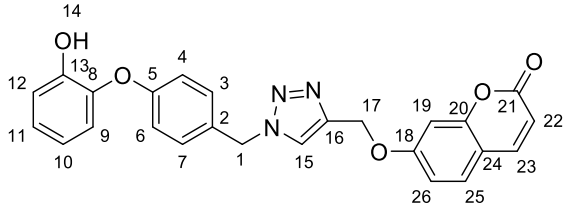
5-((4-(((4-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-2,3,5,6-tetrafluorophenyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (5l):



$C_{35}H_{29}BF_6N_6O_2$
690,23

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (2.6 mg, 0.011 mmol), alkyne **4l**[219] (4.2 mg, 0.009 mmol), cupric sulfate pentahydrate (0.23 mg, 0.0009 mmol) and sodium ascorbate (0.73 mg, 0.0037 mmol) in a mixture methanol/water 1/1 (110 µL/ 110 µL). Water (5mL) and dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) gave compound **5l** as a yellow solid (37%, 2.3 mg), R_f = 0.19 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 7.46 (s, 1H (H_{15})); 7.40-7.34 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.16 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 7.03-7.00 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.96 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.74 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.01 (s, 2H (H_{25})); 5.74 (s, 1H (H_{14})); 5.46 (s, 2H (H_1)); 4.72 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H (H_{17})); 2.55 (s, 6H (H_{27})); 1.61 (s, 6H (H_{28})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 156.8 (2C, C_{26}); 155.9 (C_8); 147.7 (C_4); 145.0 (C_{16}); 144.4 (C_5); 143.0 (2C, C_{20}); 141.9 (2C, C_{23}); 138.8 (2C, C_{19}); 136.9 (C_{22}); 131.7 (2C, C_{24}); 130.5 (C_2); 130.0 (2C, $C_{10,12}$); 128.5 (C_{18}); 124.3 (C_{11}); 121.7 (2C, C_{25}); 121.5 (C_{15}); 120.2 (C_7); 118.5 (3C, $C_{6,9,13}$); 115.8 (C_3); 101.4 (C_{21}); 53.8 (C_1); 40.9 (C_{17}); 14.7 (2C, C_{27}); 13.5 (2C, C_{28}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{35}H_{30}BF_6N_6O_2$ 690.2349, found 691.2427.

7-((1-(4-(2-Hydroxyphenoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (5m):

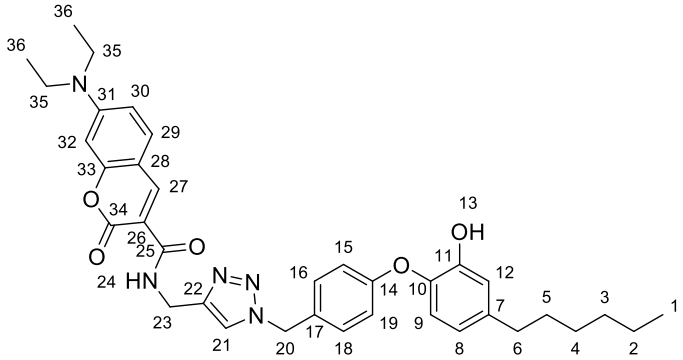


$C_{25}H_{19}N_3O_5$
441,1325

General procedure for the CuAAC involving azide **2e** (50 mg, 0.208 mmol), acetylenic **4h**[214] (35 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.35mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.0696 mmol) in a mixture methanol/water 1:1 (2 mL/ 2 mL). Water (5 mL) and dichloromethane (2 x 10 mL). Purification by flash-chromatography (dichloromethane/methanol = 99/1) gave compound **5m** as a white solid (78%, 60 mg), R_f = 0.17 (dichloromethane/methanol = 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 9.52 (bs, 1H (H_{14})); 8.30 (s, 1H (H_{15})); 7.99 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H (H_{23})); 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_{25})); 7.30 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{3,7}$)); 7.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{19})); 7.05 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.7 Hz, 1H (H_{11})); 7.01 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H (H_{26})); 6.96 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H (H_{12})); 6.95 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H (H_9)); 6.83-6.79 (m, 3H ($H_{4,6,10}$)); 6.30 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H (H_{22})); 5.54 (s, 2H (H_1)); 5.24 (2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz) δ 161.1 (C_{18}); 160.2 (C_{21}); 158.0 (C_5); 155.3 (C_{20}); 149.4 (C_{13}); 144.3 (C_{23}); 142.2 (C_8); 142.1 (C_{16}); 129.7 (2C, $C_{3,7}$); 129.5 (C_{25}); 129.2 (C_2); 125.7 (C_{11}); 124.7 (C_{15}); 122.1 (C_9); 119.7 (C_{10}); 117.3 (C_{12}); 116.1

(2C, $C_{4,6}$); 112.9 (C_{12}); 112.7 (C_{22}); 112.6 (C_{24}); 101.6 (C_{19}); 61.6 (C_{17}); 52.3 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1406. Purity (HPLC): 99.7% at 290 nm (t_R = 2.836 min).

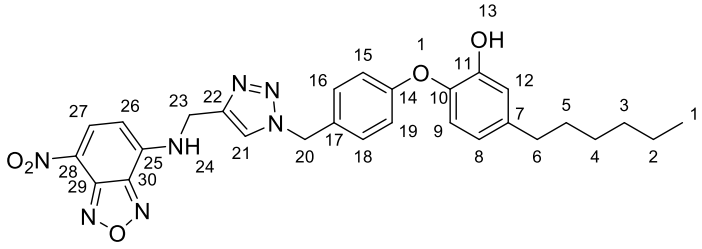
7-(Diethylamino)-N-((1-(4-(4-hexyl-2-hydroxyphenoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (5n):



$C_{36}H_{41}N_5O_5$
623,31

General procedure for the CuAAC involving azide **3e** (24 mg, 0.07 mmol, 1 eq), alkyne **4b**[211] (22 mg, 0.07 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4 mg, 0.0146 mmol, 0.2 eq) and sodium ascorbate (6 mg, 0.03 mmol) in a mixture methanol/water (2 mL/ 2 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) gave compound **5n** as a pale yellow solid (60%, 26 mg), R_f = 0.42 (dichloromethane/methanol = 95/05). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 9.37 (s, 1H (H_{13})); 9.02 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H (H_{24})); 8.67 (s, 1H (H_{27})); 7.99 (s, 1H (H_{15})); 7.69 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H (H_{29})); 7.28 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{16,18}$)); 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_9)); 6.81 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H (H_{30})); 6.79 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{15,19}$)); 6.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{12})); 6.62-6.60 (m, 3H ($H_{8,32}$)); 5.48 (s, 2H (H_{20})); 4.53 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H (H_{23})); 3.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H (H_{35})); 2.53-2.48 (m, 2H (H_6)); 1.56-1-52 (m, 2H (H_5)); 1.31-1.23 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H (H_{36})); 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 162.2 (C_{25}); 161.7 (C_{34}); 158.2 (C_{33}); 157.3 (C_{14}); 152.5 (C_{31}); 149.0 (C_{11}); 147.9 (C_{27}); 144.7 (C_{22}); 139.9 (C_{10}); 139.9 (C_{17}); 131.6 (C_{29}); 129.6 (2C, $C_{16,18}$); 129.1 (C_7); 122.6 (C_{15}); 121.9 (C_9); 119.4 (C_8); 117.1 (C_{12}); 115.9 (2C, $C_{15,19}$); 110.2 (C_{30}); 109.1 (C_{26}); 107.6 (C_{28}); 95.9 (C_{32}); 52.2 (C_{20}); 44.3 (C_{35}); 34.7 (2C, $C_{6,23}$); 31.1 (C_3); 30.8 (C_5); 28.3 (C_4); 22.0 (C_2); 13.9 (C_1); 12.3 (C_{36}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{36}H_{41}N_5O_5$ 623.3108, found 623.3087. Purity (HPLC) > 99.9% at 420 nm (t_R = 6.393 min).

5-Hexyl-2-(4-((4-(((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (5o):

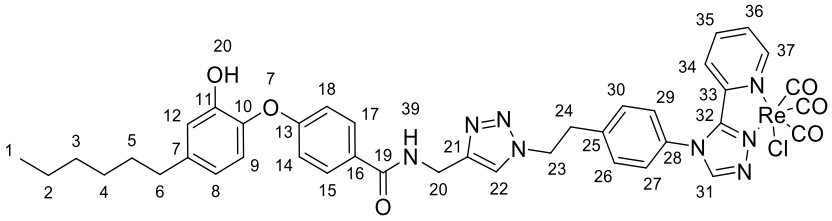


$C_{28}H_{29}N_7O_5$
543,22

General procedure for the CuAAC involving azide **3e** (13 mg, 0.04 mmol, 1 eq), alkyne **4k**[217,218] (9 mg, 0.04 mmol), cupric sulfate pentahydrate (2 mg, 0.008 mmol, 0.2 eq) and sodium ascorbate (3 mg, 0.015 mmol) in a mixture methanol/water (1.5 mL/ 1.5 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) gave compound **5o** as an orange solid (78%, 17 mg). R_f = 0.48 (dichloromethane/methanol = 95/5). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 8.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_{27})); 7.50 (s, 1H (H_{24})); 7.25-7.24 (m, 2H ($H_{16,18}$)); 6.99 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{15,19}$)); 6.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{12})); 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H (H_9)); 6.69-6.67 (m, 2H ($H_{8,21}$);

6.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_{26})); 5.51 (s, 2H (H_{20})); 4.77 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H (H_{23})); 2.56 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_6)); 1.60-1.56 (m, 2H (H_5)); 1.36-1.29 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 158.1 (C_{14}); 147.3 (C_{11}); 144.3 (C_{29}); 143.8 (C_{30}); 142.9 (C_{25}); 142.5 (C_{22}); 141.0 (C_7); 140.1 (C_{10}); 136.0 (C_{27}); 129.9 (2C, $C_{16,18}$); 128.5 (C_{17}); 125.1 (C_{28}); 121.7 (C_{15}); 120.8 (C_8); 119.6 (C_9); 117.7 (2C, $C_{15,19}$); 116.4 (C_{12}); 99.5 (C_{26}); 53.9 (C_{20}); 39.4 (C_{23}); 35.5 (C_6); 31.7 (C_3); 31.3 (C_5); 28.9 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{28}H_{30}N_7O_5$ 544.2308, found: 544.2316. Purity (HPLC): 95.8% at 330 nm (t_R = 6.205 min).

5p:



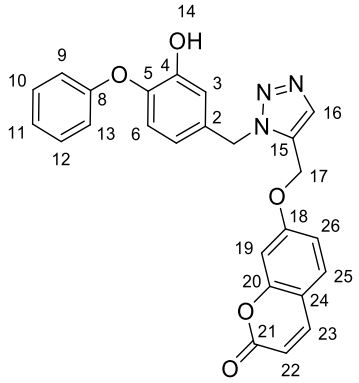
$C_{40}H_{38}ClN_8O_6Re$
948,22

General procedure for the CuAAC involving azide (gave by Team MAGENTA, SPCMIB) (27 mg, 0.045 mmol), alkyne **4p** (14 mg, 0.038 mmol), cupric sulfate pentahydrate (1 mg, 0.0038 mmol) and sodium ascorbate (3 mg, 0.015 mmol) in a mixture methanol/water (0.5 mL/ 0.5 mL). Water (3 mL) and dichloromethane (2 x 5 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol 100/0 to 98/2) gave compound **5p** as an orange solid (33%, 12 mg), R_f = 0.49 (dichloromethane/methanol = 95/05). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.46 (s, 1H (H_{31})); 9.22 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H (H_{37})); 9.09 (ddd, *J* = 5.5, 1.5, 0.8 Hz, 1H (H_{34})); 8.89 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H (H_{39})); 8.16 (td, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 2H ($H_{26,30}$)); 8.01 (s, 1H (H_{22})); 7.80 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{15,17}$)); 7.70 (ddd, *J* = 7.9, 5.5, 1.3 Hz, 1H (H_{35})); 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{27,29}$)); 6.94 (dt, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H (H_{36})); 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_9)); 6.82 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{14,18}$)); 6.80 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{12})); 6.66 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H (H_8)); 4.69 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{23})); 4.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H (H_{20})); 1.57-1.52 (m, 2H (H_5)); 1.34-1.26 (m, 6H ($H_{2,3,4}$)); 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H_1)); peaks of H_6 and H_{24} are with solvent peaks; ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 196.6 (CO); 165.1 (CO); 187.6 (CO); 166.7 (C_{19}); 160.9 (C_{13}); 154.7 (C_{37}); 154.3 (C_{32}); 147.8 (C_{11}); 144.4 (C_{33}); 141.6 (C_{25}); 141.5 (C_7); 139.5 (C_{10}); 139.3 (2C, $C_{27,19}$); 131.3 (C_{22}); 130.6 (2C, $C_{21,28}$); 128.7 (2C, $C_{15,17}$); 127.6 (C_{16}); 127.5 (2C, $C_{26,30}$); 123.0 (2C, $C_{34,35}$); 120.8 (C_{36}); 120.7 ($C_{8,9}$); 117.0 (C_{12}); 116.4 (2C, $C_{14,18}$); 51.1 (C_{23}); 36.3 (C_{20}); 35.5 (C_6); 35.3 (C_{24}); 31.7 (C_3); 31.3 (C_5); 29.0 (C_4); 22.6 (C_2); 14.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M-Cl^-]^+$) calculated for $C_{40}H_{38}N_8O_6Re$ 948.2160, found 911.2444.

I.A.4 Ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition

General procedure for the ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition RuAAC (5q, 5r)[220]:
A solution of azide **1e** (1 eq) and alkyne (1 eq) in degassed 1,4-dioxane ([alkyne] = 0.9 M) was added to a solution of Cp*$RuCl(PPh_3)_2$ (0.05 eq) in 1,4-dioxane ([Cp*$RuCl(PPh_3)_2$] = 0.009 M) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 65 °C for 18h and the solvent was removed *in-vacuo.* Triazoles **5q, 5r** were obtained after purification by flashchromatography.

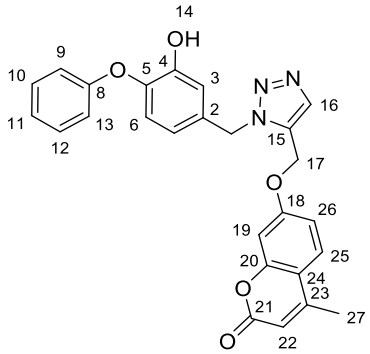
7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)methoxy)naphthalen-2(1H)-one (5q):



$C_{25}H_{19}N_3O_5$
441,13

General procedure for RuAAC involving azide **1e** (34.9 mg, 0.124 mmol), alkyne **4h** (24.9 mg, 0.124 mmol), Cp*RuCl(PPh_3)$_2$ (5 mg, 6.2 µmol) in degassed 1,4-dioxane (0.8 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 to 0/100) affording compound **5q** as a beige solid (35%, 19 mg), R_f = 0.10 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.62 (s, 1H (H_{14})); 8.00 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H (H_{22})); 7.95 (s, 1H (H_{16})); 7.65-7.60 (m, 1H (H_{25})); 7.31-7.27 (m ,2H ($H_{10,12}$)); 7.07 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{19})); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.88 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H (H_{26})); 6.82-6.80 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.79 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.67 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.32 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H (H_{23})); 5.62 (s, 2H (H_1)); 5.35 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 160.3 (C_{18}); 160.2 (C_{21}); 157.8 (C_8); 155.2 (C_{20}); 149.4 (C_4); 144.2 (C_{22}); 142.2 (C_5); 134.6 (C_{16}); 133.1 (C_{15}); 132.7 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 129.5 (C_{25}); 122.0 (C_{11}); 121.8 (C_6); 118.8 (C_7); 116.2 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.0 (C_{23}); 112.9 (C_{24}); 112.7 (C_{26}); 101.7 (C_{19}); 58.3 (C_{17}); 50.8 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, [M+H^+]) for calculated for $C_{25}H_{19}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1397. Purity (HPLC): 95.3% at 320 nm (t_R = 2.730 min).

7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)methoxy)-4-methylnaphthalen-2(1H)-one (5r):



$C_{26}H_{21}N_3O_5$
455,15

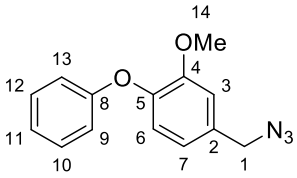
General procedure for RuAAC involving azide **1e** (30.8 mg, 0.124 mmol), alkyne **4i** (26.5 mg, 0.124 mmol), Cp*RuCl(PPh_3)$_2$ (4.9 mg, 6.2 µmol) in degassed 1,4-dioxane (0.8 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 to 0/100) affording compound **5r** as a beige solid (29%, 16.4 mg), R_f = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate: 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.62 (s, 1H (H_{14})); 7.95 (s, 1H (H_{16})); 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H (H_{25})); 7.30-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.06 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{19})); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.91 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H (H_{26})); 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H (H_6)); 6.83-6.80 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.79 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.67 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.27 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H (H_{22})); 5.62 (s, 2H (H_1)); 5.36 (s, 2H (H_{17})); 2.39 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H (H_{27})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 160.2 (C_{18}); 160.0 (C_{21}); 157.7 (C_8); 154.5 (C_{20}); 153.3 (C_{23}); 149.3 (C_4); 142.2 (C_5); 134.5 (C_{16}); 133.1 (C_{15}); 132.6 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 126.5 (C_{25}); 122.0 (C_{11}); 121.8

(C_6); 118.8 (C_7); 116.2 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.7 (C_{24}); 112.4 (C_{26}); 111.5 (C_{22}); 101.7 (C_{19}) 58.3 (C_{17}); 50.8 (C_1); 18.1 (C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H^+]$) for calculated for $C_{26}H_{22}N_3O_5$ 456.1481, found 456.1541.

I.B Chemical synthesis of chapter 2

I.B.1 Azide precursor

4-(Azidomethyl)-2-methoxy-1-phenoxybenzene (1'e):



$C_{14}H_{13}N_3O_2$
255,10

To a solution of **1c** (100 mg, 0.260 mmol, 1 eq) in dry *N,N*-dimethylformamide (20 mL) was added sodium azide (50.8 mg, 0.781 mmol, 3 eq). The mixture was stirred at 45 °C overnight. Ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL, 2 x 20 mL) were added, the organic layer was washed with water. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) to give compound **1'e** as a colourless oil (96%, 78.5 mg), R_f = 0.61 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.34-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.07 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 7.00-6.93 (m, 4H ($H_{3,6,9,13}$)); 6.86 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H (H_7)); 4.34 (s, 2H (H_1)); 3.87 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.5 (C_8); 151.5 (C_4); 145.2 (C_5); 131.8 (C_2); 129.5 (2C, $C_{10,12}$); 122.8 (C_{11}); 120.8 (C_7); 120.7 (C_8); 117.4 (2C, $C_{9,13}$); 112.5 (C_3); 56.0 (C_{14}); 54.6 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}N_3O_2$ 256.1088, found 256.1075.

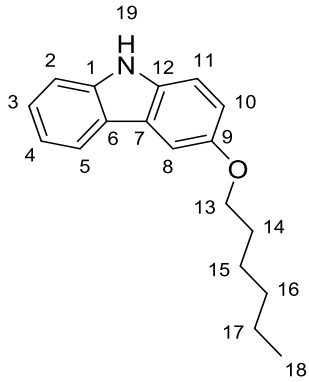
I.B.2 Alkyne precursors

Alkylation of hydroxycarbazoles:

Procedure A: To a solution of 9H-carbazole (1 eq) in ethyl acetate was added tetrabutylammonium hydrogensulfate (Bu_4NHSO_4, 0.01 eq), bromide derivative (1.5 eq) and potassium carbonate (1.2 eq). The mixture was refluxed overnight. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and water. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated. Purification of the crude product by flash chromatography gave the expected compound.

Procedure B: To a solution of 9H-carbazole (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide was added potassium carbonate (2.5 eq), bromide derivative (2.5 eq). The mixture was stirred overnight. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and water. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated. Purification of the crude product by flash chromatography gave the expected compound.

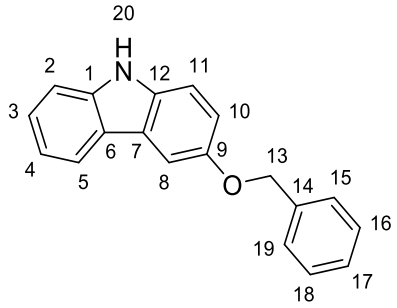
3-(Hexyloxy)-9H-carbazole (7d):



$C_{18}H_{21}NO$
267,16

Procedure B involving **6d**[234] (125 mg, 0.68 mmol), *N,N*-dimethylformamide (2 mL), potassium carbonate (236 mg, 1.73 mmol) and hexylbromide (285 mg, 1.73 mol). Ethyl acetate (5 mL) and water (15 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 8:2) gave compound **7d** as a yellow solid (55%, 100 mg), R_f = 0.41 (petroleum ether/ethyl acetate = 7/3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.02 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.89 (bs, 1H (H_{20})); 7.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_8)); 7.41-7.39 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H (H_{11})); 7.22-7.17 (m, 1H (H_3)); 7.06 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H (H_{10})); 4.08 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H (H_{13})); 1.83 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H (H_{14})); 1.53-1.47 (m, 2H (H_{15})); 1.40-1.34 (m, 4H ($H_{16,17}$)); 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H (H_{18}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 153.4 (C_9); 140.3 (C_1); 134.3 (C_{12}); 125.7 (C_4); 123.8 (C_6); 123.4 (C_7); 120.2 (C_3); 119.0 (C_5); 115.6 (C_{10}); 111.2 (C_{11}); 110.7 (C_2); 104.3 (C_8); 69.1 (C_{13}); 31.7 (C_{16}); 29.5 (C_{14}); 25.8 (C_{15}); 22.6 (C_{17}); 14.1 (C_{18}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{18}H_{22}NO$ 268.1701, found 268.1710.

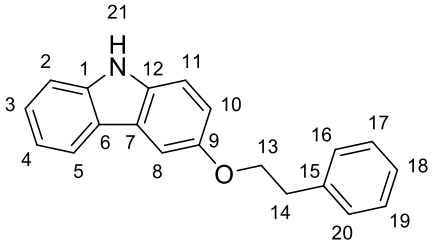
3-(Benzyloxy)-9H-carbazole (7e):



$C_{19}H_{15}NO$
273,12

Procedure A involving **6d**[234] (110 mg, 0.6 mmol), ethyl acetate (5 mL), tetrabutylammonium hydrogensulfate (2.1 mg, 0.0062 mmol), benzylbromide (154 mg, 0.9 mmol) and potassium carbonate (99 mg, 0.72 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (2 x 20 mL). Filtration gave compound **7e** as a white solid (37%, 60 mg), R_f = 0.32 (petroleum ether/ethyl acetate = 8/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 11.00 (s, 1H (H_{20})); 8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_2)); 7.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_8)); 7.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H (2H ($H_{4,5}$)); 7.44-7.31 (m, 6H ($H_{11,15,16,17,18,19}$); 7.12-7.08 (m, 2H ($H_{3,10}$)); 5.18 (s, 2H (H_{13})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 101 MHz) δ 151.9 (C_9); 140.4 (C_1); 137.6 (C_{14}); 134.7 (C_{12}); 128.3 (2C, $C_{16,18}$); 127.6 (2C, $C_{15,19}$); 127.6 (C_{17}); 125.3 (C_4); 122.7 (C_6); 122.3 (C_7); 120.1 (C_3); 117.9 (C_5); 115.3 (C_{10}); 111.5 (C_{11}); 110.9 (C_2); 104.5 (C_8); 70.0 (C_{13}). HRMS (DCI-CH_4, $[M^+]$) calculated for $C_{19}H_{15}NO$ 273.1154, found 273.1140.

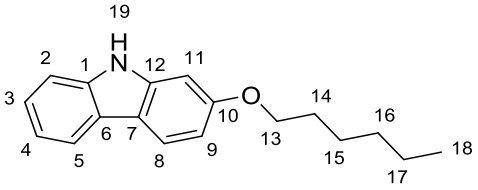
3-Phenethoxy-9H-carbazole (7f):



$C_{20}H_{17}NO$
287,13

Procedure B involving **6d**[234] (134 mg, 0.732 mmol, 1 eq), *N,N*-dimethylformamide (2.2 mL), potassium carbonate (256 mg, 1.86 mmol) and 2-(bromoethyl)benzene (344 mg, 1.86 mol). Ethyl acetate (5 mL) and water (30 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 9:1) gave compound **7f** as a white solid (24%, 50 mg), R_f = 0.46 (petroleum ether/ethyl acetate = 9/1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.00 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.91 (bs, 1H (H_{21})); 7.55 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_8)); 7.40-7.39 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.35-7.31 (m, 5H ($H_{16,17,18,19,20}$)); 7.19 (m, 1H (H_3)); 7.06 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H (H_{10})); 4.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{13})); 3.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 153.0 (C_9); 140.3 (C_1); 138.5 (C_{15}); 134.4 (C_{12}); 129.1 (2C, $C_{17,19}$); 128.5 (2C, $C_{16,20}$); 126.4 (C_{17}); 125.8 (C_4); 123.8 (C_6); 123.3 (C_7); 120.2 (C_3); 119.0 (C_5); 115.7 (C_{10}); 111.2 (C_{11}); 110.7 (C_2); 104.4 (C_8); 69.8 (C_{13}); 36.0 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, [M^+]) calculated for $C_{20}H_{17}NO$ 287.1310, found 287.1313.

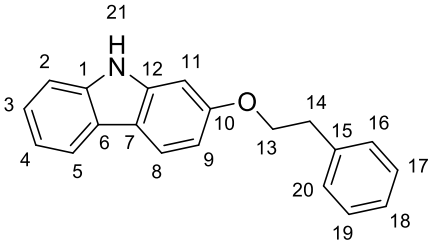
2-(Hexyloxy)-9H-carbazole (7h):



$C_{18}H_{21}NO$
267,16

Procedure A involving **2-hydroxycarbazole** (250 mg, 1.37 mmol), ethyl acetate (10 mL), tetrabutylammonium hydrogensulfate (5 mg, 0.0137 mmol), hexylbromide (340 mg, 2.06 mmol) and potassium carbonate (225 mg, 1.64 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (2 x 20 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 9/1) gave compound **7h** as a white solid (52%, 190 mg), R_f = 0.37 (petroleum ether/ethyl acetate = 9/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 11.06 (s, 1H (H_{19})); 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_2)); 7.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_8)); 7.41 (dt, *J* = 8.1, 0.9 Hz, 1H (H_5)); 7.27 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.2 Hz , 1H (H_4)); 7.09 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, 1H (H_3)); 6.94 (d, , *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{11})); 6.75 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H (H_9)); 4.03 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H (H_{13})); 1.77-1.74 (m, 2H (H_{14})); 1.48-1.45 (m, 2H (H_{15})); 1.37-1.30 (m, 4H ($H_{16,17}$)); 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H (H_{18})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.9 (C_{10}); 141.1 (C_1); 139.7 (C_{12}); 124.0 (C_4); 122.7 (C_6); 120.8 (C_8); 119.2 (C_5); 118.5 (C_7); 116.1 (C_3); 110.6 (C_2); 108.1 (C_9); 95.1 (C_{11}); 67.6 (C_{13}); 31.1 (C_{16}); 28.8 (C_{14}); 25.3 (C_{15}); 22.1 (C_{17}); 13.9 (C_{18}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H]$^+$) calculated for $C_{18}H_{22}NO$ 268.1701, found 268.1707.

2-Phenethoxy-9H-carbazole (7j):



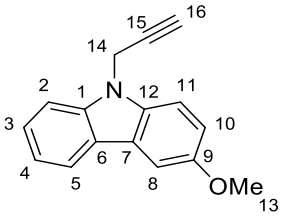
$C_{20}H_{17}NO$
287,13

Procedure A involving **2-hydroxycarbazole** (250 mg, 1.37 mmol), ethyl acetate (10 mL), tetrabutylammonium hydrogensulfate (5 mg, 0.0137 mmol), 2-(bromoethyl)benzene (381 mg, 2.06 mmol) and potassium carbonate (225 mg, 1.64 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (2 x 20 mL). Filtration gave compound **7j** as a white solid (18%, 70 mg), R_f = 0.32 (petroleum ether/ethyl acetate = 8/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 11.06 (s, 1H (H_{21})); 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_2)); 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_8)); 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_5)); 7.38-7.31 (m, 4H ($H_{16,17,19,20}$)); 7.27 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_4)); 7.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H (H_{18})); 7.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_3)); 6.97 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{11})); 6.76 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H (H_9)); 4.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{13})); 3.09 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{14})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.6 (C_{10}); 141.0 (C_1); 139.7 (C_{12}); 138.5 (C_{15}); 129.0 (2C, $C_{17,19}$); 128.3 (2C, $C_{16,20}$); 126.3 (C_{18}); 124.1 (C_4); 122.6 (C_6); 120.9 (C_8); 119.2 (C_5); 118.5 (C_3); 116.2 (C_7); 110.6 (C_2); 108.0 (C_9); 95.2 (C_{11}); 68.4 (C_{13}); 35.1 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{20}H_{18}NO$ 288.1388, found 288.1401.

General procedure for N-alkylation (8a-k):

To a solution of carbazole (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide was added potassium hydroxide (2 eq). The mixture was stirred for 5 min and propargylbromide (80% in toluene, 2 eq) was added. The mixture was stirred for additional 4 h. Ethyl acetate and water were added. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum to give the expected compound.

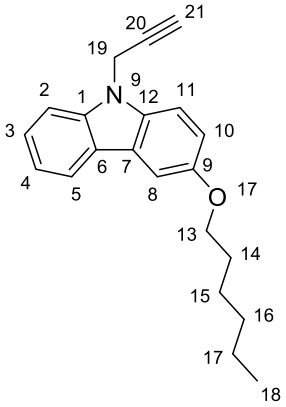
3-Methoxy-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8c):



$C_{16}H_{13}NO$
235,10

Procedure involving compound **6c**[234] (165 mg, 0.837 mmol, 1 eq), N,N-dimethylformamide (8.7 mL), potassium hydroxide (0.094 mg, 1.675 mmol, 2 eq), propargylbromide (80% in toluene, 199 mg, 1.675 mmol, 2 eq).Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 98/2 to 90/10) gave compound 8c as a yellow powder (91%, 180 mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.08 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.61 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_8)); 7.54-7.44 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H (H_{11})); 7.27 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.4 Hz, 1H (H_3)); 7.16 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H (H_{10})); 4.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{14})); 3.96 (s, 3H (H_{13})); 2.27 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{16})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 154.0 (C_9); 140.4 (C_1); 134.8 (C_{12}); 125.8 (C_4); 123.6 (C_6); 123.1 (C_7); 120.3 (C_3); 119.1 (C_5); 114.8 (C_{10}); 109.4 (C_{11}); 108.8 (C_2); 103.5 (C_8); 77.9 (C_{15}); 72.1 (C_{16}); 56.0 (C_{13}); 32.3 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{14}NO$ 236.1075, found 236.1073.

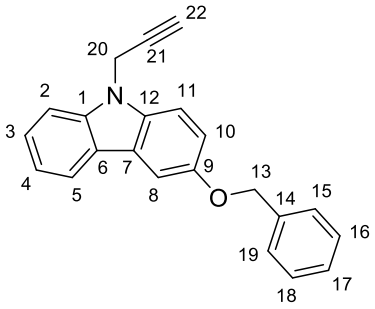
3-(Hexyloxy)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8d):



$C_{21}H_{23}NO$
305,18

Procedure involving compound **7d** (90 mg, 0.337 mmol), *N,N*-dimethylformamide (3.5 mL), potassium hydroxide (39 mg, 0.69 mmol), propargylbromide (80% in toluene, 82 mg, 0.69 mmol). Ethyl acetate (10 mL) and water (100 mL). No purification was necessary to give compound **8d** as a white solid (78%, 80 mg), R_f = 0.70 (petroleum ether/ethyl acetate = 7/3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.04 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_8)); 7.48-7.43 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.22 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 2.2 Hz, 1H (H_3)); 7.13 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H (H_{10})); 5.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{19})); 4.08 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H (H_{13})); 2.24 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{21})); 1.85-1.83 (m, 2H (H_{14})); 1.53-1.47 (m, 2H (H_{15})); 1.43-1.31 (m, 4H ($H_{16,17}$)); 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H (H_{18})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 153.5 (C_9); 140.4 (C_1); 134.8 (C_{12}); 125.8 (C_4); 123.7 (C_6); 123.2 (C_7); 120.4 (C_3); 119.1 (C_5); 115.4 (C_{10}); 109.3 (C_{11}); 108.8 (C_2); 104.7 (C_8); 77.9 (C_{20}); 72.1 (C_{21}); 69.1 (C_{13}); 32.4 (C_{19}); 31.7 (C_{16}); 29.5 (C_{14}); 25.8 (C_{15}); 22.6 (C_{17}); 14.1 (C_{18}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{21}H_{24}NO$ 306.1858, found 306.1859.

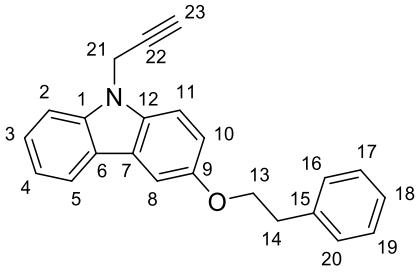
3-(Benzyloxy)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8e):



$C_{22}H_{17}NO$
311,1310

Procedure involving compound **7e** (60 mg, 0.22 mmol), *N,N*-dimethylformamide (2.5 mL), potassium hydroxide (26 mg, 0.45 mmol), propargylbromide (80% in toluene, 26 mg, 0.45 mmol). Ethyl acetate (10 mL) and water (100 mL). No purification was necessary to give compound **8e** as a clear yellow solid (100%, 68 mg), R_f = 0.78 (dichloromethane). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_2)); 7.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_8)); 7.54-7.32 (m, 8H ($H_{4,5,11,15,16,17,18,19}$)); 7.25-7.18 (m, 2H ($H_{3,10}$)); 5.20 (s, 2H ($H_{13}$)); 5.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{20})); 2.25 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{22})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 153.2 (C_9); 140.4 (C_1); 137.4 (C_{14}); 135.0 (C_{12}); 128.6 (2C, $C_{16,18}$); 127.9 (C_{17}); 127.6 (2C, $C_{15,19}$); 125.9 (C_4); 123.7 (C_6); 123.1 (C_7); 120.4 (C_3); 119.2 (C_5); 115.6 (C_{10}); 109.4 (C_{11}); 108.8 (C_2); 105.2 (C_8); 77.9 (C_{21}); 72.2 (C_{22}); 71.2 (C_{13}); 32.4 (C_{20}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{22}H_{18}NO$ 312.1388, found 312.1397.

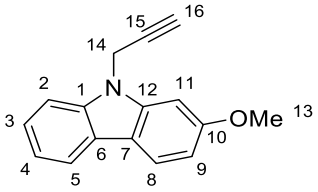
3-Phenethoxy-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8f):



$C_{23}H_{19}NO$
325,1467

Procedure involving compound **7f** (42.4 mg, 0.148 mmol), *N,N*-dimethylformamide (1.5 mL), potassium hydroxide (17 mg, 0.295 mmol), propargylbromide (80% in toluene, 35 mg, 0.295 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (150 mL). No purification was necessary to give compound **8f** as a clear yellow solid (100%, 48 mg), R_f = 0.54 (petroleum ether/ethyl acetate = 7/3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 8.01 (dt, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H (H_2)); 7.58 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_8)); 7.49-7.43 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H (H_{11})); 7.36-7.32 (m, 5H ($H_{16,17,18,19,20}$)); 7.22 (ddd, *J* = 8.0, 6.4, 1.6 Hz, 1H (H_3)); 7.13 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H (H_{10})); 5.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{21})); 4.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{13})); 3.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{14})); 2.24 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{23})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 153.2 (C_9); 140.4 (C_1); 138.5 (C_{15}); 135.0 (C_{12}); 129.0 (2C, $C_{17,19}$); 128.5 (2C, $C_{16,20}$); 126.4 (C_{18}); 125.9 (C_4); 123.7 (C_6); 123.1 (C_7); 120.4 (C_3); 119.2 (C_5); 115.5 (C_{10}); 109.4 (C_{11}); 108.8 (C_2); 104.8 (C_8); 77.9 (C_{22}); 72.2 (C_{23}); 69.9 (C_{13}); 36.0 (C_{14}); 32.5 (C_{21}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{23}H_{20}NO$ 326.1545, found 326.1547.

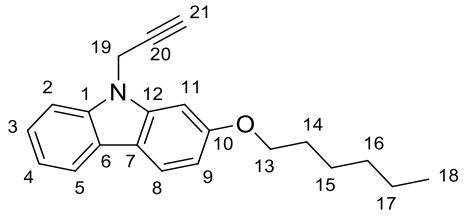
2-Methoxy-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8g):



$C_{16}H_{13}NO$
235,10

Procedure involving compound **7g**[296] (200 mg, 1.02 mmol), *N,N*-dimethylformamide (10 mL), potassium hydroxide (114 mg, 2.04 mmol) and propargylbromide (80% in toluene, 240 mg, 2.04 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (150 mL). No purification was necessary to give compound **8g** as a dark yellow solid (92%, 210 mg), R_f = 0.75 (dichloromethane). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.99 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_8)); 7.44-7.39 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.23 (ddd, *J* = 8.0, 5.8, 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.96 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{11})); 6.88 (dd), *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H (H_9); 5.00 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{14})); 3.95 (s, 3H (H_{13})); 2.26 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{16})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 159.2 (C_{10}); 141.2 (C_1); 139.9 (C_{12}); 124.5 (C_4); 123.4 (C_6); 121.1(C_8); 119.7 (C_5); 119.5 (C_3); 117.0 (C_7); 108.4 (C_2); 107.9 (C_9); 93.3 (C_{11}); 77.7 (C_{15}); 72.2 (C_{16}); 55.6 (C_{13}); 32.2 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{14}NO$ 236.1075, found 236.1074.

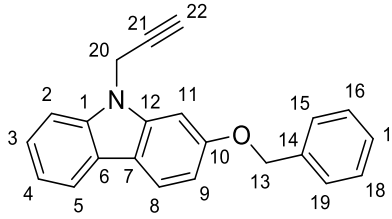
2-(Hexyloxy)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8h):



$C_{21}H_{23}NO$
305,18

Procedure involving compound **7h** (100 mg, 0.395 mmol), *N,N*-dimethylformamide (3.6 mL), potassium hydroxide (43 mg, 0.77 mmol), propargylbromide (80% in toluene, 91 mg, 0.77 mmol). Ethyl acetate (10 mL) and water (100 mL). No purification was necessary to give compound **8h** as a white solid (79%, 90 mg), R_f = 0.54 (petroleum ether/ethyl acetate = 8/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.98 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_8)); 7.43-7.38 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.22 (ddd, *J* = 8.0, 5.8, 1.0 Hz, 1H (H_3)); 6.95 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{11})); 6.87 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H (H_9)); 4.99 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{19})); 4.10 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H (H_{13})); 2.25 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{21})); 1.88-1.83 (m, 2H (H_{14})); 1.50-1.48 (m, 2H (H_{15})); 1.41-1.35 (m, 4H ($H_{16,17}$)); 0.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H (H_{18})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.7 (C_{10}); 141.2 (C_1); 139.9 (C_{12}); 124.5 (C_4); 123.5 (C_6); 121.1 (C_8); 119.6 (C_5); 119.5 (C_3); 116.9 (C_7); 108.4 (C_2); 108.4 (C_9); 94.0 (C_{11}); 77.4 (C_{20}); 72.2 (C_{21}); 68.5 (C_{13}); 32.2 (C_{19}); 31.6 (C_{16}); 29.4 (C_{14}); 25.8 (C_{15}); 22.6 (C_{17}); 14.0 (C_{18}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{21}H_{24}NO$ 306.1858, found 306.1859.

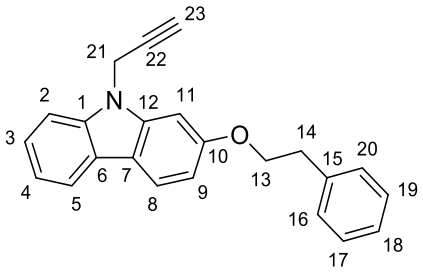
2-(Benzyloxy)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8i):



$C_{22}H_{17}NO$
311,1310

Procedure involving compound **7i**[236] (100 mg, 0.36 mmol), *N,N*-dimethylformamide (3.6 mL), potassium hydroxide (42 mg, 0.74 mmol, 2.1 eq) and propargylbromide (80% in toluene, 88 mg, 0.74 mmol, 2.1 eq). Ethyl acetate (10 mL) and water (100 mL). No purification was necessary to give compound **8i** as a pale orange solid (100%, 112 mg), R_f = 0.83 (dichloromethane). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.00-7.95 (m, 2H ($H_{2,8}$)); 7.52-7.50 (m, 2H ($H_{15,19}$)); 7.44-7.34 (m, 5H ($H_{4,5,16,17,18}$)); 7.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{11})); 6.96 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H (H_9)); 5.21 (s, 2H (H_{13})); 4.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{20})); 2.24 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{22})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.3 (C_{10}); 141.1 (C_1); 140.0 (C_{12}); 137.1 (C_{14}); 128.6 (2C, $C_{16,18}$); 128.0 (C_{17}); 127.6 (2C, $C_{15,19}$); 124.6 (C_4); 123.4 (C_6); 121.2 (C_8); 119.7 (C_5); 119.6 (C_3); 117.3 (C_7); 108.5 (C_2); 108.4 (C_9); 94.6 (C_{11}); 77.7 (C_{21}); 72.3 (C_{22}); 70.5 (C_{13}); 32.3 (C_{20}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{22}H_{18}NO$ 312.1388, found 312.1390.

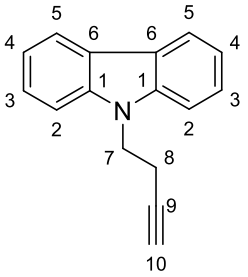
2-Phenethoxy-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (8j):



$C_{23}H_{19}NO$
325,15

Procedure involving compound **7j** (36 mg, 0.125 mmol), *N,N*-dimethylformamide (1.2 mL), potassium hydroxide (14 mg, 0.250 mmol) and propargylbromide (80% in toluene, 30 mg, 0.250 mmol). Ethyl acetate (20 mL) and water (150 mL). No purification was necessary to give compound **8j** as a clear yellow solid (74%, 30 mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.98 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_2)); 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_8)); 7.43-7.41 (m, 2H ($H_{4,5}$)); 7.38-7.34 (m, 5H ($H_{16,17,18,19,20}$)); 7.23 (ddd, *J* = 8.0, 5.6, 2.4 Hz, 1H (H_3)); 6.94 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{11})); 6.88 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H (H_9)); 4.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{21})); 4.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{13})); 3.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{14})); 2.24 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{23})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.4 (C_{10}); 141.2 (C_1); 139.9 (C_{12}); 138.3 (C_{15}); 129.1 (2C, $C_{17,19}$); 128.5 (2C, $C_{16,20}$); 126.5 (C_{18}); 124.6 (C_4); 123.4 (C_6); 121.1 (C_8); 119.7 (C_5); 119.6 (C_3); 117.1 (C_7); 108.4 (2C, $C_{2,9}$); 94.1 (C_{11}); 77.7 (C_{22}); 72.2 (C_{23}); 69.2 (C_{13}); 35.9 (C_{14}); 32.3 (C_{21}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{23}H_{20}NO$ 326.1545, found 326.1538.

9-(But-3-yn-1-yl)-9H-carbazole (8k):



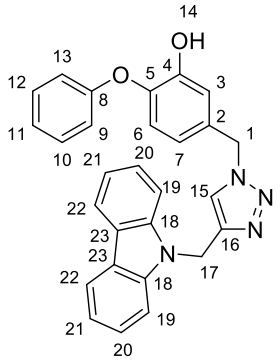
$C_{16}H_{13}N$
219,10

Potassium carbonate (0.176 g, 1.254 mmol, 1.2 eq) was added to a solution of aldehyde **7k**[241,242] (0.135 g, 0.627 mmol, 1 eq) in dry methanol (8 mL) under argon, followed by dimethyldiazomethylphosphonate (0.144 g, 7.524 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hours under argon, then diluted with ether and washed with 5% aqueous sodium bicarbonate. The solvent was dried over magnesium sulfate, filtered was evaporated under reduced pressure. No purification was necessary to give compound **8k** as a brown solid (98%, 0.616 mmol, 135 mg) ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.16 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 2H (H_2)); 7.56-7.47 (m, 4H ($H_{3,5}$)); 7.32 (ddd, *J* = 8.2, 6.4, 1.6 Hz, 2H (H_4)); 4.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_7)); 2.75 (td, *J* = 7.6 Hz, 2.6 Hz, 2H (H_8)); 2.09 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H (H_{10})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 139.9 (2C, C_1); 125.7 (2C, C_4); 123.0 (2C, C_6); 120.4 (2C, C_5); 119.2 (2C, C_3); 108.5 (2C, C_2); 80.9 (C_9); 70.6 (C_{10}); 41.8 (C_7); 18.6 (C_8). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{14}N$ 220.1126, found 220.1121.

I.B.3 Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition

General procedure for the copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition CuAAC (9a-n):
A solution of azide (1.2 eq), alkyne (1 eq), cupric sulfate pentahydrate (0.1 eq) and sodium ascorbate (0.4 eq) in a mixture of methanol/water was stirred at room temperature overnight. Water (100 mL) and dichloromethane (50 mL) were added. The combined organic layers were washed with water (50 mL) and brine (50 mL) and dried over magnesium sulfate. After concentration in vacuo, the crude product was purified by flash chromatography affording the expected product.

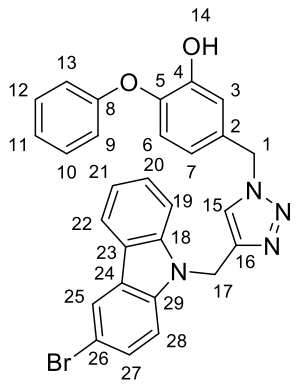
5-((4-((9H-Carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9a):



$C_{28}H_{22}N_4O_2$
446,17

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **8a**[237] (36 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.0696 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) affording compound **9a** as a white solid (77%, 60 mg), R_f = 0.19 (dichloromethane/methanol = 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.64 (bs, 1H (H_{14})); 8.14 (dt, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 2H (H_{19})); 8.08 (s, 1H (H_{15})); 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H (H_{22})); 7.45 (ddd, *J* = 8.8, 7.0, 1.3 Hz, 2H (H_{21})); 7.30-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.21 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 2H (H_{20})); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.81-6.79 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.69 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.68 (s, 2H (H_{17})); 5.42 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 143.4 (C_{16}); 142.4 (C_5); 139.7 (C_2); 133.0 (2C, C_{18}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.7 (2C, C_{21}); 123.3 (C_{15}); 122.2 (2C, C_{23}); 122.0 (C_{11}); 121.8 (C_6); 120.2 (2C, C_{19}); 119.1 (C_7); 119.0 (2C, C_{20}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 109.6 (2C, C_{22}); 52.3 (C_1); 37.6 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{28}H_{23}N_4O_2$ 447.1821, found 447.1814. Purity (HPLC): 96.4% at 290 nm (t_R = 5.456 min).

5-((4-((2-Bromo-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9b):

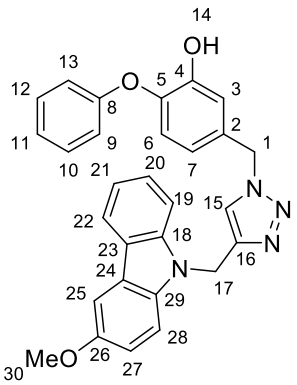


$C_{28}H_{21}BrN_4O_2$
524,08

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **8b**[238] (50 mg, 0.174 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.0696

mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol = 99/1) affording compound **9b** as a white solid (59%, 58 mg), R_f = 0.19 (dichloromethane/methanol = 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.65 (s, 1H (H_{14}); 8.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{25})); 8.20 (dt, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 1H (H_{19})); 8.08 (s, 1H (H_{15})); 7.78 (dt, *J* = 8.4, 0.8Hz, 1H (H_{22})); 7.76 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H (H_{28})); 7.58 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H (H_{27})); 7.49 (ddd, *J* = 8.6, 7.2, 1.2 Hz, 1H (H_{21})); 7.31-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.23 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 0.9 Hz, 1H (H_{20})); 7.01 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 6.89 (d, *J* = 8.1, 1H (H_6)); 6.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.82-6.79 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.68 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.68 (s, 2H (H_{17})); 5.42 (s, 2H (H_1)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 143.2 (C_{16}); 142.4 (C_5); 140.1 (C_{18}); 138.5 (C_2); 133.0 (C_{29}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 128.0 (C_{25}); 126.5 (C_{27}); 124.2 (C_{23}); 123.3 (C_{15}); 122.8 (C_{21}); 122.1 (C_{11}); 121.8 (C_6); 121.2 (C_{26}); 120.8 (C_{19}); 119.5 (C_{20}); 119.1 (C_7); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 111.8 (C_{28}); 111.2 (C_{24}); 110.0 (C_{22}); 52.3 (C_1); 37.7 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{28}H_{22}N_4O_2Br$ 525.0926, found 525.0941. Purity (HPLC): > 99.9% at 290 nm (t_R = 5.898 min).

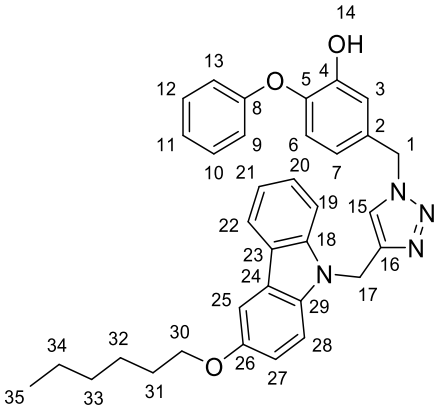
5-((4-((3-Methoxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9c):



$C_{29}H_{24}N_4O_3$
476,18

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (46 mg, 0.192 mmol), alkyne **8c** (38 mg, 0.16 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.0 mg, 0.016 mmol) and sodium ascorbate (13 mg, 0.064 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9c** as a white solid (92%, 70 mg), R_f = 0.26 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_{19})); 7.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.42-7.37 (m, 2H ($H_{15,21}$)); 7.35-7.28 (m, 3H ($H_{10,12,22}$)); 7.23-7.17 (m, 1H (H_{20})); 7.12 (tt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.07-7.04 (m, 2H ($H_{27,28}$)); 7.00-6.94 (m, 2H ($H_{9,13}$), 6.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.58 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.52 (s, 2H (H_{17})); 5.24 (s, 2H (H_1)); 3.90 (s, 3H (H_{30})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.3 (C_8); 153.9 (C_{26}); 147.9 (C_4); 144.2 (C_{16}); 140.5 (C_{18}); 135.0 (C_{29}); 130.5 (2C, $C_{2,5}$); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 125.9 (C_{21}); 123.8 (2C, $C_{15,28}$); 123.4 (C_{23}); 122.8 (C_{24}); 120.3 (C_{20}); 119.9 (C_{11}); 118.9 (C_6); 118.9 (C_7); 118.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.9 (C_3); 114.9 (C_{27}); 109.5 (C_{19}); 108.8 (C_{22}); 103.5 (C_{25}); 56.0 (C_{30}); 53.6 (C_1); 38.8 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{29}H_{25}N_4O_3$ 477.1927, found 477.1930. Purity (HPLC): 96.5% at 290 nm (t_R = 5.221 min).

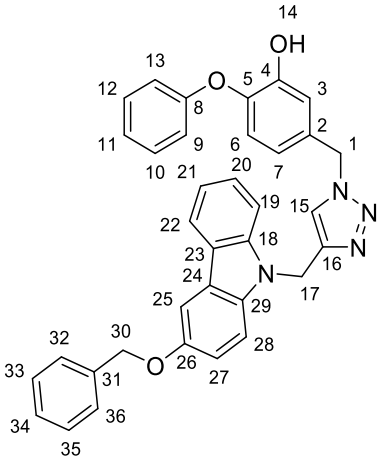
5-((4-((3-Hexyloxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9d):



$C_{34}H_{34}N_4O_3$
546,26

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (54 mg, 0.213 mmol), alkyne **8d** (54 mg, 0.176 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.4 mg, 0.0176 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.07 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9d** as a white solid (93%, 70 mg), R_f = 0.38 (dichloromethane/methanol = 99/1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.03 (dt, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H (H_{19})); 7.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{25})); 7.43-7.41 (m, 2H ($H_{15,21}$)); 7.37-7.30 (m, 3H ($H_{10,12,22}$)); 7.23-7.16 (m, 1H (H_{20})); 7.14 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 7.08 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H (H_{27})); 7.04 (s, 1H (H_{28})); 7.00-6.95 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.60 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.59 (s, 2H (H_{17})); 5.29 (s, 2H (H_1)); 4.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H (H_{30})); 1.84-1.81 (m, 2H ($_{31}$)); 1.54-1.46 (m, 2H (H_{32})); 1.40-1.34 (m, 4H ($H_{33,34}$)); 0.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H (H_{35})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.3 (C_8); 153.4 (C_{26}); 147.9 (C_4); 144.2 (C_{16}); 140.5 (C_{18}); 134.9 (C_{29}); 130.5 (2C, $C_{2,5}$); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 125.8 (C_{21}); 123.8 (2C, $C_{15,28}$); 123.4 (C_{23}); 122.9 (C_{24}); 120.3 (C_{20}); 119.9 (C_{11}); 118.9 (2C, $C_{6,7}$); 118.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.9 (C_3); 115.5 (C_{27}); 109.4 (C_{19}); 108.8 (C_{22}); 104.5 (C_{25}); 69.0 (C_{30}); 53.6 (C_1); 38.8 (C_{17}); 31.6 (C_{33}); 29.4 (C_{31}); 25.8 (C_{32}); 22.6 (C_{34}); 14.0 (C_{35}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{34}H_{35}N_4O_3$ 547.2709, found 547.2709. Purity (HPLC): 95.9% at 290 nm (t_R = 7.498 min).

5-((4-((3-Benzyloxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9e):

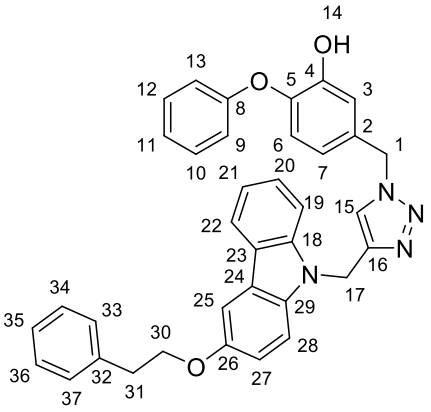


$C_{35}H_{28}N_4O_3$
552,22

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (46 mg, 0.235 mmol, 1.5 eq), alkyne **8e** (50 mg, 0.16 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.0 mg, 0.016 mmol) and sodium ascorbate (13 mg, 0.064 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9e** as a

white solid (80%, 70 mg), R_f = 0.42 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.03 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H (H_{19})); 7.66 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.52-7.48 (m, 2H ($H_{21,22}$)); 7.44-7.30 (m, 8H ($H_{10,12,28,32,33,34,35,36}$)); 7.24-7.11 (m, 3H ($H_{11,20,27}$)); 7.05 (s, 1H ($H_{15}$)); 7.00-6.96 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.60 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.59 (s, 2H (H_{17})); 5.29 (s, 2H (H_1)); 5.17 (s, 2H (H_{30})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.2 (C_8); 153.1 (C_{26}); 147.8 (C_4); 144.2 (C_{16}); 140.5 (C_{18}); 137.4 (C_{31}); 135.2 (C_{29}); 130.6 (2C, $C_{2,5}$); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 128.5 (2C, $C_{33,35}$); 127.8 (C_{34}); 127.5 (2C, $C_{32,36}$); 125.9 (C_{21}); 123.8 (2C, $C_{15,28}$); 123.4 (C_{23}); 122.8 (C_{24}); 120.3 (C_{20}); 119.9 (C_{11}); 119.0 (C_7); 118.8 (C_6); 118.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.9 (C_3); 115.6 (C_{27}); 109.5 (C_{19}); 108.8 (C_{22}); 105.0 (C_{25}); 71.1 (C_{30}); 53.7 (C_1); 38.8 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{35}H_{29}N_4O_3$ 553.2240, found 553.2234. Purity (HPLC): 95.0% at 300 nm (t_R = 6.181 min).

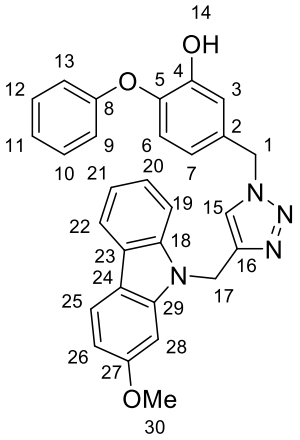
5-((4-((3-Phenethoxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9f):



$C_{36}H_{30}N_4O_3$
566,23

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (30 mg, 0.122 mmol), alkyne **8f** (33 mg, 0.102 mmol), cupric sulfate pentahydrate (3.0 mg, 0.0102 mmol) and sodium ascorbate (8 mg, 0.041 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99.5/0.5) affording compound **9f** as a white solid (74%, 42 mg), R_f = 0.48 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 8.01 (dt, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 1H (H_{19})); 7.57 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.43-7.40 (m, 2H ($H_{21,22}$)); 7.36-7.32 (m, 7H ($H_{10,12,33,34,35,36,37}$)); 7.21-7.18 (m, 1H (H_{20})); 7.14 (tt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.08 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.03 (s, 1H (H_{15})); 6.99-6.96 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.74(d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.60 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.58 (s, 2H (H_{17})); 5.28 (s, 2H (H_1)); 4.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{30})); 3.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H (H_{31})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 153.1 (C_8); 147.6 (C_{26}); 144.1 (C_4); 145.0 (C_{16}); 140.6 (C_{18}); 138.4 (C_{32}); 135.1 (C_{29}); 130.6 (2C, $C_{2,5}$); 130.0 (2C, $C_{10,12}$); 129.0 (2C, $C_{34,36}$); 128.5 (2C, $C_{33,37}$); 126.5 (C_{35}); 125.9 (C_{21}); 124.1 (2C, $C_{15,28}$); 123.5 (C_{23}); 122.9 (C_{24}); 120.3 (C_{20}); 120.1 (C_{11}); 119.0 (C_7); 118.5 (C_6); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 115.7 (C_3); 115.6 (C_{27}); 109.5 (C_{19}); 108.8 (C_{22}); 104.7 (C_{25}); 69.8 (C_{30}); 53.7 (C_1); 39.1 (C_{17}); 36.0 (C_{31}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{36}H_{30}N_4O_3$ 567.2396, found 5672386. Purity (HPLC): > 95.0% at 350 nm (t_R = 6.486 min).

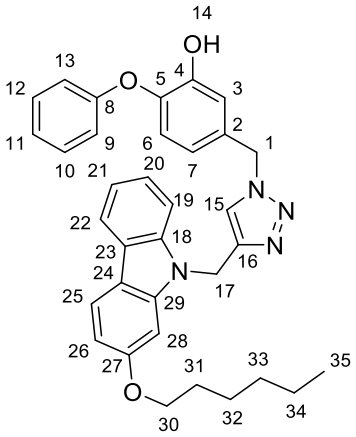
5-((4-((2-Methoxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9g):



$C_{29}H_{24}N_4O_3$
476,18

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (56.3 mg, 0.235 mmol), alkyne **8g** (46.2 mg, 0.196 mmol), cupric sulfate pentahydrate (5.0 mg, 0.0196 mmol) and sodium ascorbate (16 mg, 0.079 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9g** as a white solid (77%, 72 mg), R_f = 0.38 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.64 (s, 1H (H_{14})); 8.08 (s, 1H (H_{15})); 8.01 (dt, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H (H_{19})); 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H (H_{25})); 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_{22})); 7.35 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 1.3 Hz, 1H (H_{21})); 7.31-7.27 (m, 3H ($H_{10,12,28}$)); 7.16 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 0.9 Hz, 1H (H_{20})); 7.01 (tt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.83-6.79 (m, 3H ($H_{9,13,26}$)); 6.69 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.64 (s, 2H (H_{17})); 5.43 (s, 2H (H_1)); 3.86 (s, 3H (H_{30})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 158.8 (C_{27}); 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 143.4 (C_5); 142.4 (C_{16}); 141.2 (C_{18}); 139.8 (C_{29}); 133.1 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 124.3 (C_{21}); 123.3 (C_{11}); 122.5 (C_{23}); 122.0 (C_{15}); 121.8 (C_7); 121.0 (C_{25}); 119.3 (C_6)); 119.1 (C_{22}); 119.1 (C_{20}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.9 (C_{24}); 109.4 (C_{19}); 107.8 (C_{26}); 93.9 (C_{28}); 55.5 (C_{30}); 52.3 (C_1); 37.6 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{29}H_{25}N_4O_3$ 477.1927, found 477.1918. Purity (HPLC): 98.6% at 290 nm (t_R = 5.421 min).

5-((4-((2-(Hexyloxy)-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-ylmethyl)2phenoxyphenol (9h):

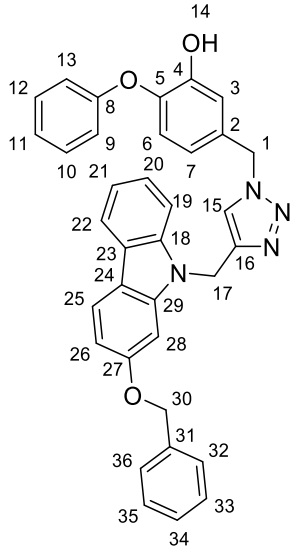


$C_{34}H_{34}N_4O_3$
546,26

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (48.0 mg, 0.2 mmol), alkyne **8h** (51 mg, 0.166 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.2 mg, 0.0166 mmol) and sodium ascorbate (13 mg, 0.066 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9h** as a white

solid (77%, 70 mg), R_f = 0.51 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ (s, 1H (H_{14})); 8.06 (s, 1H (H_{15})); 8.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H (H_{19})); 7.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_{22})); 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H (H_{21})); 7.31-7.27 (m, 3H ($H_{10,12,26}$)); 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H (H_{20})); 7.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H (H_{11})); 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.86 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.82-6.79 (m, 3H ($H_{9,13,28}$)); 6.69 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H (H_7)); 5.63 (s, 2H (H_{17})); 5.43 (s, 2H (H_1)); 4.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H (H_{31})); 1.78-1.75 (m, 2H (H_{31})); 1.48-1.43 (m, 2H (H_{32})); 1.35-1.31 (m, 4H ($H_{33,34}$)); 0.89 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H (H_{35})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 158.2 (C_{27}); 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 143.5 (C_5); 142.4 (C_{16}); 141.2 (C_{18}); 139.8 (C_{29}); 133.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 124.2 (C_{21}); 123.3 (C_{11}); 122.5 (C_{23}); 122.0 (C_{15}); 121.8 (C_7); 120.9 (C_{25}); 119.3 (C_6); 119.1 (C_{22}); 119.0 (C_{20}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.8 (C_{24}); 109.4 (C_{19}); 108.1 (C_{26}); 94.5 (C_{28}); 67.8 (C_{30}); 52.3 (C_1); 37.6 (C_{17}); 31.1 (C_{33}); 28.8 (C_{31}); 25.3 (C_{32}); 22.1 (C_{34}); 13.9 (C_{35}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{34}H_{35}N_4O_3$ 547.2709, found 547.2700. Purity (HPLC): 96.4% at 300 nm (t_R = 7.122 min).

