



HAL
open science

Synthèse d'analogues nucléotidiques visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante

Florian Chevrier

► **To cite this version:**

Florian Chevrier. Synthèse d'analogues nucléotidiques visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante. Autre. Université d'Orléans, 2018. Français. NNT : 2018ORLE2045 . tel-02165924

HAL Id: tel-02165924

<https://theses.hal.science/tel-02165924>

Submitted on 26 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

THÈSE présentée par :
Florian CHEVRIER

Soutenue publiquement le : **24 Octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Chimie Organique

**Synthèse d'analogues nucléotidiques visant
l'inhibition de la Thymidylate Synthase
Flavine-Dépendante**

THÈSE dirigée par :

Luigi A. Agrofoglio
Vincent Roy

Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Suzanne Peyrottes
Joanne Xie

D.R. CNRS, Université de Montpellier
Professeur, Ecole Normale Supérieure de Cachan

JURY:

Luigi A. Agrofoglio
Thierry Lequeux
Suzanne Peyrottes
Jérôme Thibonnet
Vincent Roy
Joanne Xie

Professeur, Université d'Orléans
Professeur, Université de Caen
D.R. CNRS, Université de Montpellier
Professeur, Université de Tours
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans
Professeur, Ecole Normale Supérieure de Cachan

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi Agrofoglio et du Dr. HDR Vincent Roy.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Luigi. A. Agrofoglio pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse au sein de son équipe. Je le remercie également pour m'avoir laissé la liberté de conduire avec une certaine autonomie les projets qu'il m'a confiés. J'aimerais aussi le remercier pour ses critiques constructives et son investissement envers les doctorants au sein de son équipe.

Ensuite, je souhaite remercier le Dr. Vincent Roy pour son encadrement quotidien au laboratoire. Je le remercie aussi pour ses conseils pratiques toujours très avisés, sa disponibilité ainsi que sa bonne humeur. Je le remercie aussi pour m'avoir permis d'effectuer l'encadrement des TPs à l'IUT ce qui fut une expérience enrichissante.

J'aimerais remercier sincèrement la D.R. CNRS Suzanne Peyrottes et la Pr. Joanne Xie d'avoir pris le temps et d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie aussi le Pr. Thierry Lequeux et le Pr. Jérôme Thibonnet pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier les gens qui nous permettent d'effectuer notre travail quotidien dans les meilleures conditions, dont notamment Marie Madeleine Le Floch, Yann Vital, Christophe Dubois, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif.

Les remerciements suivants vont au labo 6 dans sa globalité avec tous d'abord, les anciens qui m'ont permis de m'intégrer lors de mon arrivé dont Lala, Coralie et Aleks mais aussi Max à qui je dois des remerciements plus importants pour nos deux ans et demi inoubliables, passés ensemble, à devoir supporter son humour quelque peu différent, à délirer sur tout et n'importe quoi, à s'entraider au labo et bien sur, à s'éclater sur des musiques peu communes (Le vendredi Didier Super et autres). Merci encore pour tout, tu m'as permis de garder le cap et le smile lors des coups durs. Des remerciements particuliers aussi à Poko pour son écoute, son support crucial et ses conseils avisés. Je remercie également Momo pour tous les moments de décompression passés ensemble à prendre une pause, soulever de la fonte ou encore à questionner sa sexualité. Je remercie ensuite mes collègues plus récents dont Zahira, la maman du labo avec qui j'ai eu le plaisir de partager une hôte pendant quelque temps et les nouveaux V2 et Nico avec qui j'ai aussi bien rigolé. Je remercie aussi les nombreux stagiaires qui sont passés au laboratoire dont notamment Dacia, Loïc, Jonathan, Sevil, Gimli, Isma et Jean-débile.

Mes remerciements vont aussi aux autres collègues du labo avec qui j'ai passé de très bons moments que ce soit au labo, sur la passerelle ou en dehors dont : Ben, Antho, Baptou, Glo, Joe, Manu, Régis, Célia, etc...

Merci à Simon de m'avoir permis de m'évader pendant certaines de mes soirées sur BF, Rocket League et autres et pour tout le reste, pour tous les bons moments passés ensemble au fil des années.

Un grand merci aussi aux amis de toujours, rencontrés à l'IUT ou à la fac : Stevens aka Jean-Mimi, Mehdi, Vincent, Dadou, Mathouf, Caillou, etc..., pour toutes les soirées géniales passées ensemble, pour votre soutien et pour avoir toujours été là pour moi.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille du fond du cœur pour m'avoir soutenu tout au long de ces années. Je remercie aussi ma sœur qui a toujours cru en moi et qui a toujours eu cet amour et ce soutien indéfectible envers moi. Enfin, je remercie particulièrement mes parents qui ont toujours été là à me soutenir, à m'aider et qui ont toujours fait le maximum pour que je puisse réussir. Jamais, je ne pourrais être assez reconnaissant pour tous vos sacrifices et pour tout ce que vous avez fait pour moi.

SIGLES ET ABREVIATIONS

A

ACN : Acétonitrile
AcOH : Acide acétique
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF : 8-démethyl-8-amino-riboflavine
AMP : Adénosine-5'-monophosphate
AMR : Résistance aux antibiotiques
ANPs : Acyclo nucléosides phosphonates
APTS : Acide *p*-toluènesulfonique
ARN : Acide ribonucléique

B

Boc : *tert*-Butoxycarbonyle
BMRs : Bactéries multi-résistantes
BzCl : Chlorure de benzoyle
BSA : *Bis*(triméthylsilyl)acétamide

C

CAN : Nitrate de cérium et d'ammonium
CC₅₀ : Concentration cytotoxique médiane
CCM : Chromatographie sur couche mince
CH₂-THF : *N*₅,*N*₁₀-méthylène-5,6,7,8-tétrahydrofolate
CM : Métathèse croisée

D

DCE : Dichloroéthane
DCM : Dichlorométhane
DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DHFR : Dihydrofolate réductase
DHF : Dihydrofolate
DHPS : Dihydroptéroate synthétase

DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate

DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DMA : Diméthylacétamide

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxide

dTMP : 2'-Désoxythymidine-5'-monophosphate

dTTP : 2'-Désoxythymidine-5'-triphosphate

dUMP : 2'-Désoxyuridine-5'-monophosphate

E

EtOH : Ethanol

F

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FADH₂ : *N*₁,*N*₅-dihydroflavine adénine dinucléotide

FDTS : Thymidylate synthase flavine dépendante

FMN : Flavine mononucléotide

5-FU : 5-Fluorouracile

H

HBV : Virus de l'hépatite B

HCS : Criblage cellulaire à haut débit

HMBC : Corrélation hétéronucléaire à liaisons multiples

HMDS : Hexaméthylidisilazane

HPMPC : (*S*)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-méthoxypropyl)cytosine

HRMS : Spectrométrie de masse à haute résolution

hTMPK : Thymidylate Kinase humaine

I

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

L

LPS : Lipopolysaccharide

M

MAF : 8-Démethyl-8-méthylamino-riboflavine

MeOH : Méthanol

MIC : Concentration inhibitrice minimum

MS : Spectrométrie de masse

Mtb-ThyX : Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante de *Mycobacterium tuberculosis*

N

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NDP : Nucléoside diphosphate

NHC : Carbène *N*-hétérocyclique

NTP : Nucléoside triphosphate

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PCC : Chlorochromate de pyridinium

PCF₂ : *gem*-Difluorométhylphosphonate

PDB : Protein data bank

pH : Potentiel hydrogène

PMB : *p*-Méthoxybenzyle

PMBCl : Chlorure de *p*-méthoxybenzyle

PMBOH : Alcool *p*-méthoxybenzylique

PMEA : Phosphonométhoxyéthyle adénine

PMPA : 9-(2-Phosphonylméthoxypropyl) adénine

POC : *iso*-propyl oxyméthyl carbonate

PPL : Lipase de pancréas porcin

Py : Pyridine

R

RCM : Métathèse à fermeture de cycle

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RoF : Roséoflavine

ROMP : Polymérisation par ouverture de cycle via métathèse

S

SEM : 2-(Triméthylsilyl)éthoxyméthyle

S_NAr : Substitution nucléophile aromatique

S_N2 : Substitution nucléophile de type 2

T

TBAB : Bromure de tétra-*n*-butylammonium

TBAF : Fluorure de tétra-*n*-butylammonium

TBAI : Iodure de tétra-*n*-butylammonium

TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilane

Tf : Triflate

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TMS : Triméthylsilane

TMSBr : Bromure de triméthylsilane

TMSCl : Chlorure de triméthylsilane

TMSI : Iodure de triméthylsilane

TS : Thymidylate synthase

U

UV : Ultraviolet

V

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIF : Virus de l'immunodéficience féline

VIS : Virus de l'immunodéficience simienne

SOMMAIRE

Introduction générale

PARTIE A : BACTERIES, RESISTANCES ET TRAITEMENTS

I. Les bactéries : structures et mécanismes d'infection	19
II. Résistances bactériennes : causes et mécanismes	25
III. Les antibiotiques : familles et cibles	27
IV. Les Thymidylates Synthases : différents types et implications	32
1 Généralités et récents développements.....	32
2 Différences entre les 2 enzymes.....	34
3 Inhibition de la FDTS.....	39
4 Propriétés physico-chimiques du FAD.....	41
V. Objectifs de la thèse et plan de travail	47

PARTIE B : SYNTHÈSE D'ANALOGUES DU FAD EN N_{10}

I. Etat de l'art et potentiel antibactérien des analogues du FAD	54
II. Synthèse convergente des analogues du FAD en N_{10}	56
1 Structures cibles.....	56
2 Rétrosynthèse envisagée.....	56
3 Résultats et discussions.....	58
4 Conclusions et perspectives.....	78
III. Synthèse des dérivées portant le noyau isoalloxazine	79
1 Rétrosynthèse envisagée.....	79
2 Résultats et discussions.....	80
3 Tests biologiques.....	89
4 Conclusions et perspectives.....	89
IV. Synthèse des dérivées portant le noyau 5-déazaflavine	90
1 Rétrosynthèse envisagée.....	90
2 Résultats et discussions.....	91
3 Conclusions et perspectives.....	95

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE C : SYNTHÈSE D'ANALOGUES DU FAD EN N₁

I. Potentiel de ces structures et contexte	117
II. Synthèse par formation finale du noyau 1,3-diazine	120
1 Structures cibles.....	120
2 Rétrosynthèse envisagée.....	120
3 Résultats et discussions.....	121
4 Conclusions et perspectives.....	124
III. Synthèse par mono-protection régiosélective	125
1 Rétrosynthèse envisagée.....	125
2 Résultats et discussions.....	126
3 Conclusions et perspectives.....	130
IV. Synthèse par alkylation régiosélective	131
1 Rétrosynthèse envisagée.....	131
2 Résultats et discussions.....	131
3 Tests biologiques.....	147
4 Conclusions et perspectives.....	148

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE D : INSERTION DU MOTIF PCF₂ SUR DIVERS ANPS

I. Introduction	187
II. Synthèse de nouveaux ANPs visant l'inhibition de la FDTS	190
1 Contexte.....	190
2 Rétrosynthèse envisagée.....	190
3 Résultats et discussion.....	192
4 Tests biologiques.....	203
5 Conclusions et perspectives.....	204

PARTIE EXPERIMENTALE

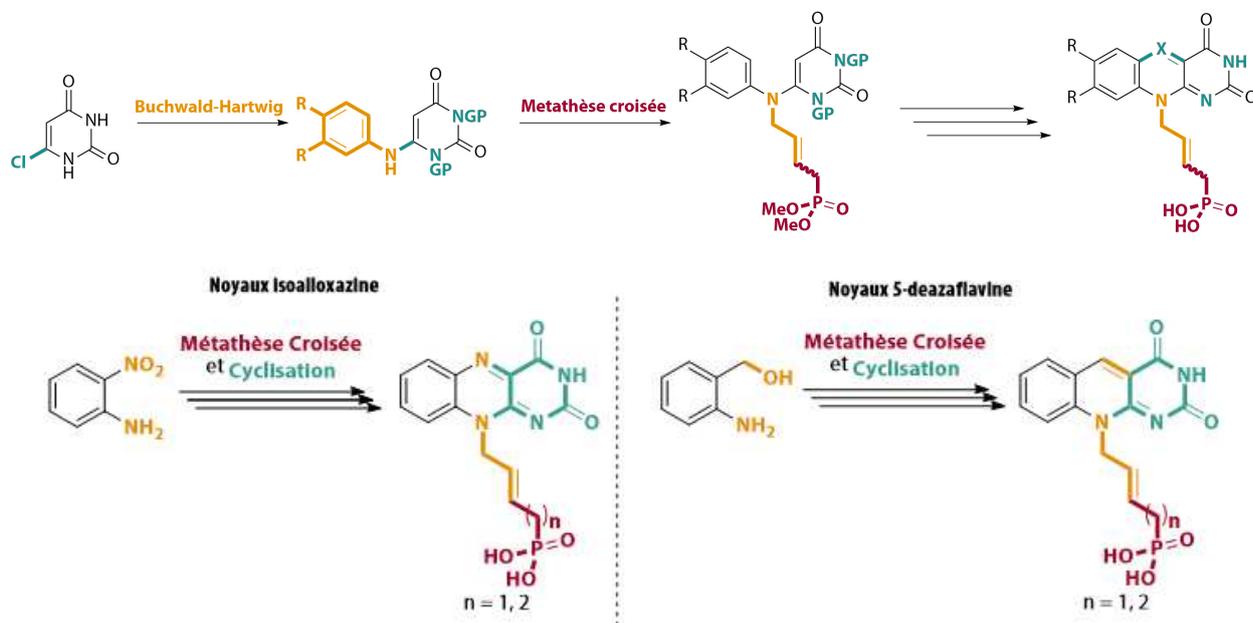
Conclusion générale

INTRODUCTION GENERALE

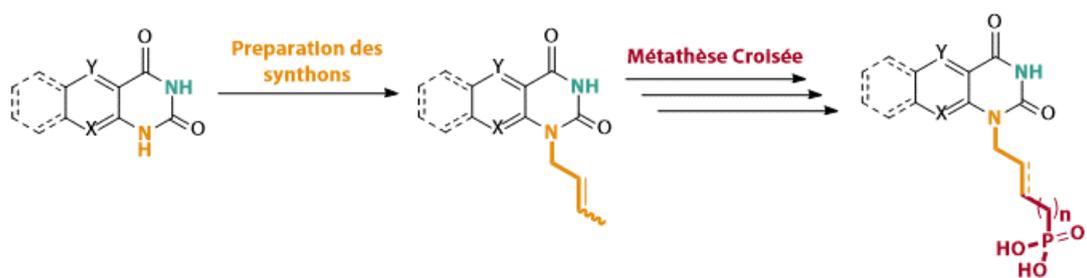
Face à l'émergence récente de bactéries multi-resistantes (BMRs) liée à une utilisation massive de chimiothérapies antibactériennes, l'OMS a récemment tiré la sonnette d'alarme en prédisant l'impossibilité de traiter ces infections à partir de 2050, sans la mise sur le marché de nouveaux traitements efficaces. Ainsi, ce problème de santé publique mondial incite la recherche de nouvelles cibles biochimiques et de petites molécules à structures originales et c'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse.

Dans une courte introduction, nous présenterons quelques généralités à propos des bactéries et de leur mécanisme d'infection pour ensuite, décrire les facteurs désormais connus qui ont mené aux résistances bactériennes. Nous nous intéresserons alors à un historique concis des antibiotiques et un accent particulier sera mis sur les structures et les mécanismes d'actions des traitements les plus actifs. Nous détaillerons par la suite la biosynthèse de novo de la 2'-désoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP) et son intérêt essentiel dans la survie des bactéries et nous nous intéresserons, plus particulièrement, à l'étape de méthylation réductrice catalysée par une Thymidylate Synthase. Enfin, nous aborderons notre cible biochimique d'intérêt : la Flavin-Dependent Thymidylate Synthase (FDTs), ses spécificités structurelles et mécanistiques et les inhibiteurs décrits dans la littérature.