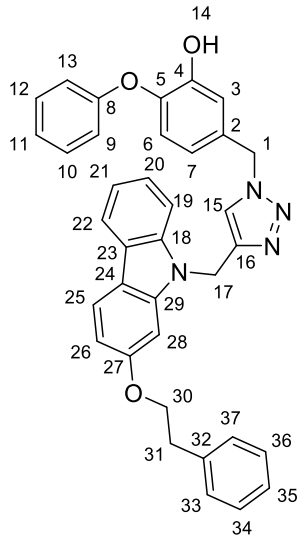
5-((4-((2-(Benzyloxy)-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9i):



Chemical Formula: $C_{35}H_{28}N_4O_3$
Exact Mass: 552,22

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (46.0 mg, 0.235 mmol, 1.5 eq), alkyne **8i** (50 mg, 0.16 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.0 mg, 0.016 mmol) and sodium ascorbate (13 mg, 0.064 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) affording compound **9i** as a white solid (85%, 75 mg), R_f = 0.59 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.00 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_{19})); 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.49-7.46 (m, 2H ($H_{21,22}$)); 7.44-7.31 (m, 8H ($H_{10,12,26,32,33,34,35,36}$)); 7.13 (tt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H (H_{11})); 7.02-6.91 (m, 5H ($H_{9,13,15,20,28}$)); 6.84 (d, *J* = Hz, 1H (H_3)); 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.61 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.64 (bs, 1H (H_{14})); 5.56 (s, 2H (H_{17})); 5.30 (s, 2H (H_1)); 5.15 (s, 2H (H_{30})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.3 (C_{27}); 156.2 (C_8), 147.8 (C_4); 144.2 (C_{16}); 141.3 (C_5); 140.1 (C_{18}); 137.0 (C_{31}); 130.5 (2C, $C_{2,29}$); 129.9 (2C, $C_{10,12}$); 128.5 (2C, $C_{33,35}$); 127.9 (2C, $C_{32,36}$); 127.6 (C_{34}); 124.7 (C_{21}); 123.9 ($C_{15,25}$); 123.2 (C_{23}); 121.1 (C_{20}); 119.9 (C_{11}); 119.5 (C_7); 119.5 (C_{22}); 118.8 (C_6); 118.3 (2C, $C_{9,13}$); 117.0 (C_{24}); 115.8 (C_3); 108.7 (C_{19}); 108.5 (C_{26}); 94.3 (C_{28}); 70.4 (C_{30}); 53.6 (C_1); 38.8 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{35}H_{29}N_4O_3$ 553.2240, found 553.2264. Purity (HPLC): 95.6% at 290 nm (t_R = 6.707 min).

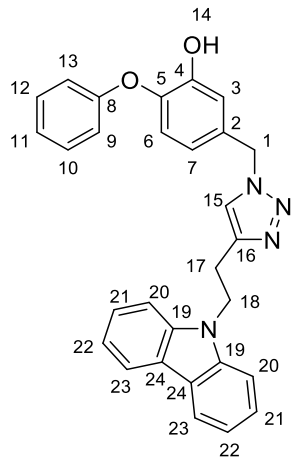
5-((4-((2-Phenethoxy-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9j):



Chemical Formula: $C_{36}H_{30}N_4O_3$
Exact Mass: 566,23

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (18.0 mg, 0.074 mmol), alkyne **8j** (20 mg, 0.062 mmol), cupric sulfate pentahydrate (2.0 mg, 0.062 mmol) and sodium ascorbate (5 mg, 0.025 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99.5/0.5) affording compound **9j** as a white solid (63%, 22 mg), R_f = 0.54 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_{19})); 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{25})); 7.41-7.30 (m, 8H ($H_{10,12,22,33,34,35,36,37}$)); 7.25-7.18 (m, 2H ($H_{20,21}$)); 7.14 (tt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.05 (s, 1H (H_{15})); 6.99-6.96 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{28})); 6.85 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H (H_{26})); 6.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.59 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.55 (s, 2H (H_{17})); 5.29 (s, 2H (H_1)); 4.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{30})); 3.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{31})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 158.4 (C_{27}); 156.1 (C_8); 147.6 (C_4); 144.1 (C_{16}); 141.4 (C_5); 140.1 (C_{18}); 138.3 (C_{32}); 130.6 (2C, $C_{2,29}$); 130.0 (2C, $C_{10,12}$); 129.1 (2C, $C_{34,36}$); 128.5 (2C, $C_{33,37}$); 126.5 (C_{35}); 124.6 (C_{21}); 124.1 (2C, $C_{15,25}$); 123.3 (C_{23}); 121.1 (C_{20}); 120.0 (C_{11}); 119.5 (C_7); 119.5 (C_{22}); 118.5 (C_6); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 116.9 (C_{24}); 115.7 (C_3); 108.5 (C_{19}); 108.5 (C_{26}); 94.0 (C_{28}); 69.2 (C_{30}); 53.7 (C_1); 39.0 (C_{17}); 35.9 (C_{31}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{36}H_{31}N_4O_3$ 567.2396, found 567.2384. Purity (HPLC): 99.4% at 300 nm (t_R = 6.606 min).

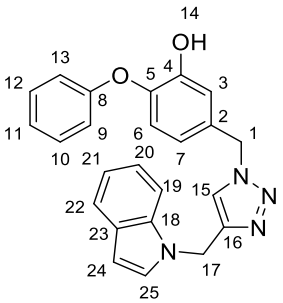
5-((4-(2-(9H-Carbazol-9-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2 phenoxyphenol (9k):



$C_{29}H_{24}N_4O_2$
460,19

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (43.0 mg, 0.180 mmol), alkyne **8k** (33 mg, 0.151 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.0 mg, 0.0151 mmol) and sodium ascorbate (12.0 mg, 0.060 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) affording compound **9k** as a white solid (86%, 60 mg), R_f = 0.19 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.68 (s, 1H (H_{14})); 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H (H_{20})); 7.86 (s, 1H (H_{15})); 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_{23})); 7.40 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.0 Hz, 2H (H_{22})); 7.34-7.30 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.17 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 0.8 Hz, 2H (H_{21})); 7.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H (H_{11})); 6.89-6.86 (m, 2H ($H_{3,6}$)); 6.86-6.83 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.53 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.42 (s, 2H (H1)); 4.67 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{18})); 3.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 144.0 (C_{16}); 142.3 (C_5); 139.8 (2C, C_{19}); 133.1 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.7 (2C, C_{22}); 123.1 (C_{15}); 122.1 (C_{11}); 122.1 (2C, C_{24}); 121.8 (C_6); 120.2 (2C, C_{20}); 118.9 (C_7); 118.8 (2C, C_{21}); 116.6 (C_3); 116.3 (2C, $C_{9,13}$); 109.1 (2C, C_{23}); 52.2 (C_1); 42.4 (C_{17}); 24.8 (C_{18}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{29}H_{25}N_4O_2$ 461.1978, found 461.1969. Purity (HPLC): 98.3% at 290 nm (t_R = 5.004 min).

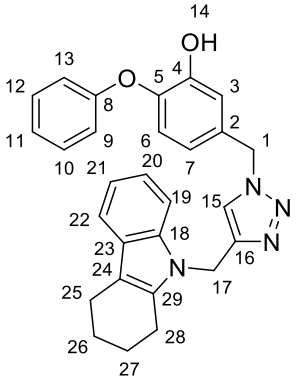
5-((4-((1H-Indol-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9l):



$C_{24}H_{20}N_4O_2$
396,16

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (48.2 mg, 0.200 mmol), alkyne **8l**[239] (26 mg, 0.168 mmol), cupric sulfate pentahydrate (4.2 mg, 0.0168 mmol) and sodium ascorbate (13.3 mg, 0.0669 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/2) affording compound **9l** as a white solid (86%, 57.5 mg), R_f = 0.34 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.66 (s, 1H (H_{14})); 8.06 (s, 1H (H_{15})); 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_{19})); 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_{22})); 7.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H (H_{25})); 7.31-7.28 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.12 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.1 Hz, 1H (H_{20})); 7.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H ($H_{11,21}$)); 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.83-6.81 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.73 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 6.44 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H (H_{24})); 5.47 (s, 2H (H_1)); 5.46 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 157.7 (C_8); 149.3 (C_4); 143.9 (C_{16}); 142.4 (C_5); 135.5(C_{18}); 133.0 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 128.6 (C_{25}); 128.2 (C_{23}); 123.3 (C_{15}); 122.0 (C_{11}); 121.8 (C_6); 121.1 (C_{20}); 120.4 (C_{22}); 119.2 (C_7); 119.1 (C_{21}); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 110.1 (C_{19}); 101.0 (C_{24}); 52.3 (C_1); 40.8 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{24}H_{21}N_4O_2$ 397.1665, found 397.1662. Purity (HPLC): 99.4% at 290 nm (t_R = 4.457 min).

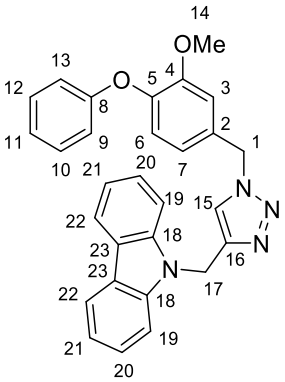
2-Phenoxy-5-((4-((1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (9m):



$C_{28}H_{26}N_4O_2$
450,21

General procedure for the CuAAC involving azide **1e** (43.9 mg, 0.183 mmol), alkyne **8m**[240] (32 mg, 0.153 mmol), cupric sulfate pentahydrate (3.8 mg, 0.0153 mmol) and sodium ascorbate (12 mg, 0.0612 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol 98/1) affording compound **9m** as a white solid (58%, 39.3 mg), R_f = 0.14 (dichloromethane/methanol = 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H (H_{19})); 7.37-7.32 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_{22})); 7.16-7.05 (m, 4H ($H_{11,15,20,21}$)); 7.01-6.98 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.64 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.90 (s, 1H (H_{14})); 5.33 (s, 2H (H_1)); 5.32 (s, 2H (H_{17})); 2.74-2.70 (m, 4H ($H_{8,11}$)); 1.94-1.88 (m, 2H (H_{26})); 1.86-1.81 (m, 2H (H_{27}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 156.1 (C_8); 147.7 (C_4); 144.1 (C_{16}); 136.0 (C_5); 135.3 (C_{18}); 130.7 (2C, $C_{2,29}$); 130.0 (2C, $C_{10,12}$); 127.6 (C_{23}); 124.0 (C_{15}); 120.9 (C_{11}); 120.0 (C_{20}); 119.0 (C_7); 118.6 (C_{21}); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 117.9 (C_{22}); 115.7 (C_3); 110.2 (C_{24}); 108.7 (C_{19}); 53.7 (C_1); 38.6 (C_{17}); 23.1 (C_{11}); 23.1 (C_{10}); 22.1 (C_9); 21.0 (C_8). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{28}H_{27}N_4O_2$ 451.2134, found 451.2132. Purity (HPLC): 95.3% at 290 nm (t_R = 5.937 min).

9-((1-(3-Methoxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-9H-carbazole (9n):



$C_{29}H_{24}N_4O_2$
460,1899

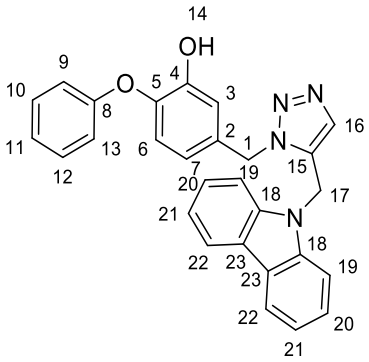
General procedure for the CuAAC involving azide **1'e** (100.0 mg, 0.392 mmol), alkyne **8a** (68 mg, 0.328 mmol), cupric sulfate pentahydrate (8.2 mg, 0.0328 mmol) and sodium ascorbate (26.0 mg, 0.131 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (10 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane) affording compound **9n** as a white solid (86%, 60 mg), R_f = 0.13 (dichloromethane). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.10 (dt, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H (H_{19})); 7.47-7.44 (m, 4H ($H_{21,22}$)); 7.33-7.22 (4H ($H_{10,12,20}$)); 7.09-7.03 (m, 2H ($H_{11,15}$)); 6.92-6.87 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_6)); 6.70-6.66 (m, 2H ($_{3,7}$)); 5.65 (s, 2H (H_{17})); 5.34 (s, 2H (H_1)); 3.67 (s, 3H (H_{14})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.2 (C_8); 151.4 (C_4); 145.7 (C_{16}); 140.0 (C_5); 130.6 (2C, C_{18}); 130.6 (C_2);

129.5 (2C, $C_{10,12}$); 125.9 (2C, C_{21}); 123.0 (2C, C_{23}); 122.9 (C_{15}); 120.4 (C_6); 120.4 (2C, $C_{7,11}$); 120.4 (2C, C_{19}); 119.4 (2C, C_{20}); 117.6 (2C, $C_{9,13}$); 112.0 (C_3); 108.7 (2C, C_{22}); 55.9 (C_{14}); 53.8 (C_1); 38.8 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H^+]$) calculated for $C_{29}H_{25}N_4O_2$ 461.1979, found 461.1977. Purity (HPLC): 97.7% at 290 nm (t_R = 6.253 min).

I.B.4 Ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition

General procedure for the ruthenium-catalysed azide-alkyne cycloaddition RuAAC (9o-q)[220]:
A solution of azide **1e** (1 eq) and alkyne (1 eq) in degassed 1,4-dioxane ([alkyne] = 0.9 M) was added to a solution of Cp*RuCl(PPh_3)$_2$ (0.05 eq) in 1,4-dioxane ([Cp*RuCl(PPh_3)$_2$] = 0.009 M) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 65 °C for 18h and the solvent was removed *in-vacuo.* Triazoles **9o-q** were obtained after purification by flash chromatography.

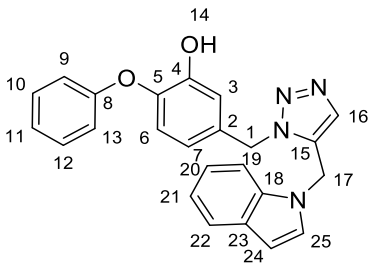
5-((5-((9H-Carbazol-9-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9o):



$C_{28}H_{22}N_4O_2$
446,17

General procedure for RuAAC involving azide **1e** (80 mg, 0.332 mmol), alkyne **8a**[237] (68.1 mg, 0.332 mmol), Cp*RuCl(PPh_3)$_2$ (13.2 mg, 16.5 µmol) in degassed 1,4-dioxane (2.2 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 20/80) affording compound **9o** as a white solid (64%, 95.2 mg), R_f = 0.50 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.64 (s, 1H (H_{14})); 8.15 (dt, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 2H (H_{19})); 7.32-7.29 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.41-7.36 (m, 4H ($H_{21,22}$)); 7.22 (ddd, *J* = 8.0, 6.2, 1.8 Hz, 2H (H_{20})); 7.13 (s, 1H (H_{16})); 7.03 (tt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.85-6.82 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.72 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.49 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.75 (s, 2H (H_{17})); 5.67 (s, 2H (H1)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.8 (C_8); 149.6 (C_4); 142.1 (C_5); 139.7 (2C, C_{18}); 134.1 (C_{15}); 132.4 (C_{16}); 132.3 (C_2); 129.5 (2C, $C_{10,12}$); 125.9 (2C, C_{21}); 122.5 (2C, C_{23}); 122.0 (C_{11}); 121.9 (C_6); 120.4 (2C, C_{19}); 119.5 (2C, C_{20}); 118.3 (C_7); 116.1 (2C, $C_{9,13}$); 115.8 (C_3); 109.0 (2C, C_{22}); 50.7 (C_1); 36.3 (C_{17}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H^+]$) for calculated for $C_{28}H_{23}N_4O_2$ 447.1743, found 447.1811. Purity (HPLC): 97.7% at 290 nm (t_R = 4.820 min).

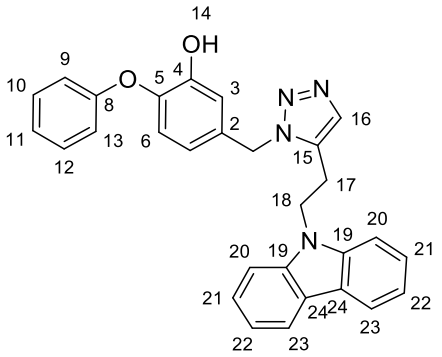
5-((5-((1H-Indol-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9p):



$C_{24}H_{20}N_4O_2$
396,16

General procedure for RuAAC involving azide **1e** (40 mg, 0.166 mmol), alkyne **8l**[239] (25.7 mg, 0.166 mmol), Cp*RuCl(PPh$_3$)$_2$ (6.6 mg, 8.3 µmol) in degassed 1,4-dioxane (1.1 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol 100/0 to 85/15) affording compound **9p** as a white solid (90%, 59.1 mg), R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d$_6$, 600 MHz) δ 9.66 (s, 1H (H$_{14}$)); 7.54 (dt, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 2H (H$_{19}$)); 7.41 (s, 1H (H$_{16}$)); 7.32 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H (H$_{25}$)); 7.31-7.29 (m, 3H (H$_{10,12,22}$)); 7.09 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.2 Hz, 1H (H$_{21}$)); 7.04-7.01 (m, 2H (H$_{11,20}$)); 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H$_6$)); 6.84-6.81 (m, 2H (H$_{9,13}$)); 6.77 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H$_3$)); 6.58 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H$_7$)); 6.45 (dd, *J* = 3.2, 0.8 Hz, 1H (H$_{24}$)); 5.63 (s, 2H (H$_1$)); 5.56 (s, 2H (H$_{17}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d$_6$, 151 MHz) δ 157.8 (C$_8$); 149.5 (C$_4$); 142.2 (C$_5$); 135.5 (C$_{18}$); 134.4 (C$_{15}$); 133.0 (C$_{16}$); 132.5 (C$_2$); 129.5 (2C, C$_{10,12}$); 128.6 (C$_{25}$); 128.3 (C$_{23}$); 122.0 (C$_{11}$); 122.0 (C$_6$); 121.4 (C$_{21}$); 120.6 (C$_{19}$); 119.5 (C$_{20}$); 118.5 (C$_7$); 116.1 (2C, C$_{9,13}$); 116.0 (C$_3$); 109.7 (C$_{22}$); 101.7 (C$_{24}$); 50.4 (C$_1$); 38.5 (C$_{17}$). HRMS (DCI-CH$_4$, [M+H$^+$]) for calculated for C$_{24}$H$_{21}$N$_4$O$_2$ 307.1665, found 397.1658.

5-((5-(2-(9H-Carbazol-9-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (9q):



$C_{29}H_{24}N_4O_2$
460,19

General procedure for RuAAC involving azide **1e** (39.8 mg, 0.165 mmol), alkyne **8k** (36.2 mg, 0.165 mmol), Cp*RuCl(PPh$_3$)$_2$ (6.6 mg, 8.25 µmol) in degassed 1,4-dioxane (1.3 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 0/100) affording compound **9q** as a beige solid (63%, 47.9 mg), R_f = 0.36 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d$_6$, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H (H$_{14}$)); 8.15 (dt, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 2H (H$_{20}$)); 7.61 (s, 1H (H$_{16}$)); 7.40-7.39 (m, 4H (H$_{22,23}$)); 7.26-7.22 (m, 2H (H$_{10,12}$)); 7.21-7.18 (m, 2H (H$_{21}$)); 6.99 (tt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H (H$_{11}$)); 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H$_6$)); 6.83-6.79 (m, 2H (H$_{9,13}$)); 6.72 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H$_3$)); 6.53 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H$_7$)); 5.38 (s, 2H (H$_1$)); 4.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H (H$_{17}$)); 3.13 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H (H$_{18}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d$_6$, 126 MHz) δ 157.7 (C$_8$); 149.6 (C$_4$); 142.2 (C$_5$); 139.5 (2C, C$_{19}$); 134.2 (C$_{15}$); 133.1 (C$_{16}$); 132.9 (C$_2$); 129.5 (2C, C$_{10,12}$); 125.8 (2C, C$_{22}$); 122.1 (2C, C$_{24}$); 122.0 (C$_{11}$); 122.0 (C$_6$); 120.3 (2C, C$_{20}$); 119.0 (2C, C$_{21}$); 118.2 (C$_7$); 116.1 (2C, C$_{9,13}$); 115.7 (C$_3$); 109.0 (2C, C$_{23}$); 50.0 (C$_1$); 41.0 (C$_{17}$); 21.9 (C$_{18}$). HRMS (DCI-CH$_4$, [M+H$^+$]) for calculated for C$_{29}$H$_{25}$N$_4$O$_2$ 461.1899, found 461.1963. Purity (HPLC): 98.6% at 290 nm (t_R = 4.975 min).

I.C Chapter 3

I.C.1 Sample preparation

The protein, cofactor NAD$^+$, alkynes and azide were added to an Eppendorf tube in that order. The blanks were made in the same way, replacing the protein with PIPES buffer. The denatured protein was heated in a water bath for at least 2 min. The quantities introduced into the tests are listed in the table below.

Components	Molar mass (g/mol)	Stock concentration	volume drawn (µL)	Final concentration (µM)
InhA		5 µM	300	4.76
NAD+	663,43	12 mM	1.25	47.6
Azide	241,25	120 mM	1.25	476
Alkynes		240 mM	2.5	1905

Tableau 23 : KTGS assays.

Each Eppendorf was agitated on a stirring wheel in a warm chamber at the desired temperature (20 °C, 30 °C and 37 °C) for 24, 48 and 72 h. At the end of the reaction, all the compounds were diluted in 300 µL of acetonitrile/methanol (50/50), vortexed for 10 s and centrifugated for 5 min at 10,000 x g before analysis by UHPLC -HRMS.

I.C.2 UHPLC-HRMS analysis

A Waters Acquity UPLC-QTOF G2 (Ultra Performance Liquid Chromatography with QTOF Detector) was used. It consists of the following modular components: a binary pump, an automatic sample injector with two 48-well trays, a column oven, a diode array detector. The separations were achieved on a Waters Acquity BEH Phenyl (100 mm x 2.1 mm, particle size 1.7 µm) column. The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B) at a flow rate of 0.4 mL min^{-1}. The temperature of the column oven was set at 30 °C. The chromatographic analysis consisted in a linear gradient program: from 60% A/40% B to 0% A/100% B between 1 and 12 min. After each run, the percentage of solvents ramped to their initial composition in 2 min and then the column was re-equilibrated for 2 min.

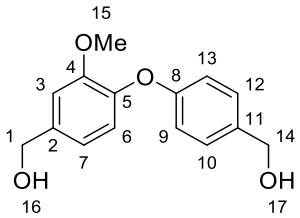
I.C.3 High-resolution mass spectrometry (HR-MS) experiments

HR-MS and HR-MS/MS were performed on a Waters Xevo G2 QTOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) with ESI in positive mode (ESI^+). The instrument parameters were as follows: for MS analysis, cone voltage 30 or 50 V, source temperature 130 °C, desolvatation temperature 450 °C, cone gas flow rate 20 $L.h^{-1}$, scan range m/z 50-1200. All analyses were performed using the LockSpray, which ensured accuracy and reproducibility. Leucine enkephalin (1 $ng.µL^{-1}$) introduced by a the LockSpray at 3 µL min^{-1} was used as the ock-mass generating reference ions at m/z 556.2771 or 554.2615 in positive mode. The MassLynx software was used to calculate the most probable chemical formula and the theoretical exact mass of the molecular ions by comparison with their measured accurate ionic masses. The extracted ion chromatogram of the monitored peaks was integrated by Quantlynx application of MassLynx 4.1 (Waters).

I.D Chemical synthesis of chapter 4

I.D.1 Bis-azide precursors

(4-(4-(Hydroxymethyl)-2-methoxyphenoxy)phenyl)methanol (11b):



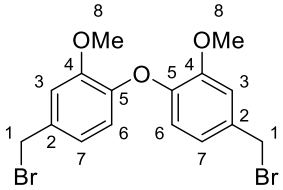
$C_{15}H_{16}O_4$
260,10

To a solution of the reagent **11a**[297] (3.0 g, 11.7 mmol, 1 eq), in a mixture of methanol (50 mL) at 4 °C was added sodium borohydride (2.66 g, 70.3 mmol, 6 eq). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then quenched with 10 mL of saturated ammonium chloride solution. Ethyl acetate (40 mL) was added and the aqueous layer was separated and the organic layer was washed with water (20 mL) three times. After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the expected product **11b** was obtained without further purification as a white solid (99%, 3.01 g), R_f = 0.27 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.28 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.95-6.83 (m, 4H ($H_{6,7,9,13}$)); 4.67 (s, 2H (C_1)); 4.62 (s, 2H (C_{14})); 3.83 (s, 3H (H_{15})); 1.83 (bs, 2H ($H_{16,17}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.5 (C_8); 151.4 (C_4); 144.3 (C_5); 137.7 (C_2); 134.9 (C_{11}); 128.5 (2C, $C_{10,12}$); 120.9 (C_7); 119.5 (C_6); 117.1 (2C, $C_{9,13}$); 111.5 (C_3); 65.0 ($C_{1/14}$); 64.9 ($C_{1/14}$); 56.0 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{15}H_{16}O_4$ 260.1049, found 260.1040.

General procedure for bromination (10c, 11c):

To a solution of the reagent in anhydrous dichloromethane at 4 °C under argon was added phosphorus tribromide. The reaction mixture was stirred for 4 h. Water was added and the mixture was evaporated under vacuum to remove the dichloromethane. The recovered aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with water and brine. After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

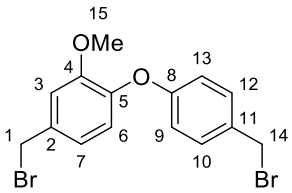
4,4'-Oxybis(1-(bromomethyl)-3-methoxybenzene) (10c):



$C_{16}H_{16}Br_2O_3$
413,95

Procedure involving **10b**[271] (50 mg, 0.172 mmol, 1 eq), phosphorus tribromide (233 mg, 0.861 mmol, 5 eq) in anhydrous dichloromethane (5 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 95/05 to 60/40) gave compound **10c** as a white solid (90%, 65 mg), R_f = 0.80 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.00 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H (H_3)); 6.88 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 6.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H (H_6)); 4.48 (s, 4H (H_1)); 3.85 (s, 6H (H_8)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 150.4 (2C, C_4); 145.7 (2C, C_5); 133.5 (2C, C_2); 121.4 (2C, C_7); 118.6 (2C, C_6); 113.2 (2C, C_3); 55.9 (2C, C_8); 33.7 (2C, C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[[M+H]^+$ -HBr]) calculated for $C_{16}H_{16}BrO_3$ 335.0283, found 335.0290.

4-(Bromomethyl)-1-(4-(bromomethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (11c):



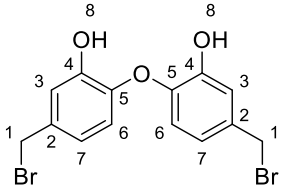
$C_{15}H_{14}Br_2O_2$
383,94

Procedure involving **11b** (0.500 g, 1.92 mmol, 1 eq), phosphorus tribromide (3.12 g, 11.5 mmol, 6 eq) in anhydrous dichloromethane (55 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 60/40) gave compound **11c** as a clear oil (98%, 0.721 g), R_f = 0.79 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.29 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.94-6.92 (m, 2H ($H_{6,7}$)); 6.89 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 4.48 (s, 1H ($H_{1/14}$)); 4.45 (s, 2H ($H_{1/14}$)); 3.75 (s, 3H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.3 (C_8); 151.0 (C_4); 144.0 (C_5); 134.5 (C_{11}); 131.5 (C_2); 130.1 (2C, $C_{9,13}$); 121.4 (C_7); 120.9 (C_6); 116.7 (2C, $C_{10,12}$); 113.2 (C_3); 55.6 (C_{15}); 33.3 (2C, $C_{1,14}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{15}H_{14}Br_2O_2$ 383.9361, found 383.9360.

General procedure for deprotection (10d, 11d):

To a solution of the reagent in anhydrous dichloromethane at -78 °C was added boron tribromide. The solution was left for 1 h at -78 °C and then at room temperature for 4 h. The reaction was quenched with cold methanol and concentrated under vacuum. Ethyl acetate was added and this organic layer was washed twice with water and then with brine. After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

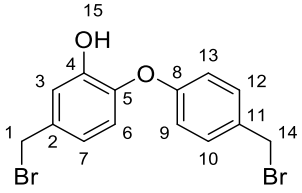
4,4'-Oxybis(1-(bromomethyl)-3-methoxybenzene) (10d):



$C_{14}H_{12}Br_2O_3$
385,92

Procedure involving **10c** (300 mg, 0.721 mmol, 1 eq), boron tribromide (1M solution in dichloromethane) (14.4 mL, 14.4 mmol, 20 eq) in anhydrous dichloromethane (20 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/1 to 75/25) gave compound **10d** which was directly engaged in the next step due to instability.

5-(Bromomethyl)-2-(4-(bromomethyl)phenoxy)phenol (11d):



$C_{14}H_{12}Br_2O_2$
369,92

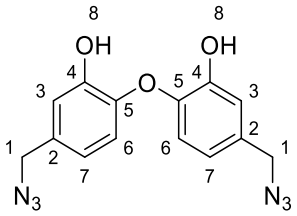
Procedure involving **11c** (93 mg, 0.241 mmol, 1 eq), boron tribromide (1M solution in dichloromethane) (1.9 mL, 1.93 mmol, 8 eq) in anhydrous dichloromethane (8 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 75/25) gave compound **11d** as a yellow oil (89%, 80 mg), R_f = 0.85 (petroleum ether/ethyl

acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.37 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.98 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H (H_{ar})); 6.88 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 5.37 (bs, 1H (H_{15})); 4.50 (s, 2H ($H_{1/14}$)); 4.45 (s, 2H ($H_{1/14}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.3 (C_8); 147.2 (C_4); 143.2 (C_5); 134.5 (C_{11}); 133.2 (C_2); 130.7 (2C, $C_{9,13}$); 121.4 (C_7); 118.8 (C_6); 118.2 (2C, $C_{10,12}$); 117.0 (C_3); 33.1 ($C_{1/14}$); 32.9 ($C_{1/14}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{12}Br_2O_2$ 369.9204, found 369.9214.

General procedure for azidation (10e, 11e, 11'e):

To a solution of the reagent in anhydrous *N,N*-dimethylformamide was added sodium azide under argon. The reaction was left at room temperature overnight. Ethyl acetate was added and this organic layer was washed twice with water and then with brine. After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

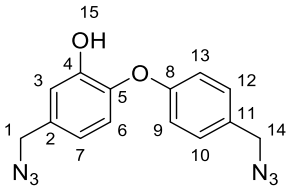
6,6'-Oxybis(3-(azidomethyl)phenol) (10e):



$C_{14}H_{12}N_6O_3$
312,10

Procedure involving **10d** (280 mg, 0.721 mmol, 1 eq), sodium azide (469 mg, 7.21 mmol, 10 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (12 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 70/30) gave compound **10e** as a brown oil (78% over two steps, 176 mg), R_f = 0.55 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H (H_3)); 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H (H_6)); 6.80 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H (H_7)); 4.28 (s, 4H (H_1)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 147.2 (2C, C_4); 143.2 (2C, C_5); 132.6 (2C, C_2); 120.7 (2C, C_7); 118.3 (2C, C_6); 116.5 (2C, C_4); 54.2 (2C, C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{12}N_6O_3$ 312.0971, found 312.0964.

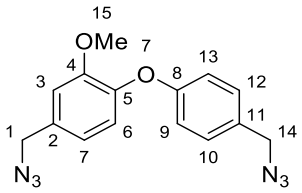
5-(Azidomethyl)-2-(4-(azidomethyl)phenoxy)phenol (11e):



$C_{14}H_{12}N_6O_2$
296,10

Procedure involving **11d** (329 mg, 0.884 mmol, 1 eq), sodium azide (460 mg, 7.08 mmol, 8 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (14 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 60/40) gave compound **11e** as a brown oil (67%, 175 mg), R_f = 0.79 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.28 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.04-6.99 (m, 3H ($H_{3,9,13}$)); 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.80 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 6.17 (bs, 1H (H_{15})); 4.30 (s, 2H ($C_{1/14}$)); 4.26 (s, 2H ($C_{1/14}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.5 (C_8); 147.4 (C_4); 143.1 (C_5); 132.1 (C_{11}); 130.5 (C_2); 129.7 (2C, $C_{9,13}$); 120.3 (C_7); 119.0 (C_6); 118.0 (2C, $C_{10,12}$); 116.2 (C_3); 54.0 ($C_{1/14}$); 53.9 ($C_{1/14}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{12}N_6O_2$ 296.1022, found 296.1017.

4-(Azidomethyl)-1-(4-(azidomethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (11'e):



$C_{15}H_{14}N_6O_2$
310,12

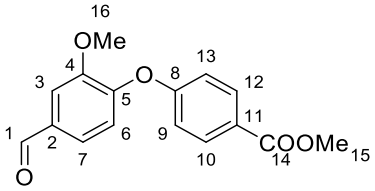
Procedure involving **11c** (100 mg, 0.260 mmol, 1 eq), sodium azide (50.8 mg, 0.781 mmol, 3 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (20 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). No purification was necessary to give compound **11'e** as a green oil (96%, 78.4 mg), R_f = 0.61 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.00-6.92 (m, 4H ($H_{3,6,9,13}$)); 6.88 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 4.34 (s, 2H ($H_{1/14}$)); 4.29 (s, 2H ($H_{1/14}$)); 3.85 (s, 3H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.8 (C_8); 151.6 (C_5); 144.6 (C_4); 132.3 (C_{11}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 129.5 (C_2); 121.2 (C_6); 120.8 (C_7); 117.3 (2C, $C_{9,13}$); 112.6 (C_3); 56.0 (C_{15}); 54.6 ($C_{1/14}$); 54.2 ($C_{1/14}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{15}H_{14}N_6O_2$ 310.1178, found 310.1172.

I.D.2 Mono-azide precursors

General procedure for aromatic nucleophilic substitution (12a, 13a):

To a solution of phenol (1 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide was added potassium carbonate (2 eq). The mixture was warmed at 120 °C and stirred for 2 h and the fluorinated derivative (1.5 eq) was added. Stirring was continued overnight. Ethyl acetate was added and this organic layer was washed twice with water and then with brine. After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

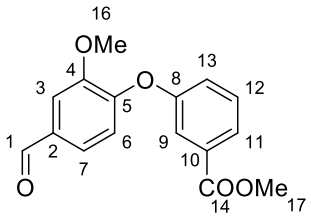
Methyl 4-(4-formyl-2-methoxyphenoxy)benzoate (12a):



$C_{16}H_{14}O_5$
286,08

Procedure involving **methyl-4-hydroxybenzoate** (1.0 g, 6.57 mmol, 1 eq), potassium carbonate (1.82 g, 13.1 mmol, 2 eq), **4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde** (1.52 g, 9.86 mmol, 1.5 eq) in *N,N*-dimethylformamide (20 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 to 85/15) gave compound **12a** as a white solid (95%, 1.79 g), R_f = 0.70 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz) δ 9.91 (s, 2H (H_1)); 7.99 (d*, *J* = 9.5 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.52 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 7.44 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H_7)); 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H (H_6)); 6.97 (d*, *J* = 9.5 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 3.87 (s, 3H $H_{15/16}$)); 3.87 (s, 3H ($H_{15/16}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 190.7 (C_1); 166.3 (C_{14}); 160.5 (C_8) ; 151.7 (C_4); 149.6 (C_5); 133.6 (C_2); 131.6 (2C, $C_{10,12}$); 125.3 (C_6); 125.2 (C_{11}); 120.5 (C_7); 117.2 (2C, $C_{9,13}$); 111.0 (C_3); 56.0 (C_{16}); 52.0 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{15}O_5$ 287.0841, found 287.0927.

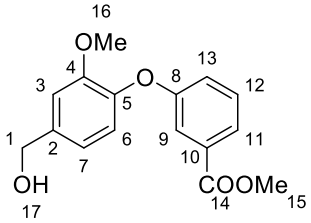
Methyl 3-(4-formyl-2-methoxyphenoxy)-4-methoxybenzoate (13a):



$C_{16}H_{14}O_5$
286,08

Procedure involving **methyl-3-hydroxybenzoate** (100 mg, 0.657 mmol, 1 eq), potassium carbonate (182 mg, 1.31 mmol, 2 eq), **4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde** (162 mg, 1.05 mmol, 1.6 eq) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 90/10 to 70/30) gave compound **13a** as a clear oil (96%, 180 mg), R_f = 0.57 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.87 (s, 1H (H_1)); 7.78 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H (H_{11})); 7.61 (dd, *J* = 2.4, 1.6 Hz, 1H (H_9)); 7.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H (H_3)); 7.38 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H ($H_{7,12}$)); 7.19 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 1.0 Hz, 1H (H_{13})); 6.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 3.87 (s, 3H (H_{17})); 3.84 (s, 3H (H_{16}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 190.7 (C_1); 166.1 (C_{14}); 156.2 (C_8); 151.2 (C_4); 150.8 (C_5); 132.8 (C_2); 131.9 (C_{10}); 129.8 (C_{12}); 125.4 (C_{11}); 125.0 (C_6); 123.2 (C_{13}); 119.4 (C_7); 118.8 (C_9); 110.8 (C_3); 56.0 (C_{16}); 52.1 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4) $[M+H]^+$ calculated for $C_{16}H_{15}O_5$ 287.0841, found 287.0911.

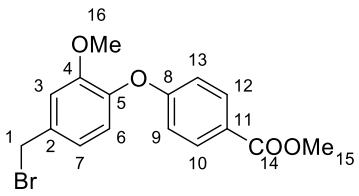
Methyl 3-(4-(hydroxymethyl)-2-methoxyphenoxy)benzoate (13b):



$C_{16}H_{16}O_5$
288,10

Same procedure as for compound **11b** involving **13a** (1.55 g, 5.43 mmol, 1 eq), sodium borohydride (1.03 g, 27.1 mmol, 5 eq) in methanol (41 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 50/50 to 20/80) gave compound **13b** as a clear yellow oil (98%, 1.53 g), R_f = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.68 (ddd, *J* = 7.7, 1.5, 0.4 Hz, 1H (H_{11})); 7.52 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_9)); 7.32 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_{12})); 7.11 (ddd, *J* = 8.3, 2.7, 1.1 Hz, 1H (H_{13})) ; 7.03 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.87 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H_7)); 4.64 (s, 2H (H_1); 3.85 (s, 3H (H_{15})); 3.77 (s, 3H (H_{16})); 2.59 (bs, 1H (H_{17}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.6 (C_{14}); 158.0 (C_8); 151.4 (C_4); 143.3 (C_5); 138.4 (C_2); 131.4 (C_{10}); 129.4 (C_{12}); 123.4 (C_{11}); 121.4 ($C_{13/6}$); 121.3 ($C_{13/6}$); 119.4 (C9); 117.3 (C_7); 111.5 (C_3); 64.7 (C_1); 55.8 (C_{16}); 52.1 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{16}H_{16}O_5$ 288.0998, found 288.0992.

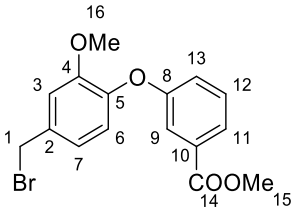
Methyl 4-(4-(bromomethyl)-2-methoxyphenoxy)benzoate (12c):



$C_{16}H_{15}BrO_4$
350,02

Same procedure as for compound **10c**, involving **12b**[272] (0.800 g, 2.78 mmol, 1 eq), phosphorus tribromide (1.13 g, 4.16 mmol, 1.5 eq) in anhydrous dichloromethane (20 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 60/40) gave compound **12c** as a clear oil (98%, 0.958 g), R_f = 0.83 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.95 (d*, *J* = 9.6 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.03 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H (H_3)); 7.00-6.96 (m, 2H ($H_{6,7}$)); 6.89 (d*, *J* = 9.6 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 4.48 (s, 2H (H_1)); 3.85 (s, 3H (H_{15})); 3.76 (s, 3H (H_{16})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.5 (C_{14}); 161.7 (C_8); 151.5 (C_4); 143.5 (C_5); 135.5 (C_2); 131.4 (2C, $C_{10,12}$); 124.1 (C_{11}); 122.0 ($C_{6/7}$); 121.7 ($C_{6/7}$); 115.9 (2C, $C_{9,13}$); 113.5 (C_3); 55.8 (C_{16}); 51.9 (C_{15}); 33.2 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{16}O_4Br$ 351.0154, found 351.0238.

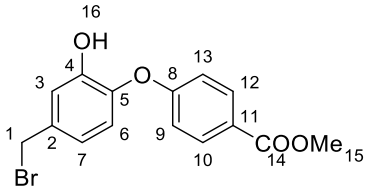
Methyl 3-(4-(bromomethyl)-2-methoxyphenoxy)benzoate (13c):



$C_{16}H_{15}BrO_4$
350,02

Same procedure as for compound **10c**, involving **13b** (145 mg, 0.504 mmol, 1 eq), phosphorus tribromide (272 mg, 1.01 mmol, 2 eq) in anhydrous dichloromethane (3.1 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 70/30) gave compound **13c** as a clear oil (85%, 151 mg), R_f = 0.73 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.71 (ddd, *J* = 7.7, 1.5, 0.4 Hz, 1H (H_{11})); 7.57 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_9)); 7.33 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_{12})); 7.12 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 1.0 Hz, 1H (H_{13})); 7.032(d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.94 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H_7)); 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 4.48 (s, 2H (H_1); 3.85 (s, 3H (H_{15})); 3.79 (s, 3H (H_{16})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.3 (C_{14}); 157.5 (C_8); 151.2 (C_4); 144.4 (C_5); 134.7 (C_2); 131.5 (C_{10}); 129.4 (C_{12}); 123.7 (C_{11}); 121.7 ($C_{13/6}$); 121.6 ($C_{13/6}$); 120.9 (C_9); 117.8 (C_7); 113.5 (C_3); 55.8 (C_{16}); 52.0 (C_{15}); 33.3 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{16}H_{16}BrO_4$ 351.0232, found 351.0230.

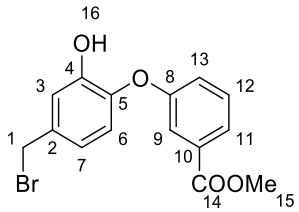
Methyl 4-(4-(bromomethyl)-2-hydroxyphenoxy)benzoate (12d):



$C_{15}H_{13}BrO_4$
336,00

Same procedure as for compound **10d,** involving **12c** (279 mg, 0.7934 mmol, 1 eq), boron tribromide (1M solution in dichloromethane) (7.9 mL, 7.93 mmol, 10 eq) in anhydrous dichloromethane (25 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 95/05 to 70/30) gave compound **12d** as a brown solid (100%, 268 mg), R_f = 0.69 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (d*, *J* = 9.6 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.12 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H (H_3)); 6.99 (d*, *J* = 9.6 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.94-6.87 (m, 2H ($H_{6,7}$)); 4.45 (s, 2H (H_1)); 3.89 (s, 3H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.5 (C_{14}); 160.6 (C_8); 147.7 (C_4); 142.2 (C_5); 135.5 (C_2); 131.8 (2C, $C_{10,12}$); 125.1 (C_{11}); 121.5 ($C_{6/7}$); 120.1 ($C_{6/7}$); 117.5 (C_3); 116.9 (2C, $C_{9,13}$); 52.2 (C_{15}); 32.9 (C_1). HRMS (DCI-CH_4) $[M+H]^+$ calculated for $C_{15}H_{14}O_4Br$ 336.9997, found 337.0083.

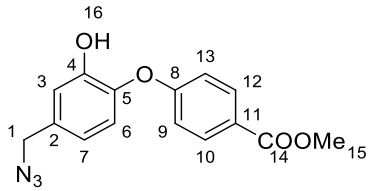
Methyl 3-(4-(bromomethyl)-2-hydroxyphenoxy)benzoate (13d):



$C_{15}H_{13}BrO_4$
336,00

Same procedure as for compound **10d,** involving **13c** (147 mg, 0.418mmol, 1 eq), boron tribromide (1M solution in dichloromethane) (4.2 mL, 4.18 mmol, 10 eq) in anhydrous dichloromethane (12 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 70/30) gave compound **13d** as a white solid (85%, 120 mg), R_f = 0.67 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.80 (ddd, *J* = 7.7, 1.5, 0.4 Hz, 1H (H_{11})); 7.67 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_9)); 7.41 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_{12})); 7.21 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 1.1 Hz, 1H (H_{13})); 7.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.88 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 5.79 (bs, 1H (H_{16}); 4.45 (s, 2H (H_1); 3.90 (s, 3H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.3 (C_{14}); 156.4 (C_8); 147.3 (C_4); 143.4 (C_5); 134.6 (C_2); 132.0 (C_{10}); 130.0 (C_{12}); 125.1 (C_{11}); 122.8 (C_{13}); 121.4 (C_6); 119.2 (C_9); 118.6 (C_7); 117.2 (C_3); 52.4 (C_{15}); 33.1 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{15}H_{14}BrO_4$ 336.9997, found 337.0072.

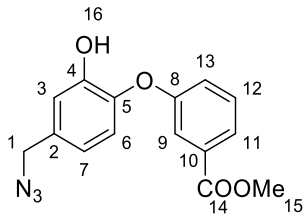
Methyl 4-(4-(azidomethyl)-2-hydroxyphenoxy)benzoate (12e):



$C_{15}H_{13}N_3O_4$
299,09

Same procedure as for compound **10e,** involving **12d** (200 mg, 0.593mmol, 1 eq), sodium azide (154 mg, 4.18 mmol, 4 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (10 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). No purification was necessary to give compound **12e** as a brown oil (100%, 178 mg), R_f = 0.66 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.95 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.97 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.83 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 2H (H_7)); 6.16 (bs, 1H (H_{16})); 4.29 (s, 2H (H_1)); 3.88 (s, 3H (C_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.6 (C_{14}); 160.9 (C_{10}); 148.0 (C_4); 142.0 (C_5); 133.3 (C_2); 131.7 (2C, $C_{10,12}$); 124.9 (C_{11}); 120.5 ($C_{6/7}$); 120.5 ($C_{6/7}$); 116.7 (C_3); 116.5 (2C, $C_{9,13}$); 54.1 (C_1); 52.1 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{15}H_{14}O_4N_3$ 300.0906, found 300.0998.

Methyl 3-(4-(azidomethyl)-2-hydroxyphenoxy)benzoate (13e):



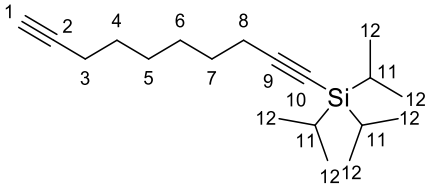
$C_{15}H_{13}N_3O_4$
299,09

Same procedure as for compound **10e,** involving **13d** (104 mg, 0.307 mmol, 1 eq), sodium azide (160 mg, 2.46 mmol, 8 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (5 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL x2) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 70/30) gave compound **13e** as a brown solid (100%, 92 mg), R_f = 0.33 (petroleum

ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.77 (ddd, *J* = 7.7, 1.2, 0.3 Hz, 1H (H_{11})); 7.63 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_9)); 7.38 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_{12})); 7.18 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 1.0 Hz, 1H (H_{13})); 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.79 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 6.13 (bs, 1H (H_{16})); 4.27 (s, 2H (H_1)); 3.87 (s, 3H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.4 (C_{14}); 156.7 (C_8); 147.7 (C_4); 143.1 (C_5); 132.4 (C_2); 131.9 (C_{10}); 129.8 (C_{12}); 124.7 (C_{11}); 122.4 (C_{13}); 120.4 (C_6); 119.1 (C_7); 118.8 (C_9); 116.4 (C_3); 54.2 (C_1); 52.3 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{15}H_{13}O_4N_3$ 299.0906, found 299.0893.

I.D.3 Alkyne precursors

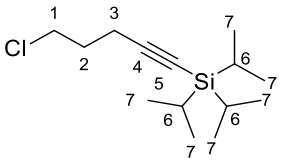
Deca-1,9-diyn-1-yltriisopropylsilane (14a):



$C_{19}H_{34}Si$
290,24

To a solution of **1,9-decadiyne** (300 mg, 2.235 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran at -78°C was added lithium bis(trimethylsilyl) (1M solution in tetrahydrofuran) (2.9 mL, 2.906 mmol, 1.3 eq) under argon. The mixture was stirred at -78 °C during 3h and **triisopropylsilyl chloride** was added (560 mg, 2.906 mmol, 1.3 eq). The reaction was left at room temperature overnight. Saturated ammonium chloride solution (8 mL) was added to quench the reaction. Dichloromethane (40 mL) was added, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 95/05 to 85/15) to give compound **14a** as a colorless liquid (59%, 383 mg), R_f = 0.77 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 2.28 (t, *J* = 6.8Hz, 2H (H_8)); 2.17 (td, *J* = 6.93, 2.6 Hz, 2H (H_3)); 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H (H_1)); 1.57-1.40 (m, 8H ($H_{4,5,6,7}$)); 1.06-1.05 (m, $H_{11,12}$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 109.0 (C_9); 84.6 (C_2); 80.1 (C_{10}); 68.1 (C_1); 28.7 ($C_{4/5/6/7}$); 28.4 ($C_{4/5/6/7}$); 28.2 ($C_{4/5/6/7}$); 28.1 ($C_{4/5/6/7}$); 19.8 ($C_{3/8}$); 18.6 (C_{12}) ; 18.3 ($C_{3/8}$); 11.3 (C_{11}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{19}H_{35}Si$ 291.2515, found 291.2508.

(5-Chloropent-1-yn-1-yl)triisopropylsilane (15):

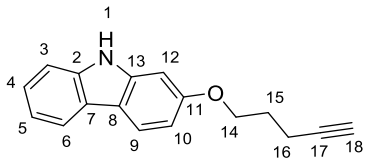


$C_{14}H_{27}ClSi$
258,16

To a solution of **5-chloro-1-pentyne** (50 mg, 4.90 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (1.8 mL) at -78 °C was added n-butyllithium (1.6M solution in hexane) (6.1 mL, 9.8 mmol, 2 eq) under argon. The mixture was stirred at -78 °C during 1h and **triisopropylsilyl chloride** (189 mg, 9.8 mmol, 1.3 eq) was added. The reaction was left at room temperature overnight. saturated ammonium chloride solution (4 mL) was added to quench the reaction. Dichloromethane (20 mL) was added and this organic layer was washed twice with water (2 x 30 mL) and then with brine (30 mL). After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/00 to 80/20) to give compound **15** as a colorless liquid (100%, 129 mg), R_f = 0.91 (petroleum ether/ethyl acetate = 95/05). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 3.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H (H_1)); 2.45 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_3)); 2.02-1.95 (m, 2H (H_2)); 1.07-1.04 (m, 21H ($H_{6,7}$)); ^{13}C

NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 106.7 (C_4); 81.5 (C_5); 43.6 (C_1); 31.6 (C_2); 18.6 (6C, C_7); 17.3 (C_3); 11.2 (3C, C_6). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{27}ClSi$ 258.1571, found 258.1578.

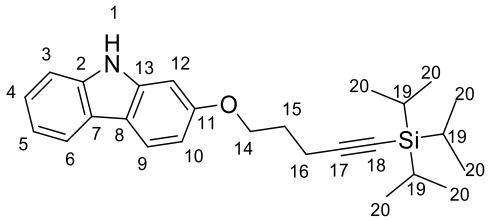
2-(Pent-4-yn-1-yloxy)-9H-carbazole (16a):



$C_{17}H_{15}NO$
249,12

To a solution of **2-hydroxycarbazole** (500 mg, 2.73 mmol, 1 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (15 mL) was added potassium carbonate (1.13 g, 8.19 mmol, 3 eq) under argon. The mixture was warmed at 90 °C during 1h30 and **5-chloro-1-pentyne** (417 mg, 4.09 mmol, 1.5 eq) was added. The reaction was left at 90 °C overnight. Ethyl acetate (30 mL) was added and this organic layer was washed with water (2 x 30 mL) and then with brine (30 mL). After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 70/30) to give compound **15** as a as a beige solid (70%, 476 mg), R_f = 0.65 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) δ 7.98 (m, *J* = 8.6 Hz, 2H ($H_{3,9}$)); 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 7.30 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H (H_5)); 7.14 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.1 Hz, 1H (H_4)); 7.06 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{12})); 6.83 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H (H_{10})); 4.17 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H (H_{14})); 2.47-2.38 (3H ($H_{16,18}$)); 2.09-1.98 (m, 2H (H_{15})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.2 (C_{11}); 140.7 (C_2); 139.4 (C_{13}); 124.5 (C_6); 123.4 (C_7); 120.9 (C_9); 119.4 (C_4); 119.4 (C_3); 117.2 (C_8); 110.2 (C_{10}); 108.5 (C_5); 95.4 (C_{12}); 83.6 (C_{17}); 68.8 (C_{18}); 66.6 (C_{14}); 28.2 (C_{16}); 15.2 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{17}H_{16}NO$ 250.1232, found 250.1227.

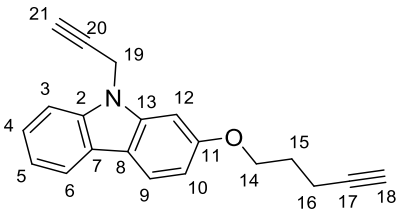
2-((5-(Triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazole (16b):



$C_{26}H_{35}NOSi$
405,25

Same procedure as for compound **16a**, involving **2-hydroxycarbazole** (200 mg, 1.09 mmol, 1 eq), anhydrous *N,N*-dimethylformamide (8.7 mL) and potassium carbonate (453 mg, 3.27 mmol, 3 eq), **15** (424 mg, 1.64 mmol, 1.5 eq), water (2 x 30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 95/05 to 85/15) gave compound **16b** as a brown powder (89%, 393 mg), R_f = 0.79 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.99 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H (H_3)); 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H (H_9)); 7.72 (bs, 1H (H_1)); 7.39-7.21 (m, 3H ($H_{4,5,6}$)); 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{10})); 6.73 (s, 1H (H_{12})); 4.10 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H (H_{14})); 2.53 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{16})); 2.08-2.02 (m, 2H (H_{15})); 1.10 (s, 21H ($H_{19,20}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.3 (C_{11}); 140.7 (C_{13}); 139.4 (C_2); 124.5 (C_6); 123.4 (C_7); 120.9 (C_9); 119.5 (C_4); 119.4 (C_3); 117.1 (C_8); 110.3 (C_{10}); 108.7 (C_5); 107.9 (C_{17}); 95.4 (C_{12}); 81.0 (C_{18}); 66.8 (C_{14}); 28.7 (C_{15}); 18.6 (C_{20}); 16.7 (C_{16}); 11.2 (C_{19}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{26}H_{35}NOSi$ 405.2488, found 405.2491.

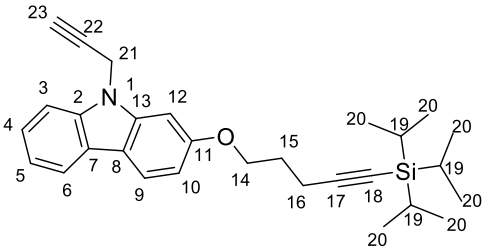
2-(Pent-4-yn-1-yloxy)-9-(prop-2-yn-1-yl)-9H-carbazole (17a):



$C_{20}H_{17}NO$
287,13

To a solution of compound **16a** (451 mg, 1.81 mmol, 1 eq) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (17 mL) was added potassium hydroxyde (508 mg, 9.04 mmol, 5 eq,) at 4 °C under argon. The mixture was left at 4 °C during 45 min. Then was added **propargyl bromide** (9.2 M solution) (5.43 mmol, 3 eq). The mixture was left at 4 °C during 5 h. Ethyl acetate was added and the organic layer was washed twice with water (2 x 30 mL) and then with brine (30 mL). After drying over magnesium sulphate and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/00 to 80/20) to give compound **17a** as an orange solid (77%, 402 mg), R_f = 0.61 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (dt, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 1H (H_3)); (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_9)); (m, 2H ($H_{5,6}$)); 7.31-7.24 (m, 1H (H_4)); 6.97 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{12})); 6.90 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H (H_{10})); 4.95 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H (H_{19})); 4.22 (t, J = 6.1 Hz, 2H (H_{14})); 2.50 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H (H_{16})); 2.28 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{18})); 2.13-2.10 (m, 2H (H_{15})); 2.05 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H (H_{21})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.4 (C_{11}); 141.1 (C_2); 139.9 (C_{13}); 124.5 (C_6); 123.4 (C_7); 121.1 (C_9); 119.6 (C_4); 119.5 (C_3); 117.1 (C_8); 108.4 (C_{10}); 108.3 (C_5); 94.0 (C_{12}); 83.6 (C_{17}); 77.8 (C_{20}); 72.2 (C_{21}); 68.9 (C_{18}); 66.6 (C_{14}); 32.2 (C_{19}); 28.3 (C_{16}); 15.2 (C_{15}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{20}H_{17}NO$ 287.1310, found 287.1302.

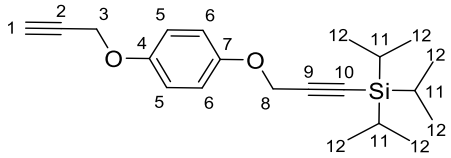
9-(Prop-2-yn-1-yl)-2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazole (17b):



$C_{29}H_{37}NOSi$
443,26

Same procedure as for compound **17a** involving **16b** (393 mg, 0.969 mmol, 1 eq), **propargyl bromide** (9.2 M solution) (2.91 mmol, 3 eq), anhydrous *N,N*-dimethylformamide (8.7 mL), potassium hydroxide (163 mg, 2.91 mmol, 3 eq), ethyl acetate (30 mL), water (2 x 30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/00 to 90/10) gave compound **17b** as a yellow solid (82%, 353 mg), R_f = 0.88 (petroleum ether/ethyl acetate = 80/20). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H (H_3)); 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_9)); 7.45 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H ($H_{5,6}$)); 7.31-7.25 (m, 1H (H_4)); 6.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_{12})); 6.91 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H (H_{10})); 4.96 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H (H_{21})); 4.26 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H (H_{14})); 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H (H_{16})); 2.28 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H (H_{23})); 2.16-2.08 (m, 2H (H_{15})); 1.12 (s, 21H ($H_{19,20}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.5 (C_{11}); 141.1 (C_2); 139.9 (C_{13}); 124.5 (C_6); 123.4 (C_7); 121.1 (C_9); 119.6 (C_4); 119.5 (C_3); 117.1 (C_8); 108.4 (C_{10}) ; 108.3 (C_5); 107.9 (C_{17}); 94.0 (C_{12}); 81.0 (C_{18}); 77.7 (C_{22}); 72.2 (C_{23}); 66.8 (C_{14}); 32.2 (C_{21}); 28.7 (C_{15}); 18.6 (C_{20}); 16.7 (C_{16}); 11.3 (C_{19}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{29}H_{38}NOSi$ 444.2644, found 444.2662.

Triisopropyl(3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)prop-1-yn-1-yl)silane (18b):



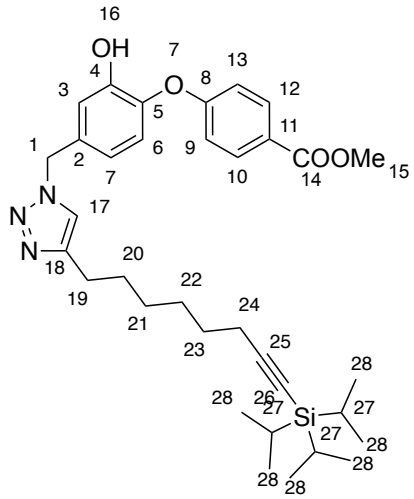
$C_{21}H_{30}O_2Si$
342,20

Same procedure as for compound **14a**, involving **1,4-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzene**[298] (2.2949 g, 12.3 mmol, 1 eq), anhydrous tetrahydrofuran (40 mL), lithium bis(trimethylsilyl)amide (1M solution in tetrahydrofuran) (12.3 mL, 12.3 mmol, 1 eq), **triisopropylsilyl chloride** (2.64 mL, 12.3 mmol, 1 eq), dichloromethane (40 mL), water (2 x 30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/00 to 80/20) gave compound **18b** as a colorless liquid (47%, 5.8 mmol, 1.986 g), R_f = 0.88 (petroleum ether/ethyl acetate = 90/10). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6.93 (m, 4H ($H_{5,6}$)); 4.68 (s, 2H (H_8)); 4.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_3)); 2.50 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_1)); 1.03 (s, 21H ($H_{10,11}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 152.5 ($C_{4/7}$); 152.2 ($C_{4/7}$); 116.4 ($C_{5/6}$); 115.9 ($C_{5/6}$); 102.2 (C_9); 89.0 (C_{10}); 78.8 (C_2); 75.3 (C_1); 57.4 (C_8); 56.5 (C_3); 18.5 (C_{12}); 11.1 (C_{11}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{21}H_{30}O_2Si$ 342.2015, found 342.2004.

I.D.4 Copper-catalyzed alkyne azide cycloaddition

General procedure A for copper-catalyzed alkyne azide cycloaddition (CuAAC):
A solution of azide (1 eq), alkyne (1 eq), cupric sulfate pentahydrate (0.2 eq) and sodium ascorbate (0.4 eq) in a mixture of methanol/water was stirred at room temperature overnight. Water and ethyl acetate were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with EDTA and brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

Methyl 4-(2-hydroxy-4-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19a):

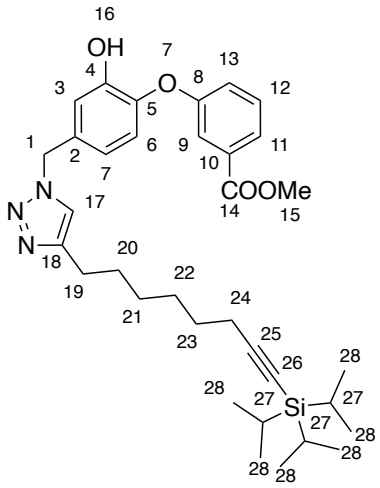


$C_{34}H_{47}N_3O_4Si$
589,33

General procedure A for CuAAC involving **12e** (0.2381 g, 0.796 mmol, 1eq), **14a** (0.2312g, 0.796 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (39.7 mg, 0.159 mmol, 0.2 eq), sodium ascorbate (63.1 mg, 0.318 mmol, 0.4 eq) in methanol (10 mL), water (15 mL) and ethyl acetate (80 mL), water (50 mL x3), EDTA (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 75/25 to 50/50) gave compound **19a** as a yellow oil (82%, 0.3850 g), R_f = 0.14 (petroleum

ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.92 (d*, *J* = 8.8 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.27 (s, 1H (H_{17})); 7.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.96-6.85 (m, 3H ($H_{6,9,13}$)); 6.76 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.39 (s, 2H (H_1)); 2.59 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_{19})); 2.17 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.60-1.23 (m, 8H ($H_{20,21,22,23}$)); 1.04-0.98 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.5 (C_{14}); 161.5 (C_8); 149.9 (C_4); 148.5 (C_5); 142.7 (C_{18}); 132.3 (C_2); 131.4 (2C, $C_{10,12}$); 124.1 (C_{11}); 121.6 (C_6); 120.8 (C_{17}); 119.4 (C_7); 116.8 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 109.0 (C_{26}); 79.9 (C_{25}); 53.8 (C_1); 51.9 (C_{15}); 28.9 (C_{19}); 28.5 (C_{23}); 28.5 (C_{22}); 28.2 (C_{20}); 25.2 (C_{21}); 19.6 (C_{24}); 18.5 (6C, C_{28}); 11.2 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{34}H_{47}N_3O_4Si$ 589.3336, found 589.3414.

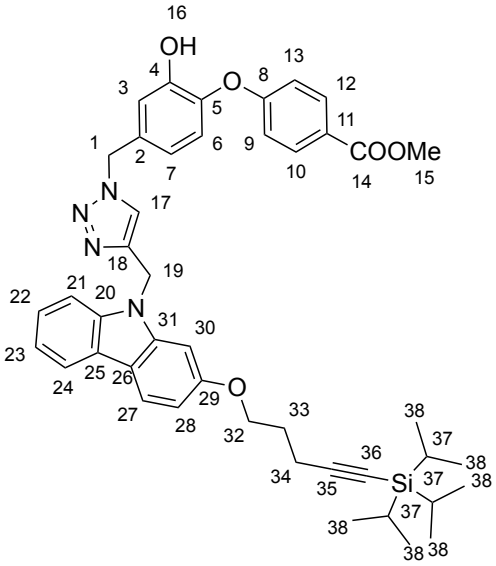
Methyl 3-(2-hydroxy-4-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19b):



$C_{34}H_{47}N_3O_4Si$
589,33

General procedure A for CuAAC involving azide **13e** (0,3344 g, 1.12 mmol, 1 eq), alkyne **14a** (0.3247 g, 1.12 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (55.8 mg, 0.224 mmol, 0.2 eq) and sodium ascorbate (88.5 mg, 0.447 mmol, 0.4 eq) in a mixture methanol/water (10 mL/10 mL). Water (20 mL), ethyl acetate (20 mL), EDTA (20 mL) and brine (15 mL). Purification by flash-chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 to 50/50) gave compound **19b** as a yellow oil (80%, 0.528 g), R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.73 (ddd, *J* = 7.8, 1.6, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 7.62 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H (H_9)); 7.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_{12})); 7.25 (s, 1H (H_{17})); 7.16 (ddd, *J* = 8.2, 2.7, 1.1 Hz, 1H (H_{13})); 7.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.74 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.40 (s, 2H (H_1)); 3.86 (s, 3H (H_{15})); 2.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_{19})); 2.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.61-1.23 (m, 8H ($H_{20,21,22,23}$)); 1.05-1.01 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.4 (C_{14}); 157.2 (C_8); 149.2 (C_{18}); 148.6 (C_4); 143.7 (C_5); 131.7 (C_2); 131.7 (C_{10}); 129.6 (C_{12}); 124.2 (C_{11}); 122.2 (C_{13}); 120.7 (C_{17}); 120.2 (C_6); 119.6 (C_7); 118.5 (C_9); 116.5 (C_3); 109.1 (C_{25}); 80.0 (C_{26}); 53.8 (C_1); 52.2 (C_{15}); 29.1 (C_{19}); 28.6 (C_{20}); 28.6 (C_{21}); 28.3(C_{22}); 25.3 (C_{23}); 19.7 (C_{24}); 18.6 (6C, C_{28}); 11.2 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{34}H_{48}N_3O_4Si$ 590.3415, found 590.3421.

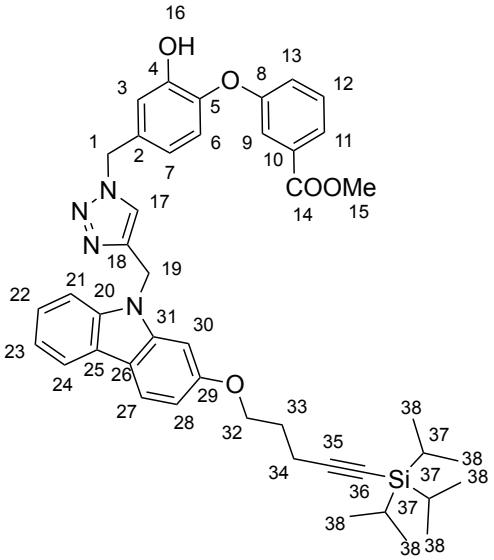
Methyl 4-(2-hydroxy-4-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19c):



$C_{44}H_{50}N_4O_5Si$
742,36

General procedure A for CuAAC involving azide **12e** (0.160 g, 0.535 mmol, 1eq), alkyne **17b** (0.237 g, 0.535 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (26.7 mg, 0.107 mmol, 0.2 eq), sodium ascorbate (42.4 mg, 0.214 mmol, 0.4 eq) in methanol (5 mL), water (5 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (30 mL x3), EDTA (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 20/80) gave compound **19c** as a white foam (76%, 0.3021 g), R_f = 0.16 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.01-7.90 (m, 4H ($H_{21,27}$)); 7.33-7.17 (m, 3H ($H_{23,24,30}$); 7.11 (s, 1H (H_{17})); 7.00 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_3)); 6.95-6.84 (m, 5H ($H_{6,9,13,27,28}$); 6.64 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H_7)); 5.46 (s, 2H (H_{19})); 5.25 (s, 2H (H_1); 4.16 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H (C_{32})); 3.87 (s, 3H (C_{15})); 2.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{34})); 2.07-2.03 (m, 2H (H_{33})); 1.09-1.06 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 166.5 (C_{14}); 161.0 (C_8); 158.5 (C_{29}); 148.9 (C_4); 144.6 (C_{18}); 142.6 (C_5); 141.2 (C_{20}); 139.9 (C_{31}); 131.8 (2C, $C_{2,11}$); 131.6 (2C, $C_{10,12}$); 124.6 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 121.1 (C_{17}); 121.0 (C_7); 119.9 (C_{27}); 119.5 (2C, $C_{6,22}$); 119.4 (C_{24}); 116.8 (C_{26}); 116.6 (C_3); 116.5 (2C, $C_{9,13}$); 108.4 (C_{21}); 108.1 (C_{28}); 107.8 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.9 (C_{35}); 66.9 (C_{32}); 53.6 (C_1); 51.9 (C_{15}); 38.5 (C_{19}); 28.7 (C_{33}); 18.5 (C_{38}); 16.6 (6C, C_{34}); 11.2 (3C, C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{44}H_{50}N_4O_5Si$ 742.3557, found 742.3550.

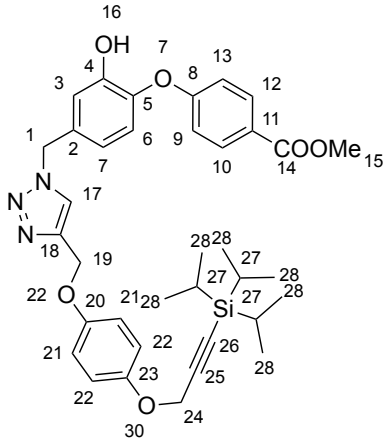
Methyl 3-(2-hydroxy-4-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19d):



$C_{44}H_{50}N_4O_5Si$
742,36

General procedure A for CuAAC involving azide **13e** (0.344 g, 1 eq), alkyne **17b** (0.5099 g, 1.15 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (57.4 mg, 0.230 mmol, 0.2 eq), sodium ascorbate (91.1 mg, 0.459 mmol, 0.4 eq) in methanol (10 mL), water (10 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL x3), EDTA (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 90/10 to 20/80) gave compound **19d** as a beige foam (86%, 0.7323 g), R_f = 0.16 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_{21})); 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.78 (td, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H (H_{11})); 7.63 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_9)); 7.41-7.31 (m, 3H ($H_{12,23,24}$)); 7.24-7.14 (m, 2H ($H_{13,22}$)); 7.10 (s, 1H (H_{17})); 6.93-6.92 (m, 2H ($H_{30,16}$)); 6.90 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.85 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H (H_{28})); 6.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.92 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.53 (s, 2H (H_{19})); 5.29 (s, 2H (H_1)); 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H (H_{32})); 3.87 (s, 3H (H_{15})); 2.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H (H_{34})); 2.06-2.02 (m, 2H (H_{33})); 1.09-0.99 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 166.2 (C_{14}); 158.6 (C_{29}); 156.5 (C_8); 148.0 (C_4); 144.8 (C_5); 143.7 (C_{18}); 141.4 (C_{20}); 140.1 (C_{31}); 132.0 (C_{10}); 131.1 (C_2); 129.9 (C_{12}); 124.9 (C_{13}); 124.6; 123.3 (C_{25}); 122.6 (C23); 121.6 (C_{17}); 121.1 (C_{27}); 120.0 (C_7); 119.5 (C_{22}); 119.5 (C_{21}); 119.2 (C_6); 119.1 (C_9); 116.9 (C_{26}); 116.1 (C_{11}); 116.0 (C_3); 108.5 (C_{24}); 108.2 (C_{28}); 107.9 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.9 (C_{35}); 67.0 (C_{32}); 53.7 (C_1); 52.3 (C_{15}); 38.8 (C_{19}); 28.7 (C_{33}); 18.6 (6C, C_{38}); 16.7 (C_{34}); 11.2 (3C, C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{44}H_{51}N_4O_5Si$ 743.3629.

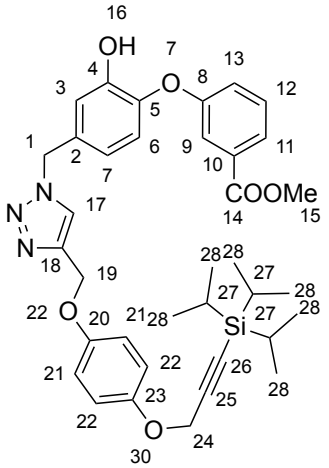
Methyl 4-(2-hydroxy-4-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19e):



$C_{36}H_{43}N_3O_6Si$
641,29

General procedure A for CuAAC involving azide **12e** (0.4429 g, 1.48 mmol, 1 eq), alkyne **18b** (0.5069 g, 1.48 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (73.9 mg, 0.296 mmol, 0.2 eq), sodium ascorbate (117.3 mg, 0.592 mmol, 0.4 eq) in methanol (7 mL), water (5 mL) and ethyl acetate (50 mL), water (50 mL x3), EDTA (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 30/70) gave compound **19e** as a green foam (90%, 0.857 g), R_f = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.64 (s, 1H (H_{17})); 7.60 (bs, 1H (H_{16})); 7.08 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.98 (d*, *J* = 8.9 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.96-6.92 (m, 2H (H_{21})); 6.89-6.82 (m, 3H ($H_{6,22}$)); 6.80 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.46 (s, 2H (H_1)); 5.08 (s, 2H (H_{19})); 4.65 (s, 2H (H_{24})); 3.87 (s, 3H (H_{15})); 1.02 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.5 (C_{14}); 160.9 (C_8); 152.7 (C_{20}); 152.3 (C_{23}); 149.0 (2C, $C_{4,18}$); 142.8 (C_5); 132.0 (C_2); 131.7 (2C, $C_{10,12}$); 124.8 (C_{11}); 121.1 (2C, $C_{6,7}$); 120.1 (C_{17}); 116.8 (C_3); 116.6 (2C, $C_{9,13}$); 116.4 (2C, C_{21}); 115.6 (2C, C_{22}); 102.1 (C_{25}); 89.0 (C_{26}); 62.6 (C_{19}); 57.4 (C_{24}); 53.9 (C_1); 52.0 (C_{15}); 18.4 (6C, C_{28}); 11.0 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{36}H_{44}N_3O_6Si$ 642.2999, found 642.2978.

Methyl 3-(2-hydroxy-4-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)benzoate (19f):



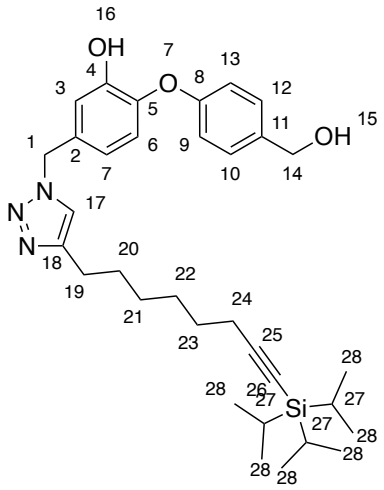
$C_{36}H_{43}N_3O_6Si$
641,29

General procedure A for CuAAC involving azide **11e** (0.3502 g, 1.17 mmol, 1 eq), alkyne **18b** (0.4008 g, 1.17 mmol, 1 eq), cupric sulfate pentahydrate (58.0 mg, 0.234 mmol, 0.2 eq), sodium ascorbate (92.7 mg, 0.468 mmol, 0.4 eq) in methanol (7 mL), water (5 mL) and ethyl acetate (50 mL), water (50 mL x3), EDTA (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash-chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 30/70) gave compound **19f** as a white foam (92%, 0.6880 g), R_f = 0.13 (petroleum

ether/ethyl acetate = 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.66 (dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H (H_{13})); 7.58 (s, 1H (H_{17})); 7.55 (dd, *J* = 2.6, 1.1 Hz, 1H (H_9)); 7.27 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H (H_{12})); 7.08 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 1.9 Hz, 1H (H_{11})); 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.87-6.77 (m, 5H ($H_{6,21,22}$)); 6.69 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.37 (s, 2H (H_1)); 4.99 (s, 2H (H_{19})); 4.61 (s, 2H (H_{24})); 3.79 (s, 3H (H_{15})); 1.00 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.2 (C_{14}); 156.9 (C_8); 152.5 (C_{20}); 152.0 (C_{23}); 148.8 (C_4); 144.3 (C_{18}); 143.5 (C_5); 131.4 (C_{10}); 131.2 (C_2); 129.5 (C_{12}); 123.9 (C_{11}); 122.7 (C_{17}); 121.9 (C_{13}); 120.2 (C_6); 119.7 (C_7); 118.2 (C_9); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, C_{21}); 115.3 (2C, C_{22}); 102.1 (C_{25}); 88.7 (C_{26}); 62.1 (C_{19}); 57.1 (C_{24}); 53.6 (C_1); 52.0 (C_{15}); 18.3 (6C, C_{28}); 10.8 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{36}H_{44}N_3O_6Si$ 642.2999, found 642.2973.

General procedure for reduction (20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f):
To a solution of the reagent in anhydrous tetrahydrofuran at -78 °C was added diisobutylaluminium hydride. The reaction mixture was stirred overnight and then quenched with 1N-HCl. Ethyl acetate and water were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

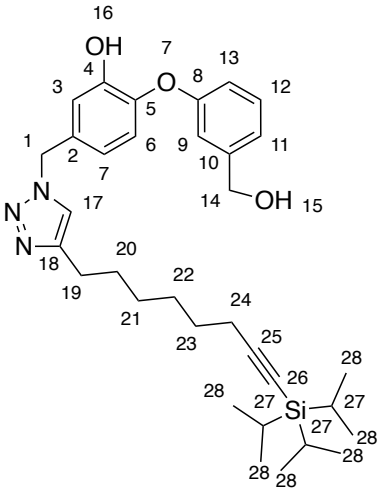
2-(4-(Hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20a):



$C_{33}H_{47}N_3O_3Si$
561,34

General procedure for reduction involving compound **19a** (0.200 g, 0.339 mmol, 1eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (0.576 mL, 0.576 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (2 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (50 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **20a** as a brown oil (82%, 0.1567 g), R_f = 0.42 (petroleum ether/ethyl acetate = 30/70). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.25-7.20 (m, 3H ($H_{10,12,17}$)); 6.95 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.89-6.85 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.65 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.33 (s, 2H (H_1)); 4.58 (s, 2H (H_{14})); 2.62 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_{19})); 2.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.62-1.23 (m, 8H ($H_{20,21,22,23}$)); 1.07-1.01 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.0 (C_8); 148.5 (C_4); 148.4 (C_5); 144.3 (C_{18}); 135.9 (C_{11}); 130.9 (C_2); 128.5 (2C, $C_{10,12}$); 120.7 (C_{17}); 119.6 (C_6); 119.5 (C_7); 117.8 (2C, $C_{9,13}$); 116.3 (C_3); 109.0 (C_{26}); 80.0 (C_{25}); 64.2 (C_{14}); 53.6 (C_1); 29.1 (C_{19}); 28.6 (C_{23}); 28.5 (C_{22}); 28.2 (C_{20}); 25.3 (C_{21}); 19.6 (C_{24}); 18.5 (6C, C_{28}); 11.2 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{33}H_{47}N_3O_3Si$ 561.3387, found 561.3478.

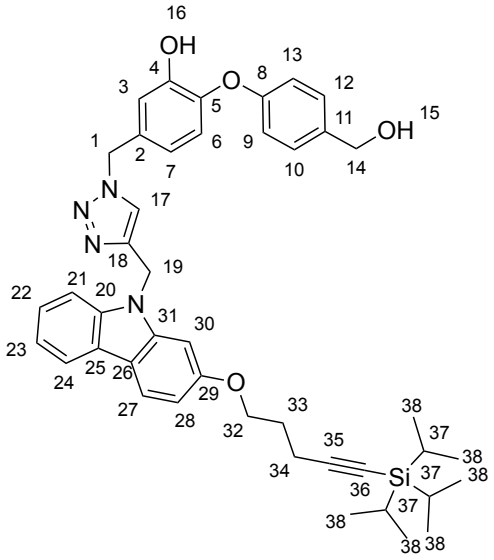
2-(3-(hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20b):



$C_{33}H_{47}N_3O_3Si$
561,34

General procedure for reduction involving compound **19b** (0.545 g, 0.923 mmol, 1 eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (7.4 mL, 7.4 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (5.9 mL) and ethyl acetate (50 mL), water (50 mL x3) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **20b** as a yellow oil (85%, 0.4395 g), R_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_{12})); 7.23 (s, 1H (H_{17})); 7.04 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H (H_{11})); 6.98 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_9)); 6.96 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.86 (ddd, *J* = 8.2, 2.5, 1.0 Hz, 1H (H_{13})); 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.68 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.36 (s, 2H (H_1)); 4.61 (2H (H_{14})); 2.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_{19})); 2.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.63-1.29 (m, 8H ($H_{20,21,22,23}$)); 1.08-0.98 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.9 (C_8); 148.6 (C_{18}); 148.5 (C_4); 144.0 (C_5); 143.2 (C_{10}); 131.2 (C_2); 129.7 (C_{12}); 121.7 (C_{13}); 120.7 (C_{17}); 119.7 (C_6); 119.6 (C_7); 116.8 (C_9); 116.3 (2C, $C_{3,11}$); 109.1 (C_{25}); 80.0 (C_{26}); 64.5 (C_{14}); 53.6 (C_1); 29.1 (C_{19}); 28.6 (C_{20}); 28.6 (C_{21}); 28.3 (C_{22}); 25.4 (C_{23}); 19.7 (C_{24}); 18.6 (6C, C_{28}); 11.2 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{33}H_{48}N_3O_3Si$ 562.3465, found 562.3477.

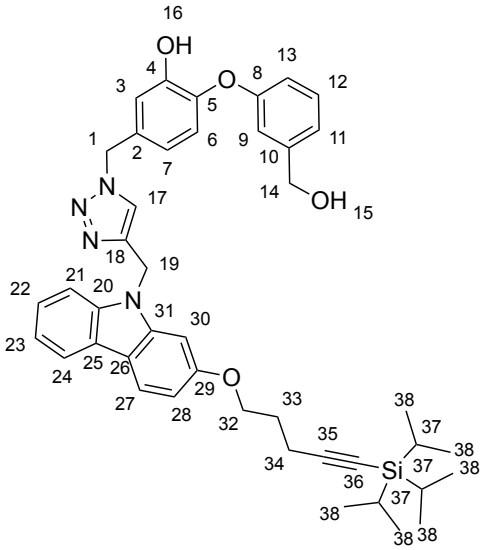
2-(4-(Hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20c):



$C_{43}H_{50}N_4O_4Si$
714,36

General procedure for reduction involving compound **19c** (0.2508 g, 0.338 mmol, 1 eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (2.70 mL, 2.7 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (2.2 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (30 mL x3) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 20/80) gave compound **20c** as a brown oil (98%, 0.2366 g), R_f = 0.49 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H (H_{21})); 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.35-7.31 (m, 2H ($H_{23,24}$)); 7.31-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.19 (ddd, *J* = 7.7, 5.2, 2.7 Hz, 1H (H_{22})); 7.06 (s, 1H (H_{17})); 6.92-6.88 (m, 3H ($H_{9,13,28}$)); 6.87-6.83 (m, 2H ($H_{3,30}$)) ; 6.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.57 (dd, 1H (H_7), *J* = 8.3, 2.1 Hz)); 5.51 (s, 2H (H_{19})); 5.25 (s, 2H (H_1)); 4.63 (s, 2H (H_{14})); 4.16 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H (H_{32})); 2.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{34})); 2.06-2.02 (m, 2H (H_{33})); 1.09-1.03 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.5 (C_{29}); 155.8 (C_8); 147.9 (C_4); 144.2 (C_5); 141.3 (C_{18}); 140.0 (C_{20}); 136.2 (C_{31}); 130.5 (2C, $C_{2,11}$); 128.6 (2C, $C_{10,12}$); 124.6 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 121.5 (C_{17}); 121.0 (C_7); 119.8 (C_{27}); 119.5 (C_6); 119.4 (C_{22}); 119.0 (C_{24}); 118.1 (2C, $C_{9,13}$); 116.9 (C_{26}); 115.9 (C_3); 108.5 (C_{21}); 108.2 (C_{28}); 107.9 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.9 (C_{35}); 67.0 (C_{32}); 64.6 (C_{14}); 53.7 (C_1); 38.9 (C_{19}); 28.7 (C_{33}); 18.6 (6C, C_{38}); 16.7 (C_{34}); 11.2 (3C, C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{43}H_{51}N_4O_4Si$ 715.3680, found 715.3703.

2-(3-(Hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20d):

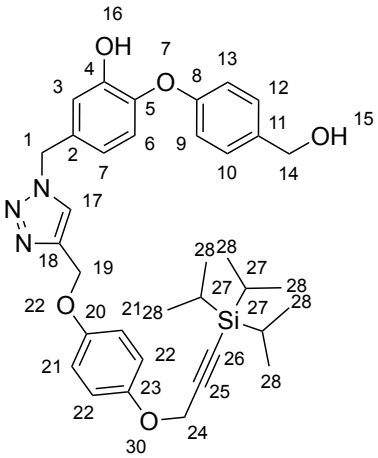


$C_{43}H_{50}N_4O_4Si$
714,36

General procedure for reduction involving compound **19d** (0.7005 g, 0.943 mmol, 1 eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (7.5 mL, 7.5 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (6 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL x3) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 20/80) gave compound **20d** as a beige foam (55%, 0.371 g), R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H (H_{21})); 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.31-7.30 (m, 2H ($H_{11,12}$)); 7.22-7.14 (m, 2H ($H_{22,23}$)); 7.07 (s, 1H (H_{17})); 7.00 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H (H_{24})); 6.94-6.91 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.85 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H (H_{28})); 6.81-6.77 (m, 2H ($H_{3,30}$)); 6.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.44 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H_7)); 5.39 (s, 2H (H_{19})); 5.08 (s, 2H (H_1)); 4.53 (s, 2H (H_{14})); 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H (H_{32})); 2.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H (H_{34})); 2.08-2.04 (m, 2H (H_{33})); 1.15-1.06 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.4 (C_{29}); 156.7 (C_8); 148.1 (C_4); 144.3 (C_5); 143.9 (C_{10}); 143.0 (C_{18}); 141.2 (C_{20}); 139.9 (C_{31}); 130.5 (C_2); 129.5 (C_{12}); 124.5 (C_{13}); 123.0 (C_{25}); 121.6 (2C, $C_{23,27}$); 120.9 (C_{17}); 119.6 (C_7); 119.5 (C_{22}); 119.4 (C_{21}); 119.3 (C_6); 116.7 (C_{26}); 116.6 (C_9); 116.1 (2C, $C_{3,11}$); 108.3 (C_{24}); 107.9 (C_{28}); 107.8 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.8 (C_{35}); 66.8 (C_{32}); 64.1 (C_{14}); 53.4 (C_1); 38.3

(C_{19}); 28.6 (C_{33}); 18.5 (6C, C_{38}); 16.6 (C_{34}); 11.1 (3C, C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{43}H_{51}N_4O_4Si$ 715.3680, found 715.3654.

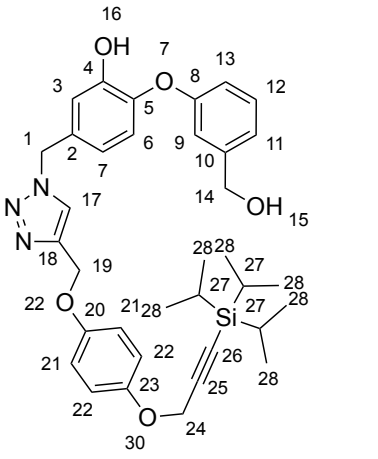
2-(4-(Hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20e):



$C_{35}H_{43}N_3O_5Si$
613,30

General procedure for reduction involving compound **19e** (0.8058 g, 1.26 mmol, 1 eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (10.0 mL, 10.0 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (7 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 10/90) gave compound **20e** as a white foam (90%, 0.693 g), R_f = 0.42 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.55 (s, 1H (H17)); 7.32 (d*, *J* = 8.6 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.02-6.95 (m, 3H ($H_{3,9,13}$)); 6.94-6.85 (m, 4H ($H_{21,22}$)); 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.73 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.43 (s, 2H (H_1)); 5.11 (s, 2H (H_{19})); 4.66 (s, 4H ($H_{14,24}$)); 1.02 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 155.7 (C_8); 152.8 (C_{20}); 152.2 (C_{23}); 147.9 (C_4); 144.8 (C_{18}); 144.3 (C_5); 136.5 (C_{11}); 130.7 (C_2); 128.8 (2C, $C_{10,12}$); 122.6 (C_{17}); 120.2 (C_6); 118.9 (C_7); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 116.5 (2C, C_{21}); 116.1 (C_3); 115.6 (2C, C_{22}); 102.2 (C_{25}); 89.0 (C_{26}); 64.6 (C_{14}); 62.7 (C_{19}); 57.5 (C_{24}); 53.8 (C_1); 18.5 (6C, C_{28}); 11.1 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{35}H_{43}N_3O_5Si$ 613.2972, found 613.2967.

2-(3-(Hydroxymethyl)phenoxy)-5-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (20f):



$C_{35}H_{43}N_3O_5Si$
613,30

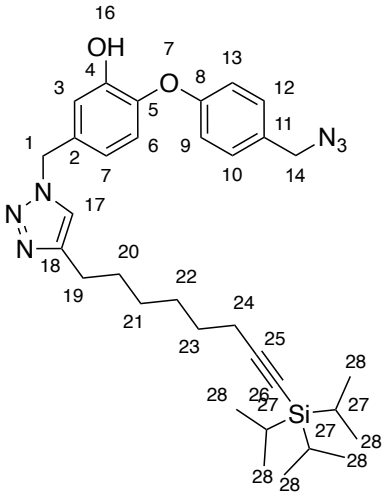
General procedure for reduction involving compound **19f** (0.6656 g, 1.04 mmol, 1 eq), diisobutylaluminium hydride (1.0 M in tetrahydrofuran), (8.3 mL, 8.3 mmol, 8 eq) in tetrahydrofuran (7

mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL) and brine (40 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 20/80) gave compound **20f** as a white foam (93%, 0.594 g), R_f = 0.50 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.54 (s, 1H (H_{17})); 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H (H_{12})); 7.00 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H (H_{13})); 6.93-6.80 (m, 7H ($H_{3,9,11,21,22}$)); 6.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.64 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.34 (s, 2H (H_1)); 5.01 (s, 2H (H_{19})); 4.63 (s, 2H (H_{24})); 4.55 (s, 2H (H_{14})); 1.02 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.8 (C_8); 152.7 (C_{20}); 152.2 (C_{23}); 148.3 (C_4); 144.4 (C_{18}); 144.1 (C10); 143.1 (C_5); 130.6 (C_2); 129.7 (C_{12}); 122.8 (C_{17}); 121.8 (C_{13}); 119.9 (C_{11}); 119.6 (C_6); 116.7 (C_7); 116.4 (C_9); 116.4 (2C, C_{21}); 116.2 (C_3); 115.5 (2C, C_{22}); 102.1 (C_{25}); 88.9 (C_{26}); 64.3 (C_{14}); 62.4 (C_{19}); 57.4 (C_{24}); 53.7 (C_1); 18.4 (6C, C_{28}); 11.0 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{35}H_{43}N_3O_5Si$ 613.2972, found 613.2955.

General procedure for azidation (*via* the formation of brominated compound) (21a, 21b, 21c, 21d, 21e, 21f):

To a solution of the reagent in anhydrous dichloromethane at 4 °C was added carbon tetrabromide (5 eq) and triphenylphosphine (5 eq). The reaction mixture was stirred overnight. Ethyl acetate was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the brominated compound which was used in the next step without further purification due to its instability. To a solution of this compound in anhydrous *N,N*-dimethylformamide was added sodium azide (10 eq).The reaction mixture was stirred at 45 °C overnight. Ethyl acetate and water were added, the organic layer was washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21a):

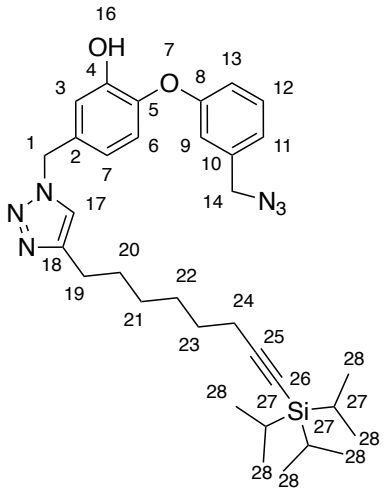


$C_{33}H_{46}N_6O_2Si$
586,35

General procedure for azidation involving compound **20a** (35.0 mg, 0.0623 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (103.3 mg, 0.312 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (81.8 mg, 0.311 mmol, 5 eq) in dichloromethane (2.0 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 20/80) gave the brominated intermediate as a yellow oil, R_f = 0.76 (petroleum ether/ethyl acetate = 30/70). The second step involved sodium azide (40.5 mg, 0.623 mmol, 10 eq), *N,N*-dimethylformamide (2 mL), ethyl acetate (30

mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 40/60) gave compound **21a** as a yellow oil (46% over two steps, 16.8 mg). R_f = 0.81 (petroleum ether/ethyl acetate = 30/70). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.30-7.24 (m, 3H ($H_{10,12,17}$)); 7.07-6.95 (m, 1H ($H_{3,9,13}$); 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.41 (s, 2H (C_1)); 4.30 (s, 2H (C_{14})); 2.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (C_{19})); 2.20 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H (C_{24})); 1.64-1.62 (m, 2H (H_{20})); 1.52-1.30 (m, 6H ($C_{21,22,23}$)) ; 1.08-1.02 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 156.9 (C_8); 148.7 (C_4); 148.6 (C_5); 143.8 (C_{18}); 131.5 (C_{11}); 130.4 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 120.6 (C_{17}); 119.8 (C_6); 119.7 (C_7); 118.1 (2C, $C_{9,13}$); 116.3 (C_3); 109.1 (C_{26}); 80.0 (C_{25}); 54.2 (C_{14}); 53.7 (C_1); 29.1 (C_{19}); 28.7 (C_{23}); 28.6 (C_{22}); 28.3 (C_{20}); 25.4 (C_{21}); 19.7 (C_{24}); 18.6 (C_{28}); 11.3 (C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{33}H_{47}N_6O_2Si$ 587.3530, found 587.3524.

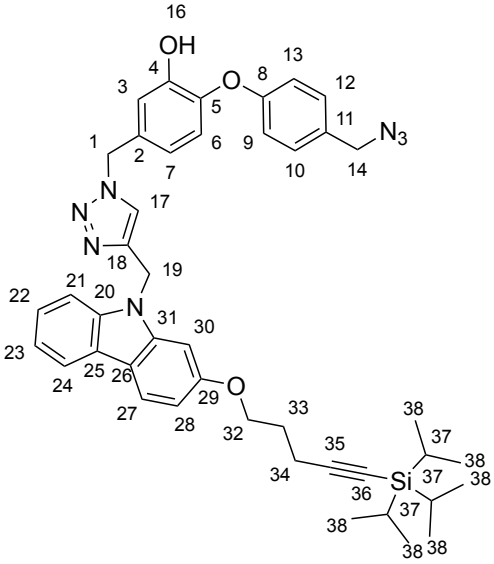
2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-(8-(triisopropylsilyl)oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21b):



$C_{33}H_{46}N_6O_2Si$
586,35

General procedure for azidation involving compound **20b** (77.4 mg, 0.138 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (228.6 mg, 0.689 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (180.8 mg, 0.689 mmol, 5 eq) in dichloromethane (6.0 mL). Ethyl acetate (80 mL), water (50 mL) and brine (40 mL). Purification by flash-chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 20/80) gave the brominated intermediate as a yellow oil, R_f = 0.88 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). The second step involved sodium azide (89.7 mg, 1.38 mmol, 10 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL). Ethyl acetate (20 mL), water (10 mL) and brine (10 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 40/60) gave compound **21b** as a brown oil (62% over two steps, 50.2 mg), R_f = 0.89 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.11 (s, 1H (H_{16})); 7.35-7.29 (m, 1H (H_{12})); 7.25 (s, 1H (H_{17})); 7.07 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 7.04 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H (H_{11})); 6.97-6.93 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.41 (s, 2H (H_1)); 4.30 (H_{14})); 2.65 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_{19})); 2.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.66-1.29 (m, 8H ($H_{20,21,22,23}$)); 1.08-0.97 (m, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.3 (C_8); 149.0 (C_{18}); 148.6 (C_4); 143.9 (C_5); 137.3 (C_{10}); 131.5 (C_2); 130.1 (C_{12}); 122.8 (C_{13}); 120.6 (C_{17}); 119.9 (C_6); 119.7 (C_7); 117.5 (C_9); 117.5 (C_{11}); 116.5 (C_3); 109.1 (C_{25}); 80.0 (C_{26}); 54.3 (C_{14}); 53.7 (C_1); 29.1 (C_{19}); 28.6 (C_{20}); 28.6 (C_{21}); 28.3 (C_{22}); 25.4 (C_{23}); 19.7 (C_{24}); 18.6 (C_{28}); 11.2 (C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{33}H_{47}N_6O_2Si$ 587.3530 found 587.3540.

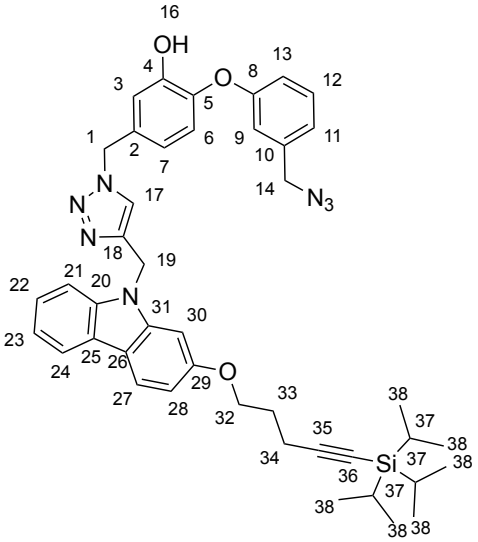
2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21c):



$C_{43}H_{49}N_7O_3Si$
739,37

General procedure for azidation involving compound **20c** (28 mg, 0.0392 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (64.5 mg, 0.196 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (51.4 mg, 0.196 mmol, 5 eq) in dichloromethane (1.2 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 30/70) gave the brominated intermediate as a yellow oil, R_f = 0.64 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). The second step involved sodium azide (25.5 mg, 0.392 mmol, 10 eq) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL). Ethyl acetate (10 mL), water (10 mL) and brine (10 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 50/50) gave compound **21c** as a beige powder (78% over two steps, 23.0 mg), R_f = 0.56 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_{21})); 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.38-7.30 (m, 2H ($H_{23,24}$)); 7.27-7.18 (m, 3H ($H_{10,12,22}$)); 7.08 (s, 1H (H_{17})); 6.99-6.95 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.93-6.91 (m, 2H ($H_{3,30}$)); 6.86 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 2H (H_{28})); 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.61 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.50 (s, 2H (H_{19})); 5.26 (s, 2H (C_1)); 4.29 (s, 2H (C_{14})); 4.17 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H (C_{32})); 2.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{34})); 2.07-2.03 (m, 2H (C_{33})); 1.08-1.05 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.5 (C_{29}); 156.5 (C_8); 148.1 (C_4); 144.7 (C_5); 143.8 (C_{11}); 141.3 (C_{18}); 140.0 (C_{20}); 130.9 (C_{31}); 130.6 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 124.6 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 121.5 (C_{17}); 121.0 (C_7); 119.9 (C_{27}); 119.5 (C_6); 119.4 (C_{22}); 119.4 (C_{24}); 118.2 (2C, $C_{9,13}$); 116.9 (C_{26}) ; 116.1 (C_3); 108.5 (C_{21}); 108.2 (C_{28}); 107.9 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.9 (C_{35}); 66.9 (C_{32}); 54.1 (C_{14}); 53.6 (C_1); 38.7 (C_{19}); 28.7 (C_{33}); 18.6 (C_{38}); 16.7 (C_{34}); 11.2 (C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{43}H_{50}N_7O_3Si$ 740.3744, found 740.3749.

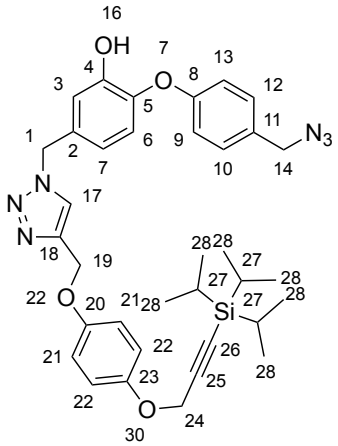
2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21d):



$C_{43}H_{49}N_7O_3Si$
739,37

General procedure for azidation involving compound **20d** (120 mg, 0.168 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (278.5 mg, 0.840 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (220.3 mg, 0.840 mmol, 5 eq) in dichloromethane (2.6 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 80/20 to 30/70) gave the brominated intermediate as a brown oil the brominated intermediate, R_f = 0.85 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). The second step involved sodium azide (109 mg, 1.69 mmol, 10 eq) in *N,N*-dimethylformamide (3.0 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 50/50) gave compound **21d** as a brown oil (32% over two steps, 39.7 mg), R_f = 0.52 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H (H_{21})); 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H (H_{27})); 7.67-7.60 (m, 1H (H_9)); 7.56-7.26 (m, 4H ($H_{12,17,23,30}$)); 7.21 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.6 Hz, 1H (H_{22})); 7.04 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H (H_{24})); 6.95-6.91 (m, 3H ($H_{3,11,13}$)); 6.86 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H (H_{28})); 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.59 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.50 (s, 2H (H_{19})); 5.25 (s, 2H (H_1)); 4.25 (s, 2H (H_{14})); 4.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H (H_{32})); 2.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H (H_{34})); 2.06-2.03 (m, 2H (H_{33})); 1.09-1.02 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.5 (C_{29}); 157.0 (C_8); 148.3 (C_4); 143.7 (C_5); 141.3 (C_{18}); 140.0 (C_{20}); 137.3 (C_{31}); 132.4 (C_{10}); 130.9 (C_2); 130.1 (C_{12}); 128.4 (C_{13}); 124.5 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 122.9 (C_{27}); 121.0 (C_{17}); 119.7 (C_7); 119.6 (C_{22}); 119.4 (C_{21}); 119.4 (C_6); 117.6 (C_9); 117.5 (C_{11}); 116.8 (C_{26}); 116.2 (C_3); 108.4 (C_{24}); 108.1 (C_{28}); 107.9 (C_{36}); 94.1 (C_{30}); 80.8 (C_{35}); 66.9 (C_{32}); 54.1 (C_{14}); 53.6 (C_1); 38.6 (C_{19}); 28.7 (C_{33}); 18.5 (C_{38}); 16.6 (C_{34}); 11.2 (C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{43}H_{50}N_7O_3Si$ 740.3744, found 740.3715.

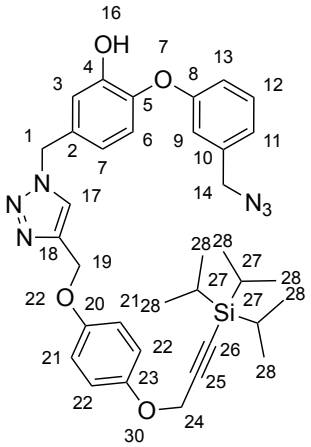
2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21e):



$C_{35}H_{42}N_6O_4Si$
638,30

General procedure for azidation involving **20e** (150.0 mg, 0.245 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (405.5 mg, 1.22 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (320.7 mg, 1.22 mmol, 5 eq) in dichloromethane (3.7 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave the brominated intermediate as a yellow oil, R_f = 0.81 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). The second step involved sodium azide (159.3 mg, 2.45 mmol, 10 eq) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **21e** as a yellow oil (65% over two steps, 101.6 mg), R_f = 0.71 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.57 (s, 1H (H_{17})); 7.26 (d*, *J* = 8.6 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.99 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.94-6.82 (m, 5H ($H_{6,21,22}$)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.43 (s, 2H (H_1)); 5.09 (s, 2H (H_{19})); 4.65 (s, 2H (H_{24})); 4.29 (s, 2H (H_{14})); 1.03 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.6 (C_8); 152.7 (C_{20}); 152.2 (C_{23}); 148.4 (C_4); 144.7 (C_{18}); 143.9 (C_5); 131.0 (C_{11}); 130.5 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 122.6 (C_{17}); 120.1 (C_6); 119.6 (C_7); 118.2 (2C, $C_{9,13}$); 116.4 (3C, $C_{3,21}$); 115.5 (2C, C_{22}); 102.1 (C_{25}); 88.9 (C_{26}); 62.5 (C_{19}); 57.4 (C_{24}); 54.1 (C_{14}); 53.8 (C_1); 18.4 (6C, C_{28}); 11.0 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{35}H_{43}N_6O_4Si$ 639.3115, found 639.3098.

2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (21f):



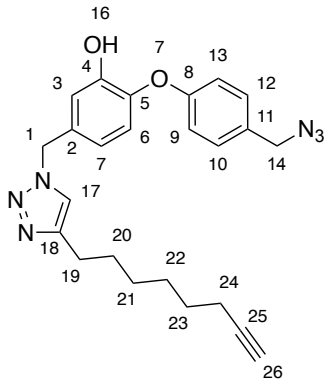
$C_{35}H_{42}N_6O_4Si$
638,30

General procedure B for azidation involving compound **20f** (140.0 mg, 0.228 mmol, 1 eq), carbon tetrabromide (378.5 mg, 1.14 mmol, 5 eq) and triphenylphosphine (299.4 mg, 1.14 mmol, 5 eq) in dichloromethane (3.5 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash

chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 40/60) gave the brominated intermediate as a yellow oil, R_f = 0.66 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). The second step involved sodium azide (148.2 mg, 2.28 mmol, 10 eq) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL). Ethyl acetate (30 mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **21f** as a brown oil (48% over two steps, 69.8 mg), R_f = 0.69 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.58 (s, 1H (H_{17})); 7.35-7.29 (m, 1H (H_{12})); 7.07-7.03 (m, 2H ($H_{3,13}$)); 6.97-6.84 (m, 7H ($H_{6,9,11,21,22}$)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.44 (s, 2H (H_1)); 5.09 (s, 2H (H_{19})); 4.65 (s, 2H (H_{24})); 4.29 (s, 2H (H_{14})); 1.03 (s, 21H ($H_{27,28}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.0 (C_8); 152.7 (C_{20}); 152.2 (C_{23}); 148.4 (C_4); 144.7 (C_{18}); 143.9 (C_5); 137.4 (C_{10}); 131.0 (C_2); 130.2 (C_{12}); 123.2 (C_{11}); 122.6 (C_{17}); 120.1 (C_{13}); 119.6 (C_6); 117.7 (C_7); 117.5 (C_3); 116.4 (C_9); 116.4 (2C, C_{21}); 115.5 (2C, C_{22}); 102.1 (C_{25}); 88.9 (C_{26}); 62.5 (C_{19}); 57.4 (C_{24}); 54.2 (C_{14}); 53.7 (C_1); 18.4 (6C, C_{28}); 11.0 (3C, C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{35}H_{42}N_6O_4Si$ 638.3037, found 638.3043.

General procedure for the TIPS-deprotection (C01, C02, C03, C04, C05 et C06):
To a solution of the reagent in anhydrous tetrahydrofuran at -78 °C was added tetrabutylammonium fluoride (10 eq). The reaction mixture was stirred overnight. Ethyl acetate and water were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the expected compound.

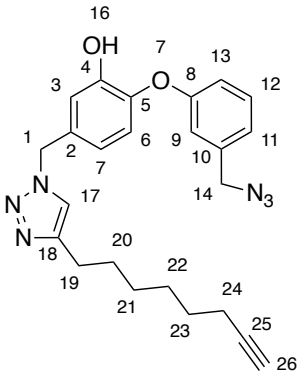
2-(4-(azidomethyl)phenoxy)-5-((4-(oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C01):



$C_{24}H_{26}N_6O_2$
430,21

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21a** (40.5 mg, 0.069 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (0.35 mL, 0.345 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (2.8 mL) and ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 40/60) gave compound **C01** as a yellow oil (75%, 22.4 mg), R_f = 0.69 (petroleum ether/ethyl acetate = 30/70). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.30 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{10,12}$)); 7.23 (s, 1H (H_{17})); 7.03 (d*, *J* = 8.7 Hz, 2H ($H_{9,13}$)); 6.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.75 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.29 (bs, 1H (H_{16})); 5.43 (s, 2H (H_1)); 4.32 (s, 2H (H_{14})); 2.70 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H_{19})); 2.16 (td, *J* = 7.1, 2.8 Hz, 2H (H_{24})); 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H (H_{26})); 1.68-1.63 (m, 2H (H_{20})); 1.54-1.35 (m, 6H ($H_{21,22,23}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.5 (C_8); 148.8 (C_{18}); 148.1 (C_4); 143.7 (C_5); 131.7 (C_{11}); 130.9 (C_2); 130.0 (2C, $C_{10,12}$)); 120.5 (C_{17}); 120.1 (C_6); 119.2 (C_7); 118.4 (2C, $C_{9,13}$); 116.0 (C_3); 84.6 (C_{25}); 68.2 (C_{26}); 54.2 (C_{14}); 53.6 (C_1); 29.2 (C_{19}); 28.6 (C_{23}); 28.4 (C_{22}); 28.3 (C_{20}); 25.6 (C_{21}); 18.3 (C_{24}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{27}N_6O_2$ 431.2195, found 431.2197.

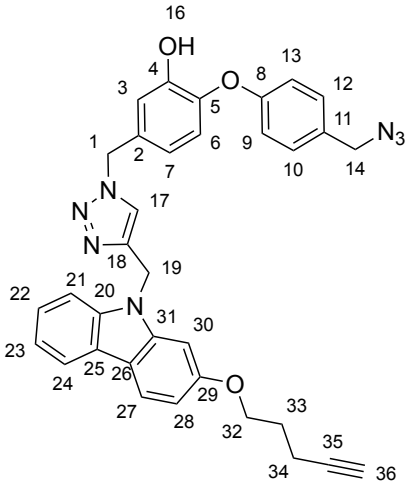
2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-(oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C02):



$C_{24}H_{26}N_6O_2$
430,21

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21b** (178 mg, 0.303 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (3.0 mL, 3.03 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (12.6 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **C02** as a yellow oil (100%, 135.3 mg), R_f = 0.63 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.31-7.25 (m, 2H ($H_{12,17}$)); 7.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 7.00 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H (H_{11})); 6.93-6.90 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.73 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.38 (s, 2H (H_1)); 4.26 (s, 2H (H_{14})); 2.62 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H (H_{19})); 2.11 (td, *J* = 6.8, 2.6 Hz, 2H (H_{24})); 1.90 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H (H_{26})); 1.58-1.55 (m, 2H (H_{20})); 1.48-1.23 (m, 6H ($H_{21,22,23}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.4 (C_8); 149.2 (C_{18}); 148.4 (C_4); 143.8 (C_5); 137.1 (C_{10}); 131.4 (C_2); 129.9 (C_{12}); 122.5 (C_{13}); 120.7 (C_{17}); 120.2 (C_6); 119.4 (C_7); 117.3 (C_9); 117.2 (C_{11}); 116.4 (C_3); 84.5 (C_{25}); 68.1 (C_{26}); 54.2 (C_{14}); 53.7 (C_1); 28.9 (C_{19}); 28.4 (C_{20}); 28.1 (C_{21}); 28.1 (C_{22}); 25.2 (C_{23}); 18.1 (C_{24}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{26}N_6O_2$ 430.2117, found 430.2104. Purity (HPLC): 96.2% at 280 nm (t_R = 4.641 min).

2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((2-(pent-4-yn-1-yloxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C04):

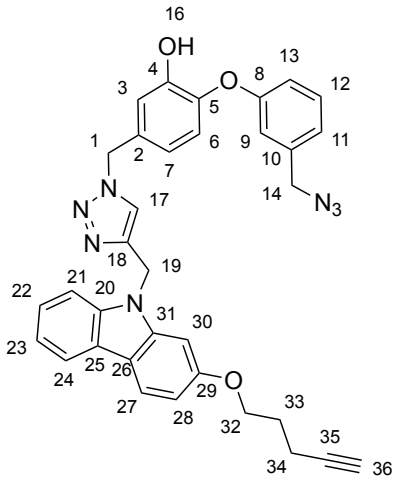


$C_{34}H_{29}N_7O_3$
583,23

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21c** (97.8 mg, 0.131 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (1.3 mL, 1.32 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (5.4 mL) and ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 40/60) gave compound **C04** as a white powder (84%, 64.7 mg), R_f = 0.34 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300

MHz) δ 7.96 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_{21})); 7.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.37-7.30 (m, 2H ($H_{23,24}$)); 7.27-7.22 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.20 (ddd, *J* = 8.0, 5.6, 2.3 Hz, 1H (H_{22})); 7.08 (s, 1H (H_{17})); 6.98-6.94 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{30})); 6.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.84 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H (H_{28})); 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.60 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 5.49 (s, 2H (H_{19})); 5.24 (s, 2H (H_1)); 4.28 (s, 2H (H_{14})); 4.13 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H (H_{32})); 2.42 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H (H_{34})); 2.07-2.03 (m, 2H (H_{33})); 1.99 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H (H_{36})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.4 (C_{29}); 156.6 (C_8); 148.2 (C_4); 144.6 (C_5); 143.6 (C_{18}); 141.3 (C_{20}); 140.0 (C_{31}); 130.9 (C_{11}); 130.5 (C_2); 129.8 (2C, $C_{10,12}$); 124.6 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 121.5 (C_{17}); 121.0 (C_7); 119.8 (C_{27}); 119.5 (2C, $C_{6,22}$); 119.4 (C_{24}); 118.1 (2C, $C_{9,13}$); 116.8 (C_{26}); 116.1 (C_3); 108.3 (C_{21}); 108.4 (C_{28}); 93.9 (C_{30}); 83.6 (C_{35}); 68.9 (C_{36}); 66.6 (C_{32}); 54.0 (C_{14}); 53.6 (C_1); 38.7 (C_{19}); 28.2 (C_{33}); 15.2 (C_{34}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{34}H_{30}N_7O_3$ 584.2410, found 584.2417. Purity (HPLC): 95.9% at 300 nm (t_R = 6.210 min).

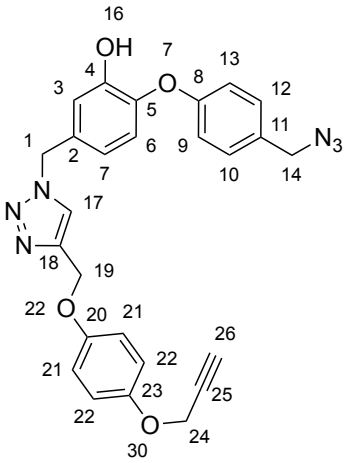
2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((2-(pent-4-yn-1-yloxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C05):



$C_{34}H_{29}N_7O_3$
583,23

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21d** (67.9 mg, 0.0918 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (0.9 mL, 0.91 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (3.0 mL) and ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 30/70) gave compound **C05** as a white powder (63%, 33.5 mg), R_f = 0.26 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.00 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H (H_{21})); 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.67-7.63 (m, 1H (H_9); 7.42-7.32 (m, 3H ($H_{11,12,23}$)); 7.23 (ddd, *J* = 7.7, 5.8, 2.0 Hz, 1H (H_{22})); 7.10-7.07 (m, 2H ($H_{17,24}$)); 6.98-6.94 (m, 3H ($H_{,13,30}$)); 6.92 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.87 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H (H_{28})); 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.66-6.62 (m, 2H ($H_{7,16}$)); 5.55 (s, 2H (H_{19})); 5.30 (s, 2H (H_1)); 4.31 (s, 2H (H_{14})); 4.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H (H_{32})); 2.45 (td, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 2H (H_{34})); 2.08-2.06 (m, 2H (H_{33})); 2.01 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H (H_{36})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.5 (C_{29}); 156.8 (C_8); 148.0 (C_4); 144.7 (C_5); 143.0 (C_{18}); 141.3 (C_{20}); 140.1 (C_{31}); 137.5 (C_{10}); 131.5 (C_2); 130.3 (C_{12}); 124.6 (C_{13}); 123.4 (C_{23}); 123.3 (C_{25}); 121.5 (C_{17}); 121.1 (C_{27}); 120.0 (C_7); 119.5 (C_{22}); 119.5 (C_{21}); 119.2 (C_6); 117.8 (C_9); 117.7 (C_{11}); 116.9 (C_{26}); 116.0 (C_3); 108.5 (C_{24}); 108.4 (C_{28}); 93.9 (C_{30}); 82.2 (C_{35}); 68.9 (C_{36}); 66.1 (C_{32}); 56.2 (C_{14}); 53.0 (C_1); 39.8 (C_{19}); 28.2 (C_{33}); 16.9 (C_{34}). HRMS (DCI-CH_4, [M+H$^+$]) calculated for $C_{34}H_{29}N_7O_3$ 583.2332, found 583.2328. Purity (HPLC): 98.4% at 300 nm (t_R = 6.225 min).

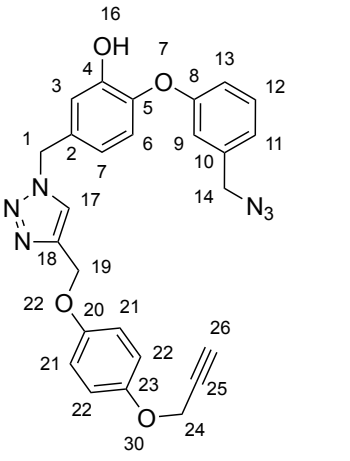
2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C07):



$C_{26}H_{22}N_6O_4$
482,17

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21e** (132.3 mg, 0.207 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (2.1 mL, 2.07 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (6.9 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 20/80) gave compound **C07** as a yellow oil (67%, 67.7 mg), R_f = 0.59 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.56 (s, 1H (H_{17})); 7.29-7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.01-6.99 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.95 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 4.90 (s, 4H ($H_{21,22}$)); 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.75 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.45 (s, 2H (H_1)); 5.13 (s, 2H (H_{19})); 4.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{24})); 4.31 (s, 2H (H_{14})); 2.50 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{26})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 156.5 (C_8); 153.0 (C_{20}); 152.1 (C_{23}); 148.1 (C_4); 144.7 (C_{18}); 143.8 (C_5); 131.1 (2C, $C_{2,11}$); 129.9 (2C, $C_{10,12}$); 122.6 (C_{17}); 120.2 (C_6); 119.5 (C_7); 118.3 (C_3); 116.1 (2C, C_{21}); 115.8 (2C, C_{22}); 78.7 (C_{25}); 75.4 (C_{26}); 62.6 (C_{19}); 56.5 (C_{24}); 54.1 (C_{14}); 53.7 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{22}N_6O_4$ 483.1781, found 483.1784.

2-(3-(Azidomethyl)phenoxy)-5-((4-((4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenol (C08):



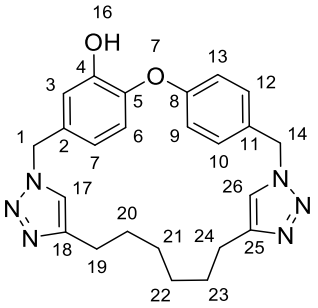
$C_{26}H_{22}N_6O_4$
482,17

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21f** (180.5 mg, 0.282 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (2.8 mL, 2.82 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (9.4 mL) and ethyl acetate (40 mL), water (40 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 60/40 to 10/90) gave compound **C08** as a yellow oil (44%, 60.1 mg), R_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate = 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 8.26 (s, 1H (H_{17})); 8.26-8.24 (m, 1H (H_{12})); 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H (H_{13})); 7.02-6.71 (m, 10H

($H_{3,6,7,9,11,12,21,22}$)); 5.34 (s, 2H (H_1)); 5.08 (s, 2H (H_{19})); 4.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{24})); 4.41 (s, 2H (H_{14})); 3.52 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_{26})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 158.0 (C_8); 152.6 (C_{20}); 151.5 (C_{23}); 149.4 (C_4); 143.2 (C_{18}); 142.0 (C_5); 137.4 (C_{10}); 133.4 (C_2); 130.0 (C_{12}); 124.6 (C_{11}); 122.1 (C_{17}); 122.0 (C_{13}); 119.2 (C_6); 116.7 ($C_{7,9}$); 116.0 (C_3); 115.9 (2C, C_{21}); 115.6 (2C, C_{22}); 79.5 (C_{25}); 78.0 (C_{26}); 61.5 (C_{19}); 55.9 (C_{24}); 53.2 (C_{14}); 52.4 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{23}N_6O_4$ 483.1781, found 483.1799.

General procedure B for copper-catalyzed alkyne azide cycloaddition (CuAAC):
A solution of diazide (1.1 eq), alkyne derivative (1 eq), $Cu(ACN)_4PF_6$ (0.1 eq) or $Cu(ACN)_4BF_4$ (0.05 eq) and tri(benzyltriazolylmethyl)amine (0.1 eq) in dichloromethane was stirred at 50 °C overnight. Water and dichloromethane were added. Filtration and washing of the precipitate with water and dichloromethane gave the expected macrocycles **M01, M03, M06, M07, M09** and **M10.** The organic layer of the filtrate was separated and the aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The combined organic layers were washed with EDTA and brine, dried over magnesium sulphate and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash chromatography led to the opened structures **C03** and **C09**. It has to be noted that in the case of monophenol derivatives, treatment of the filtrate led to mixture of opened structure regioisomers that could not be separated.

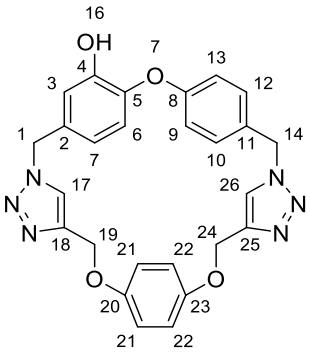
(1^4*Z*,7^4*Z*)-1^1*H*,7^1*H*-4-Oxa-1,7(1,4)-ditriazola-3,5(1,4)-dibenzenacyclotridecaphan-3^3-ol (M01):



$C_{24}H_{26}N_6O_2$
430,21

General procedure B for CuAAC involving diazide **11e** (36 mg, 0.084 mmol), **1,9-decadiyne** (11.3 mg, 0.084 mmol), $Cu(ACN)_4BF_4$ (1.4 mg, 0.0042 mmol), TBTA (2.2 mg, 0.042 mmol) and dichloromethane (21 mL). Filtration gave compound **M01** as a white solid (70%, 25 mg). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500MHz) δ 9.68 (s, 1H (H_{16})); 7.87-7.83 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.22-7.12 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.91-6.71 (m, 5H ($H_{3,6,7,17,26}$)); 5.44-5.36 (m, 4H ($H_{19,24}$)); 1.55 (m, 4H ($H_{20,23}$)); 1.30-1.27 (m, 2H ($H_{21.22}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.6 (C_8); 149.3 (2C, $C_{18,25}$); 142.8 (C_4); 142.0 (C_5); 133.6 (C_{11}); 129.8 (C_2); 129.4 (2C, $C_{10,12}$); 122.0 (2C, $C_{17,26}$); 119.0 (C_6); 116.5 (C_7); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.3 (C_3); 52.2 (C_1); 52.1 (C_{14}); 28.8 (2C, $C_{19,24}$); 28.3 (2C, $C_{20,23}$); 24.9 (2C, $C_{21,22}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{27}N_6O_2$ 431.2195, found 431.2191.