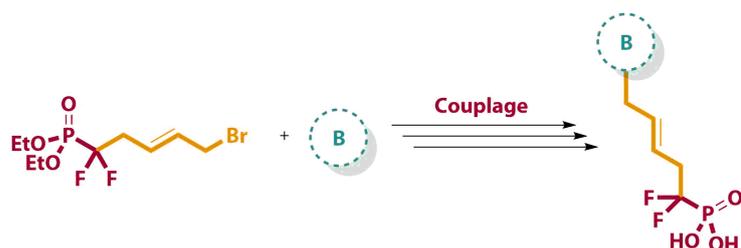
Dans un premier chapitre, suite à la mise en évidence d'interactions capitales dans la reconnaissance du FAD par le noyau lumichrome et son groupement pyrophosphate, nous nous intéresserons à la synthèse d'une nouvelle classe d'ANPs possédant des bases non canoniques substituées sur l'azote centrale N_{10} par une chaîne acyclique de type *trans*-but-2'-ényle et *trans*-pent-2'-ényle phosphonate. Parmi les méthodes de synthèses employées, nous nous intéresserons tout d'abord à une synthèse originale et convergente de ces dérivés, reposant sur des étapes clés de couplage de Buchwald-Hartwig suivi d'une réaction de métathèse croisée ; puis à des voies classiques pour la formation spécifique de ces analogues portant différents tricycles hétéaromatiques.



Le second chapitre portera sur translation de cette chaîne latérale sur l'azote N_1 dans l'optique de modifier les propriétés physico-chimiques des potentiels inhibiteurs. Aussi, une forte attention sera portée sur les méthodologies de synthèse employées fournissant ces structures finales. Ainsi, de nouvelles voies de synthèse seront développés et des optimisations nécessaires seront étudiées afin de réduire le nombre d'étape, de permettre une chimie plus responsable et une multiplication des exemples.



Enfin, dans un troisième temps, nous porterons notre intérêt sur l'introduction d'un groupement difluorométhane (CF_2) en α du phosphore, comme bioisostère plus stable de la liaison P-O du phosphate, sur la chaîne acyclique diéthyle (E)-(pent-3-èn-1-yl)phosphonate. La synthèse d'une petite librairie de nouvelles structures sera décrite et une attention particulière sera portée sur l'impact thérapeutique de ces nouveaux ANPs possédant un original panel de bases hétérocycliques.



PARTIE A : BACTERIES, RESISTANCES ET TRAITEMENTS



I. Les bactéries : structures et mécanismes d'infection

Les bactéries constituent des entités biologiques microscopiques, procaryotes et généralement unicellulaires qui sont ubiquitaires de tous les biotopes sur Terre. Ainsi, ces dernières se distinguent en plusieurs catégories de par leur forme (coque, bacille, spirille...), leur taille (de 0.5 à 5 μm de longueur), leur membrane cellulaire (paroi unie ou bi-membranée) et leurs caractéristiques propres (auto ou hétérotrophe, ana ou aérobie, mésophile, psychrophile ou encore thermophile) mais partagent des caractéristiques structurelles communes. Ainsi, en tant qu'organismes procaryotes, les bactéries ne possèdent pas de noyau, pas d'organites telles que les mitochondries, les réticulums endoplasmiques ou encore les appareils de Golgi (Schéma 1).

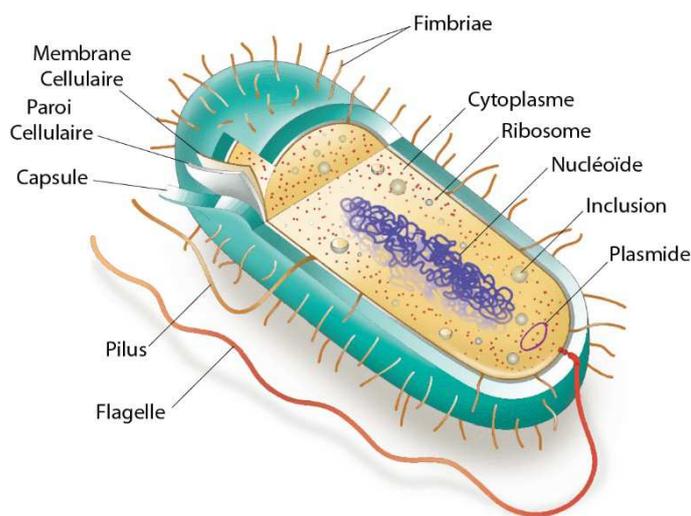


Schéma 1 : Structure générale d'une bactérie.

Cependant, elles possèdent des attributs essentiels à leur survie. Ainsi, le nucléoïde et les plasmides permettent le stockage du matériel génétique, les ribosomes réalisent la synthèse protéique et la paroi et membrane cellulaire ont un rôle protecteur de la cellule procaryote en empêchant le stress osmotique et les pressions physiques sur cette dernière. Aussi, les bactéries présentent des caractéristiques différentes aux cellules eucaryotes comme le flagelle nécessaire pour la propulsion mécanique et leurs mouvements, des inclusions stockant les minéraux à l'intérieur de la cellule et les pili responsables de l'arrimage de la cellule au tissu de l'hôte (Schéma 1).

La classification des bactéries s'effectue de manière générale en 2 catégories principales suivant les propriétés des membranes cellulaires de ces microorganismes. Ainsi, les bactéries qui expriment, à leurs surfaces membranaires, plusieurs couches de peptidoglycanes couplés à des glycopolymères anioniques, appelés acides téichoïques, ont une coloration de Gram positif car cette paroi cellulaire épaisse empêche la décoloration par l'éthanol lors du protocole de Gram. A l'inverse, les bactéries à coloration de Gram négatif disposent d'une fine membrane cellulaire composée de quelques couches de peptidoglycanes entourées d'une membrane externe lipophile composée de lipopolysaccharides (LPS) permettant ainsi la pénétration de l'éthanol dans le milieu intérieur et entraînant la décoloration concomitante (Tableau 1).¹

¹ *Medical Microbiology*. 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX), 1996.

Tableau 1 : Principales bactéries pathogènes pour l'Homme.

Morphologie	Coloration	Genre	Conséquences cliniques	
COCCI	GRAM +	<i>Staphylococcus</i>	Suppurations, Septicémies	
		<i>Streptococcus</i>	Angines, Scarlatine, Endocardites	
		<i>Pneumococcus</i>	Infections respiratoires, Méningites	
	GRAM -	<i>Neisseria</i>	Méningites, Blennorragie	
		<i>Moraxella</i>	Otites infantiles, Endocardites	
		<i>Veillonella</i>	Infections respiratoires, Méningites	
BACTERIES AEROBIES	GRAM +	<i>Bacillus</i>	Anthrax, Empoisonnement alimentaire	
		<i>Corynebacterium</i>	Diphthérie, Endocardites, Infections Respiratoires, Infections de la peau	
		<i>Erysipelothrix</i>	Erysipèle	
		<i>Listeria</i>	Listériose	
		<i>Nocardia</i>	Nocardiose	
	BACILLES		<i>Tropheryma whipplei</i>	Maladie de Whipple
	GRAM -		Entérobactéries	Infections urinaires & respiratoires, Typhoïde, Intoxication alimentaire, Dysenterie, Peste, Obésité
			Parvobactéries	Fièvre de Malte, Pasteurelloses, Coqueluche, Infections respiratoires, Méningites, Infections nosocomiales, suppurations, septicémie, Chloréla
			<i>Stenotrophomas</i>	Infections nosocomiales
			<i>Legionella</i>	Pneumopathies

BACTERIES ANAEROBIES	BACILLES	GRAM +	<i>Actinomyces</i> <i>Clostridium</i>	Infection buccale, Tétanos, Botulisme, Septicémie, Gangrènes
		GRAM -	<i>Bacteroides</i> <i>Fusiformis</i>	Suppurations, Septicémies
	COCCI	GRAM +	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	Abcès
		GRAM -	<i>Veillonella</i>	Endocardite, Osteomyélite
BACTERIES PARTICULIERES	MYCOBACTERIUM	ZIEHL	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium africanum</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i>	Tuberculose, Lèpre
	SPIROCHETES	Colorations Spécifiques	<i>Treponema</i> <i>Leptospira</i> <i>Borrelia</i>	Syphilis, Leptospirose, Maladie de Lyme
	RICKETTSIALES	Colorations Spécifiques	<i>Rickettsias</i> <i>Chlamydiaceae</i>	Typhus, Ornithose, Trachome, Infections sexuellement transmissibles (IST)
	MYCOPLASMES	Colorations Spécifiques	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	Pneumopathies, IST

Contrairement à d'autres agents pathogènes tels que les virus, les bactéries ne sont pas toutes pathogènes pour l'Homme et en conséquence, ces dernières ont une disposition à avoir deux relations distinctes avec l'écosystème où elles évoluent. Ainsi, ces microorganismes peuvent développer une relation symbiotique en agissant en tant que barrière à la fois protectrice, structurelle et métabolique chez l'Homme au niveau des muqueuses (peau, système digestifs, respiratoires, urinaires, etc.).^{2,3} À l'inverse, cette relation commensale et symbiotique peut se détériorer à cause de divers facteurs individuels et environnementaux engendrant ainsi, un état de dysbiose se caractérisant par une altération de la composition et de la fonction essentielle de la population microbienne (Schéma 2).

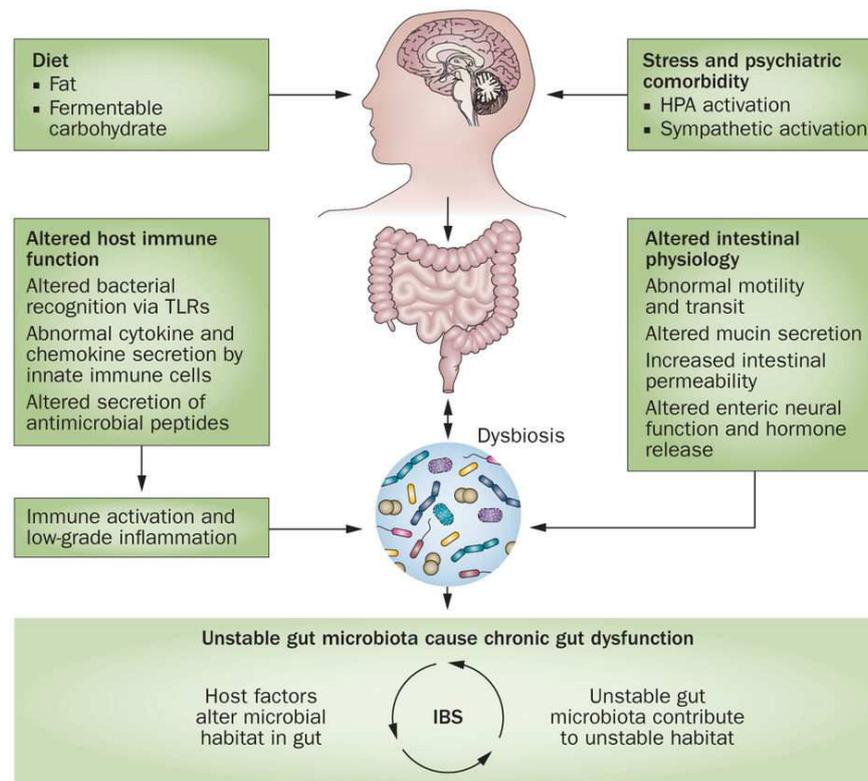


Schéma 2 : Facteurs individuels et environnementaux responsables de la dysbiose de la flore intestinale.⁴

En conséquence, la fonction protectrice normalement exercée par cette première barrière bactérienne est compromise et ceci induit inévitablement un risque prononcé pour diverses infections liés à la multiplication incontrôlée de bactéries opportunistes & pathogènes.⁵

La pathogénicité bactérienne est exprimée par la capacité d'un microorganisme à exprimer un certain degré de virulence résultant des spécificités génétiques, biochimiques ou structurelles qui lui permet de déclencher une maladie chez un hôte.

² Kamada, N.; Chen, G. Y.; Inohara, N.; Nunez, G., Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **2013**, *14*, 685-90.

³ Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D., Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21*, 8787-803.

⁴ Collins, S. M., A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2014**, *11*, 497-505.

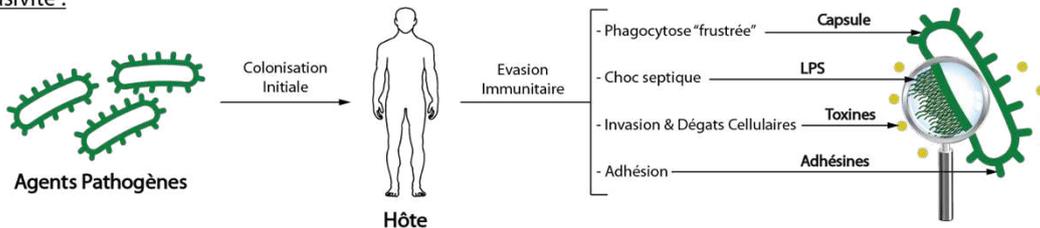
⁵ a) Pham, T. A. N.; Lawley, T. D. Emerging Insights on Intestinal Dysbiosis during Bacterial Infections. *Curr Opin Microbiol* **2014**, *17*, 67-74. b) Levy, M.; Kolodziejczyk, A. A.; Thaïss, C. A.; Elinav, E. Dysbiosis and the Immune System. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 219-232. c) Lupp, C.; Robertson, M. L.; Wickham, M. E.; Sekirov, I.; Champion, O. L.; Gaynor, E. C.; Finlay, B. B., Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 119-29.

Ainsi, les stratégies moléculaires utilisées par les bactéries pour interagir avec l'hôte peuvent être uniques à un microorganisme ou conservées à travers plusieurs espèces différentes. Cependant, 2 stratégies sont universelles aux mécanismes d'infections de tous pathogènes bactériens : l'invasivité et la toxinogénèse.

L'invasivité permet aux pathogènes d'échapper au système immunitaire de l'hôte afin de conduire à leur prolifération. Elle englobe les mécanismes de colonisation (adhérence et multiplication initiale), la production de substances microbiennes facilitant l'invasion des tissus et la capacité à contourner le système immunitaire de l'hôte. La toxinogénèse est la capacité de ces agents pathogènes à produire des toxines. Les bactéries peuvent produire deux types de toxines appelées exotoxines et endotoxines. Les exotoxines sont libérées par les cellules bactériennes et peuvent agir sur les tissus de l'hôte entourant le site de prolifération initiale. Les endotoxines sont des substances associées aux cellules de l'hôte qui peuvent être libérées à partir de cellules bactériennes en prolifération et de cellules lysées à la suite de l'action du système immunitaire ou résultant de l'action d'antibiotiques qui permettent de rompre la membrane cellulaire de l'agent pathogène.

Le mécanisme de pathogénicité bactérienne peut être alors généralisé de la manière suivante⁶ :

Invasivité :



Toxinogénèse :

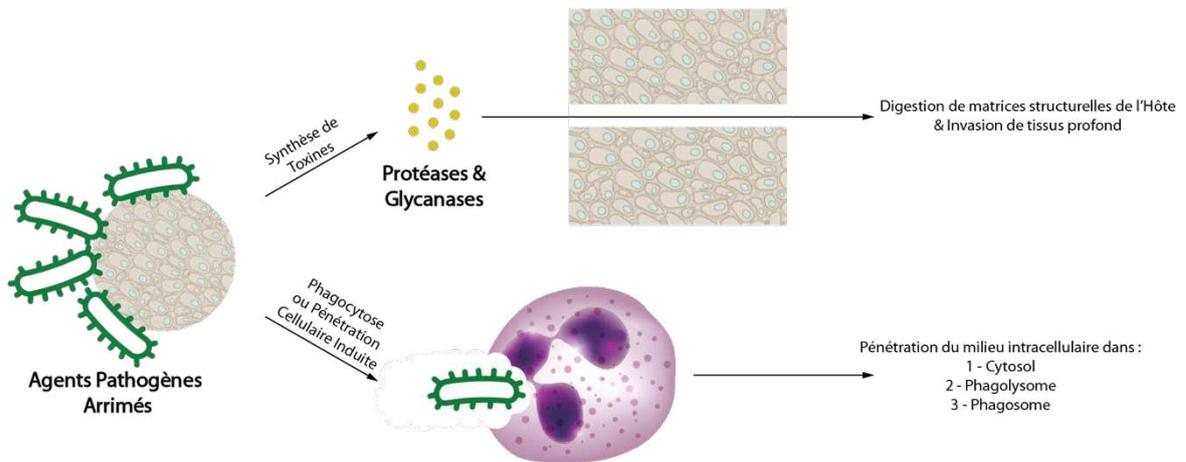


Schéma 3 : Mécanisme général de la pathogénicité bactérienne.⁶

➤ Invasivité :

En rencontrant un hôte humain, un agent pathogène bactérien peut provoquer plusieurs réponses de l'hôte en utilisant une variété de mécanismes pour échapper aux défenses de l'hôte. Les composants bactériens qui interagissent avec l'hôte sont alors :

⁶ Wilson, J. W., Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* **2002**, 78, 216-224.