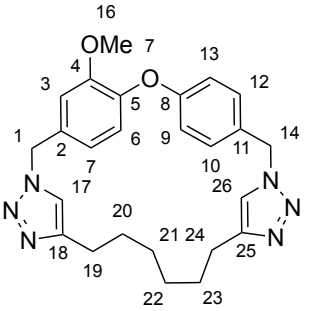
(1^4Z,7^4Z)-1^1H,7^1H-4,9,11-Trioxa-1,7(1,4)-ditriazola-3,5,10(1,4)-tribenzenacyclododecaphan-3^3-ol (M07):



$C_{26}H_{22}N_6O_5$
482.17

General procedure B for CuAAC involving diazide **11e** (111 mg, 0.375 mmol), **1,4-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (18a)**[8] (70 mg, 0.375 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (7 mg, 0.0188 mmol), TBTA (10 mg, 0.0188 mmol) and dichloromethane (60 mL). Filtration gave compound **M07** as a white solid (16%, 23 mg). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.71 (s, 1H (H_{16})); 8.25-8.18 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.29-7.26 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.96-6.94 (m, 5H ($H_{6,21,22}$)); 6.88 (s, 1H (H_{17})); 6.77-6.73 (m, 3H ($H_{3,7,26}$); 5.53 (s, 2H (H_1)); 5.51 (s, 2H (H_{14})); 5.06 (s, 2H (H_{19})); 5.04 (s, 2H (H_{24})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 157.6 (C_8); 152.3 (2C, $C_{20,23}$); 149.3 (C_4); 143.2 (2C, $C_{18,25}$); 142.1 (C_5); 133.3 (C_{11}); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 129.4 (C_2); 122.1 (2C, $C_{17,26}$); 119.2 (2C, $C_{6,7}$); 116.7 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 115.5 (4C, $C_{21,22}$); 61.6 (C_{19}); 61.5 (C_{24}); 52.3 (C_1); 52.3 (C_{14}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{23}N_6O_4$ 483.1781, found 483.1770.

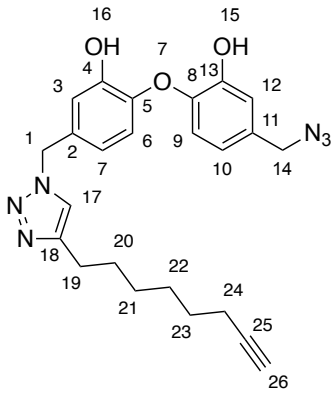
(1^4Z,7^4Z)-3^3-Methoxy-1^1H,7^1H-4-oxa-1,7(1,4)-ditriazola-3,5(1,4)-dibenzenacyclotridecaphane (M10):



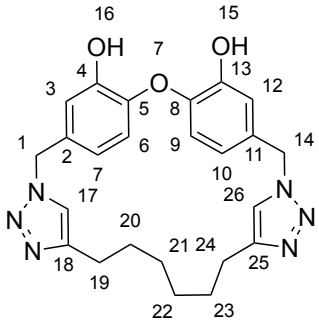
$C_{25}H_{28}N_6O_2$
444,23

General procedure B for CuAAC involving diazide **11'e** (130 mg, 0.417 mmol), **1,9-decadiyne** (56 mg, 0.417 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (8 mg, 0.0209 mmol), TBTA (11.1 mg, 0.0209 mmol) and dichloromethane (68 mL). Filtration gave compound **M10** as a white solid (35 % calculated from consumed diazide, 50 mg), R_f = 0.14 (dichloromethane /methanol 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 7.71 (s, 1H (H_{17})); 7.43 (s, 1H (H_{26})); 7.18 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H (H_3)); 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H (H_6)); 6.84-6.82 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 6.74 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H (H_7)); 6.68-6.65 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 5.54 (s, 2H (H_1)), 5.49 (s, 2H (H_{14})); 3.69 (s, 3H (H16)); 2.58 (t, J = 6.7 Hz, 2H (H_{19})); 2.52-2.50 (m, 2H (H_{24})); 1.45-1.39 (m, 2H (H_{20})); 1.27-1.21 (m, 2H (H_{23})); 1.14-1.08 (m, 2H (H_{21})); 1.01-0.95 (m, 2H (H_{22})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 158.2 (C_8); 151.6 (C_4); 148.1 (C_{18}); 147.3 (C_{25}); 144.6 (C_5); 134.1 (C_{11}); 131.4 (C_2); 127.6 (2C, $C_{10,12}$); 122.9 (C_{17}); 122.8 (C_6); 121.3 (C_{26}); 121.0 (C_7); 117.0 (2C, $C_{9,13}$); 114.0 (C_3); 55.8 (C_{16}); 52.8 (C_1); 51.7 (C_{14}); 30.6 (C_{19}); 29.4 (C_{24}); 28.9 (C_{20}); 28.5 (C_{23}); 25.3 (C_{21}); 24.9 (C_{22}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{29}N_6O_2$ 445.2352, found 445.2350.

5-(Azidomethyl)-2-(2-hydroxy-4-((4-(oct-7-yn-1-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (C03) and ($1^4Z,7^4Z$)-$1^1H,7^1H$-4-oxa-1,7(1,4)-ditriazola-3,5(1,4)-dibenzenacyclotridecaphane-$3^3,5^2$-diol (M03):



$C_{24}H_{26}N_6O_3$
446,21



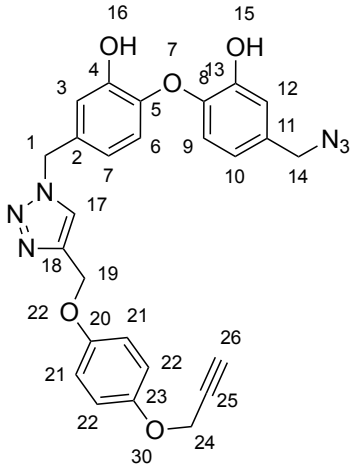
$C_{24}H_{26}N_6O_3$
446,21

General procedure B for CuAAC involving diazide **10e** (125 mg, 0.401 mmol), **1,9-decadiyne** (54 mg, 0.401 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (7.5 mg, 0.02 mmol), TBTA (11 mg, 0.02 mmol) and dichloromethane (64 mL), water (65 mL) was and dichloromethane (2 x 65 mL). Filtration gave the macrocycle **M03** whereas purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 95/5) of the crude product issued from the filtrate gave recovered diazide (23 mg) and acyclic compound **C03.**

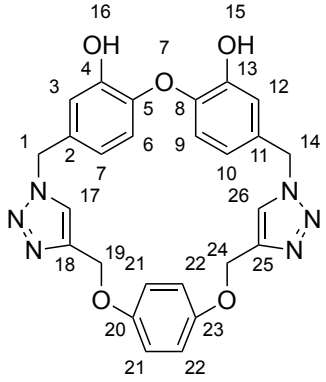
C03: white solid (10%, 15 mg), R_f = 0.21 (petroleum/ethyl acetate 50/50). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.25 (s, 1H (H_{17})); 7.03 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 7.00 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_{12})); 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_9)); 6.76 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.73 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_{10})); 5.38 (s, 2H (H_1)); 4.25 (s, 2H (H_{14})); 2.65 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H (H_{29})); 2.14 (td, *J* = 7.1, 2.7 Hz, 2H (H_{24})); 1.92 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_{26})); 1.62-1.59 (m, 2H (H_{20})); 1.48-1.46 (m, 2H (H_{23})); 1.41-1.35 (m, 2H (H_{21})); 1.34-1.29 (m, 2H (H_{22})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 148.6 (C_{18}); 148.4 (C_4); 148.1 (C_{13}); 144.9 (C_8); 144.1 (C_5); 132.3 (C_{11}); 131.1 (C_2); 121.0 (C_{17}); 120.1 (C_6); 119.8 (C_9); 119.2 (2C, $C_{7,10}$); 117.0 (C_{12}); 116.8 (C_3); 84.6 (C_{26}); 68.2 (C_{25}); 54.3 (C_{14}); 53.9 (C_1); 29.0 (C_{19}); 28.5 (C_{23}); 28.3 (C_{22}); 28.2 (C_{20}); 25.2 (C_{21}); 18.3 (C_{24}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{27}N_6O_3$ 447.2145, found 447.2153.

M03: white solid (28% calculated from consumed diazide, 40 mg). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 7.79 (s, 2H ($H_{17,26}$)); 6.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H ($H_{3,12}$)); 6.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H ($H_{6,9}$)); 6.61 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 2H ($H_{7,10}$)); 5.39 (d, 4H ($H_{1,14}$)); 2.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H ($H_{19,24}$)); 1.55-1.51 (m, 4H ($H_{20,23}$)); 1.30-1.27 (m, 4H ($H_{21,22}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 148.1 (2C, $C_{18,25}$); 147.2 (2C, $C_{4,13}$); 144.2 (2C, $C_{5,8}$); 131.9 (2C, $C_{2,11}$); 121.8 ($C_{17,26}$); 118.9 (2C, $C_{6,9}$); 118.7 (2C, $C_{7,10}$); 116.3 (2C, $C_{3,12}$); 52.2 (2C, $C_{1,14}$); 28.7 (2C, $C_{19,24}$); 28.1 (2C, $C_{21,23}$); 24.9 (2C, $C_{21,22}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{27}N_6O_3$ 447.2145, found 447.2166.

5-(Azidomethyl)-2-(2-hydroxy-4-((4-((4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (C09) and (1^4Z,7^4Z)-1^1H,7^1H-4,9,11-trioxa-1,7(1,4)-ditriazola-3,5,10(1,4)-tribenzenacyclododecaphane-3^3,5^2-diol (M09):



$C_{26}H_{22}N_6O_5$
498,17



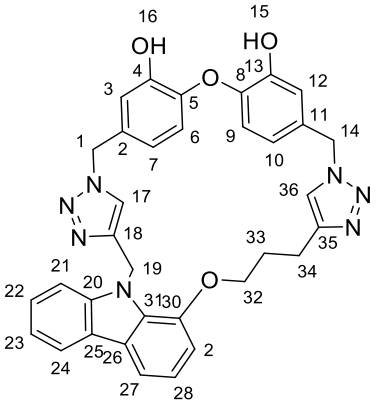
$C_{26}H_{22}N_6O_5$
498,17

General procedure B for CuAAC involving diazide **10e** (146 mg, 0.468 mmol), **1,4-bis(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (18a)**[8] (87 mg, 0.468 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (8.7 mg, 0.0234 mmol), TBTA (12.4 mg, 0.0234 mmol), dichloromethane (75 mL), Water (75 mL) and dichloromethane (2 x 75 mL). Filtration gave the macrocycle **M09** whereas purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 99/1) of the crude product issued from the filtrate gave recovered diazide (47mg) and acyclic compound **C09**.

C09: white solid (15%, 24 mg), R_f = 0.10 (petroleum/ethyl acetate 50/50). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 7.58 (s, 1H (H_{17})); 7.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H (H_3)); 6.97 (s, 1H (H_{12})); 6.89 (s, 4H ($H_{21,22}$)); 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_6)); 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_9)); 6.79 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H (H_3)); 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_{10})); 5.44 (s, 2H (H_1)); 5.12 (s, 2H (H_{19})); 4.63 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{24})); 4.27 (s, 2H (H_{14})); 2.50 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H (H_{26})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 152.9 (C_{20}); 152.2 (C_{23}); 147.6 (C_4); 147.6 (C_{13}); 144.2 (2C, $C_{5,8}$); 143.2 (C_{18}); 132.8 (C_{11}); 131.1 (C_2); 120.6 (C_6); 120.5 (C_9); 120.3 (C_{17}); 118.9 (C_7); 118.4 (C_{10}); 116.8 (C_3); 116.5 (C_{12}); 116.1 (2C, C_{21}); 115.8 (2C, C_{22}); 78.8 (C_{25}); 75.4 (C_{26}); 62.6 (C_{19}); 56.5 (C_{24}); 54.2 (C_{14}); 53.8 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{23}N_6O_5$ 499.1730, found 499.1732.

M09: white solid (33%, 52 mg). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.56 (s, 2H ($H_{17,26}$)); 8.23-8.16 (m, 2H ($H_{6,9}$)); 6.95-6.86 (m, 4H ($H_{21,22}$)); 6.68-6.69 (m, 4H ($H_{3,7,10,12}$)); 5.48 (s, 4H ($H_{1,14}$)); 5.04 (s, 4H ($H_{19,24}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 152.3 (2C, $C_{20,23}$); 148.0 (2C, $C_{4,13}$); 144.1 (2C, $C_{5,8}$); 143.1 (2C, $C_{18,25}$); 131.5 (2C, $C_{2,11}$); 124.4 (2C, $C_{17,26}$); 119.3 (2C, $C_{6,9}$); 118.8 (2C, $C_{7,10}$); 115.6 (2C, $C_{3,12}$); 115.5 (4C, $C_{21,22}$); 61.5 (2C, $C_{19,24}$); 52.2 (2C, $C_{1,14}$). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{23}N_6O_5$ 499.1730, found 499.1718.

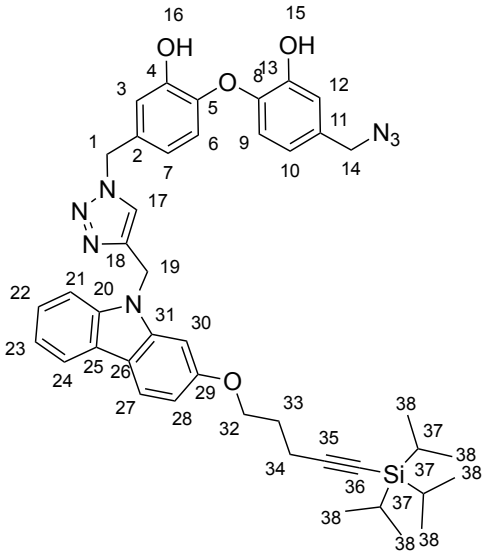
(3^4*Z*,9^4*Z*)-1^9*H*,3^1*H*,9^1*H*-6,13-Dioxa-1(9,1)-carbazola-3(4,1),9(1,4)-ditriazola-5,7(1,4)-dibenzenacyclotridecaphane-5^3,7^2-diol (M06):



$C_{34}H_{29}N_7O_4$
599,23

General procedure B for CuAAC involving diazide **10e** (193 mg, 0.619 mmol), alkyne **17a** (178 mg, 0.619 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (11.3 mg, 0.0305 mmol), TBTA (16 mg, 0.0305 mmol), dichloromethane (100 mL). Filtration gave the macrocycle **M06** as a white solid (23% calculated from consumed diazide, 68.3 mg), R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol 95/05). ^{1}H NMR (DMSO-d_6,600 MHz) δ 9.52 (s, 2H ($H_{15,16}$)); 8.04-7.87 (m, 3H ($H_{21,22,27}$)); 7.65 (s, 1H (H_{36})); 7.34-7.32 (m, 2H ($H_{23,24}$)); 7.15-7.13 (m, 1H (H_{17})); 6.95-6.90 (m, 1H (H_{30})); 6.82-6.78 (m, 3H ($H_{6,12,28}$)); 6.65-6.59 (m, 4H ($H_{3,7,9,10}$)); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 158.0 (C_{29}); 152.3 (C_{13}); 148.0 (C_4); 148.0 (C_5); 144.2 (C_8); 144.2 (C_{35}); 143.8 (C_{18}); 141.2 (C_{20}); 139.8 (C_{31}); 131.8 (C_{11}); 131.5 (C_2); 124.2 (C_{23}); 123.2 (C_{17}); 122.5 (C_{25}); 120.9 (C_{27}); 119.2 (C_{21}); 119.0 (C_{10}); 118.8 (2C, $C_{6,7}$); 118.7 (C_{22}); 116.4 (C_9); 116.2 (C_{12}); 115.9 (C_{26}); 115.5 (C_3); 109.3 (C_{24}); 108.0 (C_{28}); 94.6 (C_{30}); 67.1 (C_{32}); 61.5 (C_{36}); 52.4 (C_{14}); 52.3 (C_1); 37.5 (C_{19}); 28.6 (C_{33}); 21.8 (C_{34}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{34}H_{30}N_7O_4$ 600.2359, found 600.2386. It has to be noted that the treatment of the filtrate led to a mixture of two regioisomers due to the asymmetry of the starting alkyne **17a**.

5-(Azidomethyl)-2-(2-hydroxy-4-((4-((2-((5-(triisopropylsilyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (21g):

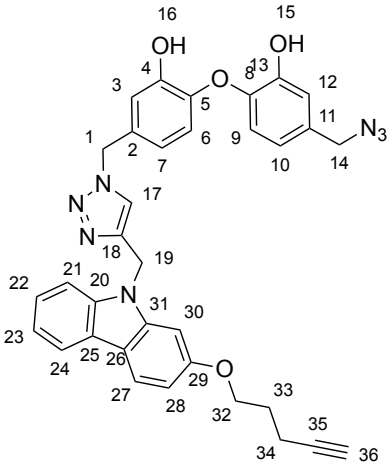


$C_{43}H_{49}N_7O_4Si$
755,36

General procedure B for CuAAC involving diazide **10e** (105.3 mg, 0.337 mmol, 1.1 eq), acetylenic **17b** (136.0 mg, 0.307 mmol, 1 eq), $Cu(ACN)_4PF_6$ (11.4 mg, 0.0307 mmol, 0.1 eq) and TBTA (16.3 mg, 0.0307 mmol, 0.1 eq) in dichloromethane (20 mL) during 1h. Water (20 mL) and dichloromethane (10 mL, 3 x

15 mL), water (20 mL), EDTA (30 mL) and brine (30 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 100/0 to 30/70) to give **21g** as a beige solid (45%, 103.3 mg), R_f = 0.45 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) δ 8.46 (s, 1H (H_{16})); 8.00-7.93 (m, 2H ($H_{21,27}$)); 7.79 (s, 1H (H_{17})); 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H (H_{24})); 7.33 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.0 Hz, 1H (H_{22})); 7.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 7.15 (ddd, *J* = 8.3, 7.4, 0.9 Hz, 1H (H_{23})); 7.02 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H (H_{ar})); 6.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H (H_{12})); 6.85 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.81 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H (H_{ar})); 6.76-6.68 (m, 2H (H_{ar})); 5.60 (s, 2H (H_{19})); 5.41 (s, 2H (H_1)); 4.33 (s, 2H (H_{14})); 4.24 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H (H_{32})); 2.53 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H (H_{34})); 2.08-2.03 (m, 2H (H_{33})); 1.10-1.04 (m, 21H ($H_{37,38}$)); ^{13}C NMR (Acetone, 75 MHz) δ 159.4 (C_{29}); 149.1 (C_4); 149.0 (C_{13}); 145.3 (C_5); 144.9 (C_8); 142.5 (C_{18}); 141.1 (C_{20}); 133.1 (C_{31}); 132.8 (2C, $C_{2,11}$); 125.1 (C_{23}); 123.9 (C_{25}); 123.1 (C_{17}); 121.6 (C_7); 120.7 (C_{27}); 120.3 (C_{21}); 120.0 (2C, $C_{6,10}$); 119.8 (C_{22}); 119.2 (C_9); 117.7 (C_{12}); 117.5 (C_{26}); 117.3 (C_3); 109.8 (C_{24}); 109.3 (C_{36}); 108.9 (C_{28}); 95.3 (C_{30}); 81.0 (C_{35}); 67.4 (C_{32}); 54.5 (C_{14}); 53.6 (C_1); 38.8 (C_{19}); 29.5 (C_{33}); 18.9 (C_{38}); 17.0 (C_{34}); 11.9 (C_{37}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{43}H_{49}N_7O_4Si$ 755.3615, found 755.3602.

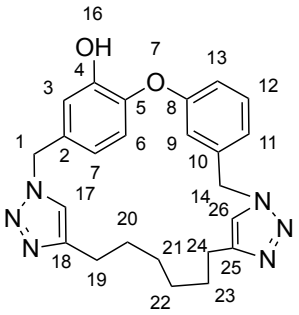
5-(Azidomethyl)-2-(2-hydroxy-4-((4-((2-(pent-4-yn-1-yloxy)-9*H*-carbazol-9-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (C06):



$C_{34}H_{29}N_7O_4$
599,23

General procedure for the TIPS-deprotection involving compound **21g** (96.9 mg, 0.128 mmol, 1 eq), tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in tetrahydrofuran), (1.3 mL, 1.28 mmol, 10 eq) in tetrahydrofuran (5.5 mL) and ethyl acetate (30 mL), water (30 mL) and brine (30 mL). Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate 70/30 to 30/70) gave acyclic compound **C06** as a white solid (72%, 55.6 mg), R_f = 0.21 (petroleum ether/ethyl acetate = 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.93 (dt, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H (H_{21})); 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H (H_{27})); 7.31-7.28 (m, 2H ($H_{23,24}$)), 7.21-7.15 (m, 1H (H_{22})); 7.05 (s, 1H (H_{17})); 6.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H (H_3)); 6.91 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H (H_{30})); 6.83-6.79 (m, 3H ($H_{6,12,28}$)); 6.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_9)); 6.71 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_{10})); 6.51 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H (H_7)); 5.44 (s, 2H (H_{19})); 5.14 (s, 2H (H_1)); 4.21 (s, 2H (H_{14})); 4.10 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H (H_{32})); 2.38 (td, *J* = 6.9, 2.4 Hz, 2H (H_{34})); 2.04-1.93 (m, 2H ($H_{33,36}$)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz) δ 158.5 (C_{29}); 147.8 (C_4); 147.8 (C_{13}); 144.6 (C_5); 144.6 (C_8); 143.6 (C_{18}); 141.3 (C_{20}); 140.0 (C_{31}); 132.3 (C_{11}); 130.5 (C_2); 124.6 (C_{23}); 123.2 (C_{25}); 121.1 (C_7); 121.9 (C_{17}); 120.2 (C_{27}); 119.9 (C_{21}); 119.6 (C_{10}); 119.5 (C_6); 118.9 (C_{22}); 118.5 (C_9); 117.0 (C_{12}); 116.9 (C_{26}); 116.7 (C_3); 108.4 (2C, $C_{24,28}$); 94.0 (C_{30}); 83.6 (C_{35}); 69.0 (C_{36}); 66.1 (C_{32}); 54.2 (C_{14}); 53.7 (C_1); 38.4 (C_{19}); 28.2 (C_{33}); 15.2 (C_{34}). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{34}H_{29}N_7O_4$ 599.2281, found 599.2297. Purity (HPLC): 96.1% at 290 nm (t_R = 5.601 min).

(1⁴*Z*,7⁴*Z*)-1¹*H*,7¹*H*-4-Oxa-1,7(1,4)-ditriazola-3(1,3),5(1,4)-dibenzenacyclotridecaphan-5²-ol (M02):



$C_{24}H_{26}N_6O_2$
430,21

General procedure B for CuAAC involving azidoalkyne **C02** (47.3 mg, 0.109 mmol), $Cu(ACN)_4PF_6$ (2 mg, 5.05 µmol), TBTA (2.8 mg, 5.05 µmol), dichloromethane (18 mL), water (20 mL) and dichloromethane (2 x 20 mL). Filtration gave macrocycle **M02** as a white solid whereas purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol 95/5) of the crude compound issued from the filtrate gave additional macrocycle **M02** (83%, 39 mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H (H_{12})); 7.26 (s, 1H (H_{17})); 7.19-7.18 (m, 2H ($H_{11,13}$)); 7.02 (s, 1H (H_{26})); 6.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H (H_3)); 6.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.55 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H (H_9)); 6.37 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H (H_7)); 5.44 (s, 2H (H_1)); 5.43 (s, 2H (H_{14})); 2.75 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H (H_{24})); 2.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_{19})); 1.63-1.58 (m, 2H (H_{23})); 1.41 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_{20})); 1.29 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H (H_{22})); 1.14 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H (H_{21})); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 156.4 (C_8); 149.2 (C_{18}); 148.7 (C_4); 147.8 (C_{25}); 144.1 (C_5); 136.7 (C_{10}); 131.8 (C_2); 130.8 (C_{12}); 124.1 (C_{13}); 121.2 (C_{26}); 120.6 (C_6); 120.1 (C_{17}); 118.4 (C_7); 118.1 (C_9); 116.9 (C_{11}); 115.5 (C_3); 53.6 (C_1); 53.2 (C_{14}); 29.5 (C_{19}); 28.1 (C_{24}); 27.9 (C_{20}); 27.5 (C_{23}); 25.0 (C_{21}); 24.9 (C_{22}). HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{24}H_{27}N_6O_2$ 431.2195, found 431.2198.

I.D.5 Macrocyclisation *in situ* assays

I.D.5.a Sample preparation

The protein, cofactor NAD^+, acyclic ligands were added to an Eppendorf in th order. The blanks were made in the same way, replacing the protein with PIPES buffer. The denatured protein was heated in a water bath for at least 2 minutes. The quantities introduced into the tests are listed in the table below.

Components	Molar mass (g/mol)	Stock concentration	volume drawn (µL)	Final concentration (µM)
InhA		5 µM	300	4.96
NAD^+	663,43	12 mM	1.25	49.6
Acyclic ligands	241,25	120 mM	1.25	496

Tableau 24 : Macrocyclisation *in situ* assays.

Each Eppendorf was agitated on a stirring wheel in a warm chamber at the desired temperature (37 °C) for 72 hours. At the end of thereaction, all the compounds were diluted in 300 µL of acetonitrile/methanol (50/50), vortexed for 10 s and centrifugated for 5 min at 10,000 x g before analysis by UHPLC -HRMS.
The analyses carried out are identical to those of KTGS

II Biology

II.A Transformation and production of InhA protein

II.A.1 Materials

Plasmid:

The *inhA* gene was optimized between the BamHI and NdeI restriction sites of the pET15b plasmid vector (GenScript) and was inserted for *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain using the GenSmart™ Codon optimization tool (Genscript).

Expression strain and kit:

- *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen)
- Kit thrombin Protease (Novagen)

Culture medium and solution:

- Enriched LB culture medium (SOC) comprising 2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$ and 10 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)
- Culture medium LB agar (Sigma Aldrich) prepared at 35 g/L in milliQ water
- Ampicillin solution at 100 mg/mL in milliQ water
- Isopropyl-β-D-galactosylpyranoside (IPTG) solution prepared at 1 M in milliQ water
- PBS buffer (EUROMEDEX)

II.A.2 Transformation and preparation stock solution

The transformation was carried out using the thermal shock method. 1 µL of plasmid solution (40 ng/mL) is added to 50 µL of competent BL21 (DE3) strain. This bacteria solution was placed on ice for one hour. After a thermal shock for approximately 50 seconds at 42 °C to allow the plasmid DNA to pass through the pores of the competent cell, this solution is filled up with pre heated enriched LB medium (SOC) (450 µL) placed at 37 °C (without antibiotics). The tube was then incubated for 1 h at 37 °C under agitation (250 rpm) and the culture (50 µL) was dispensed onto the LB-agar gel containing ampicillin (at a final concentration of 100 µg/mL). The plates were incubated overnight at 37 °C.

A pre-culture was then carried out by inoculating a single colony from the plate in LB medium (5 mL) and ampicillin (5 µL), incubated at 37 °C with agitation (270 rpm) for 2 h. The solution was then diluted in 1.5 L of LB medium and 1,5 mL of ampicillin (100 mg/mL) and incubated at 37 °C with agitation (170 rpm) during 4 h. Aliquots (1 mL) of this solution were complemented with glycerol (25% v/v final) and stored at -80 °C.

II.A.3 Bacterial culture and expression of InhA protein

Bacterial culture and protein expression were carried out in 4 distinct steps: 1) bacterial pre-culture, 2) bacterial culture, 3) induction of the InhA protein, 4) recovery of the bacteria and storage of the bacterial pooled material.

- In a 100 mL Erlenmeyer flask containing LB (20 mL), bacterial concentrate (1 mL) of the stock solution and ampicillin (20 µL) (final concentration 100 µg/mL) were added. The pre-culture was incubated overnight at 37 °C with agitation (180 rpm).

- 15 mL of pre-culture was then supplemented with 1.485 L of LB medium and 1.5 mL of ampicillin. The culture was incubated at 37 °C under agitation (140 rpm) until the optical density measured at 595 nm was between 0.6 and 0.8 indicating the growth phase of the bacteria.

- Once OD has been reached (2h30-4 h), 1.5 mL of a 1 M IPTG solution was added to the culture to trigger transcription of the *inhA* gene. The culture was then left at 37 °C under agitation (140 rpm) for a further 4 h.

- The culture was divided into 400 mL flasks and centrifuged at 4 °C for 10 minutes at 6,000 x *g*. The supernatant was removed from the tubes and each pellet was recovered with PBS buffer (25 mL) and placed in a 50 mL Falcon tube, which was then centrifuged at 4 °C at 7,000 x *g* for 30 min. The supernatant was removed again and the tubes were stored at -80 °C.

II.B Purification of InhA protein

II.B.1 Materials

Buffers:

The buffered solutions were prepared in milliQ water and adjusted to their respective pH.

Affinity chromatography

Conditioning and loading buffer (buffer A)	Elution buffer (buffer B)
20 mM Tris-HCl (3.73 g/L) 300 mM NaCl (17.5 g/L) 10 mM imidazole (0.68 g/L) pH = 7.9	20 mM Tris-HCl (3.73 g/L) 300 mM NaCl (17.5 g/L) 300 mM imidazole (20.41 g/L) pH = 7.9

Tableau 25 : buffers for affinity chromatography.

Buffer for size exclusion chromatography

Conditioning and loading buffer
30 mM PIPES (9.05 g/L) 150 mM NaCl (8.75 g/L) pH (4 °C) = 6.8

Tableau 26 : buffer for size exclusion chromatography.

Buffer and solutions for gel electrophoresis:

Denaturation buffer (1X)	Migration buffer	Coloration buffer	Decoloration buffer
Leammli sample buffer 4X (BIO-RAD) supplemented with β-mercaptoethanol (9:1)	25 mM Tris-HCl pH 6.8, 192 mM glycine, 0.1% SDS v/v, pH 8.5	50% ethanol, 10% acetic acid, 0.125 % Coomassie blue R250	30% ethanol, 10% acetic acid solution

Tableau 27 : Buffer and solutions for gel electrophoresis.

Kits and solutions:

- Page ruler prestained protein ladder 10-170K (Fermentas)
- Thrombin Protease, restriction grade (Novagen)

Equipment and instruments:

- Äkta purifier 10 (GE healthcare)
- DS-11 Spectrophotometer (DeNovix)
- HisTrap HP 1 mL (Cytiva)
- PD10 desalting column (Cytiva)
- HiLoad 16/60 Superdex 200 (BioToolomics)
- Vivaspin 20 and Vivaspin 2, cut off 10 kDa (Cytiva)

II.B.2 Protocols

The purification of the InhA protein was carried out in different stages, including an affinity column followed by a size exclusion column. The protein construction has a cleavable hexahistidine label. This tag was retained for enzymatic assays, whereas it was cleaved for crystallization assays. A desalting step followed by digestion with thrombin yields the InhA protein in its native form (with an extra Gly-Ser-His sequence at the N terminus resulting from cleavage of the tag) after a second pass through an affinity column.

II.B.2.a Affinity chromatography

The bacterial pellet was recovered in buffer A. The bacteria in suspension were then lysed with an Emulsiflex-C5 cell disruptor (Avestin). The lysate was then centrifuged at 4 °C at 25,000 x *g* for 50 min and the supernatant was transferred to a Falcon tube for injection onto the HisTrap column at a flow rate of 1 mL/mL using the following elution protocol.

Step	Volume (mL)	% buffer B
Washing	60 mL	0%
Isocratic	30 mL	12%
Gradient	25 mL	12% → 100%
Isocratic	15 mL	100%

Tableau 28 : elution protocol of affinity chromatography 1.

The chromatogram obtained during affinity chromatography 1 represents the absorbance at 280 nM as a function of the elution volume
Proteins not retained by the affinity column were eluted directly (flow-through) and wash in 12% buffer B was necessary to remove non-specific proteins (2 impurities). The protein of interest started to elute from the column at around 70% of buffer B. To check the protein purity following this first purification step, samples of the supernatant after cell lysis, flow-through, washing and elution were deposited on a gel for electrophoresis (Figure 127).



Figure 127 : chromatogram typically obtained during the first stage of affinity chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume. The green curve represents the gradient in imidazole concentration.

II.B.2.b Cleavage of the hexahistidine tag

The fractions corresponding to the protein of interest were collected, concentrated to obtain 2.5 mL and loaded onto a PD10 desalting column previously conditioned with the buffer for size exclusion chromatography. The protocol uses centrifugation or gravity to recover the reconditioned protein in a buffer that does not contain imidazole, which could interfere with the cleavage of the hexahistidine tag by thrombin. The quantities of the various components were adjusted according to the quantities in the table:

Components	Volume (mL)
10X Cleavage Buffer for thrombin 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1.5 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$	4.94 mL
Protein	9.88 mg (in 2.8 mL)
1/75 diluted thrombin	0.99 mL (13.2 µL of S0)
Water milliQ	40.7 mL
Total volume	49.4 mL

Tableau 29 : quantities of the various components for cleavage.

The mixture was left to stand at room temperature overnight.

II.B.2.c Affinity chromatography 2

The overnight incubated mixture was membrane filtered (0.2 µm), then loaded back onto the 1 mL HisTrap affinity column and eluted using the same program as above. The untagged protein was eluted with the 10 mM imidazole buffer wash (Figure 128).

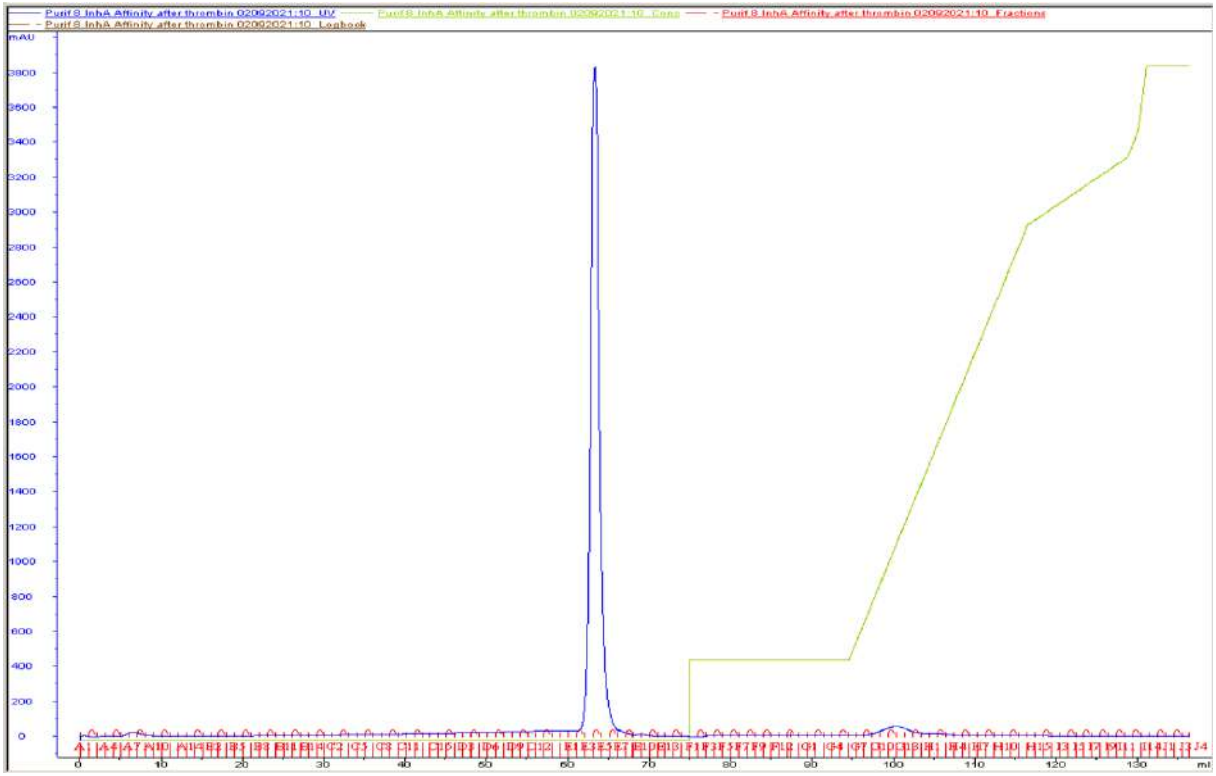


Figure 128 : chromatogram typically obtained during the second stage of affinity chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume. The green curve represents the gradient in imidazole concentration.

The chromatogram shows an almost complete cleavage efficiency by thrombin. A faint peak is present during the buffer gradient, which corresponds to uncleaved protein.

II.B.2.d Size exclusion chromatography

The fractions corresponding to the protein of interest were collected, concentrated to 2.0 mL and injected onto a size exclusion column Superdex 200 HiLoad 16/60 previously equilibrated with the buffer. The elution was carried out on 1.2 times the volume of the column at the recommended flow rate of 1.0 mL/min. The purified protein was released with an elution volume of 70 mL and the symmetry of the peak obtained indicates a homogeneous protein solution (Figure 129).

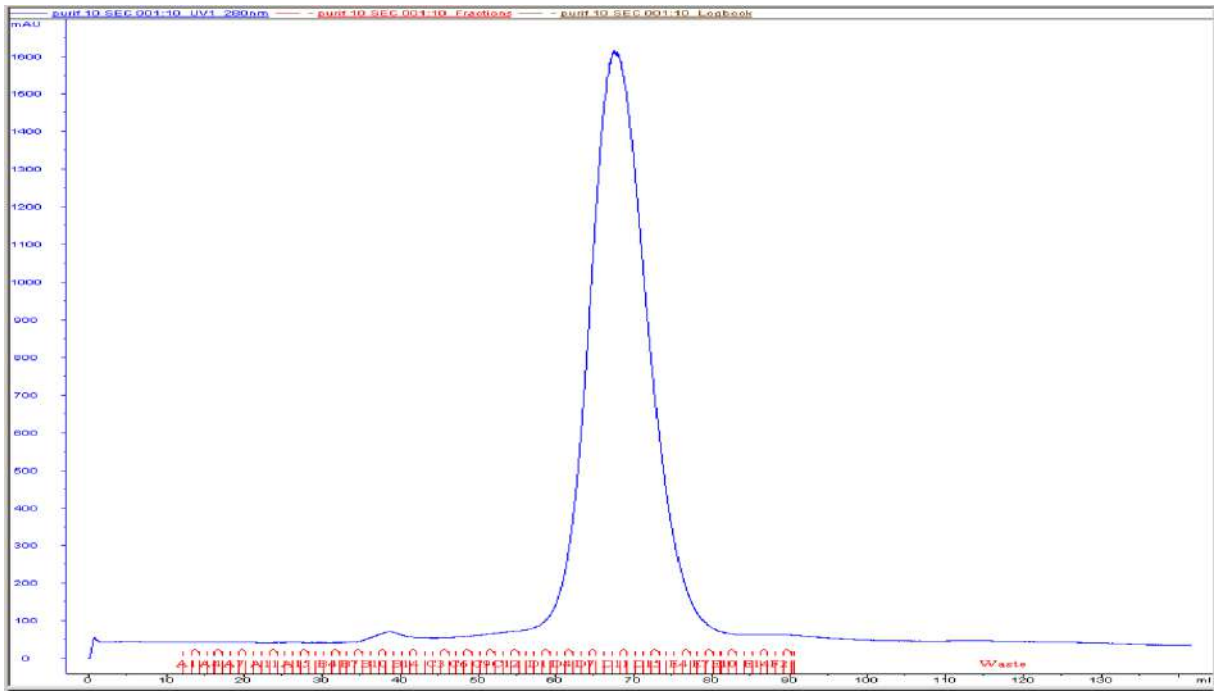


Figure 129 : chromatogram typically obtained during the size exclusion chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume.

The batch of protein with the histidine tag used for the enzymatic tests was conditioned to 5 µM, while those with the cleaved protein used for the crystallization assays were conditioned to around 400 µM. These two batches were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

II.B.2.e Electrophoresis gel

All the samples from the different purification stages were deposited on the same 12% acrylamide gel in order to monitor the purity of the protein.

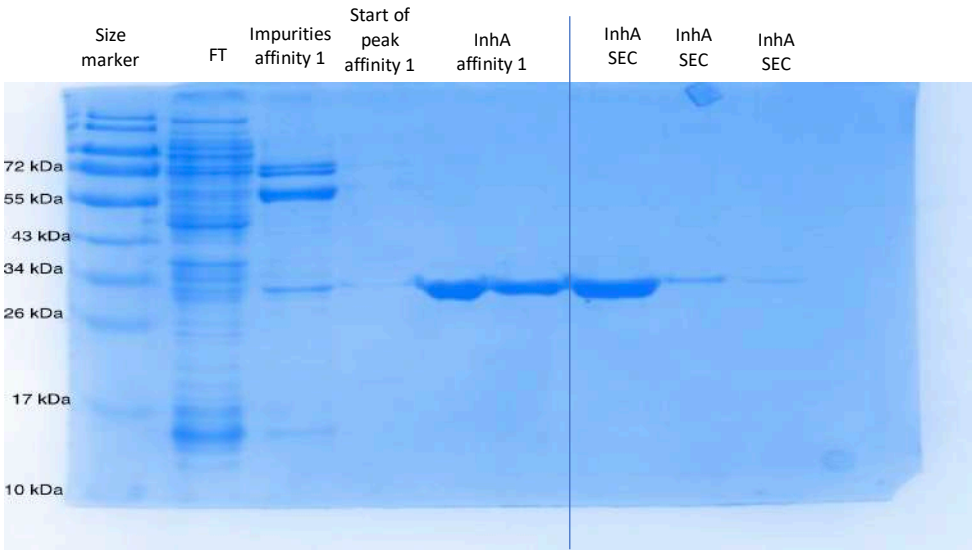


Figure 130 : electrophoresis gel of affinity chromatography 1 and steric exclusion chromatography samples.

We can see that the flow through contains a lot of impurities. The first two peaks in the first affinity column correspond to impurities whose molar mass is greater than InhA protein. The peak for the protein of interest shows no impurities. The fractions eluted in the SEC show a very high degree of purity (Figure 130).

II.C Evaluation of InhA enzyme inhibition

The protein used for the assays still contained the hexahistidine tag at the N terminus, which showed greater stability, enabling activity measurements to be taken throughout the day.

Buffers:

30 mM PIPES (9.05 g/L)
150 mM NaCl (8.75 g/L)
pH (4 °C) = 6,8

Stocks solution:

- 2-*trans*-dodecenoyl-coenzyme A substrate (DDCoA). A starting stock solution was prepared at approximately 5 mM (4.7 mg/mL) in PIPES buffer. Its concentration was checked by measuring the absorbance at 260 nM of a 1:50 diluted solution (ε_{260} = 22,600 $cm^{-1}.M^{-1}$), then the concentrated solution was diluted to give a 1 mM stock solution. 1 mL aliquots were prepared and stored at -18 °C.
- Cofactor NADH. A fresh solution was prepared at 5 mM (3.5 mg/mL) in PIPES buffer and its concentration was checked by measuring the absorbance at 340 nM of a 1:20 diluted solution (ε_{340} = 6,220 $cm^{-1}.M^{-1}$).
- InhA enzyme. Stock solution at approximately 5 µM in PIPES buffer
- Inhibitor. Solutions were prepared at 10 mM in DMSO for preliminary testing at a final concentration of 50 µM. Dilutions were made to determine the IC_{50}.

Components	Concentration of stock solution	Final concentration in the cuve	Volume to be added to the cuvette (µL)	
DDCoA	1 mM	50 µM	50	
NADH	5 mM	250 µM	50	
DMSO	/	/	45 (50) *	V_{tot} = 50 µL
Inhibitor	10 mM	50 µM	5 (0) *	
InhA enzyme	5 µM	100 nM	10	
PIPER buffer	/	/	840	

Tableau 30 : concentration and volumes for the enzymatic assay.

* Corresponding volumes for blank measurement

Protocol:

The PIPES buffer, DMSO, inhibitor, NADH cofactor and DDCoA substrate were added successively to a 1 mL vessel. The mixture was homogenized by pipetting and preincubated at 25 °C for 30 seconds. The InhA enzyme was then added and the mixture was homogenized by inverting. The oxidation of NADH to NAD^+ was monitored by measuring absorbance at 340 nM spectrophotometrically over 3 minutes.

Calculations:

For all monitored NADH oxidation, the slopes were recorded from the linear part of the curves. From these slopes, the inhibition percentage was calculated using the following formula:

$$\%\ activity = \frac{reference\ slope - inhibitor\ slope}{reference\ slope} \text{ x } 100$$

For the most active compounds, the median inhibitory concentration (IC_{50}) was evaluated using SciDAVis software. The percentage inhibition of the InhA protein (y) was plotted as a function of inhibitor concentration (x). At least six different concentrations of compound were used for this plot. Dose-response assays are generally characterized by a non-linear relationship. Its representation in a sigmoid curve whose equation of the non-linear regression model includes 4 parameters whose formula is as follows:

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

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

By solving this equation, the IC_{50} value (*C*) can be determined.

II.D Crystallization and structure determination

II.D.1 Materials

- 96-well crystallization plates (MRC Crystallization Plate - UV polymer MD11-00U-100)
- 24-well plates (Hampton Research)
- Mosquito (SPT Labtech)

II.D.2 Solutions

- MPD condition: 10% MPD (Sigma Aldrich), 100 mM Hepes, 50 mM sodium citrate, pH 7.5
- PEG condition: 14% PEG4000 (Sigma Aldrich), 100 mM ammonium acetate, 100 mM N-(2-acetamido)iminodiacetic acid (Fluka), 5% v/v DMSO, pH 6.8
- Cofactor (NAD^+/NADH) solutions were prepared in the size exclusion chromatography buffer at a final concentration of 100 mM.
- Stock solutions of ligands were prepared in DMSO at various concentrations (50, 100, 250, 500 mM) depending on their solubility.

II.D.3 Synchrotron facilities

- ALBA, Barcelone (beamline XALOC)
- ESRF, Grenoble (beamlines ID23-1, ID23-2, ID30b)
- SOLEIL, Saclay (beamline Proxima-1)

II.D.4 Protocols

II.D.4.a Co-crystallization

Crystallization assays were performed with untagged UnhA as it was known that the presence of the tag disturb its crystallization. Thawed 400 µM untagged InhA from size exclusion chromatography were incubated with cofactor on ice for 1 h. Most suitable concentrations for InhA were 4 and 8 mg/mL (140 and 280 µM, respectively) during the incubation states with a 1:10 InhA:cofactor molar ratio, representing final cofactor concentrations of 1.4 or 2.8 mM. After 15 min at room temperature, 0.5 µL of ligands (in DMSO) was added to 19.5 µL aliquots of InhA-cofactor solutions. These aliquots were left 2 h at room temperature following the addition of ligands. Meanwhile, 96-well MRC2 plates reservoirs were filled with 40 µL of crystallization solution (MPD or PEG condition). Drops were prepared by mixing 200 nL of the prepared protein aliquots and 200 nL of reservoir with the mosquito and stored at either 12 or 20 °C. Crystals generally appeared in a week in these conditions.

II.D.4.b Soaking

Soaking experiments were carried out for ligands that have not co-crystallized, or structures obtained but with no electron density corresponding to ligands. To carry out these soaking experiments, InhA protein crystals obtained either after incubation with cofactor only or cofactor and ligands were used. A crystallization solution prepared by complementing the crystallization solution (PEG condition) with cofactor, to prevent its back soaking from the crystals, was dispensed in reservoirs of a 24-well plate, with 500 µL in each reservoir. A soaking solution was prepared by adding 0.5 µL of ligand in DMSO to 19.5 µL of the previous solution. 1 µL of this soaking solution was deposited on a glass cover-slip. After the transfer of crystals, cover-slip was put upside down onto a well from the 24-well plate and sealed with grease. Various soaking times from few minutes to few hours were performed depending on the resistance of crystals.

II.D.4.c Crystal handling

At this stage, many crystal shapes were observed depending on the crystallization conditions and the presence/absence of ligands. With the change of crystallization conditions, i.e., from MPD to PEG, crystal habits changed to rectangular. In the presence of some ligands, it became more stick or pyramidal shape. Hence, the crystal habit can be a factor indicating the presence of ligand.

Crystals were cryo-protected with glycerol or paraffine to prevent damages during the freezing step in liquid nitrogen, then sent to synchrotron facilities. Throughout the diffraction experiments, paraffine was a considerably better cryo-protectant in the case of InhA and thus we finally opted to this condition.

II.D.4.d Data processing

Collected data sets were processed with XDS and the CCP4 software suite programs. The structures were solved by molecular replacement of the InhA structure. Refmac5 from the CCP4 software suite was used to refine the structure and generated tridimensional molecules on Grade2 (Global Phasing Ltd) were incorporated with Coot for model building.

II.E Inhibition of mycobacterial growth

II.E.1 Collaboration with IPBS

These analyses were carried out in collaboration with Dr Hédia Marrakchi from IPBS.

Colorimetric microassay based on the reduction of tetrazolium salts (MTT, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) to formazan by metabolically active mycobacteria was used to measure the susceptibility of Mtb H37Rv to each molecule by determining its minimum inhibitory concentration (MIC) as previously described[299]. Briefly, bacterial cells growing as surface pellicle were recovered from 100 mL culture in 7H9 broth (Middlebrook 7H9 broth base BD Difco) containing 0.2% glycerol (w/v), vortexed with 4 mm glass beads, suspended in 20 mL 7H9 broth-0.2% glycerol and centrifuged at 800 rpm to eliminate residual clumps. Serial twofold dilutions of each compound to be tested (stock solution at 1 or 10 mM in DMSO) were prepared in 100 µL 7H9 broth using 96-well flat bottom microplates (Nunc). 100 µl of mycobacterial suspension (OD 600 nm 0.1) in 7H9 broth were then added to each well. After 6 days incubation at 37 °C, MTT was added (50 µl at 1 mg/ml). After one-day incubation at 37 °C, 50 µL of 20% SDS solution were added to each well to solubilize formazan crystals and the OD of each well was measured at 570 nm (microplate reader Expert plus 96, ASYS HITECH, Austria). The MIC was determined as the lowest concentration of drug that inhibited bacterial growth from at least three independent experiments. The data were normalized to the value measured in untreated wells, after subtracting the background absorbance to each value.

II.E.2 Collaboration with Italy

The inhibition of mycobacterial growth was determined thanks to an international collaboration with Professor Maria Rosalia Pasca's team from the "Lazzaro Spallanzani" Department of Biology and Biotechnology in Pavia, Italy.

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

II.F Inhibition of mycolic acid biosynthesis

These analyses were carried out in collaboration with Professor Jana Korduláková from the Biochemistry Department of the Faculty of Natural Sciences at Comenius University in Bratislava, Slovakia.

Mtb H37Rv cells were cultivated in 7H9 broth with albumin-dextrose-catalase and 0.05% Tween 80 at 37 °C with shaking (120 rpm). **INH** and compounds **5g, 5i, 5o and 9l** (at final concentrations of 0, 1×, 5× and 25× their MICs, stock in DMSO) were added when the culture reached O.D (600 nm) ~ 0.2. At the same time, the ^{14}C-acetate (specific activity 110 mCi/mmol, ARC) was added at final concentration of 0.5 µCi/mL. After 24 h of static cultivation at 37 °C, the cultures were harvested and the fatty/mycolic acids were extracted from whole cells from 100 µL cultures and derivatized to corresponding methyl esters (FAME/MAME)[300]. Dried extracts were dissolved in 50 µL of chloroform/methanol (2:1, v/v) and 5 µL were loaded on TLC silica gel 60 F254 plates (Merck). FAME/MAME were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5, 3 runs) and visualized using an AmershamTM TyphoonTM Biomolecular Imager.
Lipids were extracted from cells from 100 µL cultures containing the same concentrations of compounds with 1.5 mL chloroform/methanol (2 :1 v/v) at 65 °C for 2 h. Then 150 µl of H_2O were added, the samples were mixed, centrifuged and bottom organic phases were removed and dried under N_2. Lipid extracts were subjected to biphasic Folch washing. Isolated lipids were dissolved in 30 µL of chloroform/methanol (2: 1, v/v) and 5 µL were loaded on the thin-layer chromatography (TLC) silica gel plates F254 (Merck). Lipids were separated in chloroform/methanol/water (20:4:0.5, v/v/v) and visualized using an AmershamTM TyphoonTM Biomolecular Imager.

II.G Analysis of sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG/InhA/HadABC

These analyses were carried out in collaboration with Professor Jana Korduláková from the Biochemistry Department of the Faculty of Natural Sciences at Comenius University in Bratislava, Slovakia.

InhA protein, HadABC complex and $KatG_{smeg}$ protein encoded by the gene *msmeg_6384* from *M. smegmatis* were overproduced in Mtb H37Ra using pMV261-*inhA*, pVV16-*hadABC* or pVV16-$katG_{smeg}$ constructs as already described[301–303]. Sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing InhA, HadABC

and $KatG_{smeg}$, as well as control strains carrying empty pMV261 and pVV16 vectors, to compounds **5g, 5i, 5o and 9l** was analyzed by drop dilution method. The culture of each strain was diluted to OD (600 nm) = 0.5. Then, 4 µl of 1x, 10x and 100x diluted samples were plated on 7H11-agar + 10 % oleic acid-albumin-dextrose-catalase containing various concentrations of tested compounds **5g** and **5i** (0.625, 1.25, 6.25, 12.5, 25 µM), **5o** (1.25, 2.5, 12.5, 25, 50 µM) and **9l** (0.3125, 0.625, 3.125, 6.25 and 12.5 µM). Plates were incubated for 18 days at 37 °C.

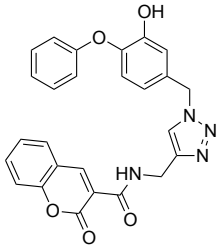
II.H Cell viability assays

These analyses were carried out in collaboration with Dr Sébastien Britton from IPBS.

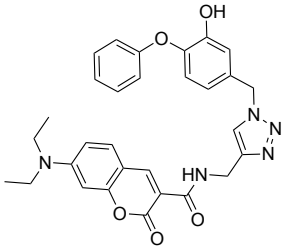
Human cell lines were grown at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator in DMEM high-glucose (Thermo Fisher Scientific) for HCT116 (Horizon Discovery), MEM containing Earle's salts, sodium pyruvate and non-essential amino acids for CACO2 (DSMZ), HepG2 (ATCC) and WI38hTERT (generous gift from Dr Olivier Sordet, CRCT, Toulouse). All media contained 10 % or 20 % (for CACO2) fetal bovine serum (Eurobio), 2.5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. For SRB assays, cells were plated in 96-well plates (Nunc Edge) at 1500, 2500, 9000 and 3500 cells/well respectively for HCT116, CACO2, HepG2 and WI38hTERT 24 h before treatment with the drug. Serial 2-fold dilutions were performed in medium and used to treat cells for 72 h. At the end of treatment, cells were fixed and stained with SRB as described[304]. After resuspending the dye in a 10 mM Tris-base solution, the OD at 490 nm of each well was measured (µQuant plate reader, Bio-tek) as a readout of the cell number. For calculation, background absorbance was subtracted to each value and the data were normalized to the value measured in untreated wells. Each point was measured in duplicate and the IC_{50} were computed from at least three independent experiments using the GraphPad Prism software to perform a non-linear regression to a four-parameter logistic curve (Inhibitor *vs* response; variable slope). An approximate value was provided when the curve did not fit the logistic curve.

STRUCTURE CHIMIQUE DES MOLÉCULES FINALES

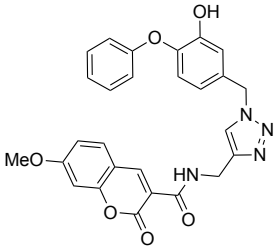
Composés finaux décrits dans le chapitre 1



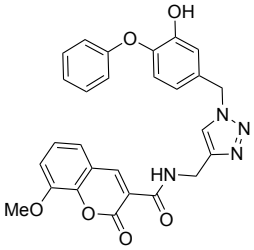
5a



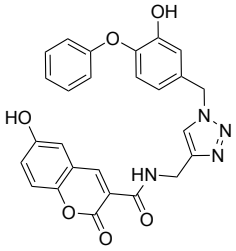
5b



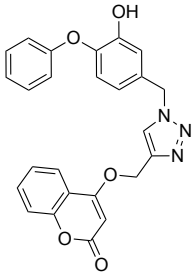
5c



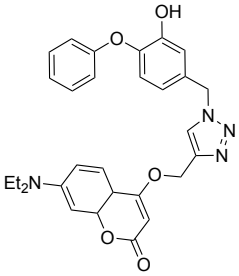
5d



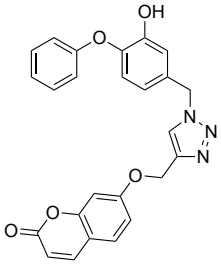
5e



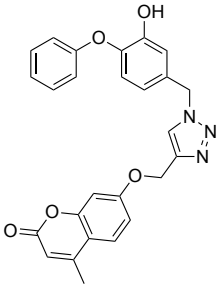
5f



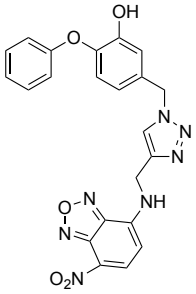
5g



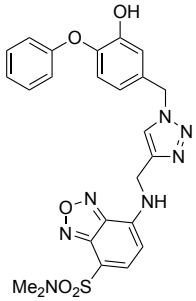
5h



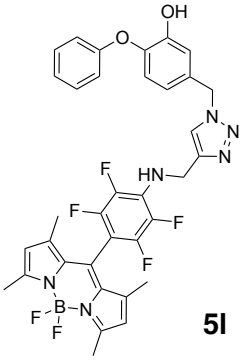
5i



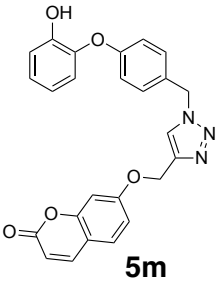
5j



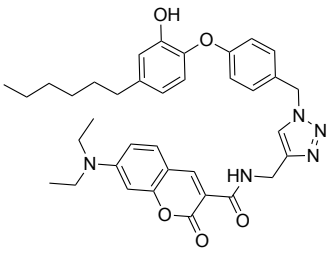
5k



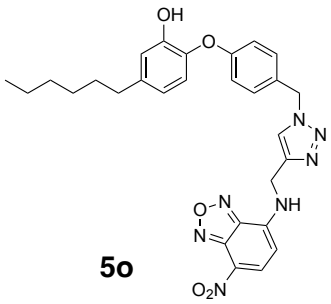
5l



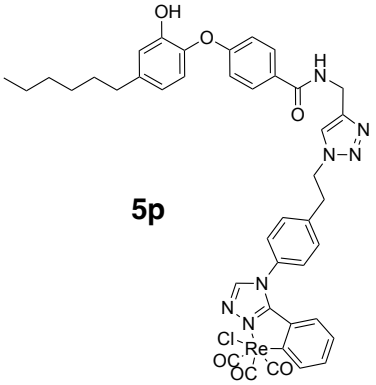
5m



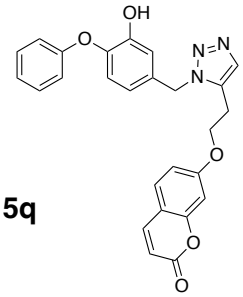
5n



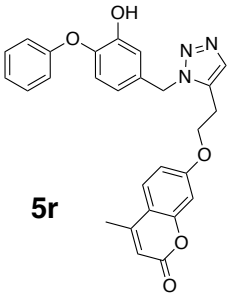
5o



5p

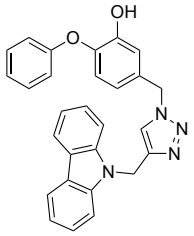


5q

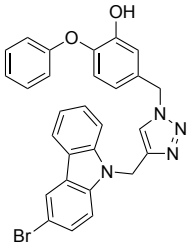


5r

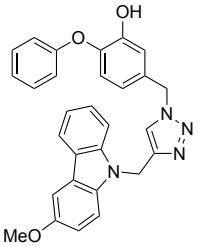
Composés finaux décrits dans le chapitre 2



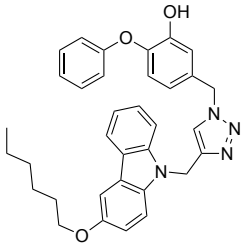
9a



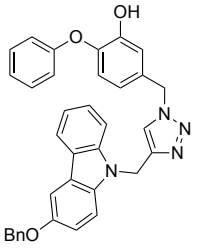
9b



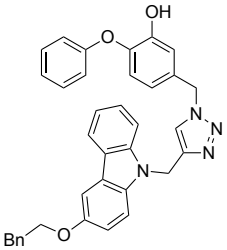
9c



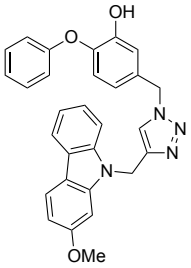
9d



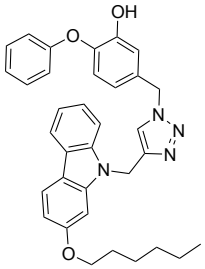
9e



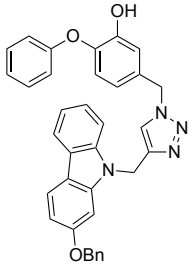
9f



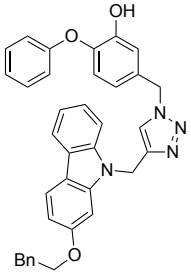
9g



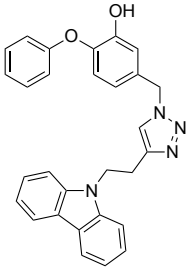
9h



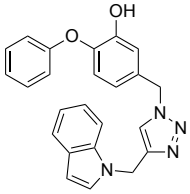
9i



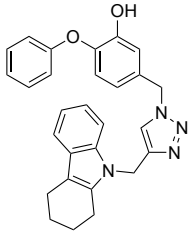
9j



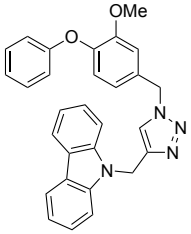
9k



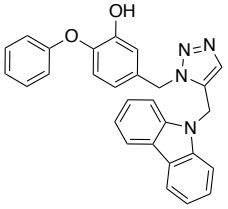
9l



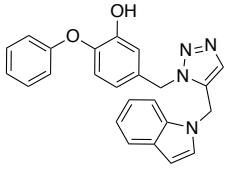
9m



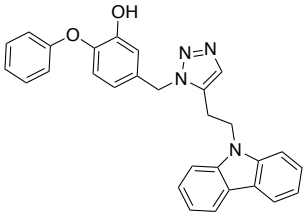
9n



9o

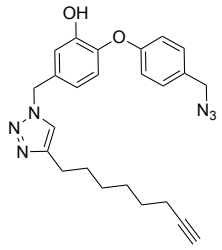


9p

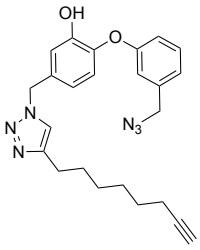


9q

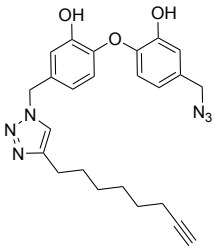
Composés finaux décrits dans le chapitre 4



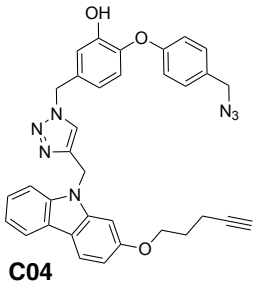
C01



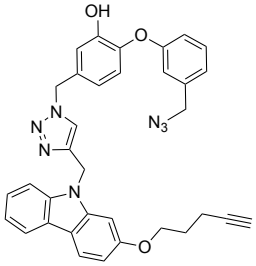
C02



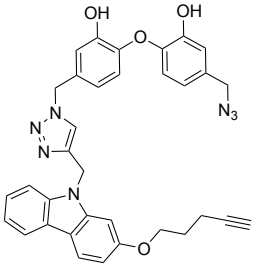
C03



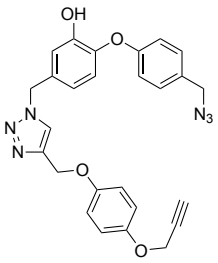
C04



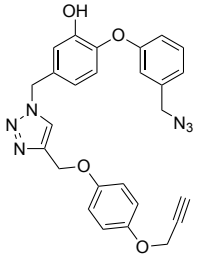
C05



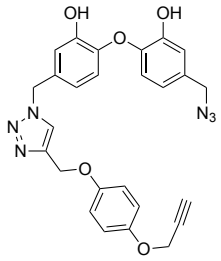
C06



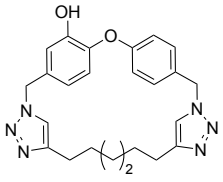
C07



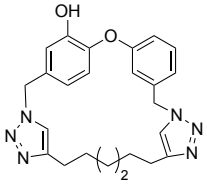
C08



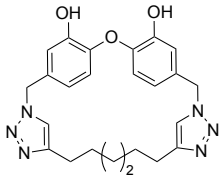
C09



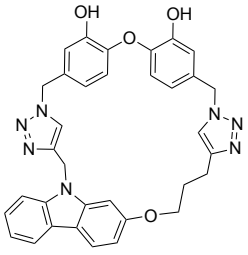
M01



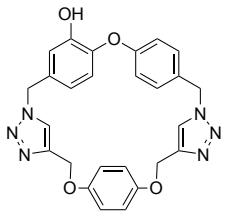
M02



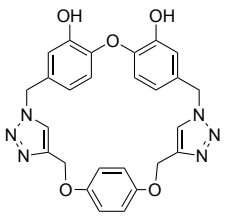
M03



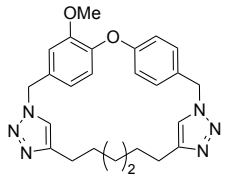
M06



M07



M09



M10

TABLES DES ILLUSTRATIONS

I Table des figures

Figure 1 : a. Colonies de Mtb. b. Visualisation de Mtb au microscope électronique. Source : commons.wikipedia. 17
Figure 2 : estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculose en 2021. Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS. 18
Figure 3 : a. Estimation du nombre de cas en France. b. Estimation du nombre de décès en France. Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS. 19
Figure 4 : estimation de l'incidence de la tuberculose MDR en 2021, pour les pays comptant au moins 1000 cas incidents. Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS. 20
Figure 5 : structures chimiques des quatre antibiotiques de première ligne et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 23
Figure 6 : réorganisation des antituberculeux. Recommandation de l'OMS en cas de tuberculose résistance de 2018. Source : rapport global de la tuberculose, 2018, OMS. 25
Figure 7 : structures chimiques et CMI des quatre antibiotiques du groupe A et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 26
Figure 8 : structures chimiques des trois antibiotiques du groupe B et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 27
Figure 9 : structures chimiques des dix antibiotiques du groupe C et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 28
*Figure 10 : visualisation de l'enveloppe de Mtb par microscopie électronique. AG : arabinogalactane, PG : peptidoglycane et CM : membrane plasmique. Source : Kalscheuer et al, Biochem. J. **2019**, 476 (14), 1995–2016. ..... 30*
*Figure 11 : enveloppe cellulaire de Mtb. LAMs : lipoarabinomannanes et PIMs : phospatidylinositol mannosides. Source : Dulberger et al, Nat. Rev. Microbiol. **2020**, 18 (1), 47–59. ..... 31*
*Figure 12 : a. structure générale des acides mycoliques, exemple d'acide α-mycolique. b. structures des autres sous-familles des acides mycoliques de Mtb. Source : Nataraj et al, Mol. Microbiol. **2015**, 98 (1), 7–16. ..... 32*
*Figure 13 : structure générale des pyrrolidines carboxamides, des pipérazines indoleformamides, des arylamides et des pyrazoles. Source : Campaniço et al, Eur. J. Med. Chem. **2018**, 150, 525–545. ..... 37*
*Figure 14 : structure générale des prolines. Source : Encinas et al, J. Med. Chem. **2014**, 57 (4), 1276–1288. ..... 37*
*Figure 15 : comparaison des interactions cible-ligand entre le HTS et le FBDD. Source : Bedwell et al, Chem. Biol. Drug Des. **2022**, 100 (4), 469–486. ..... 38*
*Figure 16 : représentation des méthodes d'évolution de fragments ; la croissance, la liaison ou la fusion. Source : Bedwell et al, Chem. Biol. Drug Des. **2022**, 100 (4), 469–486. ..... 38*
*Figure 17 : structures chimiques des cinq fragments sélectionnés. Source : Sabbah et al, J. Med. Chem. **2020**, 63 (9), 4749–4761. ..... 39*
*Figure 18 : stratégie de croissance des fragments et activités inhibitrices contre InhA de Mtb. Source : Sabbah et al, J. Med. Chem. **2020**, 63 (9), 4749–4761. ..... 40*
Figure 19 : a. Structure tertiaire de InhA. Forme apo (4TRM-E) colorée du bleu au rouge des extrémités N- à C-terminales. b. Structure tétramérique de InhA (4COD). Chaque protomère est représenté d'une couleur différente, le cofacteur NAD(H) est représenté en noir. 42
*Figure 20 : a. Comparaison de la forme apo (4TRM-E, en jaune et SBL en magenta) et forme fermée de la SBL (2X23-A, en vert et SBL en bleu). Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement. Les résidus Phe149, Tyr158 et Lys165 de la triade catalytique et Met161 sont respectivement en orange, vert, magenta et bleu et le cofacteur NAD(H) en noir. Pour des raisons de clarté, le ligand **TCU** n'est pas représenté. 43*
Figure 21 : structure de la surface de la protéine InhA. a. Surface de la structure 2X23-A. b. Surface de la structure 1ENY montrant le portail majeur. c. Surface de la structure 2X23-A montrant le portail mineur. 44
Figure 22 : comparaison de la forme apo (4TRM-E, en jaune et SBL en magenta) et forme holo (1ENY-A en vert et SBL en bleu). Les résidus Phe149 et Lys165 de la triade catalytique et Met161 sont respectivement en orange, vert, magenta et bleu. La Tyr158 de la forme apo est en jaune citron et le celle de la forme holo est en vert. Pour des raisons de clarté, le cofacteur NAD(H) n'est pas représenté. 45
*Figure 23 : structure du **THT** (trans-2-hexadécénoyl-(N-acétylcysteamine)-thioester). 46*
*Figure 24 : structure de InhA/NAD(H)/**THT** (1BVR-A en jaune, **THT** en bleu) avec le NAD(H) en noir et les chaînes latérales de la triade catalytique Phe149 (en orange), Tyr158 (en vert) et Lys165 (en rose). La SBL est représentée*

en orange. Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement. Les sites de liaison I, II et III sont indiqués. 47
Figure 25 : structures chimiques de l'isoniazide et des thionamides. 48
*Figure 26 : mécanisme d'action de l'isoniazide et des thionamides avec formation des adduits **INH/NADH**, **ETH/NADH** et **PTH/NADH**. 49*
*Figure 27 : structures de InhA en présence des adduits. a. Superposition des complexes INH/NADH (4TRO-A, **ZID**, en jaune), ETH/NADH (2H9I-A, **EAD**, en vert) et PTH/NADH (2TNJ-A, **P1H**, en rose). La SBL est en orange. b. Dans la structure 4TRO-A, concomitance de l'adduit et du cofacteur. Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose. 50*
*Figure 28 : structure chimique du **TCL**. 51*
*Figure 29 : structure de InhA en présence du **TCL** (1P45-B en jaune, **TCL** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 52*
*Figure 30 : structures chimiques des molécules **8PC**, **JPM**, **JPL** et **JPJ** et activités inhibitrices contre InhA de Mtb. 54*
*Figure 31 : structure de InhA en présence des dérivés du **TCL**. Superposition des complexes InhA/ NAD^+ /**8PC** (3FNE-A, **8PC**, en jaune), InhA/ NAD^+ /**JPM** (3FNF-A, **JPM**, en cyan), InhA/ NAD^+ /**JPL** (3FNG-A, **JPL**, en rose) et InhA/ NAD^+ /**JPJ** (3FNH-A, **JPJ**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 55*
*Figure 32 : structures chimiques des molécules **5PP**, **8PP**, **TCU**, **2TK**, **JUS**, **1TN** et **JUS** et activités inhibitrices contre InhA de Mtb. 56*
*Figure 33 : structure de InhA en présence des quatre dérivés du **TCL** portant une chaîne alkyle et montrant les meilleures IC_{50}. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/**5PP** (2B36-A et **5PP**, en jaune), InhA/NAD(H)/**8PP** (2B37-A, **8PS**, en cyan), InhA/NAD(H)/**2TK** (4OHU-A, **2TK**, en rose) et InhA/NAD(H)/**JUS** (4OIM-A, **JUS**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 57*
*Figure 34 : structures chimiques des molécules de **TCL** et ses dérivés avec un noyau triazole et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne inhibitrices (H37Rv). 58*
*Figure 35 : structures chimiques des molécules **53K**, **XT3**, **XT0**, **XT5**, **XTW** et **XTV** et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 58*
*Figure 36 : structure de InhA en présence des quatre dérivés du **TCL** portant un noyau triazole et montrant les meilleures IC_{50}. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/**53K** (5MTP-A et **53K**, en jaune), InhA/NAD(H)/XT0 (5MTR-A, **XT0**, en cyan), InhA/NAD(H)/**XTW** (5UGT-A, **XTW**, en rose) et InhA/NAD(H)/**XTV** (5UGU-A, **XTV**, en vert). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 59*
*Figure 37 : structure chimique de la molécule **1S5** et activité inhibitrice contre InhA de Mtb. 59*
*Figure 38 : structure du complexe InhA/NAD^+/**1S5** (4OXK-A en jaune et **1S5**, en cyan). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 60*
*Figure 39 : structure de InhA en présence des deux molécules de **TCL** (1P45-A en jaune, **TCL** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 61*
Figure 40 : structures chimiques des molécules bisbiaryléthers et activité inhibitrice contre InhA de Mtb. 61
*Figure 41 : structures chimiques des molécules de **TCL** et des macrocycles bisbiaryléthers et activités sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et contre InhA de Mtb. 62*
Figure 42 : structure chimique de la pyridomycine et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv). 62
*Figure 43 : structure de InhA en présence de la pyridomycine (4BII-D en jaune, **PYW** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose et la SBL est en orange. 63*
Figure 44 : structure chimique du GEQ (GENZ-10850) et activité inhibitrice contre InhA de Mtb. 63
*Figure 45 : structure de InhA en présence de la molécule de **GEQ** (1P44-A en jaune, **GEQ** en bleu). Les résidus de la triade catalytique sont représentés en vert, orange et rose, la SBL est en orange et le cofacteur NADH en noir. 64*
*Figure 46 : principe des sondes fluorescentes on/off. Source : Zhuang et al, Angew. Chem. Int. Ed. **2013**, 52 (31), 8124–8128. ..... 66*
*Figure 47 : objectif du projet mettant en pratique l'hybridation entre une molécule dérivée du **TCL** et des fluorophores pour former des composés aux propriétés fluorescentes visant la protéine. Mise en pratique des sondes on/off sur la protéine InhA. 67*

Figure 48 : structures chimiques de molécules coumarines et leurs activités in vivo et in vitro contre Mtb et InhA. Source : Srivastava et al, Eur. J. Med. Chem. ***2018****, 150, 268–281. Somagond et al, Arch. Pharm. (Weinheim)* ***2019****, 352 (10), e1900013.* 67
Figure 49 : structures chimiques des précurseurs ***1e****,* ***2e*** *et* ***3e*** *comportant le motif biaryléther et la molécule de* ***6PP*** *et ses activités in vitro et in vivo.* 69
Figure 50 : structure chimique de la coumarine. 69
Figure 51 : structures chimiques de l'ombelliférone et de la 4-hydroxycoumarine. 70
Figure 52 : structure chimique du noyau BODIPY. 70
Figure 53 : structures chimiques des hétérocycles NBD et DBD. 70
Figure 54 : structure chimique du complexe de rhénium avec les ligands pyta et atome de chlore. 71
Figure 55 : mécanisme de la déméthylation de l'anisole. Les énergies de Gibbs sont données en kcal/mol. Source : Sousa et al, Eur. J. Org. Chem. ***2013****, 2013 (35), 8048–8049.* 73
Figure 56 : a. Structure chimique de la sonde off/on à base de ***DBD*** *b. Spectre de fluorescence obtenu avec 1 µM de la sonde en absence (ligne en tirets) et présence (ligne continue) de 10 µM de hCAII dans le tampon PBS (1% DMSO) et après addition de 100 µM éthoxzolamide (EZA, ligne en pointillés),* λ_{ex} *= 430 nM. Source : Zhuang et al, Angew. Chem. Int. Ed.* ***2013****, 52 (31), 8124–8128.* 80
Figure 57 : courbes d'émission corrigées de ***5b*** *à 5 µM et variation de la concentration de la protéine InhA de 0 à 15 µM et* $[NAD^+]$ *= 49 µM.* 80
Figure 58 : courbes d'émission corrigées de ***5b*** *à 5 µM et variation de la concentration du cofacteur* NAD^+ *de 25 à 75 µM et [InhA] = 5 µM* 80
Figure 59 : photo de la cuve contenant le composé ***5b*** *(0,5 µM), la protéine InhA (5 µM) et le cofacteur* NAD^+ *(2 mM) dans le tampon PIPES.* 81
Figure 60 : courbes des évaluations antimycobactériennes des composés ***5g****,* ***5i****,* ***5o*** *et du contrôle positif la ciprofloxacine.* 82
Figure 61 : marquage métabolique des mycobactéries traitées avec les composés ***5i****,* ***5g*** *ou* ***5o****. a. Pour l'analyse de l'inhibition des lipides b. Pour l'analyse de l'inhibition des acides mycoliques.* ***5g*** *et* ***5i*** *: 1,25 µM (1x), 6,25 µM (5x), 31,25 µM (25x) et* ***5o*** *: 2,5 µM (1x), 12,5 µM (5x), 62,5 µM (25x). Abbréviations : FAME : Fatty Acid Methyl Esters, MAME : Mycolic Acid Methyl Esters, TDM : trehalose DiMycolates, TMM : Trehalose MonoMycolates, PE : PhosphotidylEthanolamine, CL : CadioLipin.* 83
Figure 62 : courbes des activités de cytotoxicité des composés ***5g****,* ***5i*** *et* ***5o****.* 84
Figure 63 : structure de InhA en présence de composés ***5a****,* ***5i*** *et* ***53K****. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/****5a*** *(8OTM-A et* ***5a*** *en jaune), InhA/NAD(H)/****5i*** *(8OTN-A,* ***5i*** *en cyan) et InhA/NAD(H)/****53K*** *(5MTP-A,* ***53K*** *en violet). Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir.* 85
Figure 64 : structure de InhA en présence du composé ***5a****. a. Superposition des 4 protomères de la structure. 8OTM-A en jaune,* ***5a*** *en gris, 8OTM-B,* ***5a*** *en marine, 8OTM-C,* ***5a*** *en jaune et 8OTM-D,* ***5a*** *en rose. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie coumarine des ligands dans les quatre molécules de l'unité asymétrique et interactions avec la Glu214.* 86
Figure 65 : structure de InhA en présence du composé ***5i****. a. Superposition des 4 protomères de la structure. 8OTN-A en jaune,* ***5i*** *en gris, 8OTN-B,* ***5i*** *en marine, 8OTN-C,* ***5i*** *en jaune et 8OTN-D,* ***5i*** *en rose. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie coumarine des ligands dans les quatre molécules de l'unité asymétrique.* 87
Figure 66 : représentation de la méthode déconstruction-reconstruction. Source : Chen et al, Drug Discov. Today ***2015****, 20 (1), 105–113.* 90
Figure 67 : objectifs de la méthode déconstruction-reconstruction. Superposition des complexes InhA/NAD(H)/ ***TCL*** *(1P45-B en gris,* ***TCL*** *en rose) et InhA/NAD(H)/****GEQ*** *(1P44-A,* ***GEQ*** *en jaune). Le cofacteur est représenté en noir et le résidu Tyr158 est en vert.* 91
Figure 68 : structures chimiques des précurseurs ***1e*** *et* ***1'e.*** 91
*Figure 69 : superposition des structures cristallographiques des ligands les fragments se liant dans le site de liaison II. InhA/NAD(H)/****TCL*** *(1P45-A et* ***TCL*** *en jaune), InhA/NAD(H)/****JVZ*** *(6R9W-A,* ***JVZ*** *en cyan) et InhA/NAD(H)/****GEQ*** *(1P44-A,* ***GEQ*** *en rose). Les flèches rouge et bleu indiquent l'entrée du site actif et le portail mineur respectivement Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD(H) en noir. Pour des raisons de clarté, le ligand* ***TCU*** *n'est pas représenté.* 94
Figure 70 : structures chimiques des molécules bisbiaryléthers et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et sur InhA de Mtb. 94

*Figure 71 : structures chimiques du **GEQ GENZ-10850** et du dérivé du **GEQ** et activité inhibitrice sur InhA de Mtb et sur la croissance mycobactérienne (H37Rv).* *95*
*Figure 72 : structures chimiques des précurseurs **carbazole**, **2-hydroxycarbazole**, **3-hydroxycarbazole**, **indole** et **1,2,3,4-tétracarbazole**.* *95*
*Figure 73 : marquage métabolique des mycobactéries traitées avec le composé **9l**. a. Analyse de la biosynthèse des lipides b. Analyse de la biosynthèse des acides mycoliques. **9l** : 0,625 µM (1x), 3,125 µM (5x), 15,625 µM (25x). Abbréviations : FAME : Fatty Acid Methyl Esters, MAME : Mycolic Acid Methyl Esters, TDM : trehalose DiMycolates, TMM : Trehalose MonoMycolates, PE : PhosphotidylEthanolamine, CL : CadioLipin.* *102*
*Figure 74 : courbe des activités de cytotoxicité du composé **9l.*** *103*
*Figure 75 : structure de InhA en présence du composé **9b**. a. Superposition des 4 protomères de la structure. Structure en jaune, **9b** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les fluctuations de la partie carbazole du ligand et interactions avec la Glu214.* *105*
*Figure 76 : principe des approches guidées par la cible, la DCC et la KTGS. Source : Bosc et al, J. Med. Chem. **2020**, 63 (8), 3817–3833.* *108*
Figure 77 : principe de la chimie click in situ. *109*
*Figure 78 : a. Représentation schématique du site actif de l'acétylcholinestérase. b. Fragments azoture et alcyne synthétisés. Source : https://www.bosterbio.com/acetylcholinesterase-activity-assay-kit-100-assays-ar4001-boster.html. Lewis et al, Angew. Chem. Int. Ed Engl. **2002**, 41 (6).* *110*
*Figure 79 : fragments azoture et alcyne (à gauche) et représentation du composé conçue par chimie click in situ dans le site actif (à droite). Source : Lewis et al, Angew. Chem. Int. Ed Engl. **2002**, 41 (6).* *110*
*Figure 80 : premier exemple de la ligation de Mannich par STAT5b. Source : Bosc et al, J. Med. Chem. **2020**, 63 (8), 3817–3833.* *111*
*Figure 81 : représentation du criblage par chimie click in situ effectué sur l'enzyme ERAP2. Source : Camberlein et al, Angew. Chem. Int. Ed Engl. **2022**, 61 (39), e202203560.* *111*
*Figure 82 : structure du **THT** (trans-2-hexadécénoyl-(N-acétylcystéamine)-thioester).* *112*
Figure 83 : représentation du principe de la chimie click in situ au sein de la protéine InhA et objectif principal du projet. *112*
Figure 84 : proportion du régioisomère 1,5-disubstitué a. à 20 °C b. à 30 °C c. à 37 °C aux différents temps : 24 h, 48 h et 72 h. *115*
Figure 85 : proportion du régioisomère 1,4-disubstitué a. à 20 °C b. à 30 °C c. à 37 °C aux différents temps : 24 h, 48 h et 72 h. *116*
Figure 86 : histogramme représentant les résultats de la condition I. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *117*
Figure 87 : histogramme représentant les résultats de la condition IV. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *118*
Figure 88 : histogramme représentant les résultats de la condition II. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *119*
Figure 89 : histogramme représentant les résultats de la condition III. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *120*
Figure 90 : histogramme représentant les résultats de la condition V. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *120*
Figure 91 : histogramme représentant les résultats de la condition VI avec les écart-types. Les valeurs sur l'axe des ordonnées indiquent l'intégration des pics chromatographiques correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de chaque molécule formée. Ceux qui ne sont pas présents sur les histogrammes indiquent qu'ils n'ont été observés dans aucun des essais (blanc, protéine ou protéine dénaturée). *121*

*Figure 92 : exemple de chromatogrammes obtenus lors des analyses de KTGS par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. a. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais avec la protéine. b. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais du blanc. c. Chromatogramme des produits obtenus dans les essais avec la protéine dénaturée. Les chiffres indiqués au-dessus des pics correspondent aux intégrations. Le premier pic observé (en bleu) représente la proportion du produit syn **9o** et le deuxième pic correspond au produit anti **9a**.....122*
*Figure 93 : structure chimique de la pyridomycine et des 2,1'-dihydropyridomycines et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et InhA (S94A), mutant conférant une résistance à l'**INH**. Source : Horlacher et al, ACS Med. Chem. Lett. **2013**, 4 (2), 264–268. Kienle et al, J. Med. Chem. **2020**, 63 (3), 1105–1131. .....126*
*Figure 94 : schéma basé sur la structure RX de InhA en complexe avec deux molécules de **TCL** (en rouge) (1P45-A, **TCL**) en présence du NAD(H) (gris). Représentation de l'enveloppe des macrocycles (en bleu). Source : Rodriguez et al, Bioorg Chem. **2020**, 95, 103498. .....127*
*Figure 95 : structures chimiques de la molécule de **TCL** et macrocycles bisbiaryléthers et activités inhibitrices sur la croissance mycobactérienne (H37Rv) et contre InhA de Mtb.....127*
Figure 96 : principe de la chimie click in situ intramoléculaire au sein du site actif de la protéine InhA. 128
*Figure 97 : structures chimiques des isomères obtenus lors de la réaction entre le diazoture **10e** et le dialcyne **17a**. 138*
*Figure 98 : structures chimiques des isomères possibles obtenus lors de la réaction entre le diazoture **13e** et le dialcyne **17a**. 139*
*Figure 99 : structure de InhA en présence du composé **C01**. a. Superposition des 6 protomères de la structure. Chaîne A, **C01** en gris, chaîne B, **C01** en marine, chaîne C, **C01** en jaune, chaîne D en jaune, **C01** en rose, chaîne E, **C01** en cyan et chaîne F, **C01** en hotpink. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 3 molécules de l'unité asymétrique. 144*
*Figure 100 : superposition de 3 protomères de la structure et de la molécule de **THT**. Chaîne B, **C01** en marine, chaîne C, **C01** en jaune, chaîne E, **C01** en cyan et InhA/NAD(H)/**THT** (1BVR-A, **THT** en vert). Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. 145*
*Figure 101 : superposition de 4 protomères de la structure de **C02** et de la molécule de **C01**. Chaîne A, **C02** en gris, chaîne B, **C02** en marine, chaîne C, **C02** en jaune, chaine D, **C02** en hotpink et chaîne E, **C01** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir.....146*
*Figure 102 : structure de InhA en présence du composé **C02**. a. Superposition des 5 protomères de la structure. Chaîne A, **C02** en gris, chaîne B, **C02** en marine, chaîne C, **C02** en jaune, chaîne D en jaune, **C02** en rose et chaîne F, **C02** en hotpink. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 3 molécules de l'unité asymétrique. c. rotation de 45° de l'image b. 147*
*Figure 103 : structure de InhA en présence du composé **C04**. a. Superposition des 2 protomères de la structure. Chaîne D, **C04** en rose et chaîne E, **C04** en cyan. Le résidu Tyr158 de la triade catalytique est représenté en vert, la SBL en orange et le cofacteur NAD^+ en noir. b. Vues avec zoom montrant les distances entre l'alcyne et l'azoture des ligands des 2 molécules de l'unité asymétrique. c. Vues avec zoom montrant la superposition des ligands **C04** et **9b**. 148*
*Figure 104 : structures chimiques des composés **C04** et **9h** et les activités inhibitrices contre InhA de Mtb. 149*
Figure 105 : exemple de dérivés ciblant les sites de liaison I, II et III de la protéine InhA. En noir, les fragments qui ciblent le site I, en rose, ceux ciblant le site II et en vert, les fragments qui ciblent le site III. 153
Figure 106 : représentation des plasmides. a. Plasmide vide. b. Plasmide contenant le gène codant pour InhA. Source : Genscript.....155
Figure 107 : représentation des techniques de transformation bactérienne a. le choc thermique b. L'électroporation. Source : https://moodle2.units.it/pluginfile.php/327420/mod_resource/content/0/TEC_CELL_SCHEDA_07_bacteria%20transformation.pdf 156
Figure 108 : a. Principe de la rétention de l'étiquette hexahistidine par les ions nickel b. Principe de la chromatographie d'affinité. Source : https://cube-biotech.com/knowledge/protein-purification/his-tag/ https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=116376&demande=desc 158
Figure 109 : a. Spectre d'absorption UV de NADH et NAD^+. b. Réaction d'oxydo-réduction entre le NADH et le NAD^+. 159
Figure 110 : structure du substrat 2-trans-dodécénoyl-CoA. Représentation en bleu la partie coenzyme A et en rose la partie acide 2-trans-dodécénoïque. 160

Figure 111 : diagramme de phases du processus de cristallogenèse. Source : Lafaye, C. Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : Les Trois Homologues à l'oxydoréductase de Thiol-Disulfure DsbA chez Neisseria Meningitidis. 2009. 162
Figure 112 : techniques de diffusion de vapeur, méthode de la goutte suspendue à gauche et méthode de la goutte assise à droite. Source : Gajdos, L. Neutron Diffraction for Deciphering Protein-carbohydrate Interactions Involved in Bacterial Infection, 2021. 163
Figure 113 : a. Photo du robot de cristallisation. b. Représentation d'une plaque 96 puits avec 2 cupules..... 164
Figure 114 : photos des cristaux de InhA en complexe avec les ligands a. Condition de cristallisation en MPD. b et c. Condition de cristallisation en PEG4000. 164
Figure 115 : a. Exemple de boucles utilisées (Actiloops commercialisées par la société Molecular Dimensions). b. Unipuck. Source : https://www.mitegen.com/product/universal-pucks-and-tools/. 166
Figure 116 : courbe du nombre de structures résolues dans la PDB par les différentes techniques : cryo-EM, RMN ou cristallographie des rayons X. Source : https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures... 167
Figure 117 : diagramme de Laue. Cristal de blende, ZnS, faisceau de rayons X parallèle à un axe d'ordre 4, d'après Friedrich, Knipping et Laue (Sitzungsberichte der Kgl. Bayer. Akad. Der Wiss. 1912). 168
Figure 118 : cliché 51 de la forme B de l'ADN obtenu par Rosalind Franklin et Raymond Gosling en 1952..... 169
Figure 119 : représentation des sept systèmes cristallins. Adapté des cours de 1ère, https://www.pichegru.net/es101_2#id_auto_10. 170
Figure 120 : spectre électromagnétique. Adapté de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_Spectrum_Properties_reflected.svg. 171
Figure 121 : a. Les interférences constructives suite à la diffraction des rayons X b. Cliché de diffraction. 171
Figure 122 : schéma décrivant le phénomène de diffraction selon la loi de Bragg. 172
Figure 123 : schéma général du synchrotron SOLEIL et d'une ligne de lumière. Source : https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/structure-dune-ligne-de-lumiere 173
Figure 124 : photos prises sur la ligne ID30B ESRF a. Bain d'azote liquide avec emplacement des UniPucks. b. Robot de transfert des cristaux c. Goniomètre. 173
Figure 125 : exemple de tableau de statistiques d'évaluation de la qualité d'un jeu de données de diffraction. 176
Figure 126 : cartes de densité électronique : 2Fo-Fc (en bleu) et Fo-Fc (en vert et en rouge) qui ont permis de construire le modèle. 179
Figure 127 : chromatogram typically obtained during the first stage of affinity chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume. The green curve represents the gradient in imidazole concentration. 260
Figure 128 : chromatogram typically obtained during the second stage of affinity chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume. The green curve represents the gradient in imidazole concentration. 261
Figure 129 : chromatogram typically obtained during the size exclusion chromatography of the InhA protein. The absorbance at 280 nm (blue) is plotted as a function of dilution volume. 262
Figure 130 : electrophoresis gel of affinity chromatography 1 and steric exclusion chromatography samples. 263

II Table des tableaux

Tableau 1 : chiffres clés des objectifs d'éradication de la tuberculose. Source : rapport global de la tuberculose, 2022, OMS. *20*
Tableau 2 : les candidats vaccins en essais cliniques. Les informations sont tirées du site du TBVI (https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/). *23*
Tableau 3 : classification des structures d'InhA à partir des données de la PDB. *41*
Tableau 4 : récapitulatif des structures cristallographiques d'InhA avec des ligands diaryléthers dans la PDB. ND : non déterminée. *53*
Figure : formation des 1,2,3-triazole par différentes méthodes *68*
*Tableau 5 : récapitulatif des activités enzymatiques et antimycobactériennes des molécules du projet SCREEN-It. * ou % à la concentration testée. ND : non déterminée / NI : non inhibiteur.* *79*
*Tableau 6 : sensibilité des souches de Mtb H37Ra surexprimant KatG, InhA et HadABC aux ligands **5g**, **5i** et **5o**.* *83*
Tableau 7 : résultats des activités de cytotoxicité des composés 5g, 5i et 5o. *84*
Tableau 8 : codes PDB des structures de complexes avec des composés se liant dans un site de liaison différent du TCL. En rose, sont représentés les fragments se liant à l'entrée du portail mineur et en vert ceux qui se lient à l'entrée du portail majeur. *93*
*Tableau 9 : récapitulatif des activités enzymatiques et antimycobactériennes des molécules finales de la série carbazole. * ou % à la concentration testée. ND : non déterminée. Les valeurs en gras représentent les meilleures activités.* *102*
Tableau 10 : sensibilité des souches Mtb H37Ra surexprimant KatG, InhA et HadABC au ligand 9l. *103*
*Tableau 11 : récapitulatif des activités enzymatiques des fragments utilisés pour la KTGS. * ou % à la concentration testée.* *116*
Tableau 12 : fragments mis en jeu lors des conditions I et IV de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ». *117*
Tableau 13 : fragments mis en jeu lors de la condition II de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ». *118*
Tableau 14 : fragments mis en jeu lors des conditions III et V de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ». *119*
Tableau 15 : fragments mis en jeu lors de la condition IV de KTGS. Les masses molaires sous les alcynes correspondent aux masses molaires exactes des produits « clickés ». *121*
*Tableau 16 : récapitulatif des activités enzymatiques des fragments et molécules finales obtenues par KTGS. * ou % à la concentration testée.* *123*
Tableau 17 : récapitulatif des essais de monoprotection du dialcyne 14a. *133*
Tableau 18 : récapitulatif des essais d'alkylation du 2-hydrocarbazole. *134*
Tableau 19 : structures chimiques des ligands acycliques et macrocycliques synthétisés dans le projet. *140*
*Tableau 20 : récapitulatif des activités inhibitrices des molécules acycliques et macrocycliques. * ou % à la concentration testée.* *142*
Tableau 21 : description des sept systèmes cristallins et des 14 réseaux de Bravais. *170*
Tableau 22 : statistiques des structures cristallographiques des complexes de InhA avec le NAD+ et les ligands 5a, 5i, 9l, C01, C02 et C04. ..... *181*
Tableau 23 : KTGS assays. *221*
Tableau 24 : Macrocyclisation in situ assays. *256*
Tableau 25 : buffers for affinity chromatography. *258*
Tableau 26 : buffer for size exclusion chromatography. *258*
Tableau 27 : Buffer and solutions for gel electrophoresis. *259*
Tableau 28 : elution protocol of affinity chromatography 1. ..... *259*
Tableau 29 : quantities of the various components for cleavage. *261*
Tableau 30 : concentration and volumes for the enzymatic assay. *264*

III Table des schémas

Schéma 1 : biosynthèse des acides mycoliques et les médicaments qui ciblent les enzymes impliquées. Les protéines régulées par les protéines Ser/Thr kinases sont indiquées par un astérisque (*). Les inhibiteurs connus et les étapes inhibées dans la voie sont indiqués (en rouge) : NCI : NCI-172033, TAC : thiacétazone, ISO : isoxyle, NAS : phénylsulfanylméthyl-[1,4]-naphtoquinones NAS-21 et NAS-91, INH : isoniazide, ETH : éthionamide, TRC : triclosan, PYR : pyridomycine , TLM : thiolactomycine, CCA : 4,6-diaryl-5,7-diméthylcoumarine, TP : composé comprenant un thiophène, AU1235, SQ109, BM212 et I3-AG85. Source : Marrakchi et al, Chem. Biol. ***2014****, 21 (1), 67–85.* *34*
Schéma 2 : réduction du substrat 2-trans-énoyl-ACP catalysée par InhA en présence du cofacteur NADH. *35*
Schéma 3 : représentation du mécanisme catalytique de la réduction de la double liaison du substrat par la protéine InhA et les acides aminés qui y contribuent. Source : Parikh et al, Biochemistry, ***1999****, 38(41), 13623-13634.* *36*
Schéma 4 : formation du noyau1,2,3-triazole par différentes méthodes. *68*
Schéma 5 : formation des précurseurs azotures ***1e****,* ***2e*** *et* ***3e****.* *72*
Schéma 6 : formation du biaryléther ***3a****.* *72*
Schéma 7 : synthèse des composés 3-carboxamide-coumarines ***4a-e****.* *73*
Schéma 8 : formation des précurseurs ***4f-i****.* *74*
Schéma 9 : formation du précurseur ***4p****.* *74*
Schéma 10 : synthèse de la première série des composés anti par CuAAC. *75*
Schéma 11 : synthèse des séries 2, 3 et 4 des composés anti par CuAAC. *76*
Schéma 12 : synthèse des composés syn par RuAAC. *76*
Schéma 13 : formation du précurseur biaryléther ***1'e.*** *96*
Schéma 14 : formation du ***3-hydroxycarbazole****.* *96*
Schéma 15 : formation des précurseurs carbazoles ***7d-j****.* *97*
Schéma 16 : formation des précurseurs propargylcarbazole ***8a-j****.* *97*
Schéma 17 : synthèse du précurseur homologue carbazole ***8k****.* *98*
Schéma 18 : synthèse des composés anti par CuAAC. *99*
Schéma 19 : synthèse des composés syn par RuAAC. *100*
Schéma 20 : représentation des fragments azoture et alcynes carbazoles et les produits potentiellement formés dans la KTGS. *114*
Schéma 21 : représentation des fragments et des composés formés lors de la KTGS. *115*
Schéma 22 : structures chimiques de la première et deuxième série des ligands acycliques étudiés. *129*
Schéma 23 : rétrosynthèse des ligands acycliques par mono chimie click. *129*
Schéma 24 : synthèse des précurseurs bis-azotures ***10e****,* ***11e*** *et* ***11'e****.* *130*
Schéma 25 : deuxième voie de rétrosynthèse des ligands acycliques par voie « non symétrique ». *131*
Schéma 26 : synthèse des précurseurs monoazotures ***12e*** *et* ***13e****.* *131*
Schéma 27 : mise au point de la substitution nucléophile aromatique pour la formation de ***12a****.* *132*
Schéma 28 : étape limitante de la préparation du monoazoture en position ortho. *132*
Schéma 29 : monoprotection du 1,9-décadiyne pour former ***14a****.* *133*
Schéma 30 : schéma réactionnel de formation des précurseurs bis-alcyne ***17a*** *et monoprotégé* ***17b****.* *134*
Schéma 31 : synthèse des précurseurs bis-alcyne ***18a*** *et monoprotégé* ***18b.*** *135*
Schéma 32 : synthèse des ligands acycliques ***C01****,* ***C02****,* ***C04****,* ***C05****,* ***C07*** *et* ***C08****.* *136*
Schéma 33 : synthèse des macrocycles ***M01****,* ***M07*** *et* ***M10****.* *137*
Schéma 34 : synthèse des ligands acycliques ***C03*** *et* ***C09*** *et des macrocycles* ***M03****,* ***M06*** *et* ***M09****.* *137*
Schéma 35 : synthèse du ligand acyclique ***C06****.* *138*
Schéma 36 : synthèse de ***M02*** *par CuAAC intramoléculaire de* ***C02****.* *138*
Schéma 37 : réduction du substrat 2-trans-énoyl-ACP catalysée par InhA en présence du cofacteur NADH. *159*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Hayman, J. Mycobacterium Ulcerans: An Infection from Jurassic Time? *The Lancet* **1984**, *324* (8410), 1015–1016. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91110-3.

(2) Kapur, V.; Whittam, T. S.; Musser, J. M. Is Mycobacterium Tuberculosis 15,000 Years Old? *J. Infect. Dis.* **1994**, *170* (5), 1348–1349. https://doi.org/10.1093/infdis/170.5.1348.

(3) Daniel, V. S.; Daniel, T. M. Old Testament Biblical References to Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **1999**, *29* (6), 1557–1558. https://doi.org/10.1086/313562.

(4) Grmek, M. D. *Les Maladies à l'aube de la civilisation occidentale : recherches sur la réalité pathologique dans le monde grec préhistorique, archaïque et classique / Mirko D. Grmek*; Médecine et sociétés; Payot. Paris, 1983.

(5) Cambau, E.; Drancourt, M. Steps towards the Discovery of Mycobacterium Tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (3), 196–201. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555.

(6) Daniel, T. M. René Théophile Hyacinthe Laënnec and the Founding of Pulmonary Medicine. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **2004**, *8* (5), 517–518.

(7) McCarthy, O. R. The Key to the Sanatoria. *J. R. Soc. Med.* **2001**, *94* (8), 413–417. https://doi.org/10.1177/014107680109400813.

(8) Villemin Jean Antoine. *Études sur la tuberculose ; preuves rationnelles et expérimentales de sa spécificité et de son inoculabilité.*; J.B Baillière; Paris, 1868.

(9) Koch, R. Die Ätiologie der Tuberkulose. **2010**. https://doi.org/10.25646/5088.

(10) Blevins, S. M.; Bronze, M. S. Robert Koch and the 'Golden Age' of Bacteriology. *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14* (9), e744–e751. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003.

(11) A. Calmette, C. Guérin. Vaccination Des Bovidés Contre La Tuberculose et Méthode Nouvelle de Prophylaxie de La Tuberculose Bovine. *Ann. Inst. Pasteur* **1924**, 371–398.

(12) Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A.; Hanssen, A. D.; Patel, R.; Osmon, D. R. The Classic: Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2005**, *437*, 3–6. https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe.

(13) Lehmann, J. Determination of Pathogenicity of Tubercle Bacilli by Their Intermediate Metabolism. *Lancet Lond. Engl.* **1946**, *1* (6384), 14. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(46)91184-1.

(14) Drain, D. J.; Martin, D. D.; Mitchell, B. W.; Seymour, D. E.; Spring, F. S. 318. 4-Aminosalicylic Acid and Its Derivatives. *J. Chem. Soc. Resumed* **1949**, No. 0, 1498–1503. https://doi.org/10.1039/JR9490001498.

(15) Yeager, R. L.; Munroe, W. G. C.; Dessau, F. I. Pyrazinamide (Aldinamide) in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65* (5), 523–546.

(16) Jones, D. S. The Health Care Experiments at Many Farms: The Navajo, Tuberculosis, and the Limits of Modern Medicine, 1952-1962. *Bull. Hist. Med.* **2002**, *76* (4), 749–790. https://doi.org/10.1353/bhm.2002.0186.

(17) Epstein, I. G.; Nair, K. G.; Boyd, L. J. Cycloserine, a New Antibiotic, in the Treatment of Human Pulmonary Tuberculosis: A Preliminary Report. *Antibiot. Med. Clin. Ther. N. Y. NY* **1955**, *1* (2), 80–93.

(18) Haegi, V. [On the treatment of pulmonary tuberculosis with ethionamide (Trecator)]. *Schweiz. Z. Tuberk. Pneumonol. Rev. Suisse Tuberc. Pneumonol. Riv. Svizzera Della Tubercolosi E Della Pneumonol.* **1961**, *18*, 218–226.

(19) Thomas, J. P.; Baughn, C. O.; Wilkinson, R. G.; Shepherd, R. G. A New Synthetic Compound with Antituberculous Activity in Mice: Ethambutol (Dextro-2,2'-(Ethylenediimino)-Di-l-Butanol). *Am. Rev. Respir. Dis.* **1961**, *83*, 891–893. https://doi.org/10.1164/arrd.1961.83.6.891.

(20) Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence. *Nature* **1998**, *393* (6685), 537–544. https://doi.org/10.1038/31159.

(21) Turner, R. D.; Chiu, C.; Churchyard, G. J.; Esmail, H.; Lewinsohn, D. M.; Gandhi, N. R.; Fennelly, K. P. Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216* (suppl_6), S636–S643. https://doi.org/10.1093/infdis/jix361.

(22) Sia, J. K.; Rengarajan, J. Immunology of Mycobacterium Tuberculosis Infections. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7* (4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.

(23) Jones, B. E.; Young, S. M. M.; Antoniskis, D.; Davidson, P. T.; Kramer, F.; Barnes, P. F. Relationship of the Manifestations of Tuberculosis to CD4 Cell Counts in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* **2012**. https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.5.1292.

(24) Sonnenberg, P.; Glynn, J. R.; Fielding, K.; Murray, J.; Godfrey-Faussett, P.; Shearer, S. How Soon after Infection with HIV Does the Risk of Tuberculosis Start to Increase? A Retrospective Cohort Study in South African Gold Miners. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191* (2), 150–158. https://doi.org/10.1086/426827.

(25) *Global Tuberculosis Report 2022*. https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022 (accessed 2023-04-19).

(26) Dheda, K.; Gumbo, T.; Maartens, G.; Dooley, K. E.; McNerney, R.; Murray, M.; Furin, J.; Nardell, E. A.; London, L.; Lessem, E.; Theron, G.; Helden, P. van; Niemann, S.; Merker, M.; Dowdy, D.; Rie, A. V.; Siu, G. K. H.; Pasipanodya, J. G.; Rodrigues, C.; Clark, T. G.; Sirgel, F. A.; Esmail, A.; Lin, H.-H.; Atre, S. R.; Schaaf, H. S.; Chang, K. C.; Lange, C.; Nahid, P.; Udwadia, Z. F.; Horsburgh, C. R.; Churchyard, G. J.; Menzies, D.; Hesseling, A. C.; Nuermberger, E.; McIlleron, H.; Fennelly, K. P.; Goemaere, E.; Jaramillo, E.; Low, M.; Jara, C. M.; Padayatchi, N.; Warren, R. M. The Epidemiology, Pathogenesis, Transmission, Diagnosis, and Management of Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant, and Incurable Tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* **2017**, *5* (4), 291–360. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30079-6.

(27) Zürcher, K.; Ballif, M.; Kiertiburanakul, S.; Chenal, H.; Yotebieng, M.; Grinsztejn, B.; Michael, D.; Sterling, T. R.; Ngonyani, K. M.; Mandalakas, A. M.; Egger, M.; Pettit, A. C.; Fenner, L. Diagnosis and Clinical Outcomes of Extrapulmonary Tuberculosis in Antiretroviral Therapy Programmes in Low- and Middle-income Countries: A Multicohort Study. *J. Int. AIDS Soc.* **2019**, *22* (9), e25392. https://doi.org/10.1002/jia2.25392.

(28) Ketata, W.; Rekik, W. K.; Ayadi, H.; Kammoun, S. Les tuberculoses extrapulmonaires. *Rev. Pneumol. Clin.* **2015**, *71* (2), 83–92. https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2014.04.001.

(29) Daffé, M.; Marrakchi, H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7* (4), 7.4.1. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018.

(30) Natarajan, A.; Beena, P. M.; Devnikar, A. V.; Mali, S. A Systemic Review on Tuberculosis. *Indian J. Tuberc.* **2020**, *67* (3), 295–311. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005.

(31) Gupta, R. S.; Lo, B.; Son, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 67. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067.

(32) Chuard, C.; Erard, V. Infections pulmonaires dues aux mycobactéries non tuberculeuses. *Rev. Médicale Suisse* **2011**, 5.

(33) Gagneux, S. Ecology and Evolution of Mycobacterium Tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16* (4), 202–213. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8.

(34) Kanabalan, R. D.; Lee, L. J.; Lee, T. Y.; Chong, P. P.; Hassan, L.; Ismail, R.; Chin, V. K. Human Tuberculosis and Mycobacterium Tuberculosis Complex: A Review on Genetic Diversity, Pathogenesis and Omics Approaches in Host Biomarkers Discovery. *Microbiol. Res.* **2021**, *246*, 126674. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674.

(35) Schmid, T. E.; Dollinger, G.; Hable, V.; Greubel, C.; Zlobinskaya, O.; Michalski, D.; Molls, M.; Röper, B. Relative Biological Effectiveness of Pulsed and Continuous 20 MeV Protons for Micronucleus Induction in 3D Human Reconstructed Skin Tissue. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2010**, *95* (1), 66–72. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.03.010.

(36) Brosch, R.; Guilhot, C. [Bovine tubercle bacilli: evolution associated with loss of transmission capacity in humans]. *Med. Sci. MS* **2015**, *31* (2), 123–126. https://doi.org/10.1051/medsci/20153102003.

(37) van Ingen, J.; Rahim, Z.; Mulder, A.; Boeree, M. J.; Simeone, R.; Brosch, R.; van Soolingen, D. Characterization of Mycobacterium Orygis as M. Tuberculosis Complex Subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18* (4), 653–655. https://doi.org/10.3201/eid1804.110888.

(38) Silva, M. L.; Cá, B.; Osório, N. S.; Rodrigues, P. N. S.; Maceiras, A. R.; Saraiva, M. Tuberculosis Caused by Mycobacterium Africanum: Knowns and Unknowns. *PLoS Pathog.* **2022**, *18* (5), e1010490. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010490.

(39) Jong, B. C. de; Antonio, M.; Gagneux, S. Mycobacterium Africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4* (9), e744. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744.

(40) Supply, P.; Brosch, R. The Biology and Epidemiology of Mycobacterium Canettii. *Strain Var. Mycobacterium Tuberc. Complex Its Role Biol. Epidemiol. Control* **2017**, 27–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_2.

(41) Magnus, K. Epidemiological Basis of Tuberculosis Eradication. *Bull. World Health Organ.* **1966**, *35* (4), 483–508.

(42) Hett, E. C.; Rubin, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: A Mycobacterial Perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2008**, *72* (1), 126–156, table of contents. https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-07.

(43) *Global tuberculosis report 2021*. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240037021 (accessed 2023-06-06).

(44) Dookie, N.; Rambaran, S.; Padayatchi, N.; Mahomed, S.; Naidoo, K. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: A Review on the Molecular Determinants of Resistance and Implications for Personalized Care. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73* (5), 1138–1151. https://doi.org/10.1093/jac/dkx506.

(45) Pai, M.; Behr, M. A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C. C.; Ginsberg, A.; Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; Menzies, D.; Raviglione, M. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2* (1), 1–23. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76.

(46) *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis: tests for TB infection*. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240056084 (accessed 2023-04-15).

(47) Mangtani, P.; Abubakar, I.; Ariti, C.; Beynon, R.; Pimpin, L.; Fine, P. E. M.; Rodrigues, L. C.; Smith, P. G.; Lipman, M.; Whiting, P. F.; Sterne, J. A. Protection by BCG Vaccine against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2014**, *58* (4), 470–480. https://doi.org/10.1093/cid/cit790.

(48) Roy, A.; Eisenhut, M.; Harris, R. J.; Rodrigues, L. C.; Sridhar, S.; Habermann, S.; Snell, L.; Mangtani, P.; Adetifa, I.; Lalvani, A.; Abubakar, I. Effect of BCG Vaccination against Mycobacterium Tuberculosis Infection in Children: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ* **2014**, *349*, g4643. https://doi.org/10.1136/bmj.g4643.

(49) Fatima, S.; Kumari, A.; Das, G.; Dwivedi, V. P. Tuberculosis Vaccine: A Journey from BCG to Present. *Life Sci.* **2020**, *252*, 117594. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117594.

(50) Lange, C.; Aaby, P.; Behr, M. A.; Donald, P. R.; Kaufmann, S. H. E.; Netea, M. G.; Mandalakas, A. M. 100 Years of Mycobacterium Bovis Bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22* (1), e2–e12. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00403-5.

(51) Pyrazinamide. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD), 2012.

(52) Pedelacq, J.-D.; Nguyen, M. C.; Terwilliger, T. C.; Mourey, L. A Comprehensive Review on Mycobacterium Tuberculosis Targets and Drug Development from a Structural Perspective. *Struct. Biol. Drug Discov.* **2020**, 545–566. https://doi.org/10.1002/9781118681121.ch23.

(53) Pyrazinamide. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **2008**, *88* (2), 141–144. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70021-0.

(54) Rastogi, N.; Labrousse, V.; Goh, K. S. In Vitro Activities of Fourteen Antimicrobial Agents against Drug Susceptible and Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis and Comparative Intracellular Activities against the Virulent H37Rv Strain in Human Macrophages. *Curr. Microbiol.* **1996**, *33* (3), 167–175. https://doi.org/10.1007/s002849900095.

(55) Isoniazid. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 112–116. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70011-8.

(56) Netgen. *La «deuxième vie» de la rifampicine*. Revue Médicale Suisse. https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-422/La-deuxieme-vie-de-la-rifampicine (accessed 2021-02-22).

(57) Rifampin. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **2008**, *88* (2), 151–154. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70024-6.

(58) Ethambutol. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **2008**, *88* (2), 102–105. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70008-8.

(59) WHO Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis, 2016 Update.

(60) Rodríguez, J. C.; Ruiz, M.; Climent, A.; Royo, G. In Vitro Activity of Four Fluoroquinolones against Mycobacterium Tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *17* (3), 229–231. https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00337-x.

(61) Woodcock, J. M.; Andrews, J. M.; Boswell, F. J.; Brenwald, N. P.; Wise, R. In Vitro Activity of BAY 12-8039, a New Fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (1), 101–106.

(62) Ginsburg, A. S.; Grosset, J. H.; Bishai, W. R. Fluoroquinolones, Tuberculosis, and Resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3* (7), 432–442. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00671-6.

(63) Drlica, K.; Hiasa, H.; Kerns, R.; Malik, M.; Mustaev, A.; Zhao, X. Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (11), 981–998. https://doi.org/10.2174/156802609789630947.

(64) Malik, M.; Drlica, K. Moxifloxacin Lethality against Mycobacterium Tuberculosis in the Presence and Absence of Chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (8), 2842–2844. https://doi.org/10.1128/AAC.00250-06.

(65) Peloquin, C. A.; Davies, G. R. The Treatment of Tuberculosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *110* (6), 1455–1466. https://doi.org/10.1002/cpt.2261.

(66) Louie, A.; Duncanson, B.; Myrick, J.; Maynard, M.; Nole, J.; Brown, D.; Schmidt, S.; Neely, M.; Scanga, C. A.; Peloquin, C.; Drusano, G. L. Activity of Moxifloxacin against Mycobacterium Tuberculosis in Acid Phase and

Nonreplicative-Persister Phenotype Phase in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (12), e01470-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01470-18.

(67) Niward, K.; Ängeby, K.; Chryssanthou, E.; Paues, J.; Bruchfeld, J.; Jureen, P.; Giske, C. G.; Kahlmeter, G.; Schön, T. Susceptibility Testing Breakpoints for Mycobacterium Tuberculosis Categorize Isolates with Resistance Mutations in gyrA as Susceptible to Fluoroquinolones: Implications for MDR-TB Treatment and the Definition of XDR-TB. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (2), 333–338. https://doi.org/10.1093/jac/dkv353.

(68) Jantarabenjakul, W.; Suntarattiwong, P.; Wacharachaisurapol, N.; Ayudhya, P. S. N.; Phaisal, W.; Tawan, M.; Moonwong, J.; Sudjaritruk, T.; Chariyavilaskul, P.; Puthanakit, T. Pharmacokinetics and Safety of WHO-Recommended Dosage and Higher Dosage of Levofloxacin for Tuberculosis Treatment in Children: A Pilot Study. *Int. J. Infect. Dis.* **2022**, *122*, 603–608. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.029.

(69) Ignatius, E. H.; Dooley, K. E. New Drugs for the Treatment of Tuberculosis. *Clin. Chest Med.* **2019**, *40* (4), 811–827. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.08.001.

(70) Degiacomi, G.; Sammartino, J. C.; Sinigiani, V.; Marra, P.; Urbani, A.; Pasca, M. R. In Vitro Study of Bedaquiline Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Multi-Drug Resistant Clinical Isolates. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.

(71) Perry, C. M.; Jarvis, B. Linezolid: A Review of Its Use in the Management of Serious Gram-Positive Infections. *Drugs* **2001**, *61* (4), 525–551. https://doi.org/10.2165/00003495-200161040-00008.

(72) Alcalá, L.; Ruiz-Serrano, M. J.; Pérez-Fernández Turégano, C.; García De Viedma, D.; Díaz-Infantes, M.; Marín-Arriaza, M.; Bouza, E. In Vitro Activities of Linezolid against Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis That Are Susceptible or Resistant to First-Line Antituberculous Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47* (1), 416–417. https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.416-417.2003.

(73) Hashemian, S. M. R.; Farhadi, T.; Ganjparvar, M. Linezolid: A Review of Its Properties, Function, and Use in Critical Care. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 1759–1767. https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515.

(74) Azimi, T.; Khoshnood, S.; Asadi, A.; Heidary, M.; Mahmoudi, H.; Kaviar, V. H.; Hallajzadeh, M.; Nasiri, M. J. Linezolid Resistance in Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*.

(75) Linezolid. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 122–125. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70014-3.

(76) Barry, V. C. Anti-Tubercular Compounds. *Nature* **1946**, *158* (4024), 863–865. https://doi.org/10.1038/158863a0.

(77) Clofazimine. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **2008**, *88* (2), 96–99. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70006-4.

(78) Stadler, J. A. M.; Maartens, G.; Meintjes, G.; Wasserman, S. Clofazimine for the Treatment of Tuberculosis. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1100488. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1100488.

(79) Cholo, M. C.; Steel, H. C.; Fourie, P. B.; Germishuizen, W. A.; Anderson, R. Clofazimine: Current Status and Future Prospects. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (2), 290–298. https://doi.org/10.1093/jac/dkr444.

(80) Cycloserine. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 100–101. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70007-6.

(81) Chirehwa, M. T.; Court, R.; de Kock, M.; Wiesner, L.; de Vries, N.; Harding, J.; Gumbo, T.; Maartens, G.; Warren, R.; Denti, P.; McIlleron, H. Population Pharmacokinetics of Cycloserine and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Target Attainment in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients Dosed with Terizidone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (11), e01381-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01381-20.

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

(83) Liu, Y.; Matsumoto, M.; Ishida, H.; Ohguro, K.; Yoshitake, M.; Gupta, R.; Geiter, L.; Hafkin, J. Delamanid: From Discovery to Its Use for Pulmonary Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). *Tuberc. Edinb. Scotl.* **2018**, *111*, 20–30. https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.008.

(84) Schena, E.; Nedialkova, L.; Borroni, E.; Battaglia, S.; Cabibbe, A. M.; Niemann, S.; Utpatel, C.; Merker, M.; Trovato, A.; Hofmann-Thiel, S.; Hoffmann, H.; Cirillo, D. M. Delamanid Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis Using the Resazurin Microtitre Assay and the BACTEC™ MGIT™ 960 System. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (6), 1532–1539. https://doi.org/10.1093/jac/dkw044.

(85) Nicolau, D. P. Carbapenems: A Potent Class of Antibiotics. *Expert Opin. Pharmacother.* **2008**, *9* (1), 23–37. https://doi.org/10.1517/14656566.9.1.23.

(86) Solapure, S.; Dinesh, N.; Shandil, R.; Ramachandran, V.; Sharma, S.; Bhattacharjee, D.; Ganguly, S.; Reddy, J.; Ahuja, V.; Panduga, V.; Parab, M.; Vishwas, K. G.; Kumar, N.; Balganesh, M.; Balasubramanian, V. In Vitro and In Vivo Efficacy of β-Lactams against Replicating and Slowly Growing/Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (6), 2506–2510. https://doi.org/10.1128/AAC.00023-13.

(87) Hugonnet, J.-E.; Tremblay, L. W.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E.; Blanchard, J. S. Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **2009**, *323* (5918), 1215–1218. https://doi.org/10.1126/science.1167498.

(88) England, K.; Boshoff, H. I. M.; Arora, K.; Weiner, D.; Dayao, E.; Schimel, D.; Via, L. E.; Barry, C. E. Meropenem-Clavulanic Acid Shows Activity against Mycobacterium Tuberculosis In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (6), 3384–3387. https://doi.org/10.1128/AAC.05690-11.

(89) Amikacin. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 87–88. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70003-9.

(90) Streptomycin. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 162–163. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70027-1.

(91) Ethionamide. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 106–108. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70009-X.

(92) Prothionamide. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 139–140. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70020-9.

(93) Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Mechanism of Thioamide Drug Action against Tuberculosis and Leprosy. *J. Exp. Med.* **2007**, *204* (1), 73–78. https://doi.org/10.1084/jem.20062100.

(94) Para-Aminosalicylic Acid. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 137–138. https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70019-2.

(95) Zheng, J.; Rubin, E. J.; Bifani, P.; Mathys, V.; Lim, V.; Au, M.; Jang, J.; Nam, J.; Dick, T.; Walker, J. R.; Pethe, K.; Camacho, L. R. Para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in Mycobacterium Tuberculosis♦. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (32), 23447–23456. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475798.

(96) Zhang, T.; Jiang, G.; Wen, S.; Huo, F.; Wang, F.; Huang, H.; Pang, Y. Para-Aminosalicylic Acid Increases the Susceptibility to Isoniazid in Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 825–829. https://doi.org/10.2147/IDR.S200697.

(97) Hoffner, S. E.; Svenson, S. B. Studies on the Role of the Mycobacterial Cell Envelope in the Multiple Drug Resistance of Atypical Mycobacteria. *Res. Microbiol.* **1991**, *142* (4), 448–451. https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90119-u.

(98) Daffé, M.; Draper, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to Their Pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **1998**, *39*, 131–203. https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60016-8.

(99) Lee, R. E.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. Mycobacterium Tuberculosis Cell Envelope. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1996**, *215*, 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80166-2_1.

(100) Daffé, M.; Etienne, G. The Capsule of Mycobacterium Tuberculosis and Its Implications for Pathogenicity. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **1999**, *79* (3), 153–169. https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0200.

(101) Kalscheuer, R.; Palacios, A.; Anso, I.; Cifuente, J.; Anguita, J.; Jacobs, W. R.; Guerin, M. E.; Prados-Rosales, R. The Mycobacterium Tuberculosis Capsule: A Cell Structure with Key Implications in Pathogenesis. *Biochem. J.* **2019**, *476* (14), 1995–2016. https://doi.org/10.1042/BCJ20190324.

(102) Daffé, M.; Draper, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to Their Pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **1998**, *39*, 131–203. https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60016-8.

(103) Touchette, M. H.; Seeliger, J. C. Transport of Outer Membrane Lipids in Mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862* (11), 1340–1354. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.005.

(104) Jackson, M. The Mycobacterial Cell Envelope—Lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (10), a021105. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105.

(105) Dulberger, C. L.; Rubin, E. J.; Boutte, C. C. The Mycobacterial Cell Envelope — a Moving Target. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18* (1), 47–59. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7.

(106) Vilchèze, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (7), 2278. https://doi.org/10.3390/app10072278.

(107) Stodola, F. H.; Lesuk, A.; Anderson, R. J. The Chemistry of the Lipids of Tubercle Bacilli: Liv. the Isolation and Properties of Mycolic Acid. *J. Biol. Chem.* **1938**, *126* (2), 505–513. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73857-X.

(108) Asselineau, J.; Lederer, E. Structure of the Mycolic Acids of Mycobacteria. *Nature* **1950**, *166* (4227), 782–783. https://doi.org/10.1038/166782a0.

(109) Marrakchi, H.; Lanéelle, M.-A.; Daffé, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (1), 67–85. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011.

(110) Abrahams, K. A.; Besra, G. S. Mycobacterial Cell Wall Biosynthesis: A Multifaceted Antibiotic Target. *Parasitology* **2018**, *145* (2), 116–133. https://doi.org/10.1017/S0031182016002377.

(111) Nataraj, V.; Varela, C.; Javid, A.; Singh, A.; Besra, G. S.; Bhatt, A. Mycolic Acids: Deciphering and Targeting the Achilles' Heel of the Tubercle Bacillus. *Mol. Microbiol.* **2015**, *98* (1), 7–16. https://doi.org/10.1111/mmi.13101.

(112) Cronan, J. E.; Waldrop, G. L. Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases. *Prog. Lipid Res.* **2002**, *41* (5), 407–435. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00007-3.

(113) Domenech, P.; Reed, M. B.; Barry, C. E. Contribution of the Mycobacterium Tuberculosis MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. *Infect. Immun.* **2005**, *73* (6), 3492–3501. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005.