1 - La capsule (partie externe de la membrane) qui contient des exopolysaccharides qui empêchent la reconnaissance des antigènes par les macrophages et les neutrophiles conduisant à une phagocytose « frustrée ».

2 - Les LPS et globalement, la membrane cellulaire de l'agent pathogène peuvent provoquer chez l'hôte un choc septique localisé ou global.

3 - Les toxines sont responsables de dégâts au niveau cellulaire qui peuvent permettre une pénétration des bactéries dans les tissus de l'hôte.

4 - Les adhésines qui facilitent l'attachement des micro-organismes dans le milieu intérieur.

➤ Toxinogénèse :

Après la colonisation initiale et l'arrimage de pathogènes dans les tissus de l'hôte, ces derniers peuvent nécessiter une protection plus approfondie vis-à-vis des défenses immunitaires en s'affranchissant des milieux interstitiels « de surface ». Ce phénomène est accompli par l'expression et la synthèse de toxines digestives qui constitue principalement des enzymes de la famille des protéases et glycanases entraînant l'affaiblissement des protéines matricielles et des polysaccharides des tissus de l'hôte. De plus, les toxines exprimées peuvent résulter en une phagocytose défectueuse et ainsi, permettre la pénétration dans le milieu intracellulaire de l'hôte et plus précisément, dans le cytosol, dans un phagolysosome ou dans un phagosome non fusionné à un lysosome (Schéma 3).

II. Résistances bactériennes : causes et mécanismes

Le premier cas de résistance bactérienne fut observé avec le premier antibiotique produit à l'échelle industrielle, la Pénicilline G sur *Staphylococcus Aureus*. D'abord réservé aux armées alliées dès 1938, la commercialisation de ce traitement au grand public vit l'apparition, dès 1942,⁷ de résistances liées à son utilisation. Ceci a eu pour conséquence la recherche intensive de nouvelles molécules via la modification chimique des composés déjà existants (nouvelles générations de pénicillines et céphalosporines synthétiques), la découverte de nouvelles cibles et la combinaison d'antibiotiques déjà sur le marché.

Cependant, même si la recherche en matière d'antibiotiques dans le domaine médical, biochimique et chimique a été fructueuse pendant la seconde moitié du 20^{ème} siècle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) met en garde contre l'AntiMicrobial Resistance (AMR) en indiquant que ces mécanismes de résistances se répandent à l'échelle mondiale et limitent les possibilités de traitements actuels et ainsi, résultent en la prolongation des maladies infectieuses, l'apparition de handicaps et la mort.⁸ Sans nouveaux antimicrobiens efficaces pour la prévention et le traitement de ces infections, les procédures médicales invasives telles que la transplantation d'organes, la chimiothérapie anticancéreuse, la gestion du diabète et les procédures de chirurgie lourdes deviendront très risquées voire impossibles à réaliser sans l'apparition d'infections intraitables.⁹

Les facteurs causatifs qui ont entraînés l'apparition des résistances bactériennes sont maintenant connus comme résultant de¹⁰ :

- 1 - La surconsommation d'antibiotiques.
- 2 - Les prescriptions inappropriées.
- 3 - L'utilisation intensive de ces composés dans l'agriculture.
- 4 - Le petit nombre de nouvelles molécules actives mises sur le marché.
- 5 - L'obstacle des tests cliniques.

En conséquence, nous assistons désormais à l'apparition de bactéries multirésistantes (BMRs) possédant un arsenal biochimique leur permettant de résister aux traitements conventionnels. La présence de facteurs de résistance chez les bactéries pathogènes est d'autant plus problématique en raison du transfert de gène horizontal, processus par lequel les bactéries acquièrent des gènes de leur écosystème au travers d'éléments génétiques transposables, d'intégrons et de plasmides.¹¹

⁷ Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Royal Soc Exper Biol Med* **1942**, *51*, 386–389.

⁸ WHO, Antimicrobial resistance, Fact Sheet n°194, Updated November 2017.

⁹ Teillant, A.; Gandra, S.; Barter, D. J.; Laxminarayan, R. Potential Burden of Antibiotic Resistance on Surgery and Cancer Chemotherapy Antibiotic Prophylaxis in the USA: A Literature Review and Modelling Study. *Lancet Infectious Diseases* **2015**, *15*, 1429-1437.

¹⁰ Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *PT* **2015**, *40*, 277–283.

¹¹ von Wintersdorff, C. J. H.; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H. M.; Wolfs, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* **2016**, *7*.

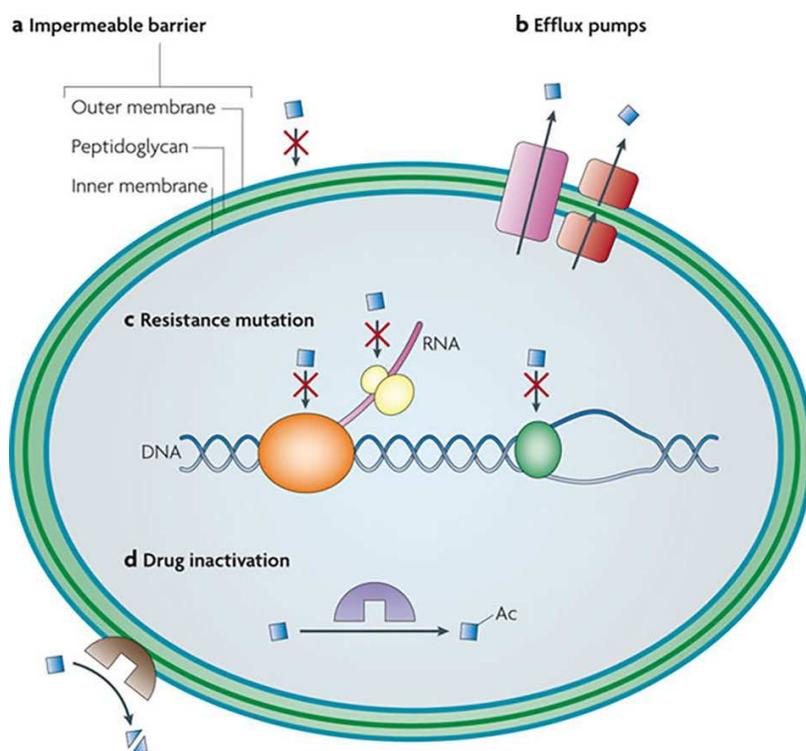


Schéma 4 : Mécanisme de résistances bactériennes.¹²

Les facteurs de résistances peuvent être classés en 4 grandes familles (Schéma 4) :

1 – Les Barrières imperméables : certains germes possèdent naturellement une résistance aux bactéricides de par l'impossibilité de ces derniers à pénétrer la membrane cellulaire (cas des bactéries Gram négative) ou de par la sur-expression de la cible biochimique visée.

2 – Les pompes à efflux : ces édifices protéiques à la surface des membranes cellulaires des pathogènes assurent l'excrétion de nombreux principes actifs.

3 – Les mutations de résistance : ces mutations modifient la protéine cible, par exemple en désactivant le site de liaison allostérique des antibiotiques mais en conservant la fonctionnalité de la protéine. Des exemples spécifiques incluent des mutations dans la gyrase (protéine verte), dans l'ARN polymérase (protéine orange) et dans les ribosomes (protéine jaune).

4 – L'inactivation de l'antibiotique : l'inactivation est réalisée par modification chimique de l'antibiotique, par exemple, l'acétylation de la famille des aminoglycosides catalysée par les acétyltransférases (protéine violette), ou par dégradation du noyau β -lactame des antibiotiques de la famille des pénicillines et céphalosporines catalysée par les β -lactamases (protéine marron).

¹² Allen, H. K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen, K. A.; Davies, J.; Handelsman, J. Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 251–259.

III. Les antibiotiques : familles et cibles

Historiquement, la lutte contre les bactéries pathogènes a débuté à la fin du 19^{ème} siècle par la compréhension des relations de causes à effets entre les germes et les maladies. Tout d'abord, les travaux du Docteur Casimir Davaine, dans les années 1860, ont permis de démontrer que la transmission de l'anthrax entre des animaux infectés et des animaux sains pouvait être effectuée par le biais d'injections fournissant des indices quant aux causes des maladies bactériennes. Par la suite, aussi dans la seconde moitié du 19^{ème} siècle, ce sont les travaux du Pr. Louis Pasteur qui ont permis d'établir de manière univoque les causes des maladies infectieuses par ses expériences et sa théorie des germes. S'appuyant sur cette théorie, le Docteur allemand Robert Koch a permis finalement de démontrer que les maladies infectieuses étaient causées par des souches spécifiques de bactéries. Ainsi en 1882, il isola *Mycobacterium Tuberculosis* et en 1884, la souche *Vibrio Cholerae* ce qui lui valut l'obtention du premier Prix Nobel de Médecine en 1905.

Du fait du développement de la microbiologie moderne et de la compréhension des mécanismes d'infection, la nécessité de combattre ces pathogènes par le biais d'antibiotiques s'est développée. Les antibactériens sont définis comme des molécules soit conçues, extraites d'espèces végétales ou des métabolites secondaires naturellement produits par des bactéries ou des mycètes qui induisent une inhibition de la croissance de pathogènes (effet bactériostatique) ou la mort de ces derniers (effet bactéricide).

Le premier composé doué d'un effet bactéricide fut découvert par le médecin italien Bartolomeo Gosio et isolé à partir de *Penicillium glaucum*. Il démontra que l'acide mycophénolique **1** (Figure 1) inhibait la croissance de *Bacillus anthracis*, toutefois, ce composé fut oublié de la communauté médicale à cause des publications de Gosio exclusivement écrites en italien. Il fut redécouvert plus tard en 1912 et par la suite, il fut prouvé que ce dernier possédait des propriétés antivirales, antifongiques, antitumorales et anti-psoriasiques.¹³

La mise en place d'un nouveau paradigme fut accomplie par l'invention du concept de la « magic bullet » par le Pr. Paul Ehrlich, lauréat du Prix Nobel de Médecine et père de la chimiothérapie spécifique et du précurseur de la coloration de Gram, en 1900. Ses travaux majeurs sur les colorants bactériens lui ont permis de découvrir que ces composés étaient absorbés par ces microorganismes et qu'il pouvait alors synthétiser une petite molécule ciblant spécifiquement les microbes sans causer de dommages à l'organisme. En 1909, il découvrit le premier antibactérien synthétisé par l'Homme, l'arsphenamine **2**¹⁴ (Salvarsan, Figure 1) sous forme de trimère et pentamère,¹⁵ basé sur les modifications chimiques nécessaires du « lead » de l'époque, l'acide arsénique, pour le traitement de la syphilis. L'approche méthodique du Pr. Paul Ehrlich concernant la recherche de médicaments a permis d'identifier et de transposer des milliers de candidats médicaments en thérapie clinique parmi lesquels, un nombre conséquent d'antimicrobiens. Cette approche a conduit à la découverte des sulfamides antibactériens et plus particulièrement du sulfamidochrysoïdine **3** (Protonsil, Figure 1) en 1932. Ce dernier constitue, en réalité, une prodrogue du principe actif, le non brevetable et peu coûteux sulfanilamide.

¹³ Bentley, R., Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. *Chem Rev* **2000**, *100*, 3801-3826.

¹⁴ Ehrlich, P.; Bertheim, A. Über Das Salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-Dioxy-Arsenobenzol Und Seine Nächsten Verwandten. *Ber Dtsch Chem Ges* **1912**, *45*, 756-766.

¹⁵ Lloyd, N. C.; Morgan, H. W.; Nicholson, B. K.; Ronimus, R. S. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 941-944.

La découverte majeure de la médecine moderne fournissant le premier antibiotique produit industriellement dans le monde entier, fut en 1929 lorsque Sir Alexander Fleming, lauréat du Prix Nobel de Médecine, découvrit qu'une colonie de *Staphylococcus aureus* avait été lysée par une contamination due à une espèce de mycètes de la famille *Penicillium notatum* et par le biais d'un composé dont la structure à noyau β -lactame fut élucidée plus tard, la benzylpénicilline **4** (Pénicilline G, Figure 1).¹⁶

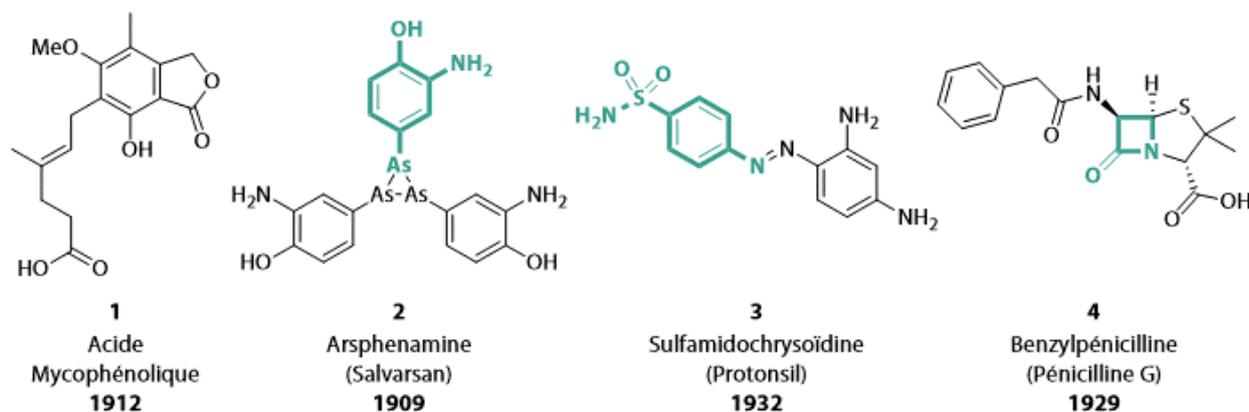


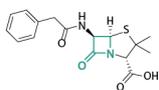
Figure 1 : Premier antibiotiques découverts

La découverte de ces trois premiers antimicrobiens, le Salvarsan, le Protosil et la Pénicilline G, a constitué un évènement majeur de la médecine moderne permettant d'établir les bases fondatrices du « drug discovery & development ». Cette méthode appliquée par d'autres chercheurs, a pavé la voie pour l'innovation en matière de nouveaux antibiotiques, dont certains ont fait leur chemin jusqu'au chevet du patient. Ainsi, la période entre les années 1940 et 1970 a été un âge d'or dans la découverte de nouvelles familles d'antibiotiques marqué par l'exploration de nouvelles structures de produits naturels, des criblages cellulaires (HCS) et un fort taux de succès « from bench-to bedside » (Schéma 5).

¹⁶ Ligon, B. L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. *Semin Pediatr Infect Dis* **2004**, 15, 52–57.

Légende : ● Antibiotiques utilisés couramment en tant que bactériostatiques

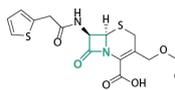
β-LACTAMES



Penicilline G - 4

2 FAMILLES :

Les Penicillines



Cefalotin - 5

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la formation de chaînes peptidoglycanes et ainsi empêche la synthèse de la membrane bactérienne entraînant la lyse.

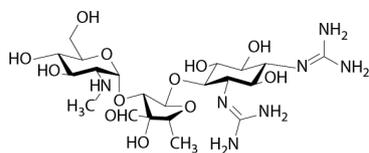
GAMME D'INHIBITION :

Large spectre.

APPARITION DE RESISTANCES :

Dès 1942 pour les penicillines

AMINOGLYCOSIDES



Streptomycin - 6

EXEMPLES NOTOIRES :

Neomycin, Gentamycin, Amikacin.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse protéique bactérienne en interférant avec la sous-unité 30S du ribosome et ainsi avec l'elongation des chaînes protéiques.

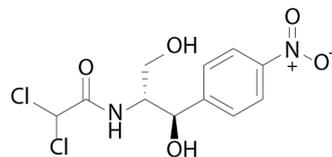
GAMME D'INHIBITION :

Large spectre.

APPARITION DE RESISTANCES :

1946

CHLORAMPHENICOL



Chloramphenicol - 7

ADMINISTRATION :

Ce composé n'est désormais prescrit que pour des conjonctivites dans les pays industrialisés au vu de ses risques et des nombreuses résistances.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse protéique bactérienne en interférant avec la sous-unité 50S du ribosome et ainsi avec l'elongation des chaînes protéiques.

GAMME D'INHIBITION :

Large spectre.