(114) Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R. inhA, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1994**, *263* (5144), 227–230. https://doi.org/10.1126/science.8284673.

(115) Quemard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R. Jr.; Blanchard, J. S. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in Mycobacterium Tuberculosis. *Biochemistry* **1995**, *34* (26), 8235–8241. https://doi.org/10.1021/bi00026a004.

(116) de Ávila, M. B.; Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F. Structural Basis for Inhibition of Enoyl-[Acyl Carrier Protein] Reductase (InhA) from Mycobacterium Tuberculosis. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27* (5), 745–759. https://doi.org/10.2174/0929867326666181203125229.

(117) Bell, A. F.; Stratton, C. F.; Zhang, X.; Novichenok, P.; Jaye, A. A.; Nair, P. A.; Parikh, S.; Rawat, R.; Tonge, P. J. Evidence from Raman Spectroscopy That InhA, the Mycobacterial Enoyl Reductase, Modulates the Conformation of the NADH Cofactor to Promote Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (20), 6425–6431. https://doi.org/10.1021/ja068219m.

(118) Chollet, A.; Maveyraud, L.; Lherbet, C.; Bernardes-Génisson, V. An Overview on Crystal Structures of InhA Protein: Apo-Form, in Complex with Its Natural Ligands and Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 318–343. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047.

(119) Rozwarski, D. A.; Vilchèze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C. Crystal Structure of the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD+ and a C16 Fatty Acyl Substrate*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15582–15589. https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15582.

(120) Parikh, S.; Moynihan, D. P.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *Biochemistry* **1999**, *38* (41), 13623–13634. https://doi.org/10.1021/bi990529c.

(121) Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium Tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18* (1), 81–101. https://doi.org/10.1128/cmr.18.1.81-101.2005.

(122) Liu, B.; Li, S.; Hu, J. Technological Advances in High-Throughput Screening. *Am. J. Pharmacogenomics* **2004**, *4* (4), 263–276. https://doi.org/10.2165/00129785-200404040-00006.

(123) He, X.; Alian, A.; Ortiz de Montellano, P. R. Inhibition of the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase InhA by Arylamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (21), 6649–6658. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.013.

(124) Campaniço, A.; Moreira, R.; Lopes, F. Drug Discovery in Tuberculosis. New Drug Targets and Antimycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 525–545. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.020.

(125) Brenner, S.; Lerner, R. A. Encoded Combinatorial Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (12), 5381–5383. https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5381.

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

(127) Mendes, V.; Blundell, T. L. Targeting Tuberculosis Using Structure-Guided Fragment-Based Drug Design. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (3), 546–554. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.003.

(128) Prati, F.; Zuccotto, F.; Fletcher, D.; Convery, M. A.; Fernandez-Menendez, R.; Bates, R.; Encinas, L.; Zeng, J.; Chung, C.-W.; De Dios Anton, P.; Mendoza-Losana, A.; Mackenzie, C.; Green, S. R.; Huggett, M.; Barros, D.; Wyatt, P. G.; Ray, P. C. Screening of a Novel Fragment Library with Functional Complexity against Mycobacterium Tuberculosis InhA. *ChemMedChem* **2018**, *13* (7), 672–677. https://doi.org/10.1002/cmdc.201700774.

(129) Keserű, G. M.; Erlanson, D. A.; Ferenczy, G. G.; Hann, M. M.; Murray, C. W.; Pickett, S. D. Design Principles for Fragment Libraries: Maximizing the Value of Learnings from Pharma Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) Programs for Use in Academia. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (18), 8189–8206. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00197.

(130) Mashalidis, E. H.; Śledź, P.; Lang, S.; Abell, C. A Three-Stage Biophysical Screening Cascade for Fragment-Based Drug Discovery. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (11), 2309–2324. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.130.

(131) Chang, L.; Campbell, J.; Raji, I. O.; Guduru, S. K. R.; Kandel, P.; Nguyen, M.; Liu, S.; Tran, K.; Venugopal, N. K.; Taylor, B. C.; Holt, M. V.; Young, N. L.; Samuel, E. L. G.; Jain, P.; Santini, C.; Sankaran, B.; MacKenzie, K. R.; Young, D. W. Discovery of Small Molecules Targeting the Tandem Tudor Domain of the Epigenetic Factor UHRF1 Using Fragment-Based Ligand Discovery. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1121. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80588-4.

(132) Kirsch, P.; Jakob, V.; Elgaher, W. A. M.; Walt, C.; Oberhausen, K.; Schulz, T. F.; Empting, M. Discovery of Novel Latency-Associated Nuclear Antigen Inhibitors as Antiviral Agents Against Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (2), 388–395. https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00845.

(133) Krimm, I. Le criblage de fragments - Une voie prometteuse pour la conception de médicaments. *médecine/sciences* **2015**, *31* (2), 197–202. https://doi.org/10.1051/medsci/20153102017.

(134) Bedwell, E. V.; McCarthy, W. J.; Coyne, A. G.; Abell, C. Development of Potent Inhibitors by Fragment-Linking Strategies. *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, *100* (4), 469–486. https://doi.org/10.1111/cbdd.14120.

(135) Bancet, A.; Raingeval, C.; Lomberget, T.; Le Borgne, M.; Guichou, J.-F.; Krimm, I. Fragment Linking Strategies for Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (20), 11420–11435. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00242.

(136) Jencks, W. P. On the Attribution and Additivity of Binding Energies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78* (7), 4046–4050.

(137) Thomas, S. E.; Collins, P.; James, R. H.; Mendes, V.; Charoensutthivarakul, S.; Radoux, C.; Abell, C.; Coyne, A. G.; Floto, R. A.; von Delft, F.; Blundell, T. L. Structure-Guided Fragment-Based Drug Discovery at the Synchrotron: Screening Binding Sites and Correlations with Hotspot Mapping. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2019**, *377* (2147), 20180422. https://doi.org/10.1098/rsta.2018.0422.

(138) Anderson, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (9), 787–797. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.09.002.

(139) Kamsri, P.; Hanwarinroj, C.; Phusi, N.; Pornprom, T.; Chayajarus, K.; Punkvang, A.; Suttipanta, N.; Srimanote, P.; Suttisintong, K.; Songsiriritthigul, C.; Saparpakorn, P.; Hannongbua, S.; Rattanabunyong, S.; Seetaha, S.; Choowongkomon, K.; Sureram, S.; Kittakoop, P.; Hongmanee, P.; Santanirand, P.; Chen, Z.; Zhu, W.; Blood, R. A.; Takebayashi, Y.; Hinchliffe, P.; Mulholland, A. J.; Spencer, J.; Pungpo, P. Discovery of New and Potent InhA Inhibitors as Antituberculosis Agents: Structure-Based Virtual Screening Validated by Biological Assays and X-Ray Crystallography. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60* (1), 226–234. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00918.

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

(141) Dessen, A.; Quémard, A.; Blanchard, J. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1995**, *267* (5204), 1638–1641. https://doi.org/10.1126/science.7886450.

(142) Prasad, M. S.; Bhole, R. P.; Khedekar, P. B.; Chikhale, R. V. Mycobacterium Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA): A Key Target for Antitubercular Drug Discovery. *Bioorganic Chem.* **2021**, *115*, 105242. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105242.

(143) Chollet, A.; Mourey, L.; Lherbet, C.; Delbot, A.; Julien, S.; Baltas, M.; Bernadou, J.; Pratviel, G.; Maveyraud, L.; Bernardes-Génisson, V. Crystal Structure of the Enoyl-ACP Reductase of Mycobacterium Tuberculosis (InhA) in the Apo-Form and in Complex with the Active Metabolite of Isoniazid Pre-Formed by a Biomimetic Approach. *J. Struct. Biol.* **2015**, 10.

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

(145) Oliveira, J. S.; Pereira, J. H.; Canduri, F.; Rodrigues, N. C.; de Souza, O. N.; de Azevedo, W. F.; Basso, L. A.; Santos, D. S. Crystallographic and Pre-Steady-State Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-Type and Isoniazid-Resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from Mycobacterium Tuberculosis. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359* (3), 646–666. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.055.

(146) Molle, V.; Gulten, G.; Vilchèze, C.; Veyron-Churlet, R.; Zanella-Cléon, I.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R.; Kremer, L. Phosphorylation of InhA Inhibits Mycolic Acid Biosynthesis and Growth of Mycobacterium Tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **2010**, *78* (6), 1591–1605. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07446.x.

(147) Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Röttger, S.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Towards a New Tuberculosis Drug: Pyridomycin – Nature's Isoniazid. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4* (10), 1032–1042. https://doi.org/10.1002/emmm.201201689.

(148) Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. Chemotherapy of Experimental Tuberculosis. V. Isonicotinic Acid Hydrazide (Nydrazid) and Related Compounds. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65* (4), 357–364. https://doi.org/10.1164/art.1952.65.4.357.

(149) Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The Isoniazid-NAD Adduct Is a Slow, Tight-Binding Inhibitor of InhA, the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Reductase: Adduct Affinity and Drug Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (24), 13881–13886. https://doi.org/10.1073/pnas.2235848100.

(150) Wengenack, N. L.; Rusnak, F. Evidence for Isoniazid-Dependent Free Radical Generation Catalyzed by Mycobacterium Tuberculosis KatG and the Isoniazid-Resistant Mutant KatG(S315T). *Biochemistry* **2001**, *40* (30), 8990–8996. https://doi.org/10.1021/bi002614m.

(151) Laborde, J.; Deraeve, C.; Lecoq, L.; Sournia-Saquet, A.; Stigliani, J.-L.; Orena, B. S.; Mori, G.; Pratviel, G.; Bernardes-Génisson, V. Synthesis, Oxidation Potential and Anti–Mycobacterial Activity of Isoniazid and Analogues: Insights into the Molecular Isoniazid Activation Mechanism. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (2), 172–179. https://doi.org/10.1002/slct.201600040.

(152) Karakousis, P. C.; Williams, E. P.; Bishai, W. R. Altered Expression of Isoniazid-Regulated Genes in Drug-Treated Dormant Mycobacterium Tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61* (2), 323–331. https://doi.org/10.1093/jac/dkm485.

(153) Bardou, F.; Raynaud, C.; Ramos, C.; Lanéelle, M. A.; Lanŕelle, G. Mechanism of Isoniazid Uptake in Mycobacterium Tuberculosis. *Microbiol. Read. Engl.* **1998**, *144 (Pt 9)*, 2539–2544. https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2539.

(154) Marrakchi, H.; Lanéelle, G.; Quémard, A. K. InhA, a Target of the Antituberculous Drug Isoniazid, Is Involved in a Mycobacterial Fatty Acid Elongation System, FAS-II. *Microbiol. Read. Engl.* **2000**, *146 (Pt 2)*, 289–296. https://doi.org/10.1099/00221287-146-2-289.

(155) Takayama, K.; Wang, L.; David, H. L. Effect of Isoniazid on the in Vivo Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, and Viability of Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2* (1), 29–35. https://doi.org/10.1128/AAC.2.1.29.

(156) Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium Tuberculosis. *Science* **1998**, *279* (5347), 98–102. https://doi.org/10.1126/science.279.5347.98.

(157) Zabinski, R. F.; Blanchard, J. S. The Requirement for Manganese and Oxygen in the Isoniazid-Dependent Inactivation of Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (9), 2331–2332. https://doi.org/10.1021/ja9639731.

(158) Nguyen, M.; Quémard, A.; Broussy, S.; Bernadou, J.; Meunier, B. Mn(III) Pyrophosphate as an Efficient Tool for Studying the Mode of Action of Isoniazid on the InhA Protein of Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (7), 2137–2144. https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2137-2144.2002.

(159) Broussy, S.; Coppel, Y.; Nguyen, M.; Bernadou, J.; Meunier, B. 1H and 13C NMR Characterization of Hemiamidal Isoniazid-NAD(H) Adducts as Possible Inhibitors of InhA Reductase of Mycobacterium Tuberculosis. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2003**, *9* (9), 2034–2038. https://doi.org/10.1002/chem.200204637.

(160) Dias, M. V. B.; Vasconcelos, I. B.; Prado, A. M. X.; Fadel, V.; Basso, L. A.; de Azevedo, W. F.; Santos, D. S. Crystallographic Studies on the Binding of Isonicotinyl-NAD Adduct to Wild-Type and Isoniazid Resistant 2-Trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *J. Struct. Biol.* **2007**, *159* (3), 369–380. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.04.009.

(161) Dhillon, G. S.; Kaur, S.; Pulicharla, R.; Brar, S. K.; Cledón, M.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2015**, *12* (5), 5657. https://doi.org/10.3390/ijerph120505657.

(162) Heath, R. J.; Yu, Y. T.; Shapiro, M. A.; Olson, E.; Rock, C. O. Broad Spectrum Antimicrobial Biocides Target the FabI Component of Fatty Acid Synthesis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (46), 30316–30320. https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30316.

(163) Roujeinikova, A.; Levy, C. W.; Rowsell, S.; Sedelnikova, S.; Baker, P. J.; Minshull, C. A.; Mistry, A.; Colls, J. G.; Camble, R.; Stuitje, A. R.; Slabas, A. R.; Rafferty, J. B.; Pauptit, R. A.; Viner, R.; Rice, D. W. Crystallographic Analysis of Triclosan Bound to Enoyl Reductase. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294* (2), 527–535. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3240.

(164) Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from Mycobacterium Tuberculosis, by Triclosan and Isoniazid. *Biochemistry* **2000**, *39* (26), 7645–7650. https://doi.org/10.1021/bi0008940.

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

(166) Kuo, M. R.; Morbidoni, H. R.; Alland, D.; Sneddon, S. F.; Gourlie, B. B.; Staveski, M. M.; Leonard, M.; Gregory, J. S.; Janjigian, A. D.; Yee, C.; Musser, J. M.; Kreiswirth, B.; Iwamoto, H.; Perozzo, R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Fidock, D. A. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase: COMPOUND ACTIVITY AND STRUCTURAL DATA*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (23), 20851–20859. https://doi.org/10.1074/jbc.M211968200.

(167) Freundlich, J. S.; Wang, F.; Vilchèze, C.; Gulten, G.; Langley, R.; Schiehser, G. A.; Jacobus, D. P.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Triclosan Derivatives: Towards Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *ChemMedChem* **2009**, *4* (2), 241–248. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800261.

(168) Li, H.-J.; Lai, C.-T.; Pan, P.; Yu, W.; Liu, N.; Bommineni, G. R.; Garcia-Diaz, M.; Simmerling, C.; Tonge, P. J. A Structural and Energetic Model for the Slow-Onset Inhibition of the Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-ACP Reductase InhA. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (4), 986–993. https://doi.org/10.1021/cb400896g.

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

(170) Spagnuolo, L. A.; Eltschkner, S.; Yu, W.; Daryaee, F.; Davoodi, S.; Knudson, S. E.; Allen, E. K. H.; Merino, J.; Pschibul, A.; Moree, B.; Thivalapill, N.; Truglio, J. J.; Salafsky, J.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. Evaluating the

Contribution of Transition-State Destabilization to Changes in the Residence Time of Triazole-Based InhA Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (9), 3417–3429. https://doi.org/10.1021/jacs.6b11148.

(171) Abdelaziz, O. A.; Othman, D. I. A.; Abdel-Aziz, M. M.; Badr, S. M. I.; Eisa, H. M. Novel Diaryl Ether Derivatives as InhA Inhibitors: Design, Synthesis and Antimycobacterial Activity. *Bioorganic Chem.* **2022**, *129*, 106125. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106125.

(172) Copeland, R. A. The Drug-Target Residence Time Model: A 10-Year Retrospective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (2), 87–95. https://doi.org/10.1038/nrd.2015.18.

(173) Lengerli, D.; Ibis, K.; Nural, Y.; Banoglu, E. The 1,2,3-Triazole 'All-in-One' Ring System in Drug Discovery: A Good Bioisostere, a Good Pharmacophore, a Good Linker, and a Versatile Synthetic Tool. *Expert Opin. Drug Discov.* **2022**, *17* (11), 1209–1236. https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2129613.

(174) Stec, J.; Vilchèze, C.; Lun, S.; Perryman, A. L.; Wang, X.; Freundlich, J. S.; Bishai, W.; Jacobs, W. R.; Kozikowski, A. P. Biological Evaluation of Potent Triclosan-Derived Inhibitors of the Enoyl–Acyl Carrier Protein Reductase InhA in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Strains of Mycobacterium Tuberculosis. *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2528–2537. https://doi.org/10.1002/cmdc.201402255.

(175) Rodriguez, F.; Saffon, N.; Sammartino, J. C.; Degiacomi, G.; Pasca, M. R.; Lherbet, C. First Triclosan-Based Macrocyclic Inhibitors of InhA Enzyme. *Bioorganic Chem.* **2020**, *95*, 103498. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103498.

(176) Maeda, K.; Kosaka, H.; Okami, Y.; Umezawa, H. A New Antibiotic, Pyridomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1953**, *6* (3), 140.

(177) Kienle, M.; Eisenring, P.; Stoessel, B.; Horlacher, O. P.; Hasler, S.; van Colen, G.; Hartkoorn, R. C.; Vocat, A.; Cole, S. T.; Altmann, K.-H. Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of C2-Modified Analogs of the Antimycobacterial Natural Product Pyridomycin. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (3), 1105–1131. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01457.

(178) Hartkoorn, R. C.; Pojer, F.; Read, J. A.; Gingell, H.; Neres, J.; Horlacher, O. P.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Pyridomycin Bridges the NADH- and Substrate-Binding Pockets of the Enoyl Reductase InhA. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (2), 96–98. https://doi.org/10.1038/nchembio.1405.

(179) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142–155. https://doi.org/10.1021/cb700248m.

(180) Sakabe, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Iwatate, R. J.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Rational Design of Highly Sensitive Fluorescence Probes for Protease and Glycosidase Based on Precisely Controlled Spirocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (1), 409–414. https://doi.org/10.1021/ja309688m.

(181) Zhuang, Y.-D.; Chiang, P.-Y.; Wang, C.-W.; Tan, K.-T. Environment-Sensitive Fluorescent Turn-On Probes Targeting Hydrophobic Ligand-Binding Domains for Selective Protein Detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (31), 8124–8128. https://doi.org/10.1002/anie.201302884.

(182) Somagond, S. M.; Kamble, R. R.; Bayannavar, P. K.; Shaikh, S. K. J.; Joshi, S. D.; Kumbar, V. M.; Nesaragi, A. R.; Kariduraganavar, M. Y. Click Chemistry Based Regioselective One-Pot Synthesis of Coumarin-3-Yl-Methyl-1,2,3-Triazolyl-1,2,4-Triazol-3(4H)-Ones as Newer Potent Antitubercular Agents. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2019**, *352* (10), e1900013. https://doi.org/10.1002/ardp.201900013.

(183) Srivastava, S.; Bimal, D.; Bohra, K.; Singh, B.; Ponnan, P.; Jain, R.; Varma-Basil, M.; Maity, J.; Thirumal, M.; Prasad, A. K. Synthesis and Antimycobacterial Activity of 1-(β-d-Ribofuranosyl)-4-Coumarinyloxymethyl- / -Coumarinyl-1,2,3-Triazole. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 268–281. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.067.

(184) Hu, Y.; Shen, Y.; Wu, X.; Tu, X.; Wang, G.-X. Synthesis and Biological Evaluation of Coumarin Derivatives Containing Imidazole Skeleton as Potential Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 958–969. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.100.

(185) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598. https://doi.org/10.1002/anie.196305651.

(186) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. https://doi.org/10.1021/ja054114s.

(187) Boyne, M. E.; Sullivan, T. J.; amEnde, C. W.; Lu, H.; Gruppo, V.; Heaslip, D.; Amin, A. G.; Chatterjee, D.; Lenaerts, A.; Tonge, P. J.; Slayden, R. A. Targeting Fatty Acid Biosynthesis for the Development of Novel Chemotherapeutics against Mycobacterium Tuberculosis: Evaluation of A-Ring-Modified Diphenyl Ethers as High-Affinity InhA Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (10), 3562–3567. https://doi.org/10.1128/AAC.00383-07.

(188) Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (8), 887–916. https://doi.org/10.2174/0929867053507315.

(189) Xia, D.; Liu, H.; Cheng, X.; Maraswami, M.; Chen, Y.; Lv, X. Recent Developments of Coumarin-Based Hybrids in Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2022**, *22* (4), 269–283.

(190) Sun, X.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X. Synthesis and Application of Coumarin Fluorescence Probes. *RSC Adv.* **2020**, *10* (18), 10826–10847. https://doi.org/10.1039/C9RA10290F.

(191) Mazimba, O. Umbelliferone: Sources, Chemistry and Bioactivities Review. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2017**, *55* (2), 223–232. https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.05.001.

(192) Mohammadi Ziarani, G.; Moradi, R.; Ahmadi, T.; Gholamzadeh, P. The Molecular Diversity Scope of 4-Hydroxycoumarin in the Synthesis of Heterocyclic Compounds via Multicomponent Reactions. *Mol. Divers.* **2019**, *23* (4), 1029–1064. https://doi.org/10.1007/s11030-019-09918-7.

(193) Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718* (1), 208–223. https://doi.org/10.1002/jlac.19687180119.

(194) Yu, Z.; Wang, H.; Chen, Z.; Dong, X.; Zhao, W.; Shi, Y.; Zhu, Q. Discovery of an Amino Acid-Modified Near-Infrared Aza-BODIPY Photosensitizer as an Immune Initiator for Potent Photodynamic Therapy in Melanoma. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (4), 3616–3631. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02154.

(195) Cheng, H.-B.; Cao, X.; Zhang, S.; Zhang, K.; Cheng, Y.; Wang, J.; Zhao, J.; Zhou, L.; Liang, X.-J.; Yoon, J. BODIPY as a Multifunctional Theranostic Reagent in Biomedicine: Self-Assembly, Properties, and Applications. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2023**, *35* (18), e2207546. https://doi.org/10.1002/adma.202207546.

(196) Jiang, C.; Huang, H.; Kang, X.; Yang, L.; Xi, Z.; Sun, H.; Pluth, M. D.; Yi, L. NBD-Based Synthetic Probes for Sensing Small Molecules and Proteins: Design, Sensing Mechanisms and Biological Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (13), 7436–7495. https://doi.org/10.1039/d0cs01096k.

(197) Okabe, K.; Inada, N.; Gota, C.; Harada, Y.; Funatsu, T.; Uchiyama, S. Intracellular Temperature Mapping with a Fluorescent Polymeric Thermometer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Nat. Commun.* **2012**, *3* (1), 705. https://doi.org/10.1038/ncomms1714.

(198) Collery, P.; Desmaele, D.; Vijaykumar, V. Design of Rhenium Compounds in Targeted Anticancer Therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25* (31), 3306–3322. https://doi.org/10.2174/1381612825666190902161400.

(199) Lo, K. K.-W. Luminescent Rhenium(I) and Iridium(III) Polypyridine Complexes as Biological Probes, Imaging Reagents, and Photocytotoxic Agents. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (12), 2985–2995. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00211.

(200) Wang, J.; Delavaux-Nicot, B.; Wolff, M.; Mallet-Ladeira, S.; Métivier, R.; Benoist, E.; Fery-Forgues, S. The Unsuspected Influence of the Pyridyl-Triazole Ligand Isomerism upon the Electronic Properties of Tricarbonyl Rhenium Complexes: An Experimental and Theoretical Insight. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (24), 8087–8099. https://doi.org/10.1039/C8DT01120F.

(201) Cinu, T. A.; Sidhartha, S. K.; Indira, B.; Varadaraj, B. G.; Vishnu, P. S.; Shenoy, G. G. Design, Synthesis and Evaluation of Antitubercular Activity of Triclosan Analogues. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12* (8), 3316–3323. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.09.003.

(202) Inturi, B.; Pujar, G. V.; Purohit, M. N.; Iyer, V. B.; S, S. G.; Kulkarni, M. Design, Synthesis and Evaluation of Diphenyl Ether Analogues as Antitubercular Agents. *RSC Adv.* **2016**, *6* (112), 110571–110582. https://doi.org/10.1039/C6RA19821J.

(203) Almalki, F. A.; Harrowven, D. C. A Corey–Seebach Macrocyclisation Strategy for the Synthesis of Riccardin C and an Unnatural Macrocyclic Bis(Bibenzyl) Analogue. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (34), 5738–5746. https://doi.org/10.1002/ejoc.201601179.

(204) Sousa, C.; Silva, P. J. BBr3-Assisted Cleavage of Most Ethers Does Not Follow the Commonly Assumed Mechanism. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (35), 8048–8049. https://doi.org/10.1002/ejoc.201301647.

(205) Shaabani, A.; Ghadari, R.; Rahmati, A.; Rezayan, A. H. Coumarin Synthesis via Knoevenagel Condensation Reaction in 1,1,3,3-N,N,N′,N′-Tetramethylguanidinium Trifluoroacetate Ionic Liquid. *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, *6* (4), 710–714. https://doi.org/10.1007/BF03246160.

(206) Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. A Convenient Synthesis of Coumarin-3-Carboxylic Acids via Knoevenagel Condensation of Meldrum's Acid with Ortho-Hydroxyaryl Aldehydes or Ketones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (9), 1755–1758. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00108-4.

(207) Liang, X.; Xu, X.; Qiao, D.; Yin, Z.; Shang, L. Dual Mechanism of an Intramolecular Charge Transfer (ICT)–FRET-Based Fluorescent Probe for the Selective Detection of Hydrogen Peroxide. *Chem. – Asian J.* **2017**, *12* (24), 3187–3194. https://doi.org/10.1002/asia.201701382.

(208) Cédrik Garino, †; Taisuke Tomita, ‡; Nicolas Pietrancosta, †; Younes Laras, †; Roselyne Rosas, §; Gaëtan Herbette, §; Bernard Maigret, ‖; Gilles Quéléver, †; Takeshi Iwatsubo, ‡ and; Jean-Louis Kraus*, †. Naphthyl and Coumarinyl Biarylpiperazine Derivatives as Highly Potent Human β-Secretase Inhibitors. Design, Synthesis, and Enzymatic BACE-1 and Cell Assays. *ACS Publ.* **2006**. https://doi.org/10.1021/jm0602864.

(209) Xi, G.-L.; Liu, Z.-Q. Coumarin-Fused Coumarin: Antioxidant Story from N,N-Dimethylamino and Hydroxyl Groups. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (13), 3516–3523. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00399.

(210) Chimenti, F.; Secci, D.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Bizzarri, B.; Granese, A.; Carradori, S.; Yáñez, M.; Orallo, F.; Ortuso, F.; Alcaro, S. Synthesis, Molecular Modeling, and Selective Inhibitory Activity against Human Monoamine Oxidases of 3-Carboxamido-7-Substituted Coumarins. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (7), 1935–1942. https://doi.org/10.1021/jm801496u.

(211) Hayashi, T.; Sun, Y.; Tamura, T.; Kuwata, K.; Song, Z.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. Semisynthetic Lectin–4-Dimethylaminopyridine Conjugates for Labeling and Profiling Glycoproteins on Live Cell Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (33), 12252–12258. https://doi.org/10.1021/ja4043214.

(212) Saeedi, M.; Safavi, M.; Karimpour-Razkenari, E.; Mahdavi, M.; Edraki, N.; Moghadam, F. H.; Khanavi, M.; Akbarzadeh, T. Synthesis of Novel Chromenones Linked to 1,2,3-Triazole Ring System: Investigation of Biological Activities against Alzheimer's Disease. *Bioorganic Chem.* **2017**, *70*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.011.

(213) Pingaew, R.; Saekee, A.; Mandi, P.; Nantasenamat, C.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Novel Chalcone–Coumarin Hybrids as Anticancer and Antimalarial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 65–76. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.087.

(214) Ferraroni, M.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Thioxocoumarins Show an Alternative Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanism Compared to Coumarins. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (1), 462–473. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01720.

(215) Arcau, J.; Andermark, V.; Aguiló, E.; Gandioso, A.; Moro, A.; Cetina, M.; Lima, J. C.; Rissanen, K.; Ott, I.; Rodríguez, L. Luminescent Alkynyl-Gold(I) Coumarin Derivatives and Their Biological Activity. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (11), 4426–4436. https://doi.org/10.1039/C3DT52594E.

(216) Hohlfeld, B. F.; Gitter, B.; Flanagan, K. J.; Kingsbury, C. J.; Kulak, N.; Senge, M. O.; Wiehe, A. Exploring the Relationship between Structure and Activity in BODIPYs Designed for Antimicrobial Phototherapy. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (13), 2416–2431. https://doi.org/10.1039/D0OB00188K.

(217) Martin, A. D.; Boulos, R. A.; Stubbs, K. A.; Raston, C. L. Phosphonated Calix[4]Arene-Based Amphiphiles as Scaffolds for Fluorescent Nano-Fibres. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (26), 7329–7331. https://doi.org/10.1039/C1CC11614B.

(218) McGill, N. W.; Williams, S. J. 2,6-Disubstituted Benzoates As Neighboring Groups for Enhanced Diastereoselectivity in β-Galactosylation Reactions: Synthesis of β-1,3-Linked Oligogalactosides Related to Arabinogalactan Proteins. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (24), 9388–9398. https://doi.org/10.1021/jo902100q.

(219) Makriyannis, A.; Vemuri, V. K. Novel Cannabinergic Nitrate Esters and Related Analogs. US20210300937, September 30, 2021.

(220) Legigan, T.; Migianu-Griffoni, E.; Abdenour Redouane, M.; Descamps, J.; Gager, O.; Monteil, M.; Barbault, F.; Lecouvey, M. Synthesis and Preliminary Anticancer Evaluation of New Triazole Bisphosphonate-Based Isoprenoid Biosynthesis Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *214*, 113241. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113241.

(221) Calupitan, J. P.; Poirot, A.; Wang, J.; Delavaux-Nicot, B.; Wolff, M.; Jaworska, M.; Métivier, R.; Benoist, E.; Allain, C.; Fery-Forgues, S. Mechanical Modulation of the Solid-State Luminescence of Tricarbonyl Rhenium(I) Complexes through the Interplay between Two Triplet Excited States. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (12), 4191–4196. https://doi.org/10.1002/chem.202005245.

(222) Kowalska-Krochmal, B.; Dudek-Wicher, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* **2021**, *10* (2), 165. https://doi.org/10.3390/pathogens10020165.

(223) Li, W.; Sanchez-Hidalgo, A.; Jones, V.; de Moura, V. C. N.; North, E. J.; Jackson, M. Synergistic Interactions of MmpL3 Inhibitors with Antitubercular Compounds In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (4), e02399-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02399-16.

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

(225) Chen, H.; Zhou, X.; Wang, A.; Zheng, Y.; Gao, Y.; Zhou, J. Evolutions in Fragment-Based Drug Design: The Deconstruction-Reconstruction Approach. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 105–113. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.015.

(226) Shirude, P. S.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G.; Davies, G.; McMiken, H.; Hegde, N.; Ambady, A.; Venkatraman, J.; Panda, M.;

Bandodkar, B.; Sambandamurthy, V. K.; Read, J. A. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8533–8542. https://doi.org/10.1021/jm4012033.

(227) Guardia, A.; Gulten, G.; Fernandez, R.; Gómez, J.; Wang, F.; Convery, M.; Blanco, D.; Martínez, M.; Pérez-Herrán, E.; Alonso, M.; Ortega, F.; Rullás, J.; Calvo, D.; Mata, L.; Young, R.; Sacchettini, J. C.; Mendoza-Losana, A.; Remuiñán, M.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J. N-Benzyl-4-((Heteroaryl)Methyl)Benzamides: A New Class of Direct NADH-Dependent 2-Trans Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) Inhibitors with Antitubercular Activity. *ChemMedChem* **2016**, *11* (7), 687–701. https://doi.org/10.1002/cmdc.201600020.

(228) Manjunatha, U. H.; S Rao, S. P.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynne, R.; Smith, P. W.; Diagana, T. T. Direct Inhibitors of InhA Are Active against Mycobacterium Tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7* (269), 269ra3. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010597.

(229) Soutter, H. H.; Centrella, P.; Clark, M. A.; Cuozzo, J. W.; Dumelin, C. E.; Guie, M.-A.; Habeshian, S.; Keefe, A. D.; Kennedy, K. M.; Sigel, E. A.; Troast, D. M.; Zhang, Y.; Ferguson, A. D.; Davies, G.; Stead, E. R.; Breed, J.; Madhavapeddi, P.; Read, J. A. Discovery of Cofactor-Specific, Bactericidal Mycobacterium Tuberculosis InhA Inhibitors Using DNA-Encoded Library Technology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (49), E7880–E7889. https://doi.org/10.1073/pnas.1610978113.

(230) He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. R. Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6308–6323. https://doi.org/10.1021/jm060715y.

(231) Martínez-Hoyos, M.; Perez-Herran, E.; Gulten, G.; Encinas, L.; Álvarez-Gómez, D.; Alvarez, E.; Ferrer-Bazaga, S.; García-Pérez, A.; Ortega, F.; Angulo-Barturen, I.; Rullas-Trincado, J.; Blanco Ruano, D.; Torres, P.; Castañeda, P.; Huss, S.; Fernández Menéndez, R.; González del Valle, S.; Ballell, L.; Barros, D.; Modha, S.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J. D.; García-Bustos, J. F.; Lavandera, J. L.; Sacchettini, J. C.; Jimenez, M. S.; Martín-Casabona, N.; Castro-Pichel, J.; Mendoza-Losana, A. Antitubercular Drugs for an Old Target: GSK693 as a Promising InhA Direct Inhibitor. *EBioMedicine* **2016**, *8*, 291–301. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.006.

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

(233) Chollet, A.; Mori, G.; Menendez, C.; Rodriguez, F.; Fabing, I.; Pasca, M. R.; Madacki, J.; Korduláková, J.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernardes-Génisson, V.; Lherbet, C.; Baltas, M. Design, Synthesis and Evaluation of New GEQ Derivatives as Inhibitors of InhA Enzyme and Mycobacterium Tuberculosis Growth. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 218–235. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.035.

(234) Ku, S.-K.; Lee, J.-H.; O, Y.; Lee, W.; Song, G.-Y.; Bae, J.-S. Vascular Barrier Protective Effects of 3-N- or 3-O-Cinnamoyl Carbazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (19), 4304–4307. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.079.

(235) Foroozesh, M.; Jiang, Q.; Sridhar, J.; Liu, J.; Dotson, B.; McClain, E. Design, Synthesis, and Evaluation of Carbazole Analogs as Potential Cytochrome P450 Inhibitors. *J. Undergrad. Chem. Res.* **2013**, *12* (4), 92–95.

(236) Kumar, R.; Ramachandran, U.; Srinivasan, K.; Ramarao, P.; Raichur, S.; Chakrabarti, R. Design, Synthesis and Evaluation of Carbazole Derivatives as PPARα/γ Dual Agonists and Antioxidants. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (13), 4279–4290. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.018.

(237) Rani, A.; Saini, P.; Singh, G.; Sushma; Singh, H.; Kaur, G.; Singh, J. 'Quick CuAAC' Chemistry for Hg(II) and Mn(II) Ion Sensing via 9H-Carbazole Derivatives. *Inorganica Chim. Acta* **2021**, *527*, 120560. https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120560.

(238) Yee, K. C. Carbazolyl Diacetylenic Compounds. US4125534A, November 14, 1978. https://patents.google.com/patent/US4125534/en (accessed 2023-04-21).

(239) Turnu, F.; Luridiana, A.; Cocco, A.; Porcu, S.; Frongia, A.; Sarais, G.; Secci, F. Catalytic Tandem Friedel–Crafts Alkylation/C4–C3 Ring-Contraction Reaction: An Efficient Route for the Synthesis of Indolyl Cyclopropanecarbaldehydes and Ketones. *Org. Lett.* **2019**, *21* (18), 7329–7332. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b02617.

(240) Ashok, D.; Thara, G.; Kumar, B. K.; Srinivas, G.; Ravinder, D.; Vishnu, T.; Sarasija, M.; Sushmitha, B. Microwave-Assisted Synthesis, Molecular Docking Studies of 1,2,3-Triazole-Based Carbazole Derivatives as Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Agents. *RSC Adv.* **2022**, *13* (1), 25–40. https://doi.org/10.1039/D2RA05960F.

(241) Dunkel, P.; Barosi, A.; Dhimane, H.; Maurel, F.; Dalko, P. I. Photoinduced Electron Transfer (PET)-Mediated Fragmentation of Picolinium-Derived Redox Probes. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (49), 12920–12931. https://doi.org/10.1002/chem.201801684.

(242) Gurova, K.; Wade, W. "Preparation of Carbazole Derivatives and Analogs for Use as Antitumor Agents" Reference Detail | CAS SciFinder^{n}. WO2014153043. https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/reference/641ad53fd687887b1be45106/referenceDetails (accessed 2023-03-22).

(243) Ohira, S. Methanolysis of Dimethyl (1-Diazo-2-Oxopropyl) Phosphonate: Generation of Dimethyl (Diazomethyl) Phosphonate and Reaction with Carbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **1989**, *19* (3–4), 561–564. https://doi.org/10.1080/00397918908050700.

(244) Lossouarn, A.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. Tailored Bioorthogonal and Bioconjugate Chemistry: A Source of Inspiration for Developing Kinetic Target-Guided Synthesis Strategies. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (1), 63–72. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00568.

(245) Mondal, M.; Groothuis, D. E.; Hirsch, A. K. H. Fragment Growing Exploiting Dynamic Combinatorial Chemistry of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin. *MedChemComm* **2015**, *6* (7), 1267–1271. https://doi.org/10.1039/C5MD00157A.

(246) Kulkarni, S. S.; Hu, X.; Doi, K.; Wang, H.-G.; Manetsch, R. Screening of Protein-Protein Interaction Modulators via Sulfo-Click Kinetic Target-Guided Synthesis. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (7), 724–732. https://doi.org/10.1021/cb200085q.

(247) Prasher, P.; Sharma, M. Tailored Therapeutics Based on 1,2,3-1H-Triazoles: A Mini Review. *MedChemComm* **2019**, *10* (8), 1302–1328. https://doi.org/10.1039/C9MD00218A.

(248) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (22), 3581–3590. https://doi.org/10.1002/ejoc.201900327.

(249) Cheeseman, J. D.; Corbett, A. D.; Gleason, J. L.; Kazlauskas, R. J. Receptor-Assisted Combinatorial Chemistry: Thermodynamics and Kinetics in Drug Discovery. *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11* (6), 1708–1716. https://doi.org/10.1002/chem.200400371.

(250) Frei, P.; Hevey, R.; Ernst, B. Dynamic Combinatorial Chemistry: A New Methodology Comes of Age. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (1), 60–73. https://doi.org/10.1002/chem.201803365.

(251) Bosc, D.; Jakhlal, J.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. Kinetic Target-Guided Synthesis in Drug Discovery and Chemical Biology: A Comprehensive Facts and Figures Survey. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (4), 381–404. https://doi.org/10.4155/fmc-2015-0007.

(252) Hu, X.; Manetsch, R. Kinetic Target-Guided Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1316–1324. https://doi.org/10.1039/B904092G.

(253) Oueis, E.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. New Insights into the Kinetic Target-Guided Synthesis of Protein Ligands. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (61), 12158–12169. https://doi.org/10.1039/C5CC04183J.

(254) Bosc, D.; Camberlein, V.; Gealageas, R.; Castillo-Aguilera, O.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. Kinetic Target-Guided Synthesis: Reaching the Age of Maturity. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 3817–3833. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01183.

(255) Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Locht, C.; Baulard, A.; Deprez, B. Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (11), 1007–1013. https://doi.org/10.1021/cb100177g.

(256) Wong, E. L.; Nawrotzky, E.; Arkona, C.; Kim, B. G.; Beligny, S.; Wang, X.; Wagner, S.; Lisurek, M.; Carstanjen, D.; Rademann, J. The Transcription Factor STAT5 Catalyzes Mannich Ligation Reactions Yielding Inhibitors of Leukemic Cell Proliferation. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 66. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07923-2.

(257) Grimster, N. P.; Stump, B.; Fotsing, J. R.; Weide, T.; Talley, T. T.; Yamauchi, J. G.; Nemecz, Á.; Kim, C.; Ho, K.-Y.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Fokin, V. V. Generation of Candidate Ligands for Nicotinic Acetylcholine Receptors via in Situ Click Chemistry with a Soluble Acetylcholine Binding Protein Template. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (15), 6732–6740. https://doi.org/10.1021/ja3001858.

(258) Bosc, D.; Camberlein, V.; Gealageas, R.; Castillo-Aguilera, O.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. Kinetic Target-Guided Synthesis: Reaching the Age of Maturity. *J Med Chem* **2020**, 17.

(259) Taylor, P.; Radić, Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 281–320. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001433.

(260) Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.* **1987**, *87* (5), 955–979. https://doi.org/10.1021/cr00081a005.

(261) Sussman, J.; Harel, M.; Frolow, F.; CO, O.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo Californica: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* **1991**, *253*, 872–879. https://doi.org/10.1126/science.1678899.

(262) Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry in Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41* (6), 1053–1057. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020315)41:6<1053::aid-anie1053>3.0.co;2-4.

(263) Camberlein, V.; Fléau, C.; Sierocki, P.; Li, L.; Gealageas, R.; Bosc, D.; Guillaume, V.; Warenghem, S.; Leroux, F.; Rosell, M.; Cheng, K.; Medve, L.; Prigent, M.; Decanter, M.; Piveteau, C.; Biela, A.; Eveque, M.; Dumont, J.; Mpakali, A.; Giastas, P.; Herledan, A.; Couturier, C.; Haupenthal, J.; Lesire, L.; Hirsch, A. K. H.; Deprez, B.; Stratikos, E.; Bouvier, M.; Deprez-Poulain, R. Discovery of the First Selective Nanomolar Inhibitors of ERAP2 by Kinetic Target-Guided Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, *61* (39), e202203560. https://doi.org/10.1002/anie.202203560.

(264) Cummings, M. D.; Sekharan, S. Structure-Based Macrocycle Design in Small-Molecule Drug Discovery and Simple Metrics To Identify Opportunities for Macrocyclization of Small-Molecule Ligands. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (15), 6843–6853. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01985.

(265) Vendeville, S.; Cummings, M. D. Chapter Twenty-Three - Synthetic Macrocycles in Small-Molecule Drug Discovery. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Desai, M. C., Ed.; Academic Press, 2013; Vol. 48, pp 371–386. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417150-3.00023-5.

(266) Horlacher, O. P.; Hartkoorn, R. C.; Cole, S. T.; Altmann, K.-H. Synthesis and Antimycobacterial Activity of 2,1'-Dihydropyridomycins. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (2), 264–268. https://doi.org/10.1021/ml300385q.

(267) Kinoshita, M.; Nakata, M.; Takarada, K.; Tatsuta, K. Total Synthesis of Pyridomycin. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (52), 7419–7422. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)70713-1.

(268) Lin, J.; Gao, D.; Wang, S.; Lv, G.; Wang, X.; Lu, C.; Peng, Y.; Qiu, L. Stimuli-Responsive Macrocyclization Scaffold Allows *In Situ* Self-Assembly of Radioactive Tracers for Positron Emission Tomography Imaging of Enzyme Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (17), 7667–7675. https://doi.org/10.1021/jacs.1c12935.

(269) Wang, Y.; Bai, H.; Miao, Y.; Weng, J.; Huang, Z.; Fu, J.; Zhang, Y.; Lin, J.; Ye, D. Tailoring a Near-Infrared Macrocyclization Scaffold Allows the Control of In Situ Self-Assembly for Photoacoustic/PET Bimodal Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, *61* (14), e202200369. https://doi.org/10.1002/anie.202200369.

(270) Chaudhuri, R.; Prasanth, T.; Dash, J. Expanding the Toolbox of Target Directed Bio-Orthogonal Synthesis: In Situ Direct Macrocyclization by DNA Templates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (7), e202215245. https://doi.org/10.1002/anie.202215245.

(271) Bauta, W. E.; Bohmann, J. a; Tidwell, M. W.; Malakhov, A. D.; Santillan, J. A. Bis-Benzyl-Tetrahydroisoquinoline Derivatives As Therapeutics For Filovirus. US2019275027A1, September 12, 2019.

(272) Sun, B.; Li, L.; Hu, Q.; Xie, F.; Zheng, H.; Niu, H.; Yuan, H.; Lou, H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Macrocyclic Bisbibenzyl Analogues as Tubulin Polymerization Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 484–499. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.007.

(273) Toutov, A. A.; Betz, K. N.; Schuman, D. P.; Liu, W.-B.; Fedorov, A.; Stoltz, B. M.; Grubbs, R. H. Alkali Metal-Hydroxide-Catalyzed C(Sp)–H Bond Silylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (4), 1668–1674. https://doi.org/10.1021/jacs.6b12114.

(274) Kral, K.; Hapke, M. Investigations on the Synthesis of Monoarylated Diynes by Monoprotection/Cross-Coupling/Deprotection Approach. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (23), 2856–2859. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.03.118.

(275) Cruz-López, O.; Temps, C.; Longo, B.; Myers, S. H.; Franco-Montalban, F.; Unciti-Broceta, A. Synthesis and Characterization of a Click-Assembled 18-Atom Macrocycle That Displays Selective AXL Kinase Inhibitory Activity. *ACS Omega* **2019**, *4* (25), 21620–21626. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03525.

(276) Chouhan, G.; James, K. CuAAC Macrocyclization: High Intramolecular Selectivity through the Use of Copper–Tris(Triazole) Ligand Complexes. *Org. Lett.* **2011**, *13* (10), 2754–2757. https://doi.org/10.1021/ol200861f.

(277) Casali, N. Escherichia Coli Host Strains. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2003**, *235*, 27–48. https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:27.

(278) Sun, Q.-Y.; Ding, L.-W.; He, L.-L.; Sun, Y.-B.; Shao, J.-L.; Luo, M.; Xu, Z.-F. Culture of Escherichia Coli in SOC Medium Improves the Cloning Efficiency of Toxic Protein Genes. *Anal. Biochem.* **2009**, *394* (1), 144–146. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.023.

(279) Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature* **1975**, *258* (5536), 598–599. https://doi.org/10.1038/258598a0.

(280) Cheung, R. C. F.; Wong, J. H.; Ng, T. B. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: A Review on Its Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96* (6), 1411–1420. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0.

(281) Walker, P. A.; Leong, L. E.-C.; Ng, P. W. P.; Tan, S. H.; Waller, S.; Murphy, D.; Porter, A. G. Efficient and Rapid Affinity Purification of Proteins Using Recombinant Fusion Proteases. *Bio/Technology* **1994**, *12* (6), 601–605. https://doi.org/10.1038/nbt0694-601.

(282) Lafaye, C. Etudes Biochimique et Structurale de DsbA1, DsbA2 et DsbA3 : Les Trois Homologues à l'oxydoréductase de Thiol-Disulfure DsbA Chez Neisseria Meningitidis. **2009**.

(283) Dessau, M. A.; Modis, Y. Protein Crystallization for X-Ray Crystallography. *J. Vis. Exp. JoVE* **2011**, No. 47, 2285. https://doi.org/10.3791/2285.

(284) Gajdos, L. Neutron Diffraction for Deciphering Protein-carbohydrate Interactions Involved in Bacterial Infection, 2021.

(285) Vénien-Bryan, C.; Li, Z.; Vuillard, L.; Boutin, J. A. Cryo-Electron Microscopy and X-Ray Crystallography: Complementary Approaches to Structural Biology and Drug Discovery. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2017**, *73* (Pt 4), 174–183. https://doi.org/10.1107/S2053230X17003740.

(286) Lévy, D.; Cicco, A. D.; Bertin, A.; Dezi, M. La cryo-microscopie électronique révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants. *médecine/sciences* **2021**, *37* (4), 379–385. https://doi.org/10.1051/medsci/2021034.

(287) Markwick, P. R. L.; Malliavin, T.; Nilges, M. Structural Biology by NMR: Structure, Dynamics, and Interactions. *PLoS Comput. Biol.* **2008**, *4* (9), e1000168. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000168.

(288) Maveyraud, L.; Mourey, L. Protein X-Ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1030. https://doi.org/10.3390/molecules25051030.

(289) Ewald, P. P. *Fifty Years of X-Ray Diffraction*; 1962.

(290) Authier, A. Une découverte qui a changé le monde : la diffraction des rayons X. *Reflets Phys.* **2014**, No. 39, 24–29. https://doi.org/10.1051/refdp/201439024.

(291) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate. *Nature* **1953**, *172* (4369), 156–157. https://doi.org/10.1038/172156a0.

(292) Toudic, B. Qu'est-ce qu'un cristal ? *Reflets Phys.* **2015**, No. 44–45, 18–24. https://doi.org/10.1051/refdp/20154445018.

(293) Karplus, P. A.; Diederichs, K. Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science* **2012**, *336* (6084), 1030–1033. https://doi.org/10.1126/science.1218231.

(294) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50* (Pt 5), 760–763. https://doi.org/10.1107/S0907444994003112.

(295) Zhao, Y.; Kim, H. S.; Zou, X.; Huang, L.; Liang, X.; Li, Z.; Kim, J. S.; Lin, W. Harnessing Dual-Fluorescence Lifetime Probes to Validate Regulatory Mechanisms of Organelle Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (45), 20854–20865. https://doi.org/10.1021/jacs.2c08966.

(296) Limberg, F.; Krueger, H. "Organic electronic components based on cross-linked alkynyl-ether functional layers" Reference Detail | CAS SciFinder^{n}. WO2016026806, February 25, 2016. https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/reference/641b075ed687887b1be7a9b9/referenceDetails (accessed 2023-03-22).

(297) Hafeez, A.; Akhter, Z.; Gallagher, J. F.; Khan, N. A.; Gul, A.; Shah, F. U. Synthesis, Crystal Structures, and Spectroscopic Characterization of Bis-Aldehyde Monomers and Their Electrically Conductive Pristine Polyazomethines. *Polymers* **2019**, *11* (9), 1498. https://doi.org/10.3390/polym11091498.

(298) Erbas-Cakmak, S.; Akkaya, E. U. Cascading of Molecular Logic Gates for Advanced Functions: A Self-Reporting, Activatable Photosensitizer. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (43), 11574–11578. https://doi.org/10.1002/ange.201306177.

(299) Le, N.-H.; Constant, P.; Tranier, S.; Nahoum, V.; Guillet, V.; Maveyraud, L.; Daffé, M.; Mourey, L.; Verhaeghe, P.; Marrakchi, H. Drug Screening Approach against Mycobacterial Fatty Acyl-AMP Ligase FAAL32 Renews the Interest of the Salicylanilide Pharmacophore in the Fight against Tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, *71*, 116938. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116938.

(300) Phetsuksiri, B.; Baulard, A. R.; Cooper, A. M.; Minnikin, D. E.; Douglas, J. D.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (5), 1042–1051. https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1042.

(301) Pflégr, V.; Horváth, L.; Stolaříková, J.; Pál, A.; Korduláková, J.; Bősze, S.; Vinšová, J.; Krátký, M. Design and Synthesis of 2-(2-Isonicotinoylhydrazineylidene)Propanamides as InhA Inhibitors with High Antitubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113668. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113668.

(302) Grzegorzewicz, A. E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S. E. M.; Belardinelli, J. M.; Vaquié, A.; Gundi, V. A. K. B.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H. R.; Brennan, P. J.; Quémard, A.; McNeil, M. R.; Jackson, M. A Common Mechanism of Inhibition of the Mycobacterium Tuberculosis Mycolic Acid Biosynthetic Pathway by Isoxyl and Thiacetazone. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (46), 38434–38441. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400994.

(303) Larsen, M. H.; Vilchèze, C.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Heifets, L.; Hazbon, M. H.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Overexpression of inhA, but Not kasA, Confers Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Smegmatis, M. Bovis BCG and M. Tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46* (2), 453–466. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03162.x.

(304) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179.

ANNEXES

European Journal of Medicinal Chemistry 259 (2023) 115646



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech



Research paper



Discovery of new diaryl ether inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* targeting the minor portal of InhA

Mélina Chebaiki [a,b], Evelyne Delfourne [a], Rasoul Tamhaev [a,b], Saïda Danoun [a], Frédéric Rodriguez [a], Pascal Hoffmann [a], Emeline Grosjean [a], Fernanda Goncalves [a], Joëlle Azéma-Despeyroux [a], Adrián Pál [c], Jana Korduláková [c], Nadège Preuilh [b], Sébastien Britton [b], Patricia Constant [b], Hedia Marrakchi [b], Laurent Maveyraud [b,*], Lionel Mourey [b,**], Christian Lherbet [a,***]

[a] *Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (LSPCMIB), UMR 5068, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France*
[b] *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France*
[c] *Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovakia*

ARTICLE INFO

Keywords:
Tuberculosis
InhA
Minor portal
Diaryl ether
Coumarin
Mechanism
Cytotoxicity

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) affects 10 million people each year and the emergence of resistant TB augurs for a growing incidence. In the last 60 years, only three new drugs were approved for TB treatment, for which resistances are already emerging. Therefore, there is a crucial need for new chemotherapeutic agents capable of eradicating TB. Enzymes belonging to the type II fatty acid synthase system (FAS-II) are involved in the biosynthesis of mycolic acids, cell envelope components essential for mycobacterial survival. Among them, InhA is the primary target of isoniazid (INH), one of the most effective compounds to treat TB. INH acts as a prodrug requiring activation by the catalase-peroxidase KatG, whose mutations are the major cause for INH resistance. Herein, a new series of direct InhA inhibitors were designed based on a molecular hybridization approach. They exhibit potent inhibitory activities of InhA and, for some of them, good antitubercular activities. Moreover, they display a low toxicity on human cells. A study of the mechanism of action of the most effective molecules shows that they inhibit the biosynthesis of mycolic acids. The X-ray structures of two InhA/NAD^+/inhibitor complexes have been obtained showing a binding mode of a part of the molecule in the minor portal, rarely seen in the InhA structures reported so far.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) has existed for millennia and is still considered a scourge. It is the second leading cause of death due to a single pathogen worldwide, after the COVID-19 pandemic. Based on the Global Tuberculosis Report 2022, 1.6 million people died from TB and an estimated 10 million people fell ill with TB in 2021 [1]. Although TB is considered curable, the coronavirus crisis has caused distortions in its diagnosis and treatment in many countries, which has made patients all the more vulnerable. In addition, the emergence of multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively-drug resistant TB (XDR-TB) strains remains a challenge. In this context, various actions, including the discovery of new drugs, have to be taken to move towards the eradication of TB. The unique composition of the mycobacterial cell envelope has led researchers to focus on the proteins involved in the biosynthesis of its major components, mycolic acids. The biosynthesis of these essential and very specific α-alkylated β-hydroxylated fatty acids involves two fatty acid synthase (FAS) systems called FAS-I and FAS-II. In FAS-II, at least four independent enzymatic activities participate to the elongation of the FAS-I products: β-ketoacyl-ACP (acyl carrier protein) reductase (MabA), enoyl-ACP reductase (InhA), β-hydroxyacyl-ACP dehydratase complex (HadABC), and β-ketoacyl-ACP synthase (KasA/KasB). Isoniazid (INH) is one of the oldest drugs for tuberculosis treatment. This small molecule acts as a prodrug, requiring the prior activation by the

* Corresponding author.
** Corresponding author.
*** Corresponding author.
E-mail addresses: laurent.maveyraud@ipbs.fr (L. Maveyraud), lionel.mourey@ipbs.fr (L. Mourey), christian.lherbet@univ-tlse3.fr (C. Lherbet).

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115646
Received 20 June 2023; Received in revised form 12 July 2023; Accepted 13 July 2023
Available online 16 July 2023
0223-5234/© 2023 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

catalase peroxidase enzyme KatG. Upon activation, the isonicotinoyl radical forms an adduct with the cofactor NAD, which inhibits InhA, leading to the arrest of mycolic acid biosynthesis and the mycobacterial death [2]. With the emergence of INH resistance, mainly due to mutations in KatG, new direct inhibitors of InhA have emerged. These include triclosan (TCL) [3] and TCL derivatives [4–7], GEQ and analogues [8,9], triazoles [10], thiazoles [11], pyridomycin [12,13], and 4-hydroxy-2--pyridones [14]. Furthermore, GlaxoSmithKline's thiadiazole GSK693 [15] and the diazaborine AN12855 [16] were two promising leads with low toxicity, good oral bioavailability, *in vivo* efficacy similar to INH, and above all, activity against *katG*-deficient Mtb. However, none of the above compounds has been approved for clinical use. Thus, there is still a need to develop new direct inhibitors which overcome INH resistance.

In this respect, being a key target for antitubercular drug discovery, InhA has been the subject of numerous structural studies by X-ray crystallography. In 1995, its structure was the very first from the Mtb proteome to be deposited in the protein data bank (PDB) [17] and there are currently 105 deposited structures compared to 80 in the last comprehensive review published in 2018 [18]. Crystal structures corresponding to the *apo*-form and to complexes with its NAD cofactor, a substrate analogue and various inhibitors, including the INH-NAD adduct and the above listed direct inhibitors, have been resolved at resolution ranging from 3.4 to 1.4 Å. This allowed defining the most important structural elements with regard to the mechanisms of action and inhibition. InhA is a tetrameric enzyme with dihedral (D2) symmetry where the four subunits are related by three 2-fold axes. The tertiary fold consists of a central seven-stranded parallel β-sheet sandwiched on each side by three helices. One of the two helical faces is overhung by two additional helices, H5 and H6, which form the so-called "substrate-binding loop" (SBL). Opposite the SBL and in the extension of the β-sheet and the other helical face, there are two loops (A and B). The SBL and loops A and B line the InhA active site, which forms a deeply buried crevice. At the bottom of the crevice and spanning the C-termini of the β-strands is the cofactor binding site. Above the cofactor binding site is found the substrate binding site, one end of which is wide open to the solvent via the major portal while at the apex of the opposite side is the much smaller minor portal [19]. The catalytic triad, composed of residues Phe149-Tyr158-Lys165, is located under the entrance of the minor portal. The conformation of the SBL loop, more specifically the position of helix H6, and the orientation of the Phe149 and Tyr158 side chains are important structural descriptors related to the different states of the enzyme, i.e. *apo*, *holo*, or in complex with inhibitors. All inhibitors, except the three inhibitors INH-NAD adduct, pyridomycin, and AN12855 compound, bind to the enzyme in the presence of the cofactor. A very few of the InhA inhibitors for which an X-ray structure has been deposited within the PDB reach the entrance to the minor portal: 8 PP (5-octyl-2-phenoxyphenol, ligand ID 8 PS in PDB 2B37) [20], PT155 (5-(4-amino-2-methylphenoxy)-2-hexyl-1-methylpyridin-4(1*H*)-one, ligand ID 1S5 in PDB 4OXK) [21], and AP-124 ((S)-1-(benzo[*d*]imidazole-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl) oxy)propan-2-ol, ligand ID JVZ in PDB 6R9W) [22]. The alkyl diphenyl ether 5-octyl-2-phenoxyphenol is one example of the many triclosan-based InhA inhibitors, which represent one quarter of all InhA structures in the PDB [5,9,20,21,23–27].

Here, we report the design and synthesis, based on a molecular hybridization approach, of a series of new diaryl ethers bearing various, mainly coumarinic, heterocycles (Fig. 1). This strategy, which consists in combining two molecules or molecular fragments to obtain a more affine compound for the target, was proven successful to discover new anti-tumor or anti-Mtb agents [28,29]. We show that these new diaryl ethers exhibit excellent inhibition of both InhA activity and mycobacterial growth. The mechanism of action of these compounds was also investigated through monitoring the effect on mycolic acid biosynthesis in Mtb and cytotoxic activity. Finally, the binding mode of these molecules

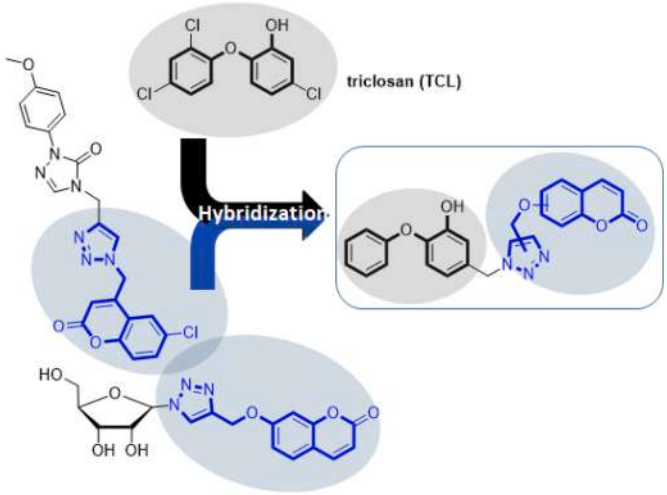


Fig. 1. Design of the new diaryl ether inhibitors by a molecular hybridization approach based on TCL and coumarins.

was elucidated through the determination of high-resolution X-ray structures of complexes, which revealed that these compounds are able to occupy the minor portal, to an extent never observed before.

2. Results and discussion

2.1. Design of the hybrid inhibitors

First structure-activity studies on TCL have shown that this diaryl ether molecule may bind at two sites of the InhA substrate-binding pocket [9]. One TCL molecule (TCL1) was found to bind through π-stacking interactions between the hydroxyl-substituted ring, hereafter called "A ring", and the nicotinamide ring of the cofactor plus hydrogen bonding between the hydroxyl moiety of the A ring and the 2′-hydroxyl group of NAD^+ and hydroxyl group of Tyr158. The dichlorophenyl ring (or "B ring") is orthogonally oriented to the A ring. It is worth mentioning that the TCL1-binding site occupies the part of the substrate-binding site, as observed in the structure of the complex with a C16 fatty acyl substrate analogue, which is directly accessible through the major portal [19]. The second TCL molecule (TCL2) binds to the remaining part of the substrate-binding site in a rather hydrophobic region close to the minor portal. This spatial configuration of TCL1 and TCL2, which underlines the size of the InhA binding site, has been exploited to further develop TCL-based inhibitors of the enzyme [5–7,20,21,23–27,30–32]. In the resolved structures of InhA complexes with TCL derivatives, the diaryl ether moiety systematically binds in the same position as TCL1 whereas the various chemical substituents, at position 5 of the A ring, reach the space occupied by the TCL2 A ring (Fig. 2). The hydroxyl group of the phenol moiety revealed as essential for activity by dictating the orientation of the molecules in the substrate-binding site (for a review, see Ref. [33]).