APPARITION DE RESISTANCES :

1948

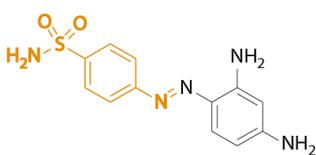
DECOUVERTE

1930

1940

1950

SULFONAMIDES



Protonil - 3

EXEMPLES NOTOIRES :

Sulfanilamide, Sulfadiazine, Sulfisoxazole.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse de l'acide dihydrofolique catalysée par la dihydropteroate synthase en constituant des inhibiteurs compétitifs du PABA.

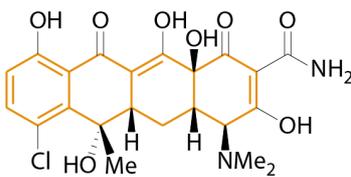
GAMME D'INHIBITION :

Bactéries Gram-positives.

APPARITION DE RESISTANCES :

1942

TETRACYCLINES



Chlortetracycline - 8

EXEMPLES NOTOIRES :

Doxycycline, Limecycline, Oxytetracycline.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse protéique bactérienne en interférant avec la sous-unité 30S du ribosome et spécifiquement, empêchant la croissance.

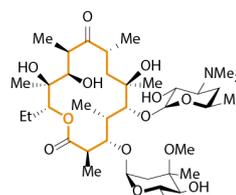
GAMME D'INHIBITION :

Large Spectre.

APPARITION DE RESISTANCES :

1950

MACROLIDES



Erythromycin - 9

EXEMPLES NOTOIRES :

Clarithromycin, Azithromycin.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse protéique bactérienne en interférant avec la sous-unité 50S du ribosome et spécifiquement, conduisant à la mort cellulaire.

GAMME D'INHIBITION :

Large Spectre.

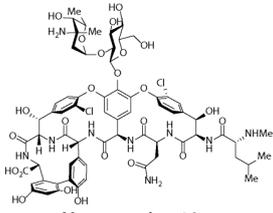
APPARITION DE RESISTANCES :

1951

Schéma 5 : Aperçu général et historique des différentes familles d'antibiotiques.¹⁷

Antibiotiques utilisés couramment en tant que bactéricides

GLYCOPEPTIDES



Vancomycin - 10

EXEMPLES NOTOIRES :

Teicoplanin, Polymyxin B, Bacitracin.

MODE D'ACTION :

Ces composés empêchent le cross-linking des chaînes peptidiques intra-membranaires entraînant la fragilité de la membrane bactérienne et la lyse.

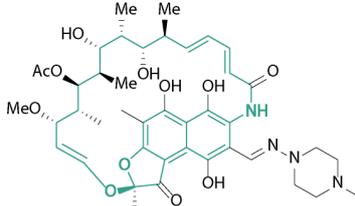
GAMME D'INHIBITION :

Large spectre.

APPARITION DE RESISTANCES :

1960

ANSAMYCINES



Rifampicin - 11

EXEMPLES NOTOIRES :

Rifamycin, Geldanamycin, Ansamitocin.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent spécifiquement l'ARN polymérase d'organisme prokaryote à l'étape d'initiation empêchant la synthèse protéique et provoquant ainsi la mort.

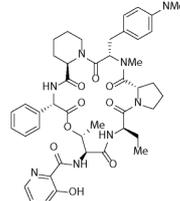
GAMME D'INHIBITION :

Bactéries Gram-positives.

APPARITION DE RESISTANCES :

1962

STREPTOGRAMINES



Streptogramin B - 12

EXEMPLES NOTOIRES :

Cette famille d'antibiotiques est administrée sous la forme d'une combinaison de 2 composés structurellement différents qui ont une action synergistique. Exemple : Streptogramin A & B.

MODE D'ACTION :

Un des 2 composés a une inhibition allostérique de la sous-unité du ribosome 50S et l'autre se lie aussi à cette sous-unité mais empêche l'élongation des chaînes polypeptidiques provoquant ainsi la mort.

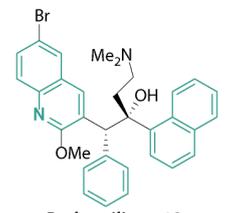
GAMME D'INHIBITION :

Bactéries Gram-positives.

APPARITION DE RESISTANCES :

1962

DIARYLQUINOLINES



Bedaquiline - 13

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse bactérienne d'ATP (F₁F₀-ATPase) tuant efficacement le pathogène.

GAMME D'INHIBITION :

Mycobacterium Tuberculosis

APPARITION DE RESISTANCES :

2006

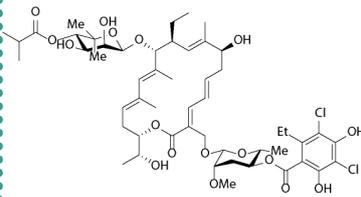
1960

1970

1980

1990

MACROLIDES



Fidaxomicin - 14

MODE D'ACTION :

Ce composé inhibe la synthèse protéique bactérienne en interférant avec la sous-unité 30S du ribosome et spécifiquement conduisant à la mort cellulaire.

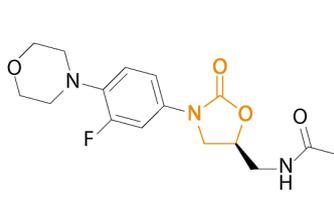
GAMME D'INHIBITION :

Clostridium Difficile

APPARITION DE RESISTANCES :

1977

OXAZOLIDINONES



Linezolid - 15

EXEMPLES NOTOIRES :

Eperzolid, Tedozolid.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent la synthèse protéique bactérienne en interférant de manière unique avec la sous-unité 50S du ribosome et conduisant à l'arrêt de la croissance ou la mort.

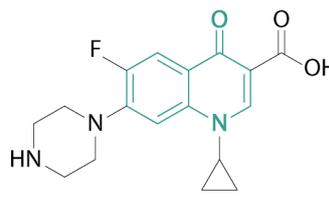
GAMME D'INHIBITION :

Bactéries Gram-positives.

APPARITION DE RESISTANCES :

2001

QUINOLONES



Cyprofloxacin - 16

EXEMPLES NOTOIRES :

Levofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin.

MODE D'ACTION :

Ces composés inhibent l'ADN gyrase et les topoisomérases bactériennes empêchant la réplication de l'ADN et la transcription et provoquant ainsi la mort.

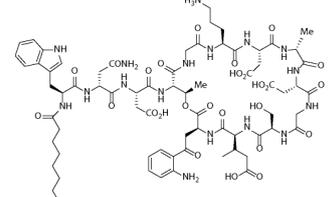
GAMME D'INHIBITION :

Large Spectres.

APPARITION DE RESISTANCES :

1968

LIPOPEPTIDES



Daptomycin - 17

EXEMPLE NOTOIRE :

Surfactin.

MODE D'ACTION :

Ces composés dépolarisent la membrane cellulaire et empêchent les multiples fonctions de cette dernière provoquant ainsi la lyse.

GAMME D'INHIBITION :

Bactéries Gram-positives.

APPARITION DE RESISTANCES :

1987

Dans la période « post-âge d'or » jusqu'à aujourd'hui, l'approche dominante pour le développement de nouveaux médicaments a été la pharmacomodulation des familles déjà existantes, la synthèse et le criblage à haut débit (High-Troughput Synthesis & Screening), les approches *in-silico* mais aussi la combinaison ou la réaffectation d'autres composés bioactifs pour combattre la résistance émergente et/ou ré-émergente des agents pathogènes.¹⁷

Avec l'essor de la protéomique, on dénote environ 200 protéines essentielles au fonctionnement normal bactérien, cependant, une infime partie est ciblée par des petites molécules. Ainsi, les composés faisant partie de l'arsenal thérapeutique, n'ont que quatre processus cellulaires majeurs pour cibles (Schéma 6) :

- 1 - La synthèse protéique avec le ribosome et ses 2 unités 50S et 30S avec des composés agissant comme inhibiteurs allostériques.
- 2 - La synthèse de la membrane cellulaire en empêchant l'élongation des chaînes polypeptidiques ou en dépolarisant la membrane.
- 3 - La transcription/réplication de l'ADN en bloquant l'initiation ou par effet terminateur de chaîne.
- 4 - Le métabolisme de l'acide folique empêchant ainsi la maturation de l'ADN, la croissance et la division cellulaire.

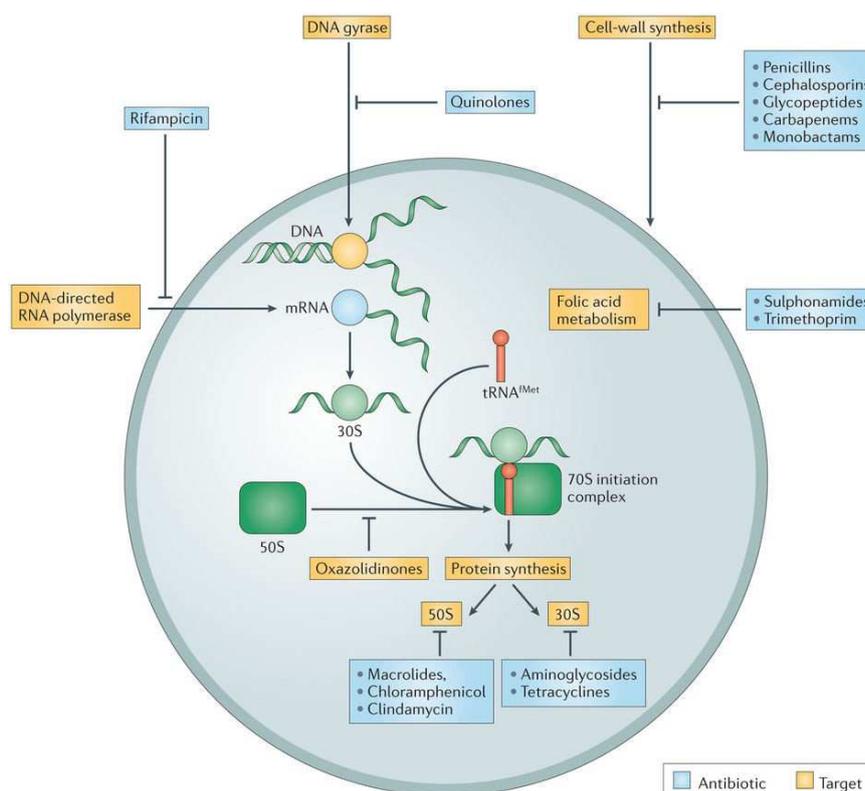


Schéma 6 : Principales cibles des antibiotiques.¹⁸

Parmi les solutions possibles contre les souches résistantes, le ciblage des processus biologiques essentiels en coordination avec les approches combinatoires prédictives apparaît comme étant inévitable pour le développement de nouvelles générations d'inhibiteurs.

¹⁷ Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529*, 336–343.

¹⁸ Lewis, K. Platforms for Antibiotic Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 371–387.

IV. Les Thymidylates Synthases : différents types et implications

1 Généralités et récents développements

Le développement de résistances bactériennes aux chimiothérapies couramment prescrites a conduit à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement et l'endiguement de souches pathogènes telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia prowazekii* ou *Bacillus anthracis*. Dans ce contexte, la biosynthèse *de novo* de l'ADN et plus spécifiquement de la 2'-désoxythymidine-5'-triphosphate (dTTP), apparaît comme une cible intéressante pour de nouveaux candidats médicaments potentiels de par l'importance capitale de ces processus biologiques pour le développement et la survie de la bactérie. En effet, cette cascade métabolique responsable de la synthèse et la réparation de l'ADN possède plusieurs cibles fortement décrites dans la littérature (Schéma 7). Une des plus exploitées se rapporte au cycle du folate, cofacteur responsable de la méthylation de la 2'-désoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP, **18**) avec 2 enzymes majeures : la Dihydrofolate Réductase (DHFR) et la Dihydroptéroate Synthétase (DHPS). Les inhibiteurs de ces enzymes constituent une stratégie thérapeutique très décrite dans la littérature pour des applications antinéoplasiques,¹⁹ antimalariennes,²⁰ antifongiques et antibactériennes.²¹

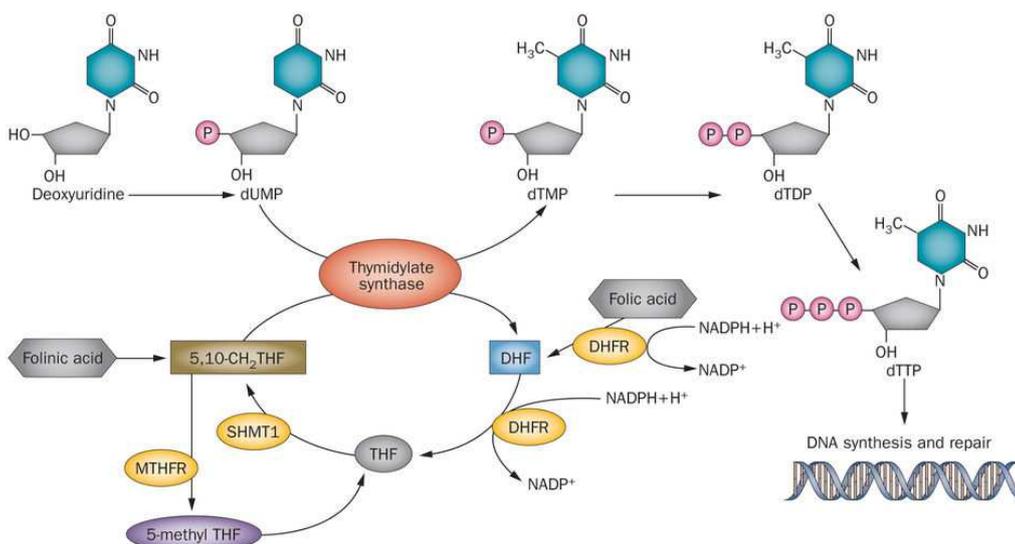


Schéma 7 : Biosynthèse de novo de la 2'-désoxythymidine-5'-triphosphate (dTTP).^{19a)}

La cible majeure faisant partie du cycle folate est la biosynthèse de la 2'-désoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP, **19**) antérieure à sa phosphorylation et son incorporation au génome par une ADN polymérase. Ce processus primordial commun à la plupart des êtres vivants (bactéries, plantes et organismes eucaryotes dont les humains) est le résultat de l'action d'une enzyme : la Thymidylate Synthase. Ainsi, cette enzyme constitue une cible de choix pour les chimiothérapies

¹⁹ a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnston, P. G.; Lenz, H.-J.; Ladner, R. D. Standing the Test of Time: Targeting Thymidylate Biosynthesis in Cancer Therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**, *11*, 282-298. b) Gonen, N.; Assaraf, Y. G. Antifolates in Cancer Therapy: Structure, Activity and Mechanisms of Drug Resistance. *Drug Resist Updat* **2012**, *15*, 183-210.

²⁰ Yuthavong, Y. Basis for Antifolate Action and Resistance in Malaria. *Microbes Infect* **2002**, *4*, 175-182.

²¹ a) Bourne, C. R. Utility of the Biosynthetic Folate Pathway for Targets in Antimicrobial Discovery. *Antibiotics (Basel)* **2014**, *3*, 1-28. b) Hawser, S.; Lociuoro, S.; Islam, K. Dihydrofolate Reductase Inhibitors as Antibacterial Agents. *Biochem Pharmacol* **2006**, *71*, 941-948. c) Then, R. L. Antimicrobial Dihydrofolate Reductase Inhibitors - Achievements and Future Options: Review. *J Chemother* **2004**, *16*, 3-12.

antinéoplasiques^{19a),22} mais aussi antibactériennes.^{21a)} Malgré les différentes libraires de molécules existantes, les inhibiteurs de thymidylates synthases restent cependant absents du paysage thérapeutique antibactérien de par les fortes ressemblances structurales entre l'enzyme humaine et bactérienne et le manque de sélectivité en découlant.