In 2006, Sullivan *et al.* developed a series of alkyl diphenyl ethers bearing an alkyl chain up to 14 carbons on the A ring. The molecule showing the best inhibitory activity, both on InhA and on the growth of Mtb, bears a 8 carbon-long alkyl chain (IC_{50} = 5 nM, MIC(H37Rv) = 6.4 μM) [20]. Later, Freundlich *et al.* diversified the nature of the substituents on the A ring with branched alkyl chains or alkyl chains containing (hetero)aromatic groups, but this did not lead to improved activities against InhA [23]. On the other hand, Stec *et al.* showed that the introduction of a triazole group among various heterocycles at position 5 exhibited favorable interactions with the protein, the best compound carrying a *n*-butyl chain on the position 4 of the triazole [7].

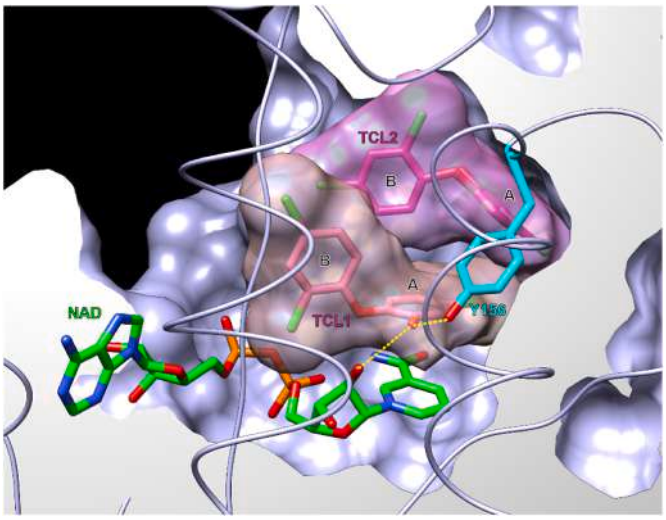


Fig. 2. X-ray structure of 1P45:A (lightblue) including cofactor NAD (green) and two molecules of triclosan: TCL1 (pink) and TCL2 (magenta) in the binding site of InhA. The clipped protein surface, ligand surfaces, Tyr158 (cyan) and major interactions between Tyr158, the cofactor and TCL1 (yellow, dashed lines) are shown.

Lately, Spagnuolo *et al.* observed that large and bulky substituents at position 5 on the A ring induce steric hindrance in the substrate-binding site resulting in the loss of key interactions [27,33]. Despite this, we and others thought that bulkier substituents at the 5-position could target the space occupied by TCL2. For instance, we recently reported the synthesis of macrocyclic *di*-triclosan analogues which displayed good inhibitory activity against InhA (IC_{50} = 4.7 μM) [6]]. Chetty *et al.* also developed a series of flexible *di*-triclosan analogues revealing inhibition in the same range [34]. To go further, we decided to replace the diaryl ether corresponding to the TCL2 site with coumarin derivatives. Indeed, the coumarin skeleton is a privileged scaffold in life sciences and is present in numerous biologically relevant natural or synthetic products. Such molecules display various biological activities such as antibacterial [35], antifungal [36], anti-Alzheimer [37], antioxidant [38], and anti-tumor [39,40]. Some of them have also been studied as potential InhA and FabI inhibitors (Fig. 1) [41–43]. We speculated that coumarin moieties could mimic the second molecule of TCL as in the PDB structure 1P45 (chain A, hereafter 1P45:A) and interact with the rather hydrophobic residues defining the TCL2 site. These coumarins could be grafted to the diaryl ether scaffold with an appropriate linker. The 1,2,3-triazole pharmacophore introduced by click-chemistry through copper(I) azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) was chosen as a spacer, as illustrated in Fig. 1.

2.2. *In silico studies of compound 7a*

Preliminary molecular docking was performed to evaluate the ability of compound **7a** (Fig. 3A) to bind into the substrate-binding site of the enzyme. With the aim of exploring the possible interactions and conformation of the compounds, we used two X-ray structures. The first one corresponds to the 1P45:A coordinates, where the binding of two TCL molecules has been observed with an open major portal and a closed minor portal. The second X-ray structure corresponds to the complex of InhA with PT70 (2-(o-tolyloxy)-5-hexylphenol, compound TCU in PDB 2X22, chain A, hereafter 2X22:A) in which the major portal is closed and the minor portal is opened [25]. Two flexible docking protocols (MSE and OPT) were applied giving four results per ligand and two docking scores per result (see Experimental section 4.2.1. for pose selection, strength and conformity). With 1P45:A, U-shaped conformations of **7a** were obtained whatever the docking protocol used (Fig. 3B). Fluctuations were limited and the hydrogen bonding network between Tyr158, the cofactor, the ligand, and the π-π interactions involving the nicotinamide group with the phenol group of **7a** were similar to TCL1 (Supporting Information Fig. S1) whereas the coumarin group occupies the same place as TCL2. In contrast, S-shaped-like conformations were

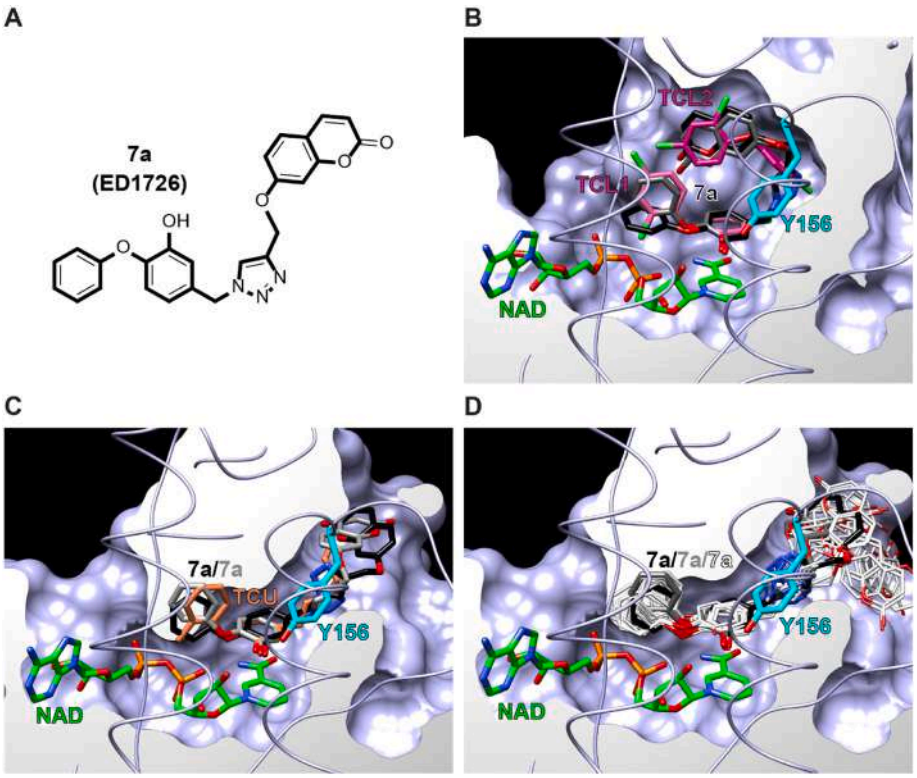


Fig. 3. A. Compound **7a** used for docking. **B.** Best poses obtained using the MSE and OPT docking protocols of **7a** (black and dark gray sticks, respectively) in 1P45:A (lightblue ribbon and surface) relatively to Tyr158 (cyan). The two TCL molecules (TC1: pink and TCL2: magenta) and NAD (green) of 1P45:A are also shown. **C.** Best poses obtained using the MSE and OPT docking protocols of **7a** (black and dark gray sticks, respectively) in 2X22:A (lightblue ribbon and surface) relatively to Tyr158 (cyan). The TCU (brightorange) and NAD (green) molecules of 2X22:A are also shown. **D.** Fluctuations of the ten best poses (MSE and OPT docking protocols, white) of **7a** in 2X22:A (lightblue ribbon and surface) relatively to Tyr158 (cyan) and NAD (green). The two best poses displayed in panel C are also shown (black and gray sticks).

observed using 2X22:A, with the coumarin reaching the minor portal (Fig. 3C). The diaryl ether moiety of **7a** showed the same interactions as TCL1 in 1P45:A and PT70/TCU in 2X22:A pattern (Supporting Information Fig. S2). Furthermore, by superimposing the strongest poses obtained after docking of **7a** in 2X22:A, fluctuations starting from the triazole were observed in the minor portal (Fig. 3D). It has to be noted that the averaged fluctuations (positions and orientations) of coumarin were found similar using the two docking protocols. Interestingly, the docking scores regardless of protocol were better for compound **7a** in 2X22:A than in 1P45:A.

2.3. Synthesis of the designed inhibitors

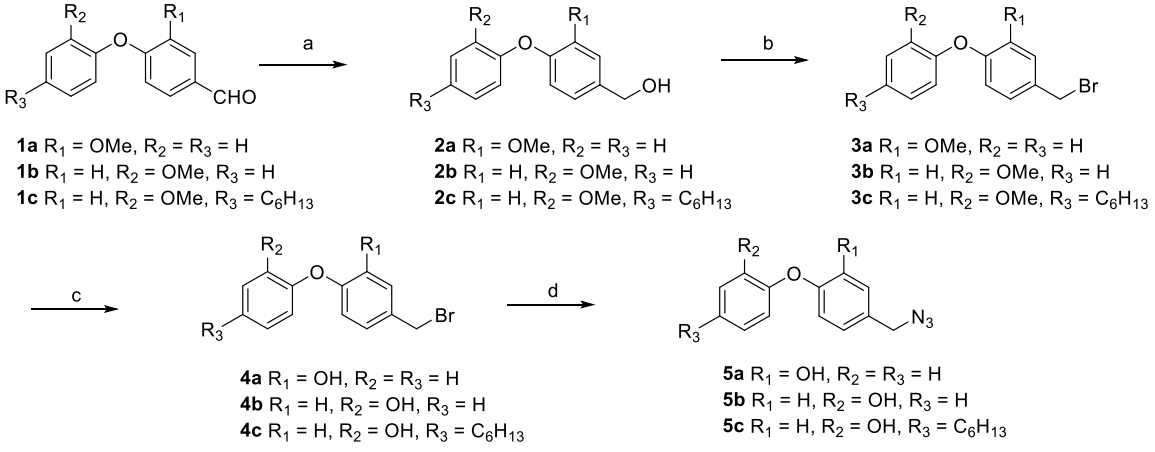
Based on our knowledge of the InhA binding site and docking results on compound **7a**, several molecules have been conceived and are described in Schemes 2 and 3. The azidomethyl derivatives **5a-c** were prepared in four steps from the corresponding aldehydes **1a-c**, themselves obtained according to procedures previously described (Scheme 1) [44,45].

Briefly, a sequence of reduction, bromation and demethylation by BBr_3 provided compounds **4a-c**. Deprotection was preferable at this stage, in terms of yield, rather than once the Huisgen's products **7a-n** were obtained. Even knowing this, an effective demethylation reaction is compound-dependent. The synthesis of compound **4a** was achieved in 94% yield, while for compounds **4b** and **4c,** moderate yields were obtained with 38 and 27%, respectively. These compounds were finally transformed into their corresponding azidomethyl derivatives by action of NaN_3 in DMF, synthons **5a-c** being so obtained in 77, 27 and 9% overall yield respectively. Described procedures were used to dispose of the propargyl derivatives **6a-c** (see Supporting Information) [46,47]. Compound **6d** was synthesized in 38% yield, by action of propargyl bromide and potassium carbonate on 7-(diethylamino)-4-hydroxycoumarin [48] in DMF. Compounds **6e-i** were prepared involving the corresponding coumarinic acid derivatives and carbodiimidazole in dichloromethane whereas intermediates **6j-k** were synthesized through well-known protocols (see Supporting Information). The synthesis of 1,2,3-triazole derivatives **7a-n** has been achieved by Cu(I)catalyzed Huisgen-Sharpless-Meldal [3 + 2] azide-alkyne dipolar cycloaddition (CUAAC) [49,50] of azidomethyl phenoxyphenols **5a-c** with propargyl coumarins **6a-i** and extended to propargyl benzoxadiazoles **6j-k** (Scheme 2).

In order to compare their inhibitory activity to that of 1,4-triazoles, two 1,5-triazole regioisomers were prepared *via* the ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition (RuAAC) [51]. Azide **5a** was reacted with alkynes **6a** or **6b** in the presence of $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ as catalyst to furnish 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives **8a** and **8b** in low yields (Scheme 3).

2.4. InhA inhibition

In order to choose appropriate fragments for the development of inhibitors targeting the minor portal of InhA, twenty-two compounds including some alkynyl precursors, azide **5a** and 1,4- and 1,5-disubstituted triazole derivatives were screened for their inhibitory potency against InhA. The assays were performed in the presence of 2-*trans*-dodecenoyl-CoA and NADH. The molecules were firstly tested at 500 μM for the alkyne precursors and 50 μM for the "click" derivatives. For the most potent inhibitors, IC_{50} values were determined (Table 1). The general trend shows that alkyne precursors exhibit low inhibitory activities compared to triazole products or even to the azide **5a**. These results clearly show that the protein does not recognize these alkynic precursors. Diaryl ether azide **5a** showed good inhibition with an IC_{50} of 0.843 μM. Compound **7d** bearing 7-diethylaminocoumarin substituted at the position 4 showed the best inhibitory activity with 0.053 μM, a 15-fold increase in comparison to **5a**. Replacement of the 7-diethylamino substituent by hydrogen (compound **7c**) resulted in a decrease of the activity. Comparison of compounds **7a** and **7l**, which only differ in the position of the hydroxyl group, showed the importance of this group which will dictate the positioning of the rest of the molecule by interacting with Tyr158. Coumarin-3-carboxamides **7e-7i** were less active but with very important differences in inhibition depending on the substituent and its position on the coumarin. 7-Diethylamino coumarin **7f** exhibited an IC_{50} of 3.5 μM while less bulky 7-methoxy-coumarin derivative **7g** was 10 fold more active with an IC_{50} of 0.345 μM. Replacing coumarins by nitrobenzoxadiazole (NBD) or 4-(*N*,*N*-dimethylaminosulfonyl)benzoxadiazole (DBD) as found in **7j** and **7k** did not result in better inhibition. Two other compounds, **7m** and **7n**, bearing a C_6-alkyl chain, were evaluated. These compounds are analogues to one of the most potent inhibitors of InhA, 5-hexyl-2-phenoxyphenol showing nanomolar inhibition of InhA enzyme but poor MIC (69 μM) [20]. The C_6-alkyl chain plays a crucial role in interacting with the rather hydrophobic region close to the minor portal in the protein substrate-binding site. The presence of the C_6 chain and the position of the hydroxyl group guide the positioning of the NBD and coumarin heterocycles toward the



1a R_1 = OMe, R_2 = R_3 = H
1b R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H
1c R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = C_6H_{13}

2a R_1 = OMe, R_2 = R_3 = H
2b R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H
2c R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = C_6H_{13}

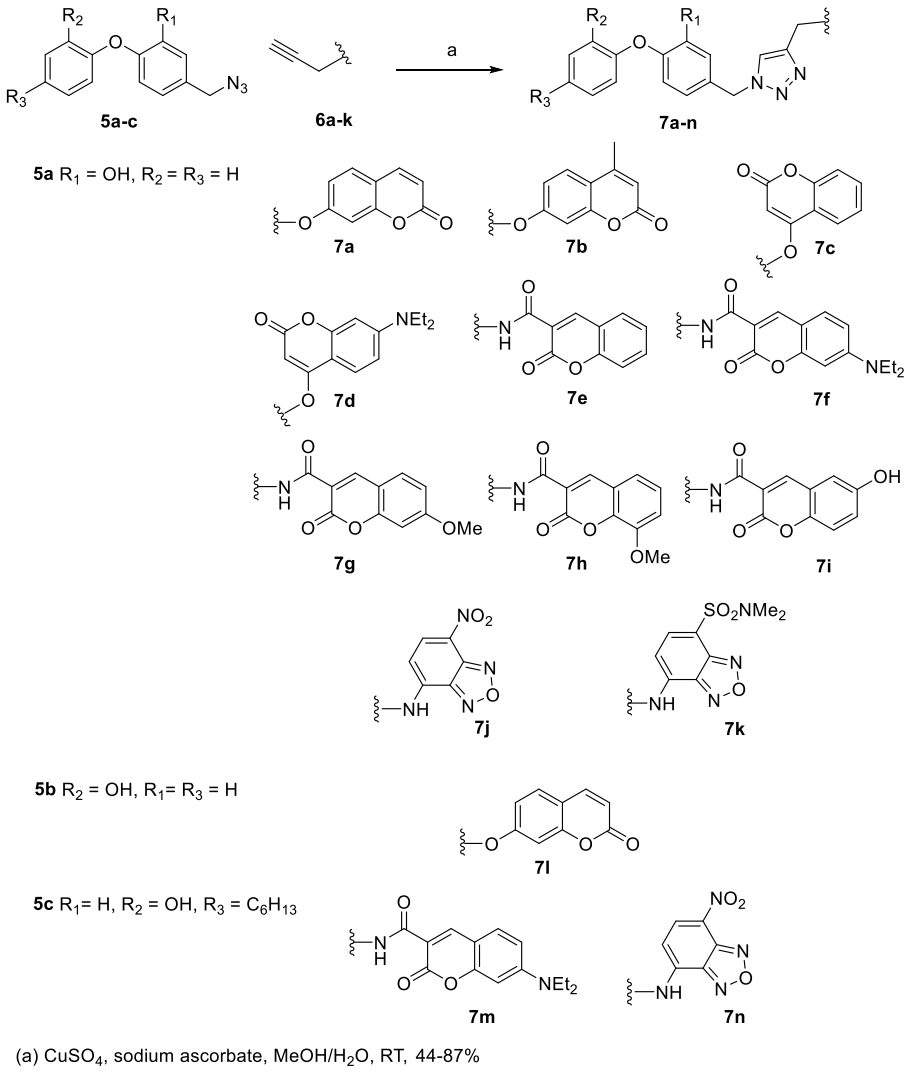
3a R_1 = OMe, R_2 = R_3 = H
3b R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H
3c R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = C_6H_{13}

4a R_1 = OH, R_2 = R_3 = H
4b R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H
4c R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = C_6H_{13}

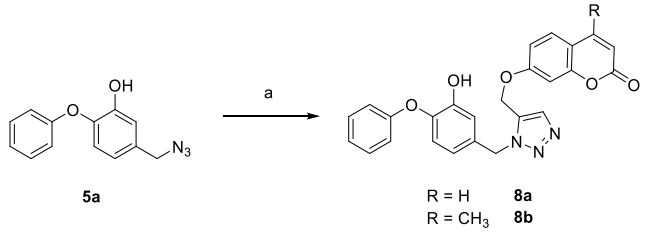
5a R_1 = OH, R_2 = R_3 = H
5b R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H
5c R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = C_6H_{13}

(a) $NaBH_4$, MeOH, RT, 3 h, **2a** quantitative, **2b** 94%, **2c** 74%. (b) NBS, PPh_3, CH_2Cl_2, RT, 3 h, **3a**, 95%, **3b** 76%, **3c** 47%. (c) BBr_3, CH_2Cl_2, - 78 °C, 4 h, **4a** 94%, **4b**, 38%, **4c** 27%. (d) NaN_3, DMF, 45 °C, 4 h, **5a** 86%, **5b** quantitative, **5c** quantitative.

Scheme 1. Synthesis of the azidomethyl derivatives.



Scheme 2. Synthesis of the various diaryl ether derivatives **7a-n** by CuAAC click chemistry.



Scheme 3. Synthesis of 1,5-triazole derivatives **8a** and **8b** *via* a ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (RuAAC).

major portal. The two molecules showed weak inhibitory activity against the InhA enzyme (Table 1). Finally, 1,5-triazole regioisomers **8a** and **8b** showed slightly weaker inhibition by comparison with **7a** and **7b,** with IC_{50} of 0.630 μM and 0.510 μM, respectively. This represents a drop in inhibition of only 2.5 to 3.8 times. These results show that 1, 5-triazole derivatives despite a very different conformational space compared with 1,4-triazoles have the ability to inhibit the InhA protein activity.

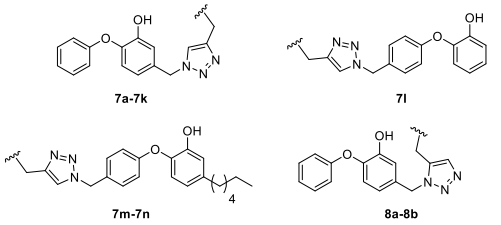
2.5. Antimycobacterial activity

Table 1 lists the inhibitory activity of the growth of Mtb H37Rv for each 1,4-triazole derivatives. Ciprofloxacine was used for comparison. MIC values obtained are very disparate, ranging from 1.25 μM to >100 μM. Two compounds, **7b** and **7d**, which display good inhibitory activity against InhA, were found to inhibit mycobacterial growth with MICs of 1.25 μM. Interestingly, these two active compounds are different by the positioning of the connection to the coumarin but also by the nature of the substituents that the coumarin carries. Compound **7a** bearing no substituent, by comparison with compound **7b,** shows a greater MIC (5 μM). 7-Des(diethylamino) compound **7c** compared to **7d** loses effectiveness. Coumarin amide **7e-7i** presented MICs values higher than 10.0 μM. Surprisingly, compounds **7l** and **7n**, which displayed poor inhibitory activity against InhA, could inhibit Mtb growth with MICs of 5.0 and 2.5 μM, respectively, while **7m** showed no activity. Therefore, we believe that these two compounds might have biological targets other than InhA.

2.6. Inhibition of mycolic acid biosynthesis in Mtb H37Rv

The effect of the three best anti-tubercular compounds, i.e. **7b**, **7d** and **7n**, on the biosynthetic pathway of mycolic acids was investigated by metabolic labeling of the pathogenic bacteria Mtb H37Rv with ^{14}C

Table 1
Activities against InhA enzyme and Mtb H37Rv strain.



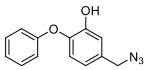
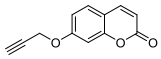
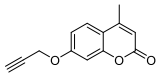
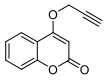
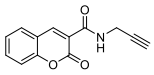
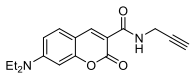
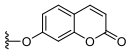
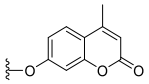
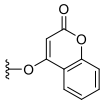
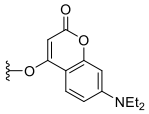
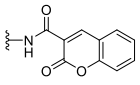
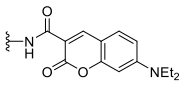
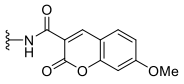
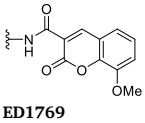
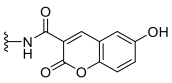
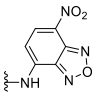
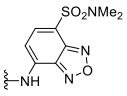
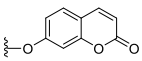
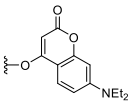
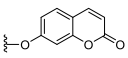
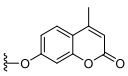
Compound	R	IC_{50} (μM or % at concentration tested)	MIC H37Rv μg/mL (μM)
5a		0.843 ± 0.094	NT
6a		200 μM: 99% 100 μM: 30%	NT
6b		500 μM: 90% 200 μM: 37%	NT
6c		500 μM: NI	NT
6e		200 μM: NI	NT
6f		500 μM: 10%	NT
7a	 **ED1726**	0.163 ± 0.017	2.2 (5)
7b	 **ED1727**	0.205 ± 0.012	0.6 (1.25)
7c	 **ED1728**	0.181 ± 0.016	2.2 (5)
7d	 **ED1834**	0.054 ± 0.015	0.7 (1.25)
7e	 **ED1751**	0.598 ± 0.061	4.7 (10)
7f	 **ED1765**	3.550 ± 1.030	>54 (>100)
7g	 **ED1806**	0.345 ± 0.029	>5 (>10)
7h	 **ED1769**	0.740 ± 0.150	5 (10)

Table 1 (*continued*)

Compound	R	IC_{50} (μM or % at concentration tested)	MIC H37Rv μg/mL (μM)
7i	 **ED1786**	0.844 ± 0.095	>4.8 (>10)
7j	 **ED1755**	0.459 ± 0.040	4.6 (10)
7k	 **ED1758**	0.733 ± 0.065	>52 (>100)
7l	 **ED1750**	50 μM: 10%	2.2 (5)
7m	 **EG1-090**	50 μM: 53.7% 10 μM: 31.5% 1 μM: 14.1%	>60 (>100)
7n	 **EG1-093**	50 μM: 32.3% 10 μM: 11.4%	1.4 (2.5)
8a	 **MC3-121**	0.630 ± 0.050	NT
8b	 **MC3-122**	0.510 ± 0.060	NT
Ciprofloxacine		NA	0.8 (2.5)
TCL		50 μM: 100% 1 μM: 61%	NT

NT: not tested, NI: no inhibition, NA: not applicable.

acetate. Treatment of Mtb H37Rv with three concentrations of compounds **7b** and **7d** corresponding to 1x, 5x, and 25x their MIC leads to a decreased production of lipids containing mycolic acids, namely trehalose monomycolates (TMM) and trehalose dimycolates (TDM) (Fig. 4A), as well as all types (alpha, methoxy, keto) of mycolic acids and accumulation of standard fatty acids (FAME) (Fig. 4B). These results are consistent with the potential of compounds **7b** and **7d** to inhibit the production of mycolic acids and their derivatives in mycobacterial cells. Of note, treatment with biaryl ether derivative **7n** displays a distinct inhibition profile and leads to the accumulation of trehalose monomycolates and decreased production of trehalose dimycolates while it has no effect on the production of mycolic acids (Fig. 4B). This result correlates with the fact that compound **7n** is a poor InhA inhibitor. This imbalance of TMM/TDM ratio in favor of TMM was reported upon the inhibition of the TMM transporter, MmpL3, using either small-molecule inhibitors [52,53], or in conditional mycobacterial *mmpL3* mutants [54].

2.7. Sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG/InhA/HadABC

The mechanism of action of **7b**, **7d**, and **7n** was investigated by using H37Ra strains carrying pVV16-$katG_{smeg}$, pMV261-*inhA* and pVV16-hadABC plasmids overexpressing catalase peroxidase KatG, InhA and

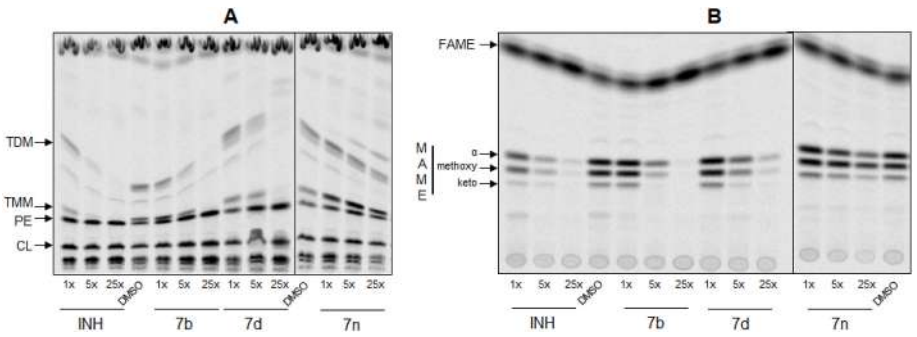


Fig. 4. TLC analysis of lipids after metabolic labeling experiment of mycobacteria treated with compounds **7b**, **7d**, or **7n** for the analysis of lipid inhibition (A) and for the analysis of mycolic acid inhibition (B). **7b** (1.25 μM 1 × , 6.25 μM 5 × , 31.25 μM 25 ×), **7d** (1.25 μM 1 × , 6.25 μM 5 × , 31.25 μM 25 ×), **7n** (2.5 μM 1 × , 12.5 μM 5 × , 62.5 μM 25 ×). Abbreviations: FAME: Fatty Acid Methyl Esters, MAME: Mycolic Acid Methyl Esters; TDM: Trehalose DiMycolates; TMM: Trehalose MonoMycolates; PE: PhosphatidylEthanolamine; CL: CardioLipin.

HadABC dehydratases, respectively. H37Ra strains carrying empty vectors pMV261 and pVV2 were used as controls. The same sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG and HadABC compared to the control strains means that the important HadABC component of the FASII system is not the target of the compounds and, as expected, these compounds are not activated by the KatG protein (Table 2). In contrast, the increased MIC of **7b** and **7d** in Mtb H37Ra overproducing InhA confirms InhA as the specific target.

2.8. Cytotoxic activity on human cell lines

The cytotoxic activity of compounds **7b**, **7d** and **7n** was evaluated after 72 h of treatment on a panel of various human cell lines including the colon carcinoma HCT116 cell line, the HepG2 hepatocarcinoma cell line (which can recapitulate the metabolization of some compounds into toxic secondary metabolites), the CACO2 colorectal carcinoma cell line (used as a model of the intestinal epithelial barrier) and WI38hTERT, which are normal lung fibroblasts immortalized by telomerase expression (Table 3). These assays revealed that compound **7b** has only weak cytotoxic effects, especially against lung fibroblasts (>100 μM, Selectivity Index >80). Compound **7n** exhibited moderate cytotoxicity against the panel tested, while **7d** was clearly cytotoxic. These results show that the nature of coumarin plays an important role in the cytotoxicity of these compounds.

2.9. X-ray structures

In parallel to the characterization of the compounds for their ability to inhibit the enzymatic activity of InhA and mycobacterial growth, a massive crystallization campaign of the corresponding complexes was launched in order to rationalize the results obtained. The structures of the complexes with compounds **7b** and **7e** could be resolved, after incubation in the presence of NAD^+, at resolutions of 1.60 and 1.96 Å, respectively (Table S1). From the more than one hundred X-ray structures of InhA available in the PDB, it appears that the protein and its complexes can be crystallized in different conditions leading to different space groups with one, two, four, six or eight molecules in the corresponding asymmetric units. The InhA/NAD^+/**7b** complex (PDB code 8OTN) crystallized in the presence of PEG 4000 in space group $P2_12_12_1$ with cell parameters a = 70.16 Å, b = 91.18 Å, c = 164.22 Å and 4 molecules in the asymmetric unit. The InhA/NAD^+/**7e** (PDB code 8OTM) complex also crystallized in the presence of PEG 4000 and with 4 molecules in the asymmetric, but in a different space group ($P2_1$ with a = 90.59 Å, b = 92.78 Å, c = 90.75 Å, β = 119.20°). In both X-ray structures, all four molecules in the asymmetric unit are almost complete, only missing one or two residues at their N and C termini. When superimposing based on Cα atoms, the different molecules in the asymmetric unit for each structure or the two structures between them, the calculated RMSD values do not exceed 0.3 Å, showing that the tertiary structures of InhA in the two complexes are almost identical. Furthermore, in both structures, the SBL loop is in closed conformation and the orientation of the Phe149 and Tyr158 side chains are in the so-called *out* and *in* conformation, respectively (Fig. 5A). The NAD^+ is positioned in the cofactor binding site where it adopts the canonical conformation observed in all InhA structures through several hydrogen bonds and hydrophobic interactions. As expected, compounds **7b** and **7e** bind similarly above the cofactor with the diaryl ether moiety in the same position as that found in the structures of InhA-TCL complexes, e.g. TCL1 in 1P45:A (see Fig. 2), the hydroxyl-substituted ring being stacked with the nicotinamide ring of the cofactor and the phenyl ring pointing towards the major portal. The orientation of the triazole with respect to the diaryl ether and its conformation is also the same for **7b** and **7e**, as well as in other structures with triazole-containing diphenyl ethers [24, 27], but fluctuations are observed for the coumarin part of the ligands in the four molecules found in the respective asymmetric units (Fig. 5B). As TCL1 in 1P45:A, hydrogen bonds are found between the hydroxyl moiety of the diphenyl ether with the hydroxyl group of Tyr158 and the 2′-hydroxyl group of NAD^+ (Fig. 6). In addition, binding of both compounds occurs through non-bonded contacts invariably involving the cofactor and residues Gly96, Phe97, Met98, Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Val203, Gln214, Leu217, and Leu218. In some instances, the very tip of the Arg225 side chain from the same protomer and the C-terminal residues, Leu268 and Leu269, of a contacting protomer from the tetramer may complete the inhibitor-binding pocket (Fig. 6). Altogether, this allows to completely embed the diphenyl ether, the triazole and the coumarin phenyl moiety of **7b** (resp. the coumarin lactone of **7e**) whereas the coumarin lactone of **7b** (resp. the coumarin phenyl moiety of **7e**) is pointing out of the open

Table 2
Sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG/InhA/HadABC to **7b**, **7d** and **7n**.

Mtb strains	MIC (μM)		
	7b	7d	7n
H37Ra pMV261	1.25–6.25	6.25	2.5–12.5
H37Ra pVV2	1.25–6.25	6.25	2.5–12.5
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ *(2)*	1.25–6.25	6.25	2.5–12.5
H37Ra pVV16-*katG*$_{smeg}$ *(4)*	1.25–6.25	6.25	2.5–12.5
H37Ra pMV261-*inhA (1)*	12.5	>25	2.5–12.5
H37Ra pMV261-*inhA (2)*	12.5	>25	2.5–12.5
H37Ra pVV16-hadABC	1.25–6.25	6.25	2.5–12.5

Table 3
Cytotoxicity of compounds **7b**, **7d** and **7n**.

Compound	MIC (μM)	IC_{50} (μM)/Selectivity Index[a]			
	H37Rv	HCT116	CACO2	HepG2	WI38hTERT
7b	1.25	23.9/19.1	25/20	31/24.8	>100/>80
7d	1.25	0.53/0.4	1.1/0.9	1.6/1.3	0.6/0.5
7n	2.5	8.70/3.5	26.1/10.5	26.9/10.8	52.9/21.2

[a] The selectivity index corresponds for each compound to the ratio between the IC_{50} on the tested human cell line and the MIC on Mtb H37Rv. MIC and IC_{50} established from three independent experiments.

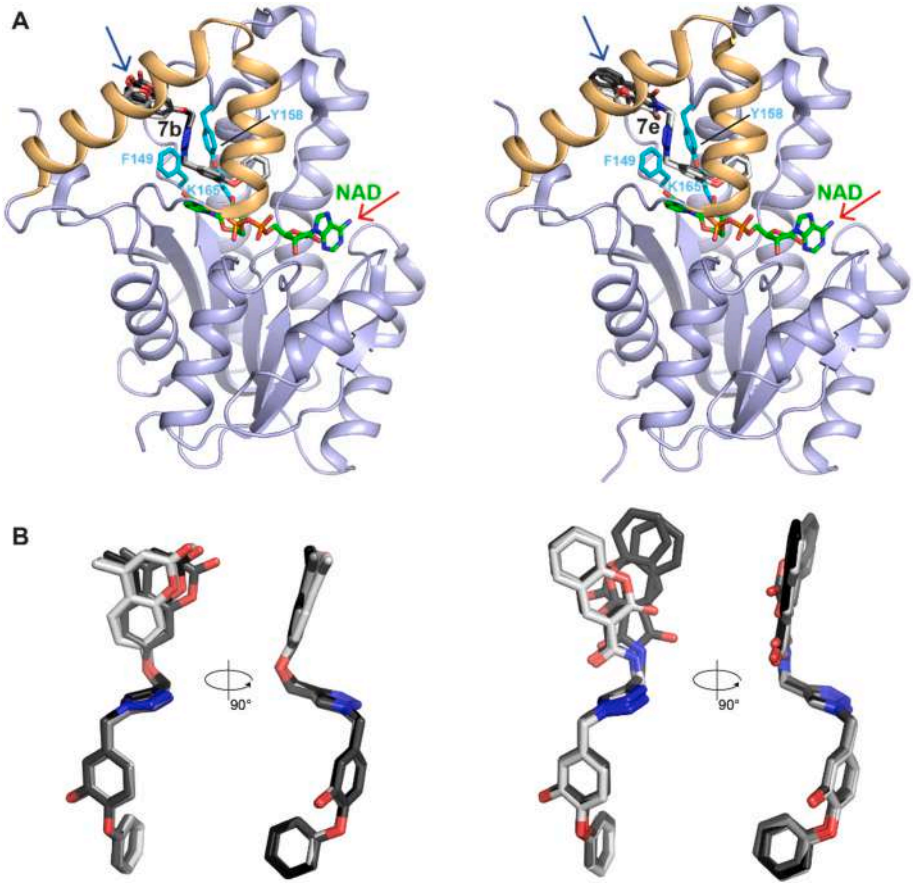


Fig. 5. X-ray structures of InhA/NAD$^+$/**7b** (left) and InhA/NAD$^+$/**7e** (right). **A.** Overall structure. Cartoon representation of InhA/NAD$^+$/**7b** (8OTN, chain D) and InhA/NAD$^+$/**7e**, (8OTM, chain B) with the NAD$^+$ (green), the ligand (shades of gray) and the side chains of the catalytic triad Phe149-Tyr158-Lys165 (cyan) shown as sticks. The SBL loop is shown in orange. Red and blue arrows in panel A indicate the active site entrance and minor portal, respectively.**B** Two perpendicular zoom-in views showing the fluctuations of the coumarin part of the ligands in the molecules found in the respective asymmetric unit (shown in A and B as different shades of gray).

crevice above the minor portal (Fig. 6). The overall conformations observed for **7b** and **7e** are reminiscent of the S-shaped conformation obtained after molecular docking of the **7a** compound. It is noteworthy that the fluctuations observed for the coumarin part in the X-ray structures do not impact the positions and conformations of the InhA residues involved in non-bonded contacts, except for the side chains of residues Gln214 and Leu217 and those of Leu268 and Leu269 of the contacting protomer, which allows fine adjustment. In the case of **7b**, these fluctuations are of low amplitude (Fig. 6A and B). The flexibility of the coumarin part is more important in the case of the complex with **7e** where in chain A, it is stabilized through hydrogen bonding between the carbonyl oxygen atom of the lactone and the NED2 atom in one of the two conformations of Gln214 (Fig. 6C), whereas in chain C, the C6–N1–C7–C8 amide dihedral bond adopts two alternate conformations resulting in the flipping of the C7–O3 bond without strongly affecting the orientation of the coumarin (Fig. 6D).

The X-ray structures obtained for **7b** and **7e** showed how a diaryl ether-based hybrid inhibitor can explore the exit of the InhA minor portal in a way never seen before for triclosan derivatives. It has been previously shown that two such derivatives (i.e. compound 8PS and 1S5 in PDB 2B37 and 4OXN, respectively) can only reach the entrance of this unexplored part of the enzyme (Supporting Information Fig. S4). Future works will deal with the design of more potent diaryl ether-triazole hybrid inhibitors bearing original substituents which can provide anchors.

3. Conclusions

A hybridization strategy, based on a diaryl ether structural scaffold and coumarinic fragments, allows the design of new inhibitors able to explore underexploited regions in InhA. The docking results, carried out on one of the targeted molecules **7a**, showed two binding modes in the active site of InhA, which depend on the chosen structure of InhA. 1P45: A or 1X22:A with major and minor portals more or less closed. Encouraged by these results, biaryl ether derivatives bearing various coumarins, or benzoxadiazoles moieties were synthesized in a few steps in high yields. Among them, two molecules **7b** and **7d** exhibited very good anti-Mtb efficiency and were able to block mycolic acid biosynthesis in Mtb H37Rv. Studies of their mechanism of action confirmed that InhA is their target. Two structures of the complexes InhA/NAD$^+$ with compounds **7b** and **7e** could be resolved. They reveal the binding of the coumarin moiety with a wide fluctuation, into the minor portal to a level never seen before. These structures represent a good opportunity for researchers interested in InhA to explore this finally accessible binding site. Further works, including structural optimization as well as pharmacological and toxicological studies, are now needed to evaluate the relevance of these molecules as anti-TB drugs.

4. Experimental section

4.1. Chemistry experimental

4.1.1. Material and methods

All commercially available chemical solvents and reagents were used without further purification. ^{1}H and ^{13}C were recorded on a Bruker Avance 600 (600 MHz and 151 MHz respectively); Bruker Avance 500 (500 MHz and 125 MHz, respectively) or a Bruker Avance 300 spectrometer (300 MHz and 75 MHz, respectively). The chemical shift values are reported in ppm using the solvent residual peak as internal reference: $CDCl_3$ $\delta = 7.26$ ppm/77.0 ppm, DMSO-d_6 $\delta = 2.50$ ppm/39.52 ppm and the coupling constants (*J*) are in Hz, while multiplicities are abbreviated by s (singlet); bs (broad singlet); d (doublet); dd (doublet of doublets); ddd (doublet of doublets of doublets); t (triplet); td (triplet of doublets); tt (triplet of triplets); m (multiplet). * = the multiplicity of the signal is

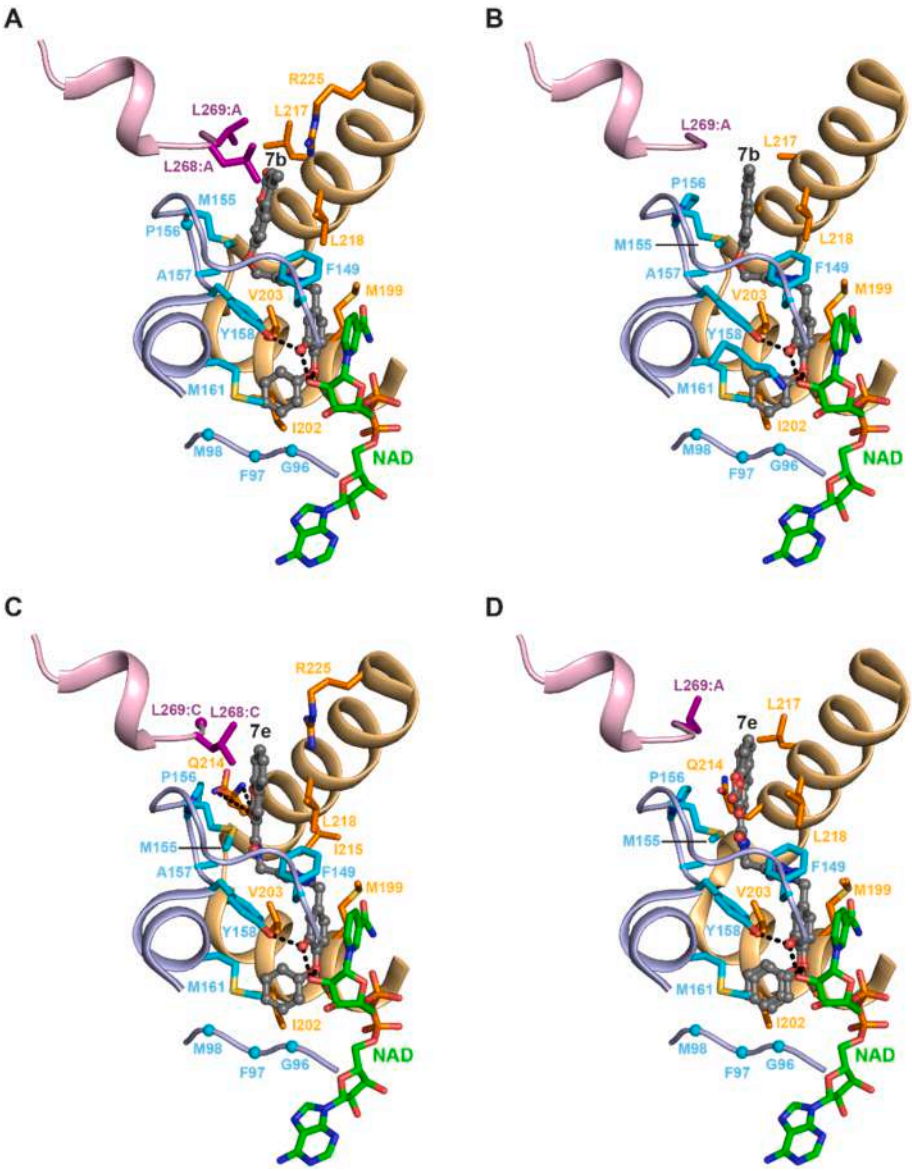


Fig. 6. Detailed description of **7b** and **7e** binding to InhA/NAD^+. The two most extreme conformations of the coumarin part observed for **7b** (resp. **7e**) are displayed in panels **A** and **B** (resp. **C** and **D**). The protein is shown as cartoon using the same color scheme as in Fig. 5. The cofactor is in green. Protein residues involved in defining the inhibitor-binding pocket are shown as cyan sticks (side chain atoms involved) or spheres (only main chain atoms are involved) and labeled. Hydrogen bonds are displayed as black dotted lines.

more complex as it is part of an AA'XX' system. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a GCT Premier spectrometer upon electron spray ionization (ESI) or chemical ionization (DCI, CH_4). Follow up of the reaction outcome by thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated Merck silica gel 60F-254 plates using an appropriate solvent system and the different spots were detected under UV lamp (λ 254 nm or 360 nm). Flash chromatography were performed using a Puriflash®300 with silica columns.

All the compounds were dissolved in acetonitrile before analysis by a Waters Acquity UHPLC-DAD-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector). The separations were achieved on a Waters Acquity BEH Phenyl (100 mm × 2.1 mm, particle size 1.7 μm) column. The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B) at a flow rate of 0.4 mL min^{-1}. The temperature of the column oven was set at 30 °C. The chromatographic analysis consisted in a linear gradient program from 60% A/40% B to 0% A/100% B between 1 and 12 min. After each run, the percentage of solvents ramped to their initial composition in 2 min and then the column was re-equilibrated for 2 min. The UV detection were performed at Lambda max of each compound and UV–Vis spectra were recorded within a range of 200–800 nm. The presence of possible impurities was evaluated at different wavelengths. The data acquisition and processing were done with the Empower 2 software. All tested compounds were more than 95% pure, as established by HPLC.

The synthesis of 3-methoxy-4-phenoxybenzaldehyde **(1a)** [44], 4-(2-methoxyphenoxy)benzaldehyde (**1b**) [45], 7-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one **(6a)** [47], 4-methyl-7-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one (**6b**) [46], 4-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one (**6c**) [46], 7-Nitro-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzo[c] [1,2,5]oxadiazol-4-amine **(6j)** [55], and *N*,*N*-dimethyl-7-(prop-2-yn-1-ylamino)benzo [c] [1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide **(6k)** [56] have been previously described and the observed chemical shifts in NMR are in accordance with the published data. The synthesis and the spectroscopic data of aldehyde derivative **1c** and propynyl coumarins **6e-6h** are described in the Supporting Information.

4.1.2. Synthesis of the derivatives

(4-Benzyl-3-methoxyphenyl)methanol (2a). To a solution of aldehyde **1a** (860 mg, 3.74 mmol) in methanol (43 mL) was added portion wise sodium borohydride (728 mg, 18.85 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and water (50 mL) was added. After concentration under reduced pressure, the mixture was extracted with

dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. No further purification was necessary. The expected compound **2a** was isolated quantitatively as a white solid (864 mg). $R_f = 0.34$ (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.33–7.27 (m, 2H); 7.07–7.02 (m, 2H); 6.97–6.92 (m, 3H); 6.89 (dd, $J = 8.2$, 1.9 Hz, 1H); 4.69 (s, 2H); 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.8; 151.3; 144.2; 137.6; 129.4 (2C); 122.4; 120.8; 119.3; 117.0 (2C); 111.5; 64.8; 55.8. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}O_3$ 230.0943, found 230.0937.

(4-(2-Methoxyphenoxy)phenyl)methanol (2b). Same procedure as for compound **2a**, involving aldehyde **1b** (340 mg, 1.49 mmol) in methanol (17 mL), sodium borohydride (290 mg, 7.45 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) to give compound **2b** as a colourless oil (320 mg, 94%). $R_f = 0.08$ (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.29 (d*, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7.14 (ddd, $J = 8.3$, 7.1 Hz, 2.0 Hz, 1H); 7.03–6.89 (m, 5H); 4.65 (s, 2H); 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.5; 151.4; 144.9; 134.9; 128.5 (2C); 129.9; 121.1; 121.1; 117.1 (2C); 112.8; 64.9; 55.9. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}O_3$ 230.0943, found 230.0954.

(4-(4-Hexyl-2-methoxyphenoxy)phenyl)methanol (2c). Same procedure as for compound **2a**, involving aldehyde **1c** (645 mg, 2.09 mmol) in methanol (30 mL) sodium borohydride (397 mg, 10.5 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (gradient dichloromethane/ethyl acetate: 100/0 to 90/10) to give compound **2c** as a white solid (608 mg, 90%) $R_f = 0.60$ (dichloromethane/ethyl acetate: 90/10). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.26 (d*, $J = 8.8$ Hz, 2H); 6.93–6.87 (m, 3H); 6.82 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H); 6.74 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.0 Hz, 1H); 4.60 (s, 2H); 3.81 (s, 3H); 2.61 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H); 1.96 (bs, 1H); 1.63 (quint, $J = 7.7$ Hz, 2H); 1.42–1.30 (m, 6H); 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.8; 151.1; 142.4; 140.0; 134.6; 128.4 (2C); 121.0; 120.7; 116.8 (2C); 113.0; 64.8; 55.9; 35.8; 31.7; 31.5; 29.0; 22.6; 14.0. HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{20}H_{27}O_3$ 315.1960, found: 315.1960.

4-(Bromomethyl)-2-methoxy-1-phenoxybenzene (3a). To a solution of alcohol **2a** (140 mg, 0.609 mmol) and triphenylphosphine (416 mg, 1.58 mmol) in dry dichloromethane (7 mL) was added portion wise *N*-bromosuccinimide (282 mg, 1.58 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After concentration under reduced pressure, the crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30) affording compound **3a** as a white solid (169 mg, 95%). $R_f = 0.62$ (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.34–7.28 (m, 2H); 7.07 (tt, $J = 7.4$ Hz, 1.4 Hz, 1H); 7.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); 6.98–6.92 (m, 3H); 6.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); 4.51 (s, 2H); 3.87 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.3; 151.2; 145.6; 134.0; 129.6 (2C); 122.9; 121.7; 120.3; 117.7 (2C); 113.4; 56.0; 33.6. HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}BrO_2$ 293.0177, found 293.0167.

1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-2-methoxybenzene (3b). Same procedure as for compound **3a** involving alcohol **2b** (290 mg, 1.26 mmol), triphenylphosphine (860 mg, 3.27 mmol), dry dichloromethane (15 mL), *N*-bromosuccinimide (583 mg, 3.27 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10) providing compound **3b** as a white solid (280 mg, 76%). $R_f = 0.55$ (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.31 (d*, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7.16 (ddd, $J = 8.4$, 7.2, 2.0 Hz, 1H); 7.01 (dd, $J = 8.1$, 1.8 Hz, 2H); 6.94 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 7.2 Hz, 1.8 Hz, 1H); 6.88 (d*, $J = 8.7$ Hz, 2H); 4.50 (s, 2H); 3.82 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.2; 151.6; 144.3; 131.5; 130.4 (2C); 125.3; 121.6; 121.2; 116.9 (2C); 112.8; 55.9; 33.6. HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{14}H_{14}BrO_2$ 293.0177, found 293.0177.

1-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-4-hexyl-2-methoxybenzene (3c). To a solution of alcohol **2c** (489 mg, 1.56 mmol) in dry dichloromethane (10 mL) at 4 °C under argon, was added phosphorous tribromide (549 g, 2.03 mmol). After 3 h, methanol (5 mL) was added. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was dissolved in dichloromethane. The organic mixture was washed with water, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (gradient petroleum ether/dichloromethane: 90/10 to 75/25) gave compound **3c** as a yellow oil (0.282 g, 47%) $R_f = 0.35$ (petroleum ether/dichloromethane: 90/10). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.30 (d*, $J = 8.8$ Hz 2H); 6.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); 6.87 (d*, $J = 8.8$ Hz, 2H); 6.82 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H); 6.75 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.9 Hz, 1H); 4.50 (s, 2H); 3.81 (s, 3H); 2.62 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H); 1.64 (quint, $J = 7.7$ Hz, 2H); 1.42–1.27 (m, 6H); 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 158.5; 151.2; 141.7; 140.5; 131.1; 130.3 (2C); 121.5; 120.7; 116.5 (2C); 112.9; 55.9; 35.8; 33.6; 31.6; 31.4; 28.9; 22.5; 14.0; HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{20}H_{25}BrO_2$ 376.1038, found 376.1042.

5-(Bromomethyl)-2-phenoxyphenol (4a). To a solution of bromide **3a** (70 mg, 0.24 mmol) in dry dichloromethane (30 mL), boron tribromide (1 M solution in dichloromethane, 3 mL, 3.0 mmol) was added dropwise under argon atmosphere. The mixture was stirred at 4 °C for 4 h. Sodium bicarbonate saturated solution (40 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 x 40 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10) affording compound **4a** as a clear yellow oil (63 mg, 94%). $R_f = 0.57$ (dichloromethane). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40–7.33 (m, 2H); 7.18–7.13 (m, $J = 7.4$ Hz, 1.4 Hz, 1H); 7.10 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H); 7.06–7.02 (m, 2H); 6.87 (dd, $J = 8.3$ Hz, 2.1 Hz, 1H); 6.80 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H); 4.46 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.2; 147.2; 143.9; 134.1; 129.9 (2C); 124.0; 121.3; 118.4 (2C); 118.3; 116.8; 33.3. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}BrO_2$ 277.9942, found 277.9937.

2-(4-(Bromomethyl)phenoxy)phenol (4b). Same procedure as for compound **4a** involving bromide **3b** (140 mg, 0.48 mmol), dry dichloromethane (60 mL), boron tribromide (1 M solution in dichloromethane, 6 mL, 6.0 mmol). The mixture was stirred at 4 °C for 4 h. Sodium bicarbonate saturated solution (50 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 x 80 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10) affording compound **4b** as a white solid (51 mg, 38%). $R_f = 0.49$ (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.36 (d*, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7.11–7.04 (m, 2H; 6.98 (d*, $J = 8.7$ Hz, 2H); 6.93–6.83 (m, 2H); 5.57 (bs, 1H); 4.50 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.9; 147.5; 142.9; 132.9; 130.7 (2C); 125.2; 120.7; 119.4; 117.9 (2C); 116.4; 33.0. HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{13}H_{12}BrO_2$ 279.0021, found 279.0021.

2-(4-(Bromomethyl)phenoxy)-5-hexylphenol (4c). To a solution of bromide **6c** (103 mg, 0.27 mmol) in dichloromethane (5 mL) at 80 °C, was added boron tribromide (1 M) (1.08 mL). After 5 h, methanol (5 mL) was added. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was dissolved in dichloromethane (20 mL). The organic mixture was washed with water (20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification of the crude product by flash chromatography (petroleum ether/dichloromethane: 70/30 to 50/50) gave compound **4c** as a white solid (27 mg, 27%) $R_f = 0.33$ (petroleum ether/dichloromethane: 60/40). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.34 (d*, $J = 8.8$ Hz, 2H); 6.96 (d*, $J = 8.8$ Hz, 2H); 6.88 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H); 6.67 (dd, $J = 8.2$ Hz, 2.1 Hz, 1H); 5.37 (bs, 1H); 4.49 (s, 2H); 2.56 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H); 1.59 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H); 1.39–1.26 (m, 6H); 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 157.4; 147.3; 140.6; 140.4; 132.6; 130.7 (2C); 120.6; 119.4; 117.5 (2C); 116.2; 35.5; 33.1; 31.7; 31.3; 28.9; 22.6; 14.1. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{19}H_{23}BrO_2$ 362.0881, found 362.0883.

5-(Azidomethyl)-2-phenoxyphenol (5a). To a solution of bromide **4a** (170 mg, 0.61 mmol) in dry *N*,*N*-dimethylformamide (2 mL), was added sodium azide (97 mg, 1.48 mmol). The mixture was stirred at 45 °C for 4 h. Ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL) were added, the

organic layer was washed with water (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) affording compound **5a** as a colourless oil (125 mg, 86%). R_f = 0.60 (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40–7.33 (m, 2H); 7.17–7.12 (tt, J = 7.4 Hz, 1.5 Hz, 1H); 7.06–7.02 (m, 3H); 6.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H); 6.79 (dd, J = 8.3 Hz, 2.3 Hz, 1H); 5.64 (s, 1H); 4.28 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.3; 147.4; 143.5; 131.7; 129.8 (2C); 123.7; 120.3; 118.6; 118.1 (2C); 116.0; 54.2. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}N_3O_2$ 241.0851, found 241.0845.

2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)phenol (5b). Same procedure as for compound **5a** involving bromide **4b** (50 mg, 0.18 mmol), dry *N*,*N*-dimethylformamide (5 mL), sodium azide (13 mg, 0.2 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) affording compound **5b** as a colourless oil R_f = 0.46 (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.28 (d*, J = 8.7 Hz, 2H); 7.15–7.00 (m, 4H); 6.93–6.83 (m, 2H); 4.31 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.9; 147.5; 143.1; 130.4; 129.9 (2C); 125.1; 120.7; 119.2; 118.0 (2C); 116.4; 54.1. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{13}H_{11}N_3O_2$ 241.0851, found 241.0869.

2-(4-(Azidomethyl)phenoxy)-5-hexylphenol (5c). To a solution of **5c** (27 mg, 0.07 mmol) in *N*,*N*-dimethylformamide (2 mL), was added sodium azide (190 mg, 0. 29 mmol). The reaction mixture was heated at 45 °C and stirred for 20 h. Diethyl ether was added to the mixture and the organic mixture was washed with water (2 x 20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated affording compound **5c** as a colorless oil (24 mg, quant.) R_f = 0.35 (petroleum ether/dichloromethane: 60/40). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.27 (d*, J = 8.6 Hz, 2H); 7.01 (d*, J = 8.7 Hz, 2H); 6.88 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.67 (dd, J = 8.2 Hz, 2.0 Hz, 1H); 5.42 (bs, 1H); 4.31 (s, 2H); 2.56 (t, J = 7.8 Hz, 2H); 1.66–1.56 (m, 2H); 1.37–1.26 (m, 6H); 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, ppm) δ 157.3; 147.3; 140.6; 140.5; 130.2 129.9 (2C); 120.6; 119.2; 117.7 (2C); 116.2; 54.2; 35.5; 31.7; 31.3; 28.9; 22.6; 14.1. HRMS (DCI-CH_4, $[M\text{-}N_2\text{-}H]^+$) calculated for $C_{19}H_{22}NO_2$ 296.1651, found: 296.1649.

7-(Diethylamino)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one (6d). To a solution of 7-(diethylamino)-4-hydroxycoumarin (0.100 g, 0.429 mmol) in *N*,*N*-dimethylformamide, were added propargyl bromide (76 mg, 0.058 mL, 0.515 mmol) and potassium carbonate (119 mg, 0.858 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 100 °C overnight and then concentrated *in vacuo*. The crude material was dissolved in ethyl acetate and washed with water (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5) affording compound **6d** as a brown powder upon standing (0.038 g, 33%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.56 (d, J = 9.0 Hz, 1H); 6.55 (dd, J = 9.0 Hz, 2.5 Hz, 1H); 6.45 (d, J = 2.5 Hz, 1H); 5.52 (s, 1H); 4.79 (d, J = 2.4 Hz, 2H); 3.39 (q, J = 7.1 Hz, 4H); 2.63 (t, J = 2.4 Hz, 1H); 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 165.3; 163.9; 155.8; 151.1; 123.9; 108.3; 103.4; 97.1; 86.4; 77.2; 76.3; 56.4; 44.7 (2C); 12.4 (2C). HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{16}H_{17}NO_3$ 271.1208, found 271.1211.

General procedure for the azide-alkyne cycloaddition. A solution of azide (1.2 eq), alkyne (1 eq), $CuSO_4.5H_2O$ (0.1 eq) and sodium ascorbate (0.4 eq) in a mixture of methanol/water was stirred at room temperature overnight. Water (100 mL) and dichloromethane (50 mL) were added. The combined organic layers were washed with water (50 mL) and brine (50 mL) and dried over $MgSO_4$. After concentration *in vacuo*, the crude product was purified by flash chromatography affording the expected product.

7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (7a). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **6a** (35 mg, 0.174 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.0696 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (20 mL). The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10) affording compound **7a** as a white solid (27.5 mg, 74%) R_f = 0.12 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.69 (s, 1H); 8.34 (s, 1H); 7.99 (d, J = 9.5 Hz, 1H); 7.64 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 7.31–7.28 (m, 2H); 7.17 (d, J = 2.5 Hz, 1H); 7.03–7.00 (m, 2H); 6.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.91 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.84–6.82 (m, 2H); 6.78 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H); 6.30 (d, J = 9.5 Hz, 1H); 5.55 (s, 2H); 5.27 (s, 2H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 161.1; 160.2; 157.7; 155.3; 149.4; 144.3; 142.5; 142.2; 133.0; 129.6 (2C); 129.5; 125.0; 122.1; 121.9; 119.2; 116.7; 116.2 (2C); 112.9; 112.7; 112.6; 101.6; 61.7; 52.4. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1405. Purity (HPLC): 96.3% at 320 nm (t_R = 3.012 min).

7-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (7b). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (100 mg, 0.416 mmol), alkyne **6b** (75 mg, 0.348 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (8.7 mg, 0.035 mmol) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol) in a mixture methanol (4 mL), water (9 mL) and dichloromethane (20 mL). Purification by flash chromatography (dicholoromethane/methanol: 99/1) afforded product **7b** as a white solid (120 mg, 74%). R_f = 0.06 (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H); 8.34 (s, 1H); 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 1H); 7.32–7.27 (m, 2H); 7.16 (d, J = 2.5 Hz, 1H); 7.05 (dd, J = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H); 7.01 (tt, J = 7.4 Hz, 1.1 Hz, 1H); 4.94 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.90 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.84–6.82 (m, 2H); 6.78 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H); 6.23 (d, J = 1.3 Hz, 1H); 5.55 (s, 2H); 5.27 (s, 2H); 2.40 (d, J = 1.3 Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.0; 160.1; 157.7; 154.6; 153.4; 149.4; 142.5; 142.2; 133.0; 129.6 (2C); 126.5; 125.0; 122.1; 121.9; 119.2; 116.7; 116.2 (2C); 113.4; 112.6; 111.3; 101.6; 61.6; 52.4; 18.1. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{22}N_3O_5$ 456.1559, found 456.1554. Purity (HPLC): >99.9% at 320 nm (t_R = 3.259 min).

4-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (7c). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (56 mg, 0.233 mmol); alkyne **6c** (39 mg, 0.195 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4.9 mg, 0.0195 mmol) and sodium ascorbate (16 mg, 0.078 mmol) in a mixture methanol (2.5 mL), water (7.5 mL) and dichloromethane (20 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 99/1) gave compound **7c** as a white solid (62 mg, 72%). R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 7.65 (t_{app}, J = 7.7 Hz, 1H); 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.32 (t_{app}, J = 8.0 Hz, 2H); 7.01 (t_{app}, J = 7.1 Hz, 1H); 6.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.92 (d, J = 1.6 Hz, 1H)); 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 2H); 6.80 (dd, J = 7.9, 1.5 Hz, 1H); 6.17 (s, 1H); 5.58 (s, 2H); 5.43 (s, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz) δ 164.3; 161.5; 157.7; 152.8; 149.4; 142.5; 141.2; 132.9; 132.8; 129.6 (2C); 125.4; 124.2 122.9; 122.1; 121.9; 119.2; 116.7; 116.5; 116.2 (2C); 115.1; 91.3; 62.8; 52.5. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1400. Purity (HPLC): 95.3% at 280 nm (t_R = 3.330 min).

7-(Diethylamino)-4-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2H-chromen-2-one (7d). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (38 mg, 0.158 mmol), alkyne **6d** (36 mg, 0.133 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4 mg, 0.00133 mmol) and sodium ascorbate (11 mg, 0.0052 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (5 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 98/2) yielded product **7d** as a pale-yellow solid (55 mg, 81%). R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.63 (s, 1H (H_{15})); 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 1H); 7.40–7.33 (m, 2H); 7.16 (tt, J = 7.5 Hz, 1.1 Hz, 1H); 7.05–7.01 (m, 2H); 6.98 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.77 (dd, J = 8.2 Hz, 2.2 Hz, 1H); 6.55 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H); 6.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H); 5.81 (s, 1H); 5.54 (s, 1H); 5.50 (s, 2H); 5.28 (s, 2H); 3.39 (q, J = 7.1 Hz, 4H); 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.1; 164.2; 156.2; 155.7; 151.1; 148.0; 144.4; 142.3; 130.4; 129.9 (2C); 124.0; 123.8; 123.2; 120.2; 119.0; 118.3 (2C); 116.1; 108.3; 103.5;

97.0; 85.9; 62.1; 53.9; 44.7 (2C); 12.3 (2C). HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{29}H_{29}N_4O_5$ 513.2138, found 513.2154. Purity (HPLC): 97.4% (t_R = 4.720 min, λ_{max} = 360 nm).

N-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (7e). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving **5a** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **6e** (40 mg, 0.174 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.070 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (20 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 99/1) gave product **7e** as a white solid (70 mg, 86%) R_f = 0.28 (dichloromethane/methanol: 97/3). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.68 (s, 1H); 9.14 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.89 (s, 1H); 8.06 (s, 1H); 8.00 (dd, J = 7.8 Hz, 1.5 Hz, 1H); 7.76 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.8 Hz, 1H); 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.45 (ddd, J = 8.7 Hz, 7.1 Hz, 1.1 Hz, 1H); 7.31–7.27 (m, 2H); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H); 6.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.89 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.84–6.81 (m, 2H); 6.78 (dd, J = 8.2 Hz, 2.1 Hz, 1H); 5.51 (s, 2H); 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.1; 160.3; 157.7; 153.9; 149.4; 147.7; 144.4; 142.4; 134.2; 133.1; 130.3; 129.6 (2C); 125.1; 123.1; 122.0; 121.9; 119.2; 118.8; 118.4; 116.7; 116.2 (2C); 116.2; 52.3; 34.9. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{21}N_4O_5$ 469.1512, found 469.1511. Purity (HPLC): >99.9% (t_R = 2.886 min, λ_{max} = 300 nm).

7-(Diethylamino)-N-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (7f). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (43 mg, 0.179 mmol), alkyne **6f** (44.6 mg, 0.15 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (3.8 mg, 0.015 mmol) and sodium ascorbate (12 mg, 0.06 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (5 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 99/1) provided compound **7f** as a yellow solid (60 mg, 74%). R_f = 0.37 (dichloromethane/methanol: 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.69 (bs, 1H); 9.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.68 (s, 1H); 8.04 (s, 1H); 7.69 (d, J = 9.1 Hz, 1H); 7.31–7.28 (m, 2H); 7.00 (tt, J = 7.3, 1.0 Hz, 1H); 6.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.89 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 6.84–6.81 (m, 3H); 6.78 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H); 6.61 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 5.50 (s, 2H); 4.57 (d, J = 5.7 Hz, 2H); 3.48 (q, J = 7.0 Hz, 4H); 1.14 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 162.2; 161.7; 157.7; 157.3; 152.5; 149.5; 147.9; 144.7; 142.4; 133.1; 131.6; 129.6 (2C); 123.0; 122.0; 121.9; 119.1; 116.7; 116.2 (2C); 110.2; 109.1; 107.6; 95.9; 52.3; 44.3; 34.7; 12.3; HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{30}H_{30}N_5O_5$ 540.2247, found 540.2240. Purity (HPLC): >99.9% at 420 nm (t_R = 4.363 min).

N-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (7g). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (9 mg, 0.037 mmol), alkyne **6g** (8 mg, 0.031 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (0.8 mg, 0.0031 mmol) and sodium ascorbate (2.5 mg, 0.0124 mmol) in a mixture methanol (0.5 mL), water (2.5 mL) and dichloromethane (6 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 98/2) yielded product **7g** as a pale-yellow solid (13 mg, 87%). R_f = 0.14 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.67 (s, 1H); 9.08 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.86 (s, 1H); 8.05 (s, 1H); 7.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H); 7.31–7.27 (m, 2H); 7.12 (d, J = 2.2 Hz, 1H); 7.05 (dd, J = 8.7 Hz, 2.4 Hz, 1H); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H); 6.94 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.89 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.84–6.80 (m, 2H); 6.78 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H); 5.51 (s, 2H); 4.59 (d, J = 5.6 Hz, 2H); 3.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 164.5; 161.4; 160.8; 157.7; 156.2; 149.4; 148.0; 144.5; 142.4; 133.1; 131.6; 129.6 (2C); 123.0; 122.0; 121.9; 119.2; 116.7; 116.2 (2C); 114.6; 113.7; 112.1; 100.3; 56.3; 52.3; 34.9. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{27}H_{23}N_4O_6$ 499.1618, found 499.1626. Purity (HPLC): 95.4% at 350 nm (t_R = 3.367 min).

N-((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-8-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (7h). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (21.5 mg, 0.09 mmol), alkyne **6h** (19.3 mg, 0.075 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (1.9 mg, 0.0075 mmol) and sodium ascorbate (6 mg, 0.03 mmol) in a mixture methanol (1 mL), water (4 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 98/2) gave product **7h** as a pale-yellow solid (22 mg, 59%). R_f = 0.08 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.67 (s, 1H); 9.14 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.86 (s, 1H); 8.05 (s, 1H); 7.53 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H); 7.44 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H); 7.37 (dd, J = 8.2 Hz, 8.1 Hz, 1H); 7.31–7.27 (m, 2H); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H); 6.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.89 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.84–6.81 (m, 2H); 6.78 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H); 5.51 (s, 2H); 4.59 (d, J = 5.5 Hz, 2H); 3.94 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.1; 160.0; 157.7; 149.4; 147.9; 146.3; 144.4; 143.2; 142.4; 133.1; 129.6 (2C); 125.1; 123.1; 122.0; 121.9; 121.2; 119.2; 119.0; 118.9; 116.7; 116.2 (2C); 116.1 56.2; 52.3; 34.9. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{27}H_{23}N_4O_6$ 499.1618, found 499.1608. Purity (HPLC): 99.2% at 320 nm (t_R = 3.253 min).

6-Hydroxy-N-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-4-carboxamide (7i). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (27 mg, 0.11 mmol), alkyne **6i** (25 mg, 0.096 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (2.4 mg, 0.0096 mmol) and sodium ascorbate (7.7 mg, 0.038 mmol) in a mixture methanol (1.1 mL), water (6.1 mL) and dichloromethane (10 mL). The mixture was filtered affording compound **7i** as a pale-yellow solid (27 mg, 48%). R_f = 0.08 (dichloromethane/methanol: 95/5). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.94 (s, 1H); 9.67 (s, 1H); 9.17 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.81 (s, 1H); 8.05 (s, 1H); 7.36 (d, J = 9.0 Hz, 1H); 7.31–7.27 (m, 3H); 7.18 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 1H); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H); 6.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.89 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 6.84–6.81 (m, 2H); 6.77 (dd, J = 8.2 Hz, 2.0 Hz, 1H); 5.50 (s, 2H); 4.59 (d, J = 5.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 161.3; 160.6; 157.7; 154.2; 149.4; 147.7; 147.4; 144.5; 142.4; 133.1; 129.6 (2C); 123.1; 122.5; 122.0; 121.9; 119.2; 119.0; 118.6; 117.1; 116.7; 116.2 (2C); 113.8; 52.3; 34.9. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{26}H_{21}N_4O_6$ 485.1461, found 485.1449. Purity (HPLC): 96.5% at 290 nm (t_R = 2.108 min).

5-((4-(((7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-phenoxyphenol (7j). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **6j** (38 mg, 0.174 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.070 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (20 mL). The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 99/1) affording compound **7j** as an orange solid (32 mg, 44%). R_f = 0.15 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.85 (bs, 1H (H_{25})); 9.66 (bs, 1H); 8.52 (d, J = 8.9 Hz, 1H); 8.17 (s, 1H (H_{15})); 7.29 (t_{app}, J = 7.9 Hz, 2H); 7.01 (t, J = 7.3 Hz, 1H)); 6.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H); 6.74 (dd, J = 8.2 Hz, 2.1 Hz, 1H); 6.53 (d, J = 8.9 Hz, 1H); 5.50 (s, 2H); 4.77 (s, 2H). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.7; 149.3; 149.0; 143.8; 142.9; 141.8; 137.7; 142.5; 133.0; 129.6 (2C); 123.6; 122.1; 121.8; 119.2; 116.7; 116.3 (2C); 110.4; 99.9; 52.4; 38.6. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{22}H_{18}N_7O_5$ 460.1369, found 460.1377. Purity (HPLC): 97.7% at 330 nm (t_R = 4.718 min).

7-(((1-(3-Hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-N,N-dimethylbenzo[c][1,2,5]oxadiazole-4-sulfonamide (7k). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5a** (11.5 mg, 0.048 mmol), alkyne DBD **6k** (11 mg, 0.04 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (1.02 mg, 0.0041 mmol) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.0167 mmol) in a mixture methanol (1 mL), water (3.5 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (dichloromethane/methanol: 98/2) gave compound **7k** as a yellow solid (15.5 mg, 75%). R_f = 0.12 (dichloromethane/methanol: 98/2). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 9.71 (s, 1H); 8.77 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.13 (s, 1H); 7.81 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 7.30–7.27 (m, 2H); 7.01 (t, J = 7.4 Hz, 1H); 6.91 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 6.87 (d, J = 2.0 Hz, 1H); 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H); 6.73 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H); 6.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H); 5.48 (s, 2H); 4.66 (d, J = 5.5 Hz, 2H); 2.67 (s, 6H). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 126 MHz) δ 157.8; 149.4; 146.6; 144.5; 143.8; 142.6; 140.9; 140.4; 133.2; 129.8 (2C); 123.6; 122.3; 122.0; 119.3; 116.8; 116.4 (2C); 106.2; 99.7; 52.5; 38.4; 37.6 (2C). HRMS (ESI, $[M]^+$) calculated for $C_{24}H_{23}N_7O_5S$

521.1481, found 521.1464. Purity (HPLC): >99.9% at 420 nm (t_R = 3.235 min).

7-((1-(4-(2-Hydroxyphenoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methoxy)-2H-chromen-2-one (7l). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5b** (50 mg, 0.208 mmol), alkyne **6a** (35 mg, 0.174 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4.35 mg, 0.0174 mmol) and sodium ascorbate (14 mg, 0.696 mmol) in a mixture methanol (2 mL), water (7 mL) and dichloromethane (20 mL). Purification by flash chromatography gave compound **7l** as a white solid (80 mg, 87%). R_f = 0.17 (dichloromethane/methanol: 99/1). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 9.52 (bs, 1H); 8.30 (s, 1H); 7.99 (d, J = 9.5 Hz, 1H); 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 7.30 (d*, J = 8.8 Hz, 2H); 7.15 (d, J = 2.4 Hz, 1H); 7.05 (ddd, J = 8.7 Hz, 6.9 Hz, 1.7 Hz, 1H); 7.01 (dd, J = 8.6 Hz, 2.5 Hz, 1H); 6.96 (dd, J = 8.2 Hz, 1.6 Hz, 1H); 6.95 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H); 6.83–6.79 (m, 3H); 6.30 (d, J = 9.5 Hz, 1H); 5.54 (s, 2H); 5.24 (2H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz) δ 161.1; 160.2; 158.0; 155.3; 149.4; 144.3; 142.2; 142.1; 129.7 (2C); 129.5; 129.2; 125.7; 124.7; 122.1; 119.7; 117.3; 116.1 (2C); 112.9; 112.7; 112.6; 101.6; 61.6; 52.3. HRMS (ESI, $[M+H]^+$) calculated for $C_{25}H_{20}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1406. Purity (HPLC): 99.7% (t_R = 2.836 min, λ_{max} = 290 nm).

7-(Diethylamino)-N-((1-(4-(4-hexyl-2-hydroxyphenoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (7m). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5c** (24 mg, 0.07 mmol), alkyne **6f** (22 mg, 0.07 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (4 mg, 0.0146 mmol, 0.2 eq) and sodium ascorbate (6 mg, 0.03 mmol, 0.4 eq) in a mixture methanol (2 mL), water (5 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5) gave compound **7m** as a pale-yellow solid (26 mg, 56%). R_f = 0.42 (dichloromethane/methanol: 95/05). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 9.37 (s, 1H); 9.02 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 8.67 (s, 1H); 7.99 (s, 1H); 7.69 (d, J = 9.1 Hz, 1H); 7.28 (d*, J = 8.8 Hz, 2H); 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 6.81 (dd, J = 9.1 Hz, 2.5 Hz, 1H); 6.79 (d*, J = 8.7 Hz, 2H); 6.76 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.62–6.60 (m, 3H); 5.48 (s, 2H); 4.53 (d, J = 5.6 Hz, 2H); 3.48 (q, J = 7.1 Hz, 4H); 2.53–2.48 (m, 2H); 1.53 (quint, J = 7.5 Hz, 2H); 1.31–1.23 (m, 6H); 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 6H); 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 162.2; 161.7; 158.2; 157.3; 152.5; 149.0; 147.9; 144.7; 139.9; 139.9; 131.6; 129.6 (2C); 129.1; 122.6; 121.9; 119.4; 117.1; 115.9 (2C); 110.2; 109.1; 107.6; 95.9; 52.2; 44.3; 34.7 (2C); 31.1; 30.8; 28.3; 22.0; 13.9; 12.3. HRMS (DCI-CH_4, $[M]^+$) calculated for $C_{36}H_{41}N_5O_5$ 623.3108, found: 623.3087. Purity (HPLC): >99.9% at 420 nm (t_R = 6.393 min).

5-Hexyl-2-(4-((4-(((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl) amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenoxy)phenol (7n). General procedure for the azide-alkyne cycloaddition involving azide **5c** (13 mg, 0.04 mmol), alkyne **6j** (9 mg, 0.04 mmol), $CuSO_4.5H_2O$ (2 mg, 0.008 mmol, 0.2 eq) and sodium ascorbate (3 mg, 0.015 mmol, 0.4 eq) in a mixture methanol (1.5 mL), water (4.5 mL) and dichloromethane (10 mL). Purification by flash chromatography (gradient dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5) gave compound **7n** as an orange solid (17 mg, 80%). R_f = 0.48 (dichloromethane/methanol: 95/5). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 8.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 7.50 (s, 1H); 7.25–7.24 (m, 2H); 6.99 (d*, J = 8.7 Hz, 2H); 6.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H); 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H); 6.69–6.67 (m, 2H); 6.35 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 5.51 (s, 2H); 4.77 (d, J = 5.4 Hz, 2H); 2.56 (t, J = 7.9 Hz, 2H); 1.60–1.56 (m, 2H); 1.36–1.29 (m, 6H); 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ 158.1; 147.3; 144.3; 143.8; 142.9; 142.5; 141.0 140.1; 136.0; 129.9 (2C); 128.5; 125.1; 121.7; 120.8; 119.6 117.7 (2C); 116.4; 99.5; 53.9; 39.4; 35.5; 31.7; 31.3; 28.9; 22.6; 14.1. HRMS (DCI-CH_4, $[M+H]^+$) calculated for $C_{28}H_{30}N_7O_5$ 544.2308, found: 544.2316. Purity (HPLC): 95.8% at 330 nm (t_R = 6.205 min).

General procedure for the Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition RuAAC [57]**.** A solution of azide **1e** (1 eq) and alkyne (1 eq) in degassed 1,4-dioxane ([alkyne] = 0.9 M) was added to a solution of $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ (0.05 eq) in 1,4-dioxane ([$Cp^*RuCl(PPh_3)_2$] = 0.009 M) under argon atmosphere. The mixture was stirred at 65 °C for 18 h and the solvent was removed *in vacuo*. Triazoles **5q, 5r** were obtained after purification by flash-chromatography.

7-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl) methoxy)naphthalen-2(1H)-one (8a). General procedure involving azide **2** (34.9 mg, 0.124 mmol), alkyne **6a** (24.9 mg, 0.124 mmol), $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ (5.0 mg, 6.2 μmol, 0.05 eq) in degassed 1,4-dioxane (0.8 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 to 0/100) affording the expected compound as a beige solid (19.0 mg, 35%). R_f = 0.10 (petroleum ether/ethyl acetate: 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.62 (s, 1H (H_{14})); 8.00 (d, J = 9.4 Hz, 1H (H_{22})); 7.95 (s, 1H (H_{16})); 7.65–7.60 (m, 1H (H_{25})); 7.31–7.27 (m,2H ($H_{10,12}$)); 7.07 (d, J = 2.4 Hz, 1H (H_{19})); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H (H_6)); 6.88 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H (H_{26})); 6.82–6.80 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.67 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.32 (d, J = 9.5 Hz, 1H (H_{23})); 5.62 (s, 2H (H_1)); 5.35 (s, 2H (H_{17})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 160.3 (C_{18}); 160.2 (C_{21}); 157.8 (C_8); 155.2 (C_{20}); 149.4 (C_4); 144.2 (C_{22}); 142.2 (C_5); 134.6 (C_{16}); 133.1 (C_{15}); 132.7 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 129.5 (C_{25}); 122.0 (C_{11}); 121.8 (C_6); 118.8 (C_7); 116.2 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.0 (C_{23}); 112.9 (C_{24}); 112.7 (C_{26}); 101.7 (C_{19}); 58.3 (C_{17}); 50.8 (C_1). HRMS (DCI-CH_4, [M + H^+]) for calculated for $C_{25}H_{19}N_3O_5$ 442.1403, found 442.1397. Purity (HPLC): 95.3% at 320 nm (t_R = 2.730 min).

7-((1-(3-hydroxy-4-phenoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl) methoxy)-4-methylnaphthalen-2(1H)-one (8b). General involving azide **2** (30.8 mg, 0.124 mmol), alkyne **6b** (26.5 mg, 0.124 mmol), $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ (4.9 mg, 6.2 μmol, 0.05 eq) in degassed 1,4-dioxane (0.8 mL). The crude product was purified by flash chromatography (gradient petroleum ether/ethyl acetate: 70/30 to 0/100) affording the expected compound as a beige solid (16.4 mg, 29%). R_f = 0.11 (petroleum ether/ethyl acetate: 40/60). ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ 9.62 (s, 1H (H_{14})); 7.95 (s, 1H (H_{16})); 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 1H (H_{25})); 7.30–7.27 (m, 2H ($H_{10,12}$)); 7.06 (d, J = 2.5 Hz, 1H (H_{19})); 7.01 (tt, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H (H_{11})); 6.91 (dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 1H (H_{26})); 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 1H (H_6)); 6.83–6.80 (m, 2H ($H_{9,13}$)); 6.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H (H_3)); 6.67 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H (H_7)); 6.27 (d, J = 1.3 Hz, 1H (H_{22})); 5.62 (s, 2H (H_1)); 5.36 (s, 2H (H_{17})); 2.39 (d, J = 1.3 Hz, 3H (H_{27})); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ 160.2 (C_{18}); 160.0 (C_{21}); 157.7 (C_8); 154.5 (C_{20}); 153.3 (C_{23}); 149.3 (C_4); 142.2 (C_5); 134.5 (C_{16}); 133.1 (C_{15}); 132.6 (C_2); 129.6 (2C, $C_{10,12}$); 126.5 (C_{25}); 122.0 (C_{11}); 121.8 (C_6); 118.8 (C_7); 116.2 (C_3); 116.2 (2C, $C_{9,13}$); 113.7 (C_{24}); 112.4 (C_{26}); 111.5 (C_{22}); 101.7 (C_{19}) 58.3 (C_{17}); 50.8 (C_1); 18.1 (C_{27}). HRMS (DCI-CH_4, [M + H^+]) for calculated for $C_{26}H_{22}N_3O_5$ 456.1481, found 456.1541.

4.2. Molecular docking

Molecular graphics were performed with the UCSF Chimera package [58]. The protein structures were downloaded from the RCSB Protein Data Bank and aligned with MatchMaker [59] on a reference structure 1BVR (chain A, 1BVR:A) [19]. The protein structures were prepared (structure checks, rotamers, hydrogenation, splitting of chains) using Biovia (www.3dsbiovia.com) Discovery Studio Visualizer 2021 (DSV), UCSF Chimera and in-house Python codes. Molecular modeling studies were carried with Molegro Virtual Docker 6 (www.molexus.com) software using 1P45 (chain A, 1P45:A) [9] and 2X22 (chain A, 2X22:A) [25] PDB entries as differential targets. The 1P45:A structure is characterized by a open major portal and a closed minor portal, in contrast to 2X22:A in which the major portal is closed and the minor portal is opened, the conformations of SBL (Substrate Binding Loop) extended region (residues 190–230) also differs, the structure of the cofactor (NAD^+) remains highly conserved. In addition to both enzyme conformations, two molecular docking protocols (MSE and OPT) and two internal scoring schemes (MolDock and ReRank) [60] were combined in a multimodal (docking) and consensus (scoring) approach. The two protocols share the same set of flexible residues: Ala154, Ala157, Ala164, Ala198, Ala201, Ala206, Arg195, Asn231, Asp148, Asp150, Gln214, Glu219, Ile202, Ile215, Leu217, Leu218, Lys165, Met98, Met103, Met155,

Met161, Met199, Met232, Phe149, Phe97, Pro193, Thr162, Thr195, Trp160, Trp22, and Tyr158. Softened potentials were used with a tolerance of 1 and a strength 0.9. According to structural studies, these residues cover different cases of minor and major portal fluctuations in InhA known structures. No displaceable water molecules were taken in account inner the binding site (known as mainly hydrophobic). The corresponding NAD molecules (from 1P45:A or 2X22:A) were treated as cofactors and where set as NAD^+ with partial negative charges on phosphates and positive charge on nicotinamide group. The NAD is not flexible during the docking process, but treated independently of the protein: a component Ligand-Cofactor (in addition to the Ligand-Protein contribution) was used in docking scores calculations. Clustering of poses (tabu clustering) was set with an RMS threshold of 1.9 Å in order to be a little more discriminant on the best poses. Templates (pharmacophoric profile) were used with a strength of −500 and a grid resolution of 0.4 Å using conserved atom positions along InhA ligands: ether group (oxygen, hydrogen donor); alcohol group (oxygen, hydrogen donor/acceptor) and ring (carbons) of ligand TCU (PT70, taken from 2X22:A), similarity measure parameters were let at their default values. In the case of OPT (Differential evolution algorithm) protocol, the docking process used 10000 iteration steps, and a grid resolution of 0.3 Å, along 40 (1P45:A) or 30 (2X22:A) independent runs. The convergence was reached for all ligands, internal parameters (population size, crossover rate, scaling factor…) of the algorithm were let as default. A final minimization (per run) was parameterized using 4000 steps for lateral chains and 2000 steps for protein backbone followed by a minimization and optimization (hydrogen bonds) of ligands. The same parameters were applied to the MSE (Simplex evolution algorithm) protocol, internal parameters (population size, number of iterations, energy threshold …) of the algorithm were let as default. The docking parameters used for all these simulations were benchmarked for their ability to reproduce the conformation of several co-crystalized inhibitors such TCL in 1P45:A and TCU in 2X22:A. Typical root-mean-square deviation (RMSD) between the docking poses and X-ray structures were in the range 0.5–1.0 Å for the best poses (ReRank and MolDock combined scores). The most realistic complexes (best poses) were selected on the basis of conformity and strength. Conformity reflects the ability to reproduce the conformation of TCL-based ligands bound to InhA in known X-ray crystal structures complexes and the corresponding interaction network, mainly π-π or π-alkyl interactions with nicotinamide group of NAD, hydrogen bonding with Tyr158, hydrogen or electrostatic interactions with cofactor (OH from ribose, amido group, phosphates, charged nitrogen of pyridinium). If a given pose is found to be in the best group of values for both docking scores (ReRank and MolDock), the pose is qualified as strong.

4.3. Biology experimental

4.3.1. Production and purification of InhA

Optimized InhA sequence from Mtb (UniProt P9WGR1) for *Escherichia coli* BL21(DE3) strain with GenSmart™ Codon Optimization tool (Genscript) was inserted in pET15b plasmid using NdeI and BamHI restriction sites. A colony from transformed BL21(DE3) with the pET15b-InhA plasmid was grown in LB medium containing 100 μg/mL ampicillin at 37 °C 180 rpm overnight. 10 mL of this culture was added to 990 mL LB medium containing ampicillin (100 μg/mL) and incubated at 37 °C 150 rpm until an optical density (OD) at 600 nm of 0.6–0.8 was reached. Then, 1 mL of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 M was added before incubating the bacteria for 4 h at 150 rpm at 30 °C. Bacteria cells were pelleted by centrifugation at 6,000×*g* for 30 min at 4 °C, then resuspended with buffer A (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.9) and lysed using an Emulsiflex-C5 cell disruptor (Avestin). After a centrifugation at 25,000×*g* for 30 min at 4 °C, the supernatant was filtered off with a 0.2 μm filter and injected into a nickel-chelated HisTrap HP column (Cytiva) equilibrated with buffer A. Unbound proteins were washed off with buffer A, then His_6-InhA was eluted using buffer 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.9. Fractions containing His_6-InhA were pooled together and concentrated.

For enzymatic assays, the concentrated protein was centrifuged at 10,000×*g* for 10 min at 4 °C and injected into a preparative gel filtration SepFast 16/60 6–600 kDa pg column (BioToolomics) pre-equilibrated with buffer 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8. His_6-InhA containing fractions were flash frozen in liquid nitrogen at a final concentration of 5 μM.

For crystallographic assays, concentrated His_6-InhA from affinity purification was incubated at room temperature with Thrombin (Novagen) overnight to cleave the histidine tag. Then, the solution was filtered off with a 0.2 μm filter and injected again into a nickel-chelated HisTrap HP column (Cytiva) equilibrated with buffer A and cleaved proteins were eluted with the same buffer. Fractions corresponding to the cleaved InhA were pooled together, concentrated, centrifuged at 10,000×*g* for 10 min at 4 °C and injected on a preparative gel filtration column SepFast 16/60 6–600 kDa pg column (BioToolomics) equilibrated with buffer 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8. Fractions corresponding to InhA were collected and concentrated.

4.3.2. Evaluation of InhA enzyme inhibition

NADH was obtained from Sigma-Aldrich. Stock solutions of all compounds were prepared in DMSO (5% v/v). Kinetic assays were performed using *trans*-2-dodecenoyl-coenzyme A (DDCoA) and His_6-InhA as previously described [61]. Briefly, reactions were performed at 25 °C in 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8 containing 250 μM of the NADH cofactor, 50 μM of the DDCoA substrate and the tested compound at different concentrations. Reactions were initiated by addition of InhA (50 nM final) and NADH oxidation was followed at 340 nm. The inhibitory activity of each compound was expressed as the percentage of inhibition of the InhA activity (initial velocity of the reaction) with respect to the control reaction without inhibitor. Inhibition = ((slope InhA alone – slope with compound)/slope InhA alone)*100. All activity assays were performed in duplicate or triplicate. IC_{50} values were determined using the 4-parameter curve-fitting software XLFit (IDBS) with at least six points.

4.3.3. Crystallization and structure determination

To obtain crystals of InhA in complex with ligands, cleaved InhA (in 30 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 6.8) was co-incubated at either 4 or 8 mg/mL with NAD^+ (respectively 1.4 and 2.8 mM, corresponding to a 1:10 protein/NAD^+ ratio) for 1 h at 4 °C. Mixtures were then placed at room temperature 10 min before adding ligands (solubilized in DMSO), by respecting the final 5% v/v DMSO with the protein. After 2 h incubation at room temperature or 4 °C, depending on the ligand solubility, crystallization assays were performed using the vapor diffusion method at 20 °C by mixing, with the help of a Mosquito crystallization robot (SPT Labtech, Melbourn, UK), 200 nL of InhA previously incubated with NAD^+ and ligands with 200 nL of reservoir solution containing 14% PEG 4000, 100 mM ADA, 100 mM ammonium acetate, 5% v/v DMSO, pH 6.8. After 1 week, crystals were cryoprotected with paraffine before being flash frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the ESRF beamline ID30B and the ALBA beamline XALOC, processed with autoProc [62], staraniso [63], and XDS [64] (Supporting Information Table S1). Structures were solved by molecular replacement with MOLREP [65] using the A chain of 4OHU in the case of the complex in the presence of **7b** and 4OYR in the case of **7e**. Refinement was performed using Buster/TNT [66]. Dictionaries for compounds were generated using Grade2 [67] and used in Coot (0.9.8.1) for model building [68].

4.3.4. Inhibition of mycobacterial growth

Colorimetric microassay based on the reduction of tetrazolium salts (MTT, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) to formazan by metabolically active mycobacteria was used to measure the

susceptibility of Mtb H37Rv to each molecule by determining its minimum inhibitory concentration (MIC) as previously described [69]. Briefly, bacterial cells growing as surface pellicle were recovered from 100 mL culture in 7H9 broth (Middlebrook 7H9 broth base BD Difco) containing 0.2% glycerol (w/v), vortexed with 4 mm glass beads, suspended in 20 mL 7H9 broth-0.2% glycerol and centrifuged at 800 rpm to eliminate residual clumps. Serial twofold dilutions of each compound to be tested (stock solution at 1 or 10 mM in DMSO) were prepared in 100 μL 7H9 broth using 96-well flat bottom microplates (Nunc). 100 μL of mycobacterial suspension (OD 600 nm = 0.1) in 7H9 broth were then added to each well. After 6 days incubation at 37 °C, MTT was added (50 μl at 1 mg/mL). After one-day incubation at 37 °C, 50 μL of 20% SDS solution were added to each well to solubilize formazan crystals and the OD of each well was measured at 570 nm (microplate reader Expert plus 96, ASYS HITECH, Austria). The MIC was determined as the lowest concentration of drug that inhibited bacterial growth from at least three independent experiments. The data were normalized to the value measured in untreated wells, after subtracting the background absorbance from each value.

4.3.5. Inhibition of mycolic acid biosynthesis

Mtb H37Rv cells were cultivated in 7H9 broth with albumin-dextrose-catalase and 0.05% Tween 80 at 37 °C with shaking (120 rpm). **INH** and compounds **7b**, **7d** and **7n** (at final concentrations of 0, 1 ×, 5 × and 25 × their MICs, stock in DMSO) were added when the culture reached OD 600 nm ~ 0.2. At the same time, the ^{14}C-acetate (specific activity 110 mCi/mmol, ARC) was added at final concentration of 0.5 μCi/mL. After 24 h of static cultivation at 37 °C, the cultures were harvested and the fatty/mycolic acids were extracted from whole cells from 100 μL cultures and derivatized to corresponding methyl esters (FAME/MAME) [70]. Dried extracts were dissolved in 50 μL of chloroform/methanol (2:1, v/v) and 5 μL were loaded on TLC silica gel 60 F254 plates (Merck). FAME/MAME were separated in n-hexane/ethyl acetate (95:5, 3 runs) and visualized using an AmershamTM TyphoonTM Biomolecular Imager.

Lipids were extracted from cells from 100 μL cultures containing the same concentrations of compounds with 1.5 mL chloroform/methanol (2:1 v/v) at 65 °C for 2 h. Then 150 μL of H_2O were added, the samples were mixed, centrifuged and bottom organic phases were removed and dried under N_2. Lipid extracts were subjected to biphasic Folch washing. Isolated lipids were dissolved in 30 μL of chloroform/methanol (2: 1, v/v) and 5 μL were loaded on the thin-layer chromatography (TLC) silica gel plates F254 (Merck). Lipids were separated in chloroform/methanol/water (20:4:0.5, v/v/v) and visualized using an AmershamTM TyphoonTM Biomolecular Imager.

4.3.6. Analysis of sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing KatG/InhA/HadABC

InhA protein, HadABC complex and $KatG_{smeg}$ protein encoded by the gene *msmeg_6384* from *M. smegmatis* were overproduced in Mtb H37Ra using pMV261-*inhA*, pVV16-hadABC or pVV16-$katG_{smeg}$ constructs as already described [71–73]. Sensitivity of Mtb H37Ra strains overproducing InhA, HadABC and $KatG_{smeg}$, as well as control strains carrying empty pMV261 and pVV16 vectors, to compounds **7b**, **7d**, and **7n** was analyzed by drop dilution method. The culture of each strain was diluted to OD 600 nm = 0.5. Then, 4 μL of 1x, 10x and 100x diluted samples were plated on 7H11-agar +10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase containing various concentrations of tested compounds **7b** and **7d** (0.625, 1.25, 6.25, 12.5, 25 μM) and **7n** (1.25, 2.5, 12.5, 25, 50 μM). Plates were incubated for 18 days at 37 °C.

4.3.7. Cell viability assays

Human cell lines were grown at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator in DMEM high-glucose (Thermo Fisher Scientific) for HCT116 (Horizon Discovery), MEM containing Earle's salts, sodium pyruvate and non-essential amino acids for CACO2 (DSMZ), HepG2 (ATCC) and WI38hTERT (Dr Olivier Sordet, CRCT, Toulouse). All media contained 10% or 20% (for CACO2) fetal bovine serum (Eurobio), 2.5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin. For SRB assays, cells were plated in 96-well plates (Nunc Edge) at 1500, 2500, 9000 and 3500 cells/well respectively for HCT116, CACO2, HepG2 and WI38hTERT 24 h before treatment with the drug. Serial 2-fold dilutions were performed in medium and used to treat cells for 72 h. At the end of treatment, cells were fixed and stained with SRB as described [74]. After resuspending the dye in a 10 mM Tris-base solution, the OD at 490 nm of each well was measured (μQuant plate reader, Bio-tek) as a readout of the cell number. For calculation, background absorbance was subtracted to each value and the data were normalized to the value measured in untreated wells. Each point was measured in duplicate and the IC_{50} were computed from at least three independent experiments using the GraphPad Prism software to perform a non-linear regression to a four-parameter logistic curve (Inhibitor vs response; variable slope). An approximate value was provided when the curve did not fit the logistic curve.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships which could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

We thank the mass spectrometry service, Institut de Chimie de Toulouse ICT-UAR 2599 (Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France, https://ict.cnrs.fr) for help with chemical analyses. We thank Isabelle Fabing for her help with chromatographic analyses and purification. We also thank the scientific staff of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France), SOLEIL (Gif sur Yvette, France) and ALBA (Barcelona, Spain). We particularly thank the staff of beamlines XALOC at ALBA and ID30B at the European Synchrotron Radiation Facility, where the crystallographic experiments were conducted. We also thank Valérie Guillet for managing synchrotron radiation trips. The UPLC, UPC2, crystallization and macromolecular crystallography equipment used in this study are part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA, http://www.pict.ipbs.fr). We thank Williams R. Jacobs, Jr. for pMV261-*inhA* construct, Mary Jackson for pVV16-hadABC construct and Oliver Sordet (CRCT, Toulouse) for his generous gift of WI38hTERT lung fibroblasts. We thank Stéphanie Ballereau for giving us a sample of DBD-Cl, precursor of compound **6k**. This work was supported by Slovak Research and Development Agency (grant n. APVV-19-0189), and by the OPII, ACCORD, ITMS2014+: 313021X329, co-financed by ERDF. This study received funding from the l'Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées (UFTMiP) and the Région Occitanie for a PhD grant (R. Tamhaev) and the Région Occitanie for the Pré-maturation "Prostacure" grant to S. Britton and N. Preuilh.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115646.

References

[1] WHO, Global Tuberculosis Report 2022, World Health Organization, Geneva, 2022.
[2] A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R. Jacobs Jr., inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis, Science 263 (1994) 227–230.

[3] S.L. Parikh, G. Xiao, P.J. Tonge, Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid, Biochemistry 39 (2000) 7645–7650.

[4] M.E. Boyne, T.J. Sullivan, C.W. amEnde, H. Lu, V. Gruppo, D. Heaslip, A.G. Amin, D. Chatterjee, A. Lenaerts, P.J. Tonge, R.A. Slayden, Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against Mycobacterium tuberculosis: evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors, Antimicrob. Agents Chemother. 51 (2007) 3562–3567.

[5] P. Pan, S.E. Knudson, G.R. Bommineni, H.J. Li, C.T. Lai, N. Liu, M. Garcia-Diaz, C. Simmerling, S.S. Patil, R.A. Slayden, P.J. Tonge, Time-dependent diaryl ether inhibitors of InhA: structure-activity relationship studies of enzyme inhibition, antibacterial activity, and in vivo efficacy, ChemMedChem 9 (2014) 776–791.

[6] F. Rodriguez, N. Saffon, J.C. Sammartino, G. Degiacomi, M.R. Pasca, C. Lherbet, First triclosan-based macrocyclic inhibitors of InhA enzyme, Bioorg. Chem. 95 (2020), 103498.

[7] J. Stec, C. Vilcheze, S. Lun, A.L. Perryman, X. Wang, J.S. Freundlich, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr., A.P. Kozikowski, Biological evaluation of potent triclosan-derived inhibitors of the enoyl-acyl carrier protein reductase InhA in drug-sensitive and drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis, ChemMedChem 9 (2014) 2528–2537.

[8] A. Chollet, G. Mori, C. Menendez, F. Rodriguez, I. Fabing, M.R. Pasca, J. Madacki, J. Kordulakova, P. Constant, A. Quemard, V. Bernardes-Genisson, C. Lherbet, M. Baltas, Design, synthesis and evaluation of new GEQ derivatives as inhibitors of InhA enzyme and Mycobacterium tuberculosis growth, Eur. J. Med. Chem. 101 (2015) 218–235.

[9] M.R. Kuo, H.R. Morbidoni, D. Alland, S.F. Sneddon, B.B. Gourlie, M.M. Staveski, M. Leonard, J.S. Gregory, A.D. Janjigian, C. Yee, J.M. Musser, B. Kreiswirth, H. Iwamoto, R. Perozzo, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, D.A. Fidock, Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of Enoyl reductase: compound activity and structural data, J. Biol. Chem. 278 (2003) 20851–20859.

[10] A. Suresh, S. Srinivasarao, N. Agnieszka, A.K. Ewa, M. Alvala, C. Lherbet, K.V. G. Chandra Sekhar, Design and synthesis of 9H-fluorenone based 1,2,3-triazole analogues as Mycobacterium tuberculosis InhA inhibitors, Chem. Biol. Drug Des. 91 (2018) 1078–1086.

[11] P.S. Shirude, P. Madhavapeddi, M. Naik, K. Murugan, V. Shinde, R. Nandishaiah, J. Bhat, A. Kumar, S. Hameed, G. Holdgate, G. Davies, H. McMiken, N. Hegde, A. Ambady, J. Venkatraman, M. Panda, B. Bandodkar, V.K. Sambandamurthy, J. A. Read, Methyl-thiazoles: a novel mode of inhibition with the potential to develop novel inhibitors targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis, J. Med. Chem. 56 (2013) 8533–8542.

[12] R.C. Hartkoorn, C. Sala, J. Neres, F. Pojer, S. Magnet, R. Mukherjee, S. Uplekar, S. Boy-Rottger, K.H. Altmann, S.T. Cole, Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid, EMBO Mol. Med. 4 (2012) 1032–1042.

[13] M. Kienle, P. Eisenring, B. Stoessel, O.P. Horlacher, S. Hasler, G. van Colen, R. C. Hartkoorn, A. Vocat, S.T. Cole, K.H. Altmann, Synthesis and structure-activity relationship studies of C2-modified analogs of the antimycobacterial natural product pyridomycin, J. Med. Chem. 63 (2020) 1105–1131.

[14] U.H. Manjunatha, S.P.S. Rao, R.R. Kondreddi, C.G. Noble, L.R. Camacho, B.H. Tan, S.H. Ng, P.S. Ng, N.L. Ma, S.B. Lakshminarayana, M. Herve, S.W. Barnes, W. Yu, K. Kuhen, F. Blasco, D. Beer, J.R. Walker, P.J. Tonge, R. Glynne, P.W. Smith, T. T. Diagana, Direct inhibitors of InhA are active against Mycobacterium tuberculosis, Sci. Transl. Med. 7 (2015), 269ra263.

[15] M. Martinez-Hoyos, E. Perez-Herran, G. Gulten, L. Encinas, D. Alvarez-Gomez, E. Alvarez, S. Ferrer-Bazaga, A. Garcia-Perez, F. Ortega, I. Angulo-Barturen, J. Rullas-Trincado, D. Blanco Ruano, P. Torres, P. Castaneda, S. Huss, R. Fernandez Menendez, S. Gonzalez Del Valle, L. Ballell, D. Barros, S. Modha, N. Dhar, F. Signorino-Gelo, J.D. McKinney, J.F. Garcia-Bustos, J.L. Lavandera, J. C. Sacchettini, M.S. Jimenez, N. Martin-Casabona, J. Castro-Pichel, A. Mendoza-Losana, Antitubercular drugs for an old target: GSK693 as a promising InhA direct inhibitor, EBioMedicine 8 (2016) 291–301.

[16] Y. Xia, Y. Zhou, D.S. Carter, M.B. McNeil, W. Choi, J. Halladay, P.W. Berry, W. Mao, V. Hernandez, T. O'Malley, A. Korkegian, B. Sunde, L. Flint, L. K. Woolhiser, M.S. Scherman, V. Gruppo, C. Hastings, G.T. Robertson, T.R. Ioerger, J. Sacchettini, P.J. Tonge, A.J. Lenaerts, T. Parish, M. Alley, Discovery of a cofactor-independent inhibitor of Mycobacterium tuberculosis InhA, Life Sci. Alliance 1 (2018), e201800025.

[17] A. Dessen, A. Quemard, J.S. Blanchard, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, Crystal structure and function of the isoniazid target of Mycobacterium tuberculosis, Science 267 (1995) 1638–1641.

[18] A. Chollet, L. Maveyraud, C. Lherbet, V. Bernardes-Genisson, An overview on crystal structures of InhA protein: apo-form, in complex with its natural ligands and inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 146 (2018) 318–343.

[19] D.A. Rozwarski, C. Vilchèze, M. Sugantino, R. Bittman, J.C. Sacchettini, Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD^+ and a C16 fatty acyl substrate, J. Biol. Chem. 274 (1999) 15582–15589.

[20] T.J. Sullivan, J.J. Truglio, M.E. Boyne, P. Novichenok, X. Zhang, C.F. Stratton, H. J. Li, T. Kaur, A. Amin, F. Johnson, R.A. Slayden, C. Kisker, P.J. Tonge, High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis, ACS Chem. Biol. 1 (2006) 43–53.

[21] H.J. Li, C.T. Lai, P. Pan, W. Yu, N. Liu, G.R. Bommineni, M. Garcia-Diaz, C. Simmerling, P.J. Tonge, A structural and energetic model for the slow-onset inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase InhA, ACS Chem. Biol. 9 (2014) 986–993.

[22] P. Kamsri, C. Hanwarinroj, N. Phusi, T. Pornprom, K. Chayajarus, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Srimanote, K. Suttisintong, C. Songsiriritthigul, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, S. Rattanabunyong, S. Seetaha, K. Choowongkomon, S. Sureram, P. Kittakoop, P. Hongmanee, P. Santanirand, Z. Chen, W. Zhu, R.A. Blood, Y. Takebayashi, P. Hinchliffe, A.J. Mulholland, J. Spencer, P. Pungpo, Discovery of new and potent InhA inhibitors as antituberculosis agents: structure-based virtual screening validated by biological assays and X-ray crystallography, J. Chem. Inf. Model. 60 (2020) 226–234.

[23] J.S. Freundlich, F. Wang, C. Vilchèze, G. Gulten, R. Langley, G.A. Schiehser, D. P. Jacobus, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant Mycobacterium tuberculosis, ChemMedChem 4 (2009) 241–248.

[24] C.-T. Lai, H.-J. Li, W. Yu, S. Shah, G.R. Bommineni, V. Perrone, M. Garcia-Diaz, P. J. Tonge, C. Simmerling, Rational modulation of the induced-fit conformational change for slow-onset inhibition in Mycobacterium tuberculosis InhA, Biochemistry 54 (2015) 4683–4691.

[25] S.R. Luckner, N. Liu, C.W. am Ende, P.J. Tonge, C. Kisker, A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis, J. Biol. Chem. 285 (2010) 14330–14337.

[26] H.H. Soutter, P. Centrella, M.A. Clark, J.W. Cuozzo, C.E. Dumelin, M.A. Guie, S. Habeshian, A.D. Keefe, K.M. Kennedy, E.A. Sigel, D.M. Troast, Y. Zhang, A. D. Ferguson, G. Davies, E.R. Stead, J. Breed, P. Madhavapeddi, J.A. Read, Discovery of cofactor-specific, bactericidal Mycobacterium tuberculosis InhA inhibitors using DNA-encoded library technology, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113 (2016) E7880–e7889.

[27] L.A. Spagnuolo, S. Eltschkner, W. Yu, F. Daryaee, S. Davoodi, S.E. Knudson, E. K. Allen, J. Merino, A. Pschibul, B. Moree, N. Thivalapill, J.J. Truglio, J. Salafsky, R.A. Slayden, C. Kisker, P.J. Tonge, Evaluating the contribution of transition-state destabilization to changes in the residence time of triazole-based InhA inhibitors, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 3417–3429.

[28] L.-Y. Ma, Y.-C. Zheng, S.-Q. Wang, B. Wang, Z.-R. Wang, L.-P. Pang, M. Zhang, J.-W. Wang, L. Ding, J. Li, C. Wang, B. Hu, Y. Liu, X.-D. Zhang, J.-J. Wang, Z.-J. Wang, W. Zhao, H.-M. Liu, Design, synthesis, and structure–activity relationship of novel LSD1 inhibitors based on pyrimidine–thiourea hybrids as potent, orally active antitumor agents, J. Med. Chem. 58 (2015) 1705–1716.

[29] S. Bhakta, N. Scalacci, A. Maitra, A.K. Brown, S. Dasugari, D. Evangelopoulos, T. D. McHugh, P.N. Mortazavi, A. Twist, E. Petricci, F. Manetti, D. Castagnolo, Design and synthesis of 1-((1,5-Bis(4-chlorophenyl)-2-methyl-1H-pyrrol-3-yl)methyl)-4-methylpiperazine (BM212) and N-Adamantan-2-yl-N′-((E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) pyrrole hybrid derivatives: discovery of potent antitubercular agents effective against multidrug-resistant mycobacteria, J. Med. Chem. 59 (2016) 2780–2793.

[30] O.A. Abdelaziz, D.I.A. Othman, M.M. Abdel-Aziz, S.M.I. Badr, H.M. Eisa, Novel diaryl ether derivatives as InhA inhibitors: design, synthesis and antimycobacterial activity, Bioorg. Chem. 129 (2022), 106125.

[31] T.S. Ibrahim, E.S. Tahe, E. Samir, A.M. Malebar, A.N. Khayya, M.F.A. Mohamed, R. M. Bokhti, M.A. AlAwad, I.A. Seliem, H.Z. Asfou, N.A. Alhakamy, S.S. Panda, A.M. M. Al-Mahmoudy, In vitro antimycobacterial activity and physicochemical characterization of diaryl ether triclosan analogues as potential inhA reductase inhibitors, Molecules 25 (2020) 3125.

[32] A.P. Tiwari, B. Sridhar, H.I. Boshoff, K. Arora, G. Gautham Shenoy, K.E. Vandana, G. Varadaraj Bhat, Design, synthesis, in silico and in vitro evaluation of novel diphenyl ether derivatives as potential antitubercular agents, Mol. Divers. 24 (2020) 1265–1279.

[33] R. Vosatka, M. Kratky, J. Vinsova, Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents, Eur. J. Pharmaceut. Sci. 114 (2018) 318–331.

[34] S. Chetty, T. Armstrong, S. Sharma Kharkwal, W.C. Drewe, C.I. De Matteis, D. Evangelopoulos, S. Bhakta, N.R. Thomas, New InhA inhibitors based on expanded triclosan and di-triclosan analogues to develop a new treatment for tuberculosis, Pharmaceuticals 14 (2021) 361.

[35] H. Liu, D.-G. Xia, Z.-W. Chu, R. Hu, X. Cheng, X.-H. Lv, Novel coumarin-thiazolyl ester derivatives as potential DNA gyrase Inhibitors: design, synthesis, and antibacterial activity, Bioorg. Chem. 100 (2020), 103907.

[36] L. Xu, J. Yu, L. Jin, L. Pan, Design, synthesis, and antifungal activity of 4-amino coumarin based derivatives, Molecules 27 (2022) 2738.

[37] Y. Yun, J. Yang, Y. Miao, X. Wang, J. Sun, Synthesis and biological evaluation of 4-arylcoumarins as potential anti-Alzheimer's disease agents, Bioorg. Med. Chem. Lett. 30 (2020), 126900.

[38] R. Martinčič, J. Mravljak, U. Švajger, A. Perdih, M. Anderluh, M. Novič, In silico discovery of novel potent antioxidants on the basis of pulvinic acid and coumarine derivatives and their experimental evaluation, PLoS One 10 (2015), e0140602.

[39] L. Rubab, S. Afroz, S. Ahmad, S. Hussain, I. Nawaz, A. Irfan, F. Batool, K. Kotwica-Mojzych, M. Mojzych, An update on synthesis of coumarin sulfonamides as enzyme inhibitors and anticancer agents, Molecules 27 (2022) 1604.

[40] Q.-H. Cui, W.-B. Li, Z.-Y. Wang, K.-Y. Xu, S. Wang, J.-T. Shi, L.-W. Zhang, S.-W. Chen, Design, synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as potential BRD4 inhibitors, Bioorg. Chem. 128 (2022), 106117.

[41] S.M. Somagond, R.R. Kamble, P.K. Bayannavar, S.K.J. Shaikh, S.D. Joshi, V. M. Kumbar, A.R. Nesaragi, M.Y. Karidurganavar, Click chemistry based regioselective one-pot synthesis of coumarin-3-yl-methyl-1,2,3-triazolyl-1,2,4-triazol-3(4H)-ones as newer potent antitubercular agents, Arch. Pharmazie 352 (2019), e1900013.

[42] S. Srivastava, D. Bimal, K. Bohra, B. Singh, P. Ponnan, R. Jain, M. Varma-Basil, J. Maity, M. Thirumal, A.K. Prasad, Synthesis and antimycobacterial activity of 1-(β-d-Ribofuranosyl)-4-coumarinyloxymethyl-/-coumarinyl-1,2,3-triazole, Eur. J. Med. Chem. 150 (2018) 268–281.

[43] Y. Hu, Y. Shen, X. Wu, X. Tu, G.X. Wang, Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents, Eur. J. Med. Chem. 143 (2018) 958–969.
[44] B. Inturi, G.V. Pujar, M.N. Purohit, V.B. Iyer, S.G. S, M. Kulkarni, Design, synthesis and evaluation of diphenyl ether analogues as antitubercular agents, RSC Adv. 6 (2016) 110571–110582.
[45] S.L. Kostiuk, T. Woodcock, L.F. Dudin, P.D. Howes, D.C. Harrowven, Unified syntheses of cavicularin and riccardin C: addressing the synthesis of an arene adopting a boat configuration, Chemistry 17 (2011) 10906–10915.
[46] J. Arcau, V. Andermark, E. Aguiló, A. Gandioso, A. Moro, M. Cetina, J.C. Lima, K. Rissanen, I. Ott, L. Rodríguez, Luminescent alkynyl-gold(i) coumarin derivatives and their biological activity, Dalton Trans. 43 (2014) 4426–4436.
[47] M. Ferraroni, F. Carta, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Thioxocoumarins show an alternative carbonic anhydrase inhibition mechanism compared to coumarins, J. Med. Chem. 59 (2016) 462–473.
[48] Y. Zhao, H.S. Kim, X. Zou, L. Huang, X. Liang, Z. Li, J.S. Kim, W. Lin, Harnessing dual-fluorescence lifetime probes to validate regulatory mechanisms of organelle interactions, J. Am. Chem. Soc. 144 (2022) 20854–20865.
[49] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, J. Org. Chem. 67 (2002) 3057–3064.
[50] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 41 (2002) 2596–2599.
[51] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H.H.Y. Sun, I.D. Williams, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, G. Jia, Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 15998–15999.
[52] K. Tahlan, R. Wilson, D.B. Kastrinsky, K. Arora, V. Nair, E. Fischer, S.W. Barnes, J. R. Walker, D. Alland, C.E. Barry 3rd, H.I. Boshoff, SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of Mycobacterium tuberculosis, Antimicrob. Agents Chemother. 56 (2012) 1797–1809.
[53] A.E. Grzegorzewicz, H. Pham, V.A. Gundi, M.S. Scherman, E.J. North, T. Hess, V. Jones, V. Gruppo, S.E. Born, J. Korduláková, S.S. Chavadi, C. Morisseau, A. J. Lenaerts, R.E. Lee, M.R. McNeil, M. Jackson, Inhibition of mycolic acid transport across the Mycobacterium tuberculosis plasma membrane, Nat. Chem. Biol. 8 (2012) 334–341.
[54] W. Li, A. Obregón-Henao, J.B. Wallach, E.J. North, R.E. Lee, M. Gonzalez-Juarrero, D. Schnappinger, M. Jackson, Therapeutic potential of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid transporter, MmpL3, Antimicrob. Agents Chemother. 60 (2016) 5198–5207.
[55] A.D. Martin, R.A. Boulos, K.A. Stubbs, C.L. Raston, Phosphonated calix[4]arene-based amphiphiles as scaffolds for fluorescent nano-fibres, Chem. Commun. 47 (2011) 7329–7331.
[56] A. Makriyannis, S.P. Nikas, C.T. Iliopoulos, S. Kulkarni, L. Ji, Novel Labelled Cannabinergic Ligands and Related Analogs, 2021, US20210300937.
[57] T. Legigan, E. Migianu-Griffoni, M.A. Redouane, A. Descamps, J. Deschamp, O. Gager, M. Monteil, F. Barbault, M. Lecouvey, Synthesis and preliminary anticancer evaluation of new triazole bisphosphonate-based isoprenoid biosynthesis inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 214 (2021), 113241.
[58] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612.
[59] E.C. Meng, E.F. Pettersen, G.S. Couch, C.C. Huang, T.E. Ferrin, Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera, BMC Bioinf. 7 (2006) 339.
[60] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock, A new technique for high-accuracy molecular docking, J. Med. Chem. 49 (2006) 3315–3321.
[61] H. Doğan, Ş.D. Doğan, M.G. Gündüz, V.S. Krishna, C. Lherbet, D. Sriram, O. Şahin, E. Sarıpınar, Discovery of hydrazone containing thiadiazoles as Mycobacterium tuberculosis growth and enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 188 (2020), 112035.
[62] C. Vonrhein, C. Flensburg, P. Keller, A. Sharff, O. Smart, W. Paciorek, T. Womack, G. Bricogne, Data processing and analysis with the autoPROC toolbox, Acta Crystallogr. D 67 (2011) 293–302.
[63] I.J. Tickle, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, A. Sharff, C. Vonrhein, G. Bricogne, STARANISO, Global Phasing Ltd, Cambridge, United Kingdom, 2018.
[64] W. Kabsch, XDS, Acta Crystallogr. D 66 (2010) 125–132.
[65] A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP, Acta Crystallogr. D 66 (2010) 22–25.
[66] G. Bricogne, E. Blanc, M. Brandl, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, P. Roversi, A. Sharff, O.S. Smart, C. Vonrhein, T.O. Womack, BUSTER Version 2.10.4, Global Phasing Ltd, Cambridge, United Kingdom, 2017.
[67] O.S. Smart, A. Sharff, J. Holstein, T.O. Womack, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, C. Vonrhein, G. Bricogne, Grade2 version 1.3, in, 2021.
[68] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, Acta Crystallogr. D 60 (2004) 2126–2132.
[69] N.H. Le, P. Constant, S. Tranier, V. Nahoum, V. Guillet, L. Maveyraud, M. Daffé, L. Mourey, P. Verhaeghe, H. Marrakchi, Drug screening approach against mycobacterial fatty acyl-AMP ligase FAAL32 renews the interest of the salicylanilide pharmacophore in the fight against tuberculosis, Bioorg. Med. Chem. 71 (2022), 116938.
[70] B. Phetsuksiri, A.R. Baulard, A.M. Cooper, D.E. Minnikin, J.D. Douglas, G.S. Besra, P.J. Brennan, Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis, Antimicrob. Agents Chemother. 43 (1999) 1042–1051.
[71] V. Pflégr, L. Horváth, J. Stolaříková, A. Pál, J. Korduláková, S. Bősze, J. Vinšová, M. Krátký, Design and synthesis of 2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene) propanamides as InhA inhibitors with high antitubercular activity, Eur. J. Med. Chem. 223 (2021), 113668.
[72] A.E. Grzegorzewicz, J. Korduláková, V. Jones, S.E. Born, J.M. Belardinelli, A. Vaquié, V.A. Gundi, J. Madacki, N. Slama, F. Laval, J. Vaubourgeix, R.M. Crew, B. Gicquel, M. Daffé, H.R. Morbidoni, P.J. Brennan, A. Quémard, M.R. McNeil, M. Jackson, A common mechanism of inhibition of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone, J. Biol. Chem. 287 (2012) 38434–38441.
[73] M.H. Larsen, C. Vilchèze, L. Kremer, G.S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M.H. Hazbon, D. Alland, J.C. Sacchettini, W.R. Jacobs Jr., Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium smegmatis, M. bovis BCG and M. tuberculosis, Mol. Microbiol. 46 (2002) 453–466.
[74] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, Nat. Protoc. 1 (2006) 1112–1116.

Étude de nouveaux inhibiteurs de la protéine InhA de *Mycobacterium tuberculosis* découverts par chimie click *in situ*

Mots-clés : tuberculose / *Mycobacterium tuberculosis* / InhA / cristallisation / triclosan / GEQ / chimie médicinale / KTGS / chimie click *in situ* / macrocyclisation *in situ*

Résumé :
En 2021, la tuberculose représentait la 13ème cause de mortalité dans le monde avec 10.6 millions de nouveaux cas et 1.4 million de décès. L'émergence de souches de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) résistantes aux médicaments antituberculeux représente plus que jamais un défi majeur de santé publique au niveau mondial. Les enzymes du système de synthèse des acides gras de type II (FAS-II) intervenant dans la biosynthèse des acides mycoliques, composants essentiels de l'enveloppe cellulaire des mycobactéries, sont des cibles privilégiées pour inhiber la croissance mycobactérienne. Parmi ces enzymes, InhA est la cible principale de l'isoniazide (INH), le médicament antituberculeux de première ligne le plus utilisé. L'INH est une prodrogue qui nécessite une activation par l'enzyme KatG.
L'objectif principal de la présente thèse était de découvrir des inhibiteurs directs d'InhA, ne nécessitant donc pas une pré-activation. Ainsi, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à développer de nouvelles séries de molécules, ciblant la protéine InhA, par différentes méthodes : l'hybridation et la méthode de déconstruction-reconstruction. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une forte inhibition de l'activité enzymatique de la protéine InhA et également de la croissance de Mtb. Les résolutions des structures cristallographiques de la protéine InhA co-cristallisé avec ces composés ont montré des interactions originales dans le portail mineur, un site sous-exploité dans la littérature. Dans un deuxième temps, une nouvelle méthode de criblage par assemblage de fragments guidé par la cible a été exploitée. La mise au point de la synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (KTGS) par l'application de la chimie click *in situ* a été effectuée. Ce criblage permettrait à partir d'une bibliothèque de fragments préétablie de concevoir des composés directement, par confinement, dans le site actif de l'enzyme. Enfin, une extension de la réactivité de chimie click *in situ* a été étudiée pour favoriser des réactions intramoléculaires. Ainsi, une série de ligands acycliques, composés à la fois des fonctions alcyne et azoture, a été développée et a montré une inhibition de l'activité enzymatique de la protéine InhA. Des études par radiocristallographie des rayons X ont permis de décrire le positionnement de ces ligands dans le site actif de la protéine et indique qu'une macrocyclisation *in situ* pourrait être réalisée.

Study of new inhibitors of the InhA protein of *Mycobacterium tuberculosis* discovered by *in situ* click chemistry

Keywords: tuberculosis / *Mycobacterium tuberculosis* / InhA / crystallisation / triclosan / GEQ / medicinal chemistry / KTGS / in situ click chemistry / *in situ* macrocyclisation

Abstract:
In 2021, tuberculosis was the 13th leading cause of death in the world, with 10.6 million new cases and 1.4 million deaths. The emergence of strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistant to anti-tuberculosis drugs represents more than ever a major public health challenge worldwide. The enzymes of the type II fatty acid synthase system (FAS-II) involved in the biosynthesis of mycolic acids, essential components of the mycobacterial cell envelope, are prime targets for inhibiting mycobacterial growth. Among these enzymes, InhA is the main target of isoniazid (INH), the most widely used first-line anti-tuberculosis drug. INH is a prodrug that requires activation by the KatG enzyme. The main objective of this thesis was to discover direct inhibitors of InhA which do not require pre-activation. We began by developing new series of molecules targeting the InhA protein, using different methods: hybridization and the deconstruction-reconstruction method. The results obtained showed strong inhibition of the enzymatic activity of the InhA protein and also on the growth of Mtb. Resolutions of the crystallographic structures of the InhA protein co-crystallized with these compounds showed original interactions in the minor portal, a site under-exploited in the literature. In a second part, a new screening method using target-guided fragment assembly was exploited. Kinetically controlled target-guided synthesis (KTGS) was developed using *in situ* click chemistry. Based on a library of pre-established fragments, such screening would enable compounds to be designed directly in the enzyme's active site. Finally, an extension of the reactivity of *in situ* click chemistry was studied to promote intramolecular reactions. A series of acyclic ligands, with both alkyne and azide functions, was developed and shown to inhibit the enzymatic activity of the InhA protein. X-ray crystallography studies were carried out to describe the positioning of these ligands in the active site of the protein, indicating that macrocyclisation could be achieved *in situ*.