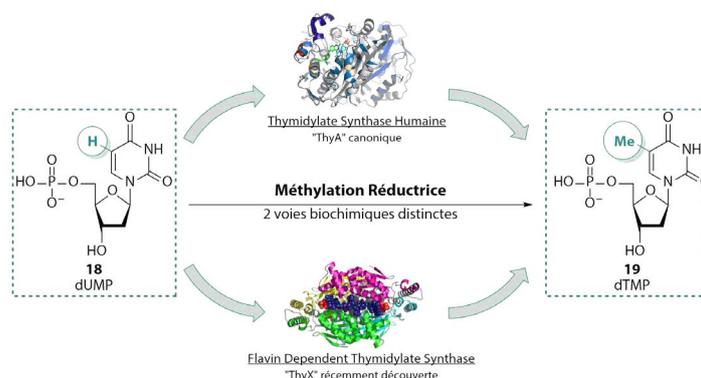


Schéma 8 : 2 voies distinctes pour la biosynthèse *de novo* de la dTMP

Néanmoins, en 2002, Myllykallio *et al.* a mis en évidence l'existence d'une voie biochimique alternative de la synthèse de novo de la dTMP par le biais d'une nouvelle enzyme, la Flavin-Dependent Thymidylate Synthase (FDTS, Schéma 8).²³ Cette dernière, encodée par le gène ThyX, est présente exclusivement dans des organismes procaryotes et absente chez l'Homme. Aussi, 1/3 des microorganismes sont dépendants de cette voie métabolique alternative comme seule source de dTMP et parmi ces derniers, la majorité sont pathogènes pour l'Homme (Schéma 9).²⁴

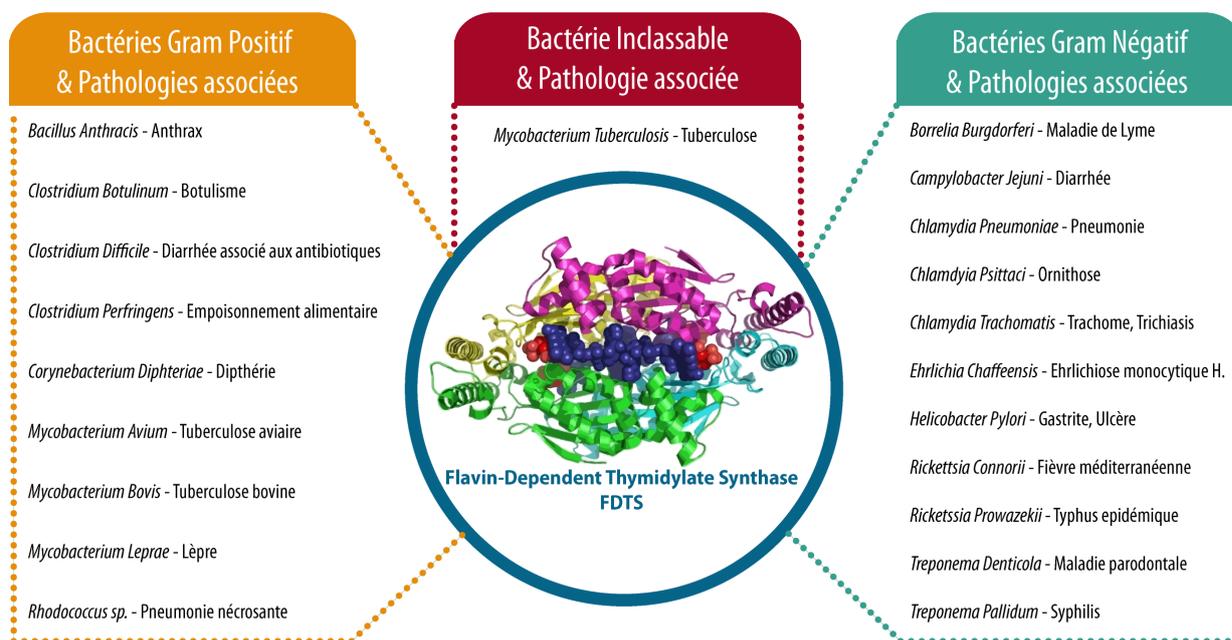


Schéma 9 : Bactéries pathogènes exprimant la FDTS.²⁴

²² Garg, D.; Henrich, S.; Salo-Ahen, O. M. H.; Myllykallio, H.; Costi, M. P.; Wade, R. C. Novel Approaches for Targeting Thymidylate Synthase to Overcome the Resistance and Toxicity of Anticancer Drugs. *J Med Chem* **2010**, *53*, 6539–6549.

²³ Myllykallio, H.; Lipowski, G.; Leduc, D.; Filee, J.; Forterre, P.; Liebl, U. An Alternative Flavin-Dependent Mechanism for Thymidylate Synthesis. *Science* **2002**, *297*, 105–107.

²⁴ Mathews, I. I. Flavin-Dependent Thymidylate Synthase as a Drug Target for Deadly Microbes: Mutational Study and a Strategy for Inhibitor Design. *J Bioterr & Biodef* **2013**, *Suppl 12* (650), 004.

Il est important de noter que la plupart de ces pathogènes ne possèdent qu'une seule Thymidylate Synthase et en conséquence, cette spécificité biologique fait de cette enzyme une cible de choix dans le développement de nouveaux agents antibactériens avec peu ou pas d'effets secondaires sur l'Homme.

2 Différences entre les 2 enzymes

La Thymidylate Synthase, encodée par le gène *ThyA*, est une enzyme qui a été intensivement étudiée dans la littérature donnant lieu à une grande librairie de structures cristallines disponibles et par conséquent, cette dernière est considérée comme une voie biochimique canonique, on la qualifie alors de Thymidylate Synthase classique. Le mécanisme chimique accepté de la *ThyA* se compose de 5 étapes (Figure 2).²⁵ La première étape consiste en la protonation du N_{10} du N_5, N_{10} -méthylène-5,6,7,8-tétrahydrofolate (5,10- CH_2 -THF ou CH_2H_4 folate, **20**) résultant en la formation d'une base de Schiff. Un résidu cystéine active ensuite de manière covalente le dUMP par une addition de Michael (étape 2). L'énolate résultant attaque l'iminium en N_5 de **20** (étape 3). L'intermédiaire ponté et ainsi lié à l'enzyme subit une élimination d'Hofmann du tétrahydrofolate (THF ou H_4 folate, étape 4) pour former un méthylène exocyclique intermédiaire. Enfin, le méthylène en C_6 de cet intermédiaire est réduit par le transfert d'hydrure du tétrahydrofolate précédemment éliminé (étape 5), résultant alors en la formation de dihydrofolate (DHF ou H_2 folate, **21**) et de dTMP.

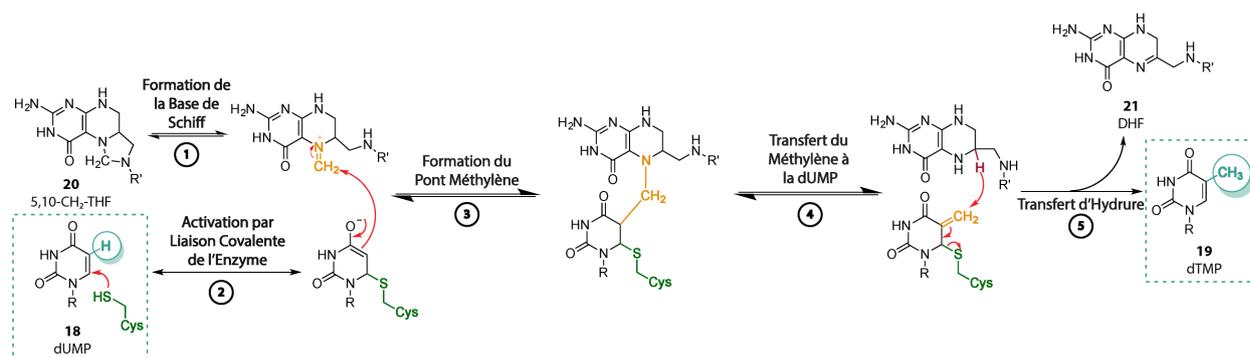


Figure 2 : Mécanisme réactionnel de la TS classique.²⁵

L'inhibition de cette enzyme, en provoquant l'arrêt de la synthèse de l'ADN, du cycle cellulaire et à la mort cellulaire a conduit à des inhibiteurs majeurs tel que la 5-fluorouracile²⁶ **22** (5-FU) et ses formes prodrogues (Capecitabine **23**, Tegafur **24**) qui constituent des composés se liant spécifiquement au site de liaison de la dUMP empêchant alors le transfert du groupement méthylène.²⁷ Cependant, ces composés souffrent d'un problème de sélectivité majeur entre l'enzyme humaine et bactérienne. A l'inverse, les chimiothérapies majoritairement utilisées se composent d'antifolates, dont le rôle est

²⁵ Carreras, C. W.; Santi, D. V. The Catalytic Mechanism and Structure of Thymidylate Synthase. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 721–762.

²⁶ a) Heidelberger, C.; Mooren, D.; Plevin, E.; Scheiner, J.; Griesbach, L.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Schnitzer, R. J.; Duschinsky, R. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179*, 663. b) Danenberg, P. V.; Langenbach, R. J.; Heidelberger, C. Fluorinated Pyrimidines. Structures of Reversible and Irreversible Complexes of Thymidylate Synthetase and Fluorinated Pyrimidine Nucleotides. *Biochemistry* **1974**, *13*, 926–933. c) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 330–338.

²⁷ Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Kohen, A. Mechanisms and Inhibition of Uracil Methylating Enzymes. *Bioorg Chem* **2012**, *43*, 37–43.

d'occuper le site de liaison du CH₂-THF tel que le Raltitrexed **25** et le Nolatrexed **26**, qui sont des inhibiteurs plus spécifiques et plus actifs de la Thymidylate Synthase (Figure 3).

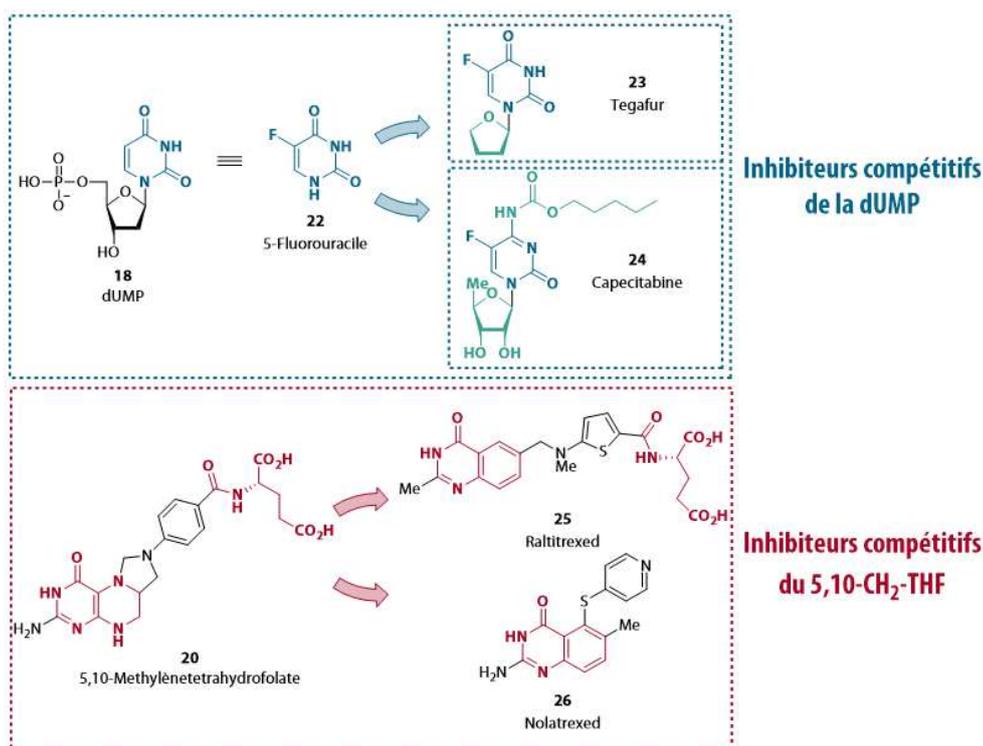


Figure 3 : Exemple d'inhibiteurs de la Thymidylate Synthase classique.

Concernant le mécanisme de la Flavin-Dependent Thymidylate Synthase (FDTS), ce dernier est sujet à une littérature abondante et a été proposé pour la première fois par Koehn *et al.* en 2009 (Figure 4).²⁸

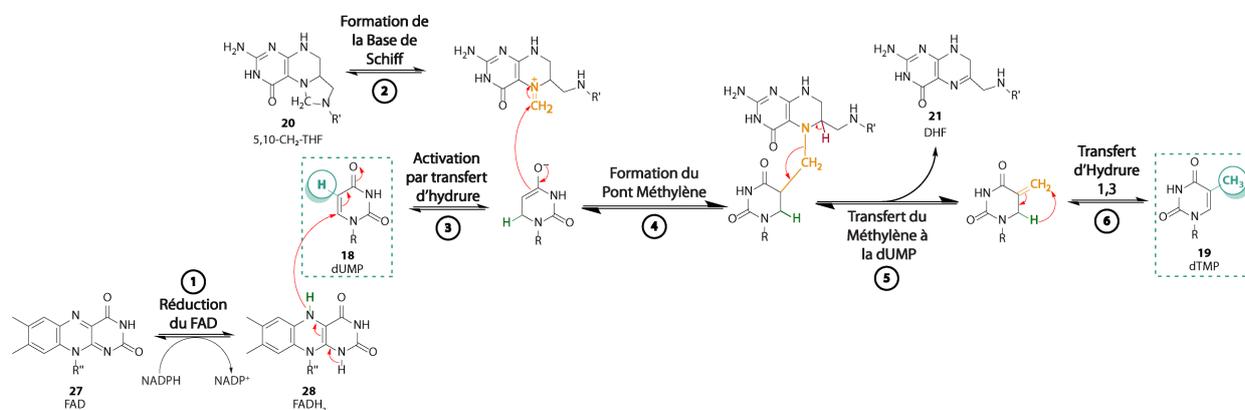


Figure 4 : Premier mécanisme proposé de la FDTS.²⁸

Dans cette étude, il met en évidence que la FDTS présente des différences majeures avec la TS. Ainsi, contrairement à cette dernière, les intermédiaires réactionnels ne sont pas liés au site actif de l'enzyme durant la catalyse. Le mécanisme est alors capital à élucider, car il permet de comprendre le fonctionnement normal de l'enzyme par les structures des états de transition et les interactions entre les substrats et l'enzyme dans le but de synthétiser des inhibiteurs sélectifs de cette cible. Même si la FDTS & la TS nécessitent le CH₂-THF comme source de méthylène, la FDTS nécessite un cofacteur Flavin

²⁸ a) Koehn, E. M.; Fleischmann, T.; Conrad, J. a; Palfey, B. a; Lesley, S. a; Mathews, I. I.; Kohen, A. An Unusual Mechanism of Thymidylate Biosynthesis in Organisms Containing the ThyX Gene. *Nature* **2009**, 458, 919–923. b) Koehn, E. M.; Kohen, A. Flavin-Dependent Thymidylate Synthase: A Novel Pathway towards Thymine. *Arch Biochem Biophys* **2010**, 493, 96–102.

Adénosine Dinucléotide (FAD, **27**) qui, comme dans la plupart des flavoprotéines, est réduit par le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) en DiHydroflavine Adénosine Dinucléotide (FADH₂, **28**) (étape 1). Ce dernier agit alors en tant que donneur d'hydrure en position 6 de la dUMP dans l'étape d'addition de Michael afin d'aboutir à la formation d'un énolate, qui comme dans le mécanisme de la ThyA, attaque la base de Schiff (étapes 2 & 3). L'élimination de DHF permet de rompre le pont méthylène et aboutit à une double liaison entre le C₅ et le C₇ de la dUMP. La viabilité et la stabilité chimique en solution de cet isomère de la dTMP ont été mises en évidence par Koehn *et al.* auparavant (étape 5).²⁹ Enfin, un transfert d'hydrure en 1,3 permet l'isomérisation en dTMP (étape 6).

Le second mécanisme a été proposé par Palfey *et al.*³⁰ en 2014 après le piégeage d'un intermédiaire qui s'apparente à une forme électroniquement polarisée de la dUMP neutralisée dans un milieu acide.³¹ Ce qui suggère que l'activation de la base est le résultat d'une mésomérie et pas le résultat de l'action des cofacteurs comme précédemment suggéré (Figure 5).

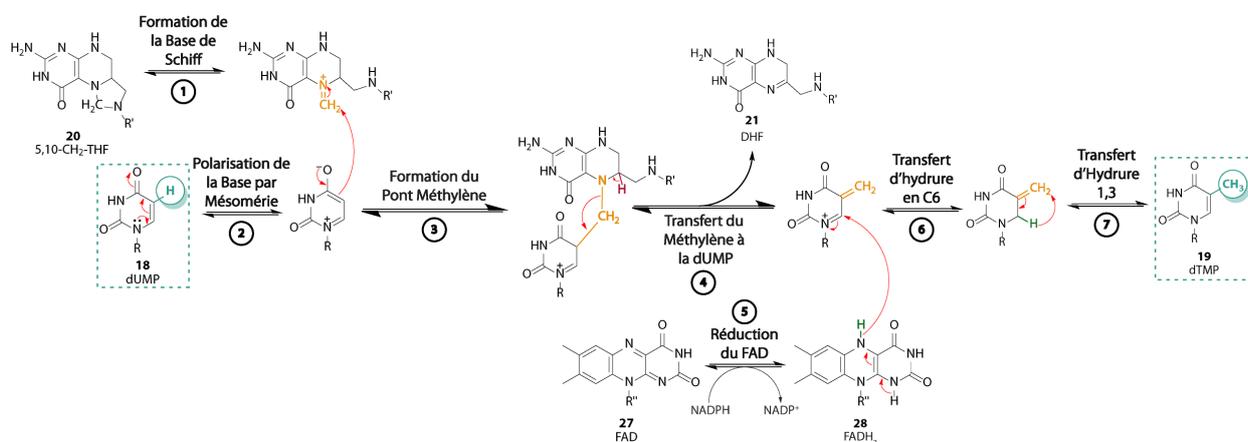


Figure 5 : Second mécanisme proposé de la FDTS.³⁰

Ce second mécanisme met en évidence que cette forme polarisée de la dUMP subit, dans un premier temps, le transfert de méthylène par l'action de **20** (étape 3 & 4) puis le transfert d'hydrure en C₆ (étapes 5 & 6) et enfin la même isomérisation que dans le mécanisme précédent.

En 2014, en réalisant le radiomarquage des intermédiaires réactionnels de la FDTS dans de l'eau deutérée, l'équipe de Kohen a proposé un nouveau mécanisme à partir des analyses de masse des intermédiaires deutérés, validant ainsi les précédents.³² Les données collectées dans cette étude ne suffisent pas à apporter les précisions nécessaires sur les étapes finales du mécanisme et ainsi, les auteurs proposent deux voies distinctes pour ce dernier :

²⁹ Hong, B.; Maley, F.; Kohen, A. Role of Y94 in Proton and Hydride Transfers Catalyzed by Thymidylate Synthase. *Biochem* **2007**, *46*, 14188–14197.

³⁰ Conrad, J. A.; Ortiz-Maldonado, M.; Hoppe, S. W.; Palfey, B. A. Detection of Intermediates in the Oxidative Half-Reaction of the FAD-Dependent Thymidylate Synthase from *Thermotoga Maritima*: Carbon Transfer without Covalent Pyrimidine Activation. *Biochemistry* **2014**, *53*, 5199–5207.

³¹ Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A. Trapping of an Intermediate in the Reaction Catalyzed by Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 4442–4448.

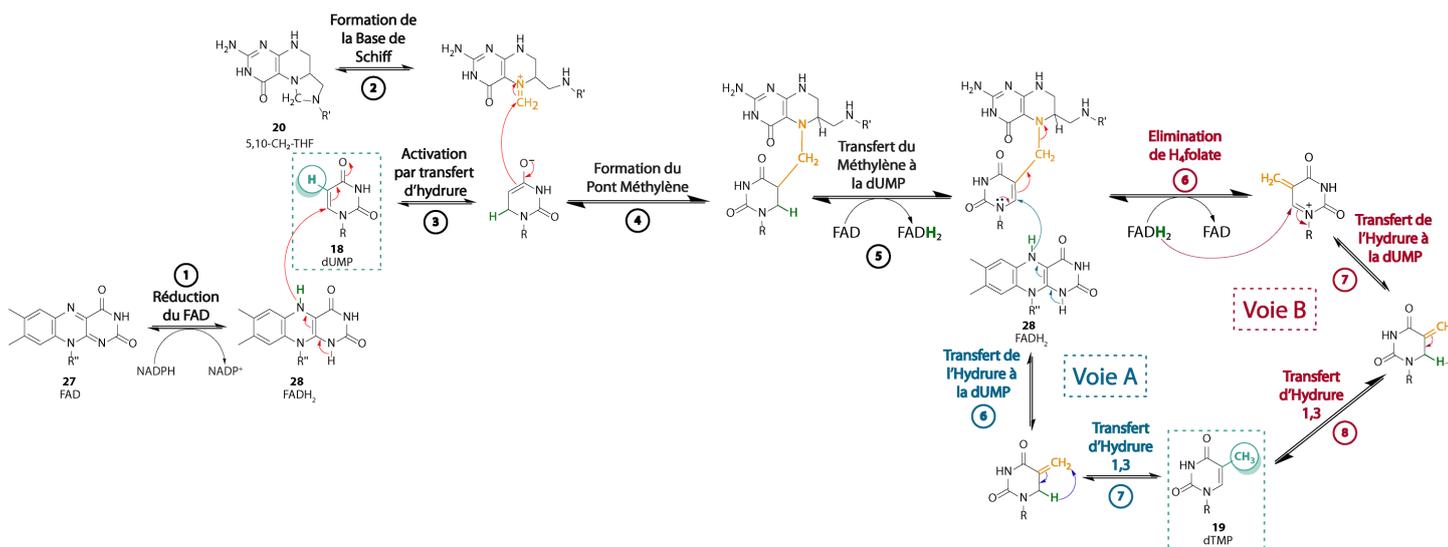


Figure 6 : Troisième mécanisme proposé de la FDTS.³²

1 – Voie A : L'élimination du H₄folate est concertée avec le transfert d'hydrure provenant du FAD (étape 6).

2 – Voie B : L'élimination du H₄folate est suivi du transfert d'hydrure provenant du FAD (étape 6 puis 7).

Récemment, un mécanisme complet a pu être établi après l'identification d'un nouvel intermédiaire réactionnel de dégradation du FAD par Kohen *et al.* (Figure 7).³³ Le FAD est alors réduit par l'action du NADPH et l'amidure en N₅ ainsi formé accepte le méthylène de la base de Schiff pour ensuite effectuer son transfert à la dUMP polarisée et conduire au pont méthylène (étape 1-5).

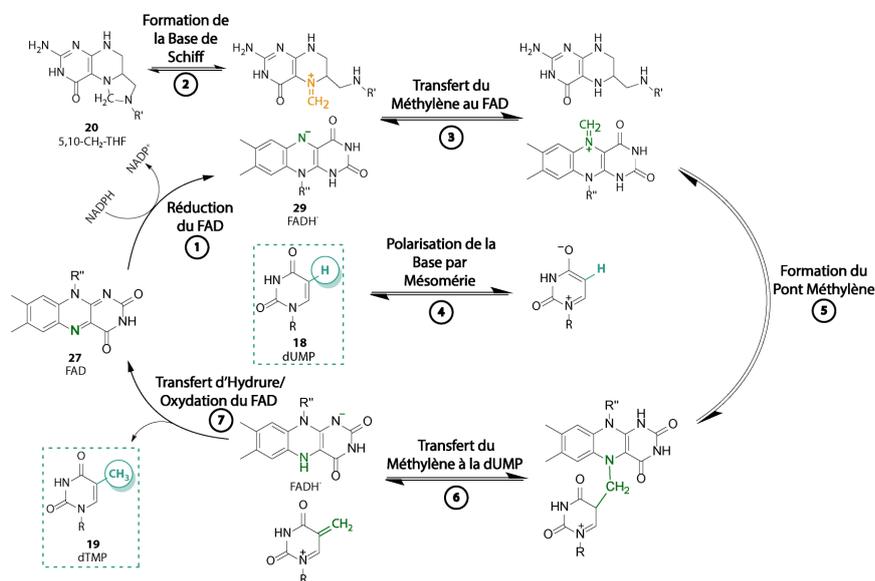


Figure 7 : Mécanisme complet de la FDTS.³³

Ce mécanisme diffère des travaux publiés précédemment dans le sens où la force motrice de la réaction n'est plus une activation de la dUMP par polarisation ou par addition de Michael mais ici, la première

³² Mishanina, T. V.; Corcoran, J. M.; Kohen, A. Substrate Activation in Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 10597–10600.

³³ Mishanina, T. V.; Yu, L.; Karunaratne, K.; Mondal, D.; Corcoran, J. M.; Choi, M. A.; Kohen, A. An Unprecedented Mechanism of Nucleotide Methylation in Organisms Containing ThyX. *Science* **2016**, *351*, 507–510.

étape est la réduction du FAD qui est capable de pousser l'équilibre vers la formation de la dTMP. Ce mécanisme centré sur le FAD et les précédents apportent de nombreuses réponses quant au fonctionnement de l'enzyme mais laissent aussi des questions en suspens.

Afin de répondre à ce problème, l'équipe de Palfey s'est intéressée récemment à l'étape d'activation de la dUMP et à l'étape de transfert du méthylène à ce dernier (Figure 8).³⁴ Dans cette publication est exposé un mécanisme inédit où la base est activée par déprotonation de l'azote N₃ ce qui induit une délocalisation de la charge négative sur l'oxygène O₂ et O₄, conduisant ainsi à une meilleure nucléophilie de la fonction énamine pour l'iminium du FAD (étapes 3 & 4). Aussi, Palfey *et al.* postule que le phosphate de la dUMP serait responsable de la force motrice qui permettrait l'élimination du FADH⁻ par déprotonation et de ce fait, la formation de dTMP (étapes 5, 6 & 7).

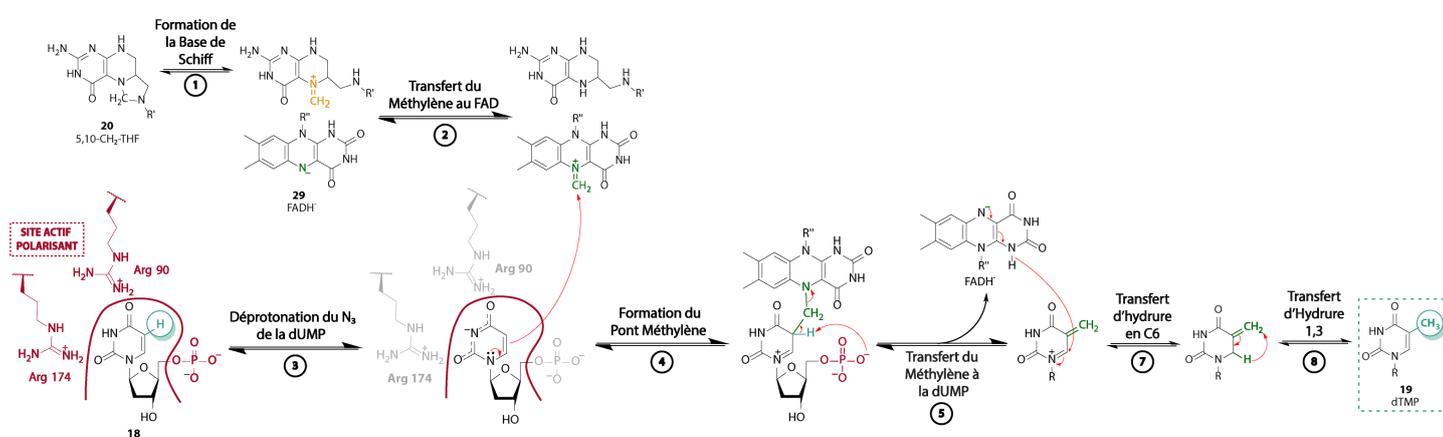


Figure 8 : Récentes avancées du mécanisme de la FDTs. **Erreur ! Signet non défini.**

En plus des différences mécanistiques des 2 enzymes, ces dernières diffèrent par des caractéristiques plus fondamentales telles que leurs séquences génomiques,³⁵ leurs structures protéiques primaires et quaternaires^{25,36} mais aussi par leurs sites actifs (Schéma 10).

³⁴ Stull, F. W.; Bernard, S. M.; Sapra, A.; Smith, J. L.; Zuiderweg, E. R. P.; Palfey, B. A. Deprotonations in the Reaction of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3261–3269.

³⁵ Giladi, M.; Bitan-Banin, G.; Mevarech, M.; Ortenberg, R. Genetic Evidence for a Novel Thymidylate Synthase in the Halophilic Archaeon Halobacterium Salinarum and in Campylobacter Jejuni. *FEMS Microbiol Lett* **2002**, *216*, 105–109.

³⁶ a) Hardy, L. W.; Finer-Moore, J. S.; Montfort, W. R.; Jones, M. O.; Santi, D. V.; Stroud, R. M. Atomic Structure of Thymidylate Synthase: Target for Rational Drug Design. *Science* **1987**, *235*, 448–455. b) Kuhn, P.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Canaves, J. M.; Brinen, L. S.; Dai, X.; Deacon, A. M.; Elsliger, M. A.; Eshaghi, S.; Floyd, R.; *et al.* Crystal Structure of Thy1, a Thymidylate Synthase Complementing Protein from Thermotoga Maritima at 2.25 Å Resolution. *Proteins* **2002**, *49*, 142–145. c) Graziani, S.; Bernauer, J.; Skouloubris, S.; Graille, M.; Zhou, C.-Z.; Marchand, C.; Decottignies, P.; Tilbeurgh, H. van; Myllykallio, H.; Liebl, U. Catalytic Mechanism and Structure of Viral Flavin-Dependent Thymidylate Synthase ThyX. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 24048–24057.

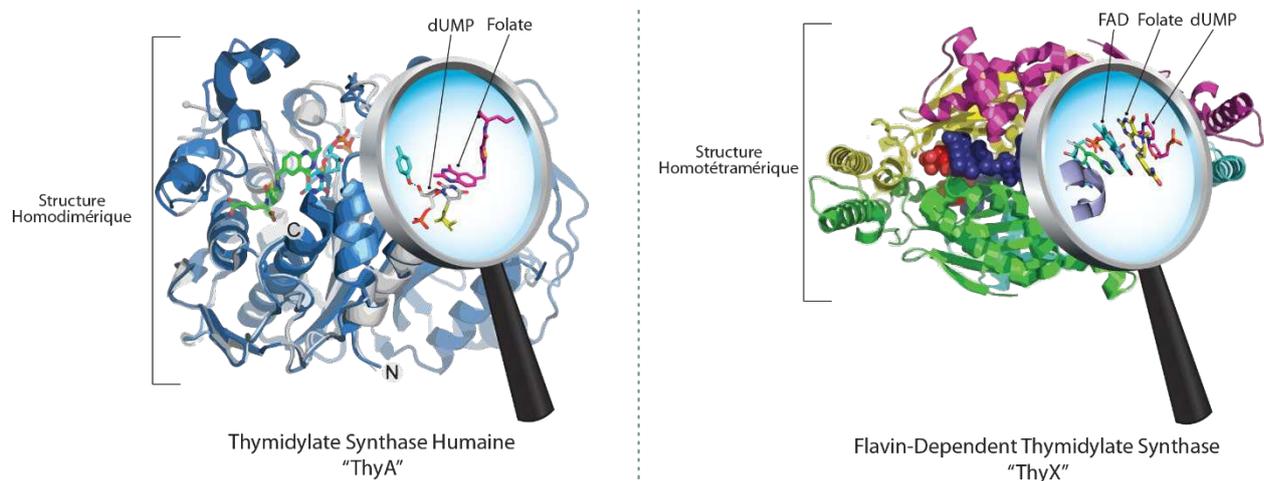


Schéma 10 : Comparaison des structures et des sites actifs des 2 enzymes

Les études cristallographiques du site actif de la FDTS ont démontré de fortes interactions de type π -stacking entre les différents cofacteurs donnant lieu au positionnement spécifique des différents substrats dans le site actif (Schéma 10) et aussi, donnant lieu à une forte flexibilité conformationnelle de ce dernier.³⁷

L'étude de Leduc *et al.* en 2004 a montré, en étudiant les acides aminés dans un rayon de 7 Å autour de l'azote N_5 du FAD, qu'un acide aminé de type Histidine (H53) est responsable de l'arrimage du FAD par π -stacking dans le site actif.^{37a)}

En 2012, l'équipe de Kohen montre à la fois que la réduction du FAD en $FADH_2$ est effectuée par le NADPH dans le site actif mais aussi, que le FAD par son noyau alloxazine et sa forte densité électronique réalise à son tour des interactions π - π avec le noyau tetrahydroptéridine du CH_2 -THF et le noyau pyrimidine de la dUMP.^{37b)}

Par conséquent, la littérature illustre le fait que cette enzyme diffère grandement de l'enzyme humaine et révèle cette dernière comme une cible biochimique intéressante dans le but de développer une nouvelle classe d'antibiotique sélectif.

3 Inhibition de la FDTS

Avec la littérature concernant le mécanisme de l'enzyme et les études cristallographiques du site actif, plusieurs stratégies d'inhibition ont été développées avec la synthèse de composés venant interférer dans 2 phases majeures du mécanisme enzymatique :

1 - Le transfert du méthylène sur la dUMP

2 - Le transfert d'hydrure sur le FAD

La particularité des potentiels inhibiteurs de la FDTS est qu'ils doivent nécessairement présenter une spécificité élevée pour cette dernière et une faible spécificité pour la thymidylate synthase humaine afin de minimiser la toxicité induite par ce type de composé.

³⁷ a) Leduc, D.; Graziani, S.; Lipowski, G.; Marchand, C.; Maréchal, P. L.; Liebl, U.; Myllykallio, H. Functional Evidence for Active Site Location of Tetrameric Thymidylate Synthase X at the Interphase of Three Monomers. *PNAS* **2004**, *101*, 7252–7257. b) Koehn, E. M.; Perissinotti, L. L.; Moghram, S.; Prabhakar, A.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Kohen, A. Folate Binding Site of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *PNAS* **2012**, *109*, 15722–15727.

Ainsi, plusieurs équipes se sont intéressés à développer des inhibiteurs sélectifs de la FDTS et la première publication dans ce sens date de 2008 où l'équipe de Herscovici publie une librairie de composés partageant un motif 2-phenylthiazolidine (Figure 9).³⁸

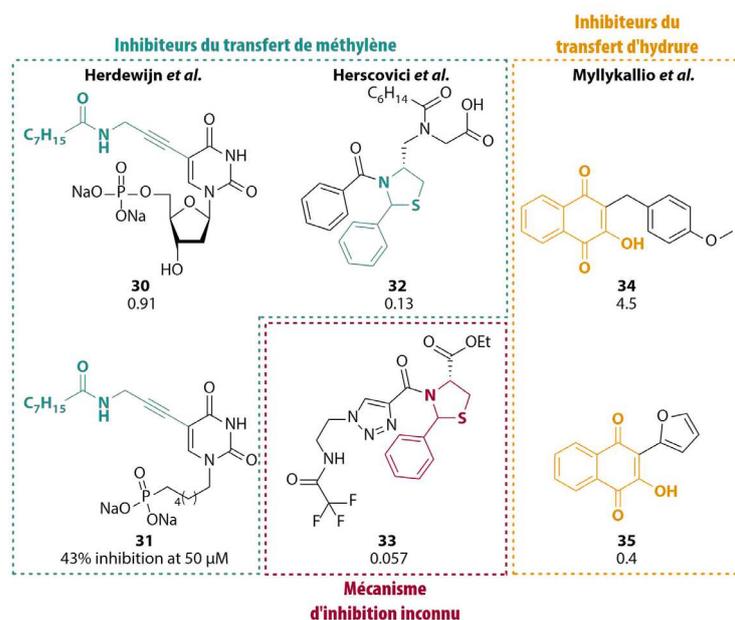


Figure 9 : Exemples d'inhibiteurs actifs sur la FDTS accompagnés de leur constante d'inhibition exprimée en μ M.

Dans cette publication, 2 composés **32** et **33** se révèlent actifs à des concentrations submicromolaires sur la FDTS et les auteurs prouvent que 2 types d'inhibition ont été observés pour ces 2 composés. Ainsi, **32** est un inhibiteur compétitif de la dUMP car l'augmentation de la concentration de la dUMP induit une forte réduction de l'inhibition enzymatique, ce qui n'est pas observé pour le second composé **33**.

En 2011, Lescrinier *et al.* publie une grande bibliothèque d'analogues de la dUMP fonctionnalisés en C_5 par de longues chaînes lipophiles.³⁹ Cette fonctionnalisation induit l'impossibilité du transfert de méthylène lors de la catalyse enzymatique car ces composés constituent aussi des inhibiteurs compétitifs de la dUMP. Le lead **30** a montré une activité sur la FDTS (IC_{50} : 0.91 μ M) mais surtout une sélectivité intéressante avec une IC_{50} sur la TSase humaine supérieure à 50 μ M. A partir de ces résultats préliminaires, une pharmacomodulation de ce lead a été effectuée et publiée dans la littérature.⁴⁰ La chaîne octynamide en C_5 a été conservée mais les modifications structurales explorées se sont portées sur la partie osidique par la synthèse de dérivées acycliques connues comme étant des mimes de ribose. Le composé **31** a montré une activité satisfaisante (43% d'inhibition à 50 μ M) mais réduite comparée au lead publié 2 ans auparavant.

³⁸ Esra Önen, F.; Boum, Y.; Jacquement, C.; Spanedda, M. V.; Jaber, N.; Scherman, D.; Myllykallio, H.; Herscovici, J. Design, Synthesis and Evaluation of Potent Thymidylate Synthase X Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 3628–3631.

³⁹ Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; *et al.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 2'-Deoxyuridine Monophosphate Analogues As Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in Mycobacterium Tuberculosis. *J Med Chem* **2011**, *54*, 4847–4862.

⁴⁰ Parchina, A.; Froeyen, M.; Margamuljana, L.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Briers, Y.; Lavigne, R.; Herdewijn, P.; Lescrinier, E. Discovery of an Acyclic Nucleoside Phosphonate That Inhibits Mycobacterium Tuberculosis ThyX Based on the Binding Mode of a 5-Alkynyl Substrate Analogue. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1373–1383.

Une approche différente a été entreprise par l'équipe de Myllykallio, avec la synthèse d'analogues de naphthoquinones qui, par π -stacking, interagissent avec le FAD et par leur potentiel oxydo-réducteur, captent les hydrures responsables de la réduction de ce dernier.⁴¹ Parmi les quinones testées sur la FDTs, la meilleure inhibition de la réduction du FAD fut obtenue avec le composé **34** et possédant une IC_{50} de 4.5 μ M. Suite à ces résultats préliminaires et dans le but de comprendre les interactions et le mode d'action de ce dernier, les auteurs ont alors réalisé le docking de **34** dans le site actif de plusieurs FDTs cristallisées et ont observé que ce composé occupait le site actif par une interaction forte avec le FAD et plus spécifiquement, occupait partiellement la poche de liaison de la dUMP. Comme précédemment, la pharmacomodulation de ce lead a été effectuée et publiée en 2015.⁴² La seule partie modifiée sur ce lead est le groupement p-méthoxybenzyl qui a été remplacé par divers hétéroaromatiques et, de cette étude, la plupart des composés synthétisés montrent des activités inhibitrices de la FDTs supérieures. Le composé le plus actif de la série **35** porte un noyau furane avec une IC_{50} de 0.4 μ M, l'inhibition est alors décuplée par rapport à **34**.

Enfin, des études de criblage à haut débit ont été effectuées sur la FDTs avec l'usage de méthodes *in silico*, tel que le docking sur les structures cristallines de l'enzyme disponibles de chimiothèques diverses.

Par cette méthode, Blundell *et al.* ont pu identifier plus de 2000 potentiels inhibiteurs dont 13 qui reproduisent les interactions avec les cofacteurs du site actif par π -stacking avec la dUMP et le FAD mais aussi par liaison hydrogène avec des résidus de type arginine. Parmi ces composés, la plupart ne présentaient aucune ou une légère inhibition et seulement un composé disposant d'un squelette de type 1H-imidazo[4,5-d]pyridazine a montré une inhibition de 29% de Mtb-ThyX à 100 μ M.⁴³ Récemment, Herdewijn *et al.* a publié une étude de criblage à haut débit en mesurant l'inhibition d'une chimiothèque de plus de 40000 composés par un dosage spectrophotométrique en retour basé sur l'oxydation du NADPH en NADP⁺ catalysé par Mtb-ThyX. Cette méthode expérimentale très efficace a permis de mettre en évidence 7 composés possédant de faibles IC_{50} et une sélectivité envers la FDTs. Le lead issu de cette publication possède un squelette de type 1,4-benzoxazine qui lui permet une forte affinité avec le site actif se traduisant expérimentalement par une faible IC_{50} de 710 ± 20 nM.⁴⁴

4 Propriétés physico-chimiques du FAD

Sur la base des mécanismes proposés et afin d'acquérir une forte sélectivité pour la FDTs, il est crucial de s'intéresser au rôle central du FAD dans la fonction de cette enzyme. Ce cofacteur issu de la riboflavine (Vitamine B2, **36**) se constitue d'un noyau diméthylisoalloxazine **37** ou l'azote N_{10} de ce dernier est substitué d'une chaîne ribityle. Les formes biologiquement actives sont dérivées de la vitamine B2 par :

⁴¹ Basta, T.; Boum, Y.; Briffotiaux, J.; Becker, H. F.; Lamarre-Jouenne, I.; Lambry, J.-C.; Skouloubris, S.; Liebl, U.; Graille, M.; Tilbeurgh, H. van; *et al.* Mechanistic and Structural Basis for Inhibition of Thymidylate Synthase ThyX. *Open Biol* **2012**, *2*, 120.

⁴² Skouloubris, S.; Djaout, K.; Lamarre, I.; Lambry, J.-C.; Anger, K.; Briffotiaux, J.; Liebl, U.; de Reuse, H.; Myllykallio, H. Targeting of Helicobacter Pylori Thymidylate Synthase ThyX by Non-Mitotoxic Hydroxy-Naphthoquinones. *Open Biol* **2015**, *5*.

⁴³ Luciani, R.; Saxena, P.; Surade, S.; Santucci, M.; Venturelli, A.; Borsari, C.; Marverti, G.; Ponterini, G.; Ferrari, S.; Blundell, T. L.; *et al.* Virtual Screening and X-Ray Crystallography Identify Non-Substrate Analog Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Med Chem* **2016**, *59*, 9269–9275.

⁴⁴ Abu El Asrar, R.; Margamuljana, L.; Klaassen, H.; Nijs, M.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Myllykallio, H.; Becker, H. F.; De Jonghe, S.; Herdewijn, P.; *et al.* Discovery of a New Mycobacterium Tuberculosis Thymidylate Synthase X Inhibitor with a Unique Inhibition Profile. *Biochem Pharmacol* **2017**, *135*, 69–78.

1 - L'action de la riboflavine kinase qui réalise la phosphorylation de la position 5' du ribityle fournissant la flavine mononucléotide (FMN, **38**).

2 - L'action de la FAD synthase qui permet le couplage de la FMN avec l'adénine monophosphate (AMP) par la formation du groupement pyrophosphate du FAD (**27**) (Figure 10).

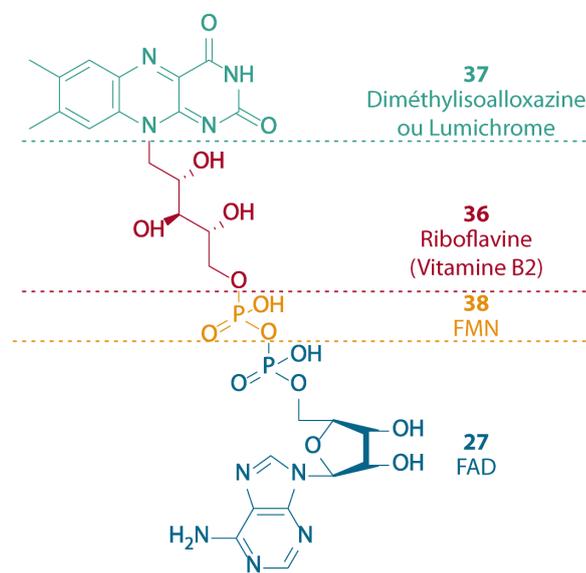


Figure 10 : Structures de la Riboflavine, FMN et FAD

De par le rôle ubiquitaire des flavoprotéines dans les espèces vivantes à la fois procaryotes⁴⁵ et eucaryotes,⁴⁶ les propriétés physico-chimiques de ces composés ont été largement étudiées. En effet, les propriétés chromophoriques de **38** et **27** proviennent du noyau diméthylisoalloxazine **37**, partagé par ces deux cofacteurs.⁴⁷

➤ Absorption dans l'ultraviolet et le visible

Ce dernier, aussi appelé flavine, porte son nom de par sa couleur jaune se traduisant par le mot flavus en latin. Ainsi, cette couleur jaune caractéristique provient de la bande d'absorption avec la plus basse énergie de ce même noyau chromophore flavine sous forme oxydée et à 445 nm (courbe bleu turquoise, Figure 11). Cette courbe montre la présence de cette bande à 445 nm, qui correspond au transfert d'électrons entre le noyau xylène enrichi et le noyau pyrimidine appauvri, mais aussi, la présence de 3 autres bandes d'absorption qui correspondent à des transitions électroniques différentes (220, 262 et 391 nm) de la forme oxydée du FAD à pH physiologique. Ainsi, l'absorption de lumière de ce noyau est interdépendante à la fois, des transitions électroniques intramoléculaires mais aussi, de manière plus fondamentale, des différents états d'ionisation de ce système. La forme oxydée possède trois états d'ionisation, dont 2 chimiquement impossibles à pH physiologique correspondant à la déprotonation de l'azote N_3 ($pK_{a,ox} \approx 10.2$) et à la protonation de l'azote N_1 ($pK_{a,ox} < 0$) (Figure 12).

⁴⁵ Gudipati, V.; Koch, K.; Lienhart, W.-D.; Macheroux, P. The Flavoproteome of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 535–544.

⁴⁶ Lienhart, W.-D.; Gudipati, V.; Macheroux, P. The Human Flavoproteome. *Arch Biochem Biophys* **2013**, *535*, 150–162.

⁴⁷ Sun, M.; Moore, T. A.; Song, P.-S. Molecular Luminescence Studies of Flavines. I. Excited States of Flavines. *J Am Chem Soc* **1972**, *94*, 1730–1740.

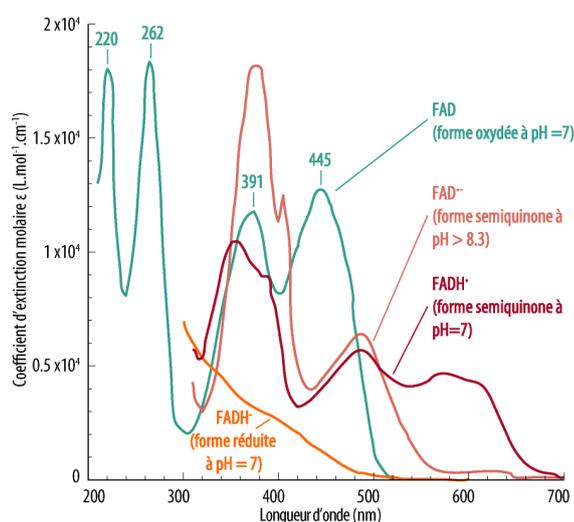


Figure 11 : Spectre d'absorption du noyau flavine dans différents états d'oxydo-réduction et sous plusieurs formes ioniques.^{48,49}

De plus, l'addition concomitante d'un électron et d'un proton sur l'azote N_{10} résulte en la forme radicalaire semiquinone $\text{FAD}\cdot$ **39** du système diméthylisalloxazine avec un potentiel d'oxydo-réduction E_2 de -231 mV et à pH physiologique.

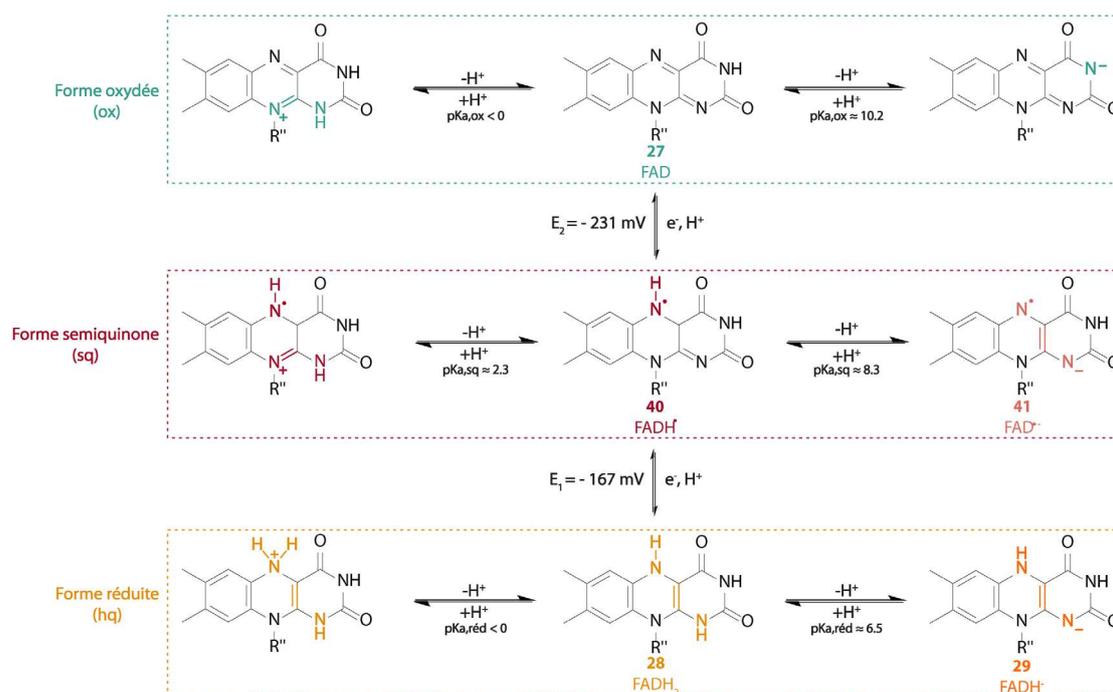


Figure 12 : Etats d'ionisation et couples d'oxydo-réduction du système diméthylisalloxazine.⁴⁹

Cette dernière est caractérisée par 2 transitions électroniques majeures à 615 et 580 nm ayant pour conséquence la couleur bleue sous la forme neutre **40**. Les états d'ionisation sont comme précédemment non observables à pH physiologique et résultent de la déprotonation de l'azote N_1 ,

⁴⁸ a) Land, E. J.; Swallow, A. J. One-Electron Reactions in Biochemical Systems as Studied by Pulse Radiolysis. II. Riboflavine. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2117–2125. b) Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH Dependence of the Absorption and Emission Behaviour of Riboflavin in Aqueous Solution. *Chem Phys* **2002**, *282*, 429–439. c) Brazard, J.; Usman, A.; Lacomat, F.; Ley, C.; Martin, M. M.; Plaza, P. New Insights into the Ultrafast Photophysics of Oxidized and Reduced FAD in Solution. *J Phys Chem A* **2011**, *115*, 3251–3262.

⁴⁹ Ghisla, S.; Edmondson, D. E. Flavin Coenzymes. In *eLS*; John Wiley & Sons Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014.

($pK_{a,sq} \approx 8.3$) ou de la protonation de ce même azote ($pK_{a,sq} \approx 2.3$). Cependant, la forme anionique FAD^- **41** possède des propriétés spectroscopiques différentes de la forme protonée même si ces deux dernières sont caractérisées par une bande d'absorption de plus haute énergie à 500 nm (courbe safran, Figure 11) et ainsi, par leur couleur rouge.

Le second couple d'oxydo-réduction du FAD, correspondant au passage de **40** au $FADH_2$ **28** avec un potentiel E_1 de -167 mV, résulte en la formation de la forme réduite du FAD par l'addition d'un second proton et d'un électron. En ce qui concerne les états d'ionisation de cette forme, seule la forme $FADH^-$ **29** est physiologiquement possible avec la déprotonation de l'azote N_1 ($pK_{a,réd} \approx 6.5$). À la vue de son spectre d'absorption (courbe orange, Figure 11), l'espèce anionique **29** ne possède pas de transitions électroniques conséquentes qui se traduiraient par des maxima d'absorptions significatifs dans le visible ou dans le proche UV. Ainsi, **29** est intrinsèquement incolore mais montre une forte couleur rouge à des concentrations élevées provenant de la bande large de faible intensité qui s'étend au-delà de 500 nm.

➤ Fluorescence

Comme précédemment, les propriétés fluorescentes du FAD et de ses dérivés sont la conséquence du noyau isoalloxazine et ainsi, ces derniers partagent de fortes similarités quant à la longueur d'onde d'excitation et d'émission mais aussi quant à leurs rendements quantiques.⁵⁰ La forme oxydée du FAD et de ses dérivés montrent un maximum d'absorption à une longueur d'onde d'émission de 520 nm ce qui correspond à une lumière fluorescente jaune-verte (Figure 13).

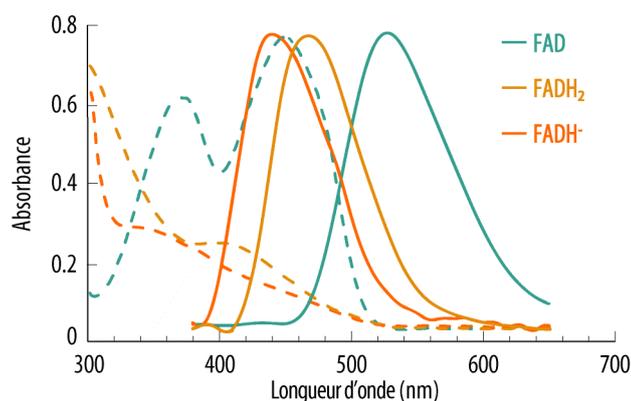


Figure 13 : Spectre d'excitation (pointillé) & d'émission (continu) du FAD et des formes réduites $FADH_2$ & $FADH^-$.⁵¹

Pour les différentes formes du FAD en solution aqueuse, l'influence du pH sur la fluorescence de ces dernières a fait l'objet d'étude où les auteurs montrent que la forme anionique FAD^- est seulement faiblement fluorescente à cause de sa faible absorption dans le visible ($\Phi_F \approx 1.2 \times 10^{-3}$) et la forme cationique $FADH^+$ ne possède concrètement pas d'émission de lumière en réponse à une excitation ($\Phi_F < 5 \times 10^{-5}$). De plus, la forme neutre **27** a montré une extinction de fluorescence à faible pH par la protonation de l'azote N_1 à l'état excité⁵² (Figure 13). En résumé, le caractère fluorescent du FAD est

⁵⁰ Barrio, J. R.; Tolman, G. L.; Leonard, N. J.; Spencer, R. D.; Weber, G. Flavin 1, N6-Ethenoadenine Dinucleotide: Dynamic and Static Quenching of Fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 941–943.

⁵¹ a) Kao, Y.-T.; Saxena, C.; He, T.-F.; Guo, L.; Wang, L.; Sancar, A.; Zhong, D. Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13132–13139. b) Zhao, R.-K.; Lukacs, A.; Haigney, A.; Brust, R.; Greetham, G. M.; Towrie, M.; Tonge, P. J.; Meech, S. R. Ultrafast Transient Mid IR to Visible Spectroscopy of Fully Reduced Flavins. *Chem Phys* **2011**, *13*, 17642–17648.

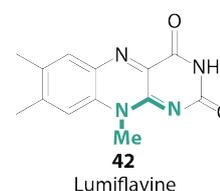
⁵² Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH Dependence of the Absorption and Emission Behaviour of Riboflavin in Aqueous Solution. *Chem Phys* **2002**, *282*, 429–439.

fortement dépendant du pH et en conséquence, un maximum d'émission de fluorescence a été observé à un pH d'environ 2.7.⁵³

Les mesures de rendements quantiques au maximum d'émission de 545 nm pour le FAD et les espèces dérivées de ce dernier, montrent une différence fondamentale d'efficacité d'émission de ces fluorophores en solution aqueuse. Ainsi, la lumiflavine **42**, riboflavine et la FMN, en raison de leurs fortes ressemblances structurales, détiennent des rendements quantiques analogues avec $\Phi_F \approx 0.25-0.30$ tandis que la littérature décrit une baisse du rendement quantique pour le FAD avec $\Phi_F = 0.03$ (Tableau 2).⁵⁴

Tableau 2 : Rendement quantique de la vitamine B2 et de dérivées.^{49,55}

Rendement quantique (Φ_F) mesuré avec une longueur d'onde d'émission de 545 nm				
Solvant à 25°C	Lumiflavine 42	Riboflavine 36	FMN 38	FAD 27
H ₂ O	0.29	0.26	0.25	0.03
Ethanol	0.45	0.32	0.27	0.20
Dioxane	0.64	0.41	X	X



La perte de rendement quantique du FAD en solution aqueuse a été attribuée à la formation d'un complexe intramoléculaire énergétiquement favorisé résultant d'interactions de type π -stacking entre le noyau lumichrome et l'adénine. Cet empilement coplanaire des orbitales de ces deux noyaux hétéroaromatiques résulte ainsi, en un phénomène de transfert d'électrons photo-induit qui provoque alors une stabilisation de l'état fondamental et donc une extinction de fluorescence.⁵⁶ De ce constat, deux conformations en équilibre et en solution aqueuse (pH = 7.5) ont été observées pour le FAD :⁵⁰

1 - Forme ouverte qui est majoritairement responsable de la fluorescence du FAD où l'adénine et le FAD sont séparés par le ribityle sous forme de chaîne linéaire – durée de vie de la fluorescence : 2.3 nanosecondes.^{56a)}

2 - Forme empilée qui est essentiellement non fluorescente où les interactions de type π -stacking rapprochent les deux noyaux hétéroaromatiques – durée de vie de la fluorescence : 0.3 nanosecondes.^{56a)}

⁵³ Cerletti, P.; Siliprandi, N. Pure Crystalline Flavine Adenine Dinucleotide. *Arch Biochem Biophys* **1958**, *76*, 214–224.

⁵⁴ Van Den Berg, P. A. W.; Widengren, J.; Hink, M. A.; Rigler, R.; Visser, A. J. W. G. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Flavins and Flavoenzymes: Photochemical and Photophysical Aspects. *Spectrochim Acta A* **2001**, *57*, 2135–2144.

⁵⁵ a) Weber, G. Fluorescence of Riboflavin and Flavin-Adenine Dinucleotide. *Biochem J* **1950**, *47*, 114–121. b) Bowd, A., Byrom, P., Hudson, J. B. and Turnbull, J. H. Excited States of Flavin Coenzymes - III. Fluorescence and Phosphorescence Emissions. *Photochem Photobiol* **1968**, *8*, 1–10.

⁵⁶ a) Visser, A. J. W. G. Kinetics of Stacking Interactions in Flavin Adenine Dinucleotide from Time-Resolved Flavin Fluorescence. *Photochem Photobiol* **1984**, *40*, 703–706. b) Van Den Berg, P. A. W.; Feenstra, K. A.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C.; Visser, A. J. W. G. Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics. *J Phys Chem B* **2002**, *106*, 8858–8869. c) Nakabayashi, T.; Islam, M. S.; Ohta, N. Fluorescence Decay Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide in a Mixture of Alcohol and Water in the Femtosecond and Nanosecond Time Range. *J Phys Chem B* **2010**, *114*, 15254–15260.

L'extinction de fluorescence du FAD a aussi été mentionnée dans la littérature par l'addition de différents substrats aromatiques riches en électrons π tel que l'indole, le tryptophane ou encore à l'intérieur du site actif de protéines ce qui explique la faible fluorescence liée aux flavoprotéines, fournissant des indices capitaux sur le positionnement et la réactivité du FAD.⁵⁷

➤ Propriétés d'oxydo-réduction

Du fait des transitions entre les différentes espèces redox et entre les différents états d'ionisation, le flavoprotéome intervient dans une grande variété de transformations d'oxydo-réductions. Cette spécificité biochimique fondamentale est issue de la capacité que possède le noyau diméthylisoalloxazine à former des complexes de transfert de charge avec un accepteur, ce qui lui confère une versatilité en termes de variété de substrat et de type de réactions catalysées. De ce fait, la forme réduite du FAD agit comme un donneur d'un ou de deux électrons, sous la forme d'atomes d'hydrogène ou d'ions hydrure, vers un accepteur appauvri en électrons. A l'inverse, la forme oxydée du FAD agit, quant à elle, comme un accepteur d'un ou de deux électrons de la part d'un donneur aromatique enrichi. Ces transferts électroniques et le passage inhérent entre les différentes espèces des couples d'oxydo-réductions (ox vers sq vers hq) sont régis par les potentiels d'oxydo-réduction du FAD exprimés en mV (Figure 12) responsables du rôle central de ce dernier dans le mécanisme de la FDS. Enfin, ces complexes sont souvent observés comme intermédiaires de réaction de par leurs émissions électromagnétiques lors des transitions et des absorptions électroniques et ainsi, fournissent des informations mécanistiques sur le rôle et les interactions du FAD avec les substrats et/ou les produits.

⁵⁷ a) Karen, A.; Ikeda, N.; Mataga, N.; Tanaka, F. Picosecond Laser Photolysis Studies of Fluorescence Quenching Mechanisms of Flavin: A Direct Observation of Indole-Flavin Singlet Charge Transfer State Formation in Solutions and Flavoenzymes. *Photochem Photobiol* **1983**, *37*, 495–502. b) Mataga, N.; Chosrowjan, H.; Shibata, Y.; Tanaka, F. Ultrafast Fluorescence Quenching Dynamics of Flavin Chromophores in Protein Nanospace. *J Phys Chem B* **1998**, *102*, 7081–7084.

V. Objectifs de la thèse et plan de travail suivi

Dans ce contexte global d'apparition de BMRs, l'implication de la FDTS, par l'équipe de Myllykallio en 2002 comme nouveau processus biochimique pour la biosynthèse de novo de la dTMP et ainsi comme une nouvelle cible antibactérienne, a permis d'entreprendre la synthèse de nouveaux antimicrobiens sélectifs, ciblant un large groupe de pathogènes et ne montrant pas ou peu de toxicité pour l'Homme. Compte tenu du faible nombre d'inhibiteurs à la fois efficaces et affins pour cette enzyme, notre laboratoire s'est entrepris à inhiber ce processus essentiel à la survie de ces pathogènes. Ainsi, sur la base de données précédemment publiées qui montrent un mécanisme chimique sans précédent et une grande cavité au niveau du site actif avec de forts mouvements conformationnels, la synthèse de trois séries d'inhibiteurs potentiels a été entreprise en collaboration avec les équipes partenaires du projet (Schéma 11) :

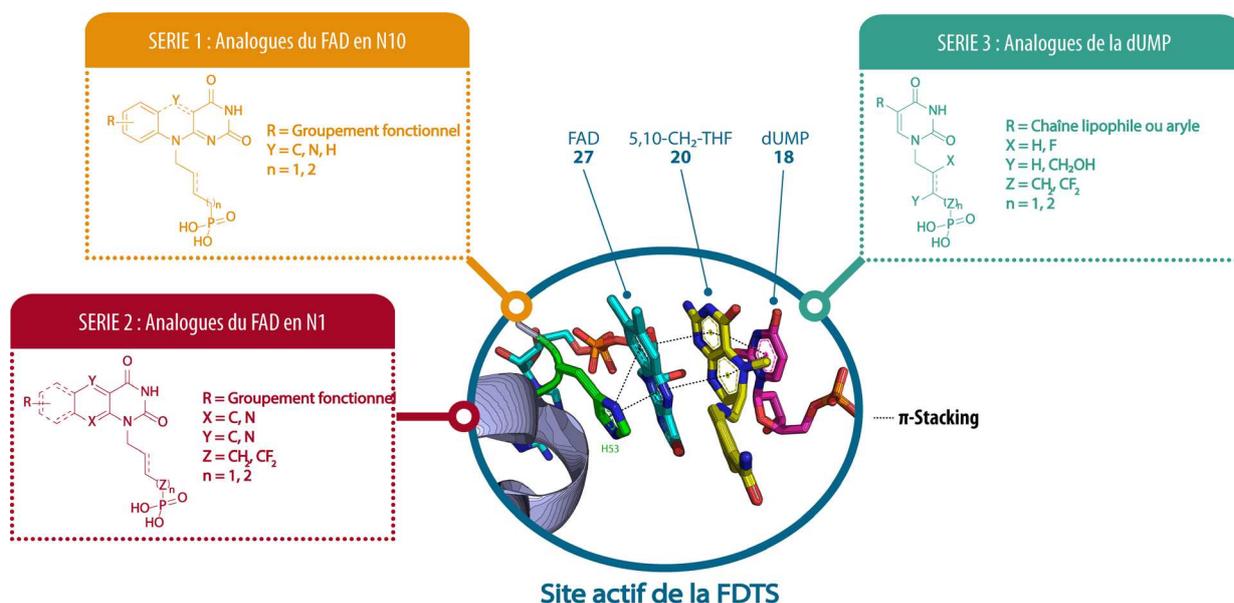


Schéma 11 : Différentes familles d'inhibiteurs potentiels ciblés.

1 Série 1 : Analogues du FAD en N₁₀

La littérature récente sur le mécanisme de la FDTS se rejoint à propos du rôle central du FAD comme donneur d'hydrure mais aussi comme donneur de méthylène dans cette catalyse enzymatique. Ainsi, de récentes études de cristallographie aux rayons X de la FDTS ont permis de déterminer les interactions entre ce cofacteur et le site actif de l'enzyme de *Mycobacterium Tuberculosis* dans le but d'étudier les

mouvements conformationnels et le mécanisme de cette dernière et afin d'en déduire des structures d'inhibiteurs originales et affines (Figure 14).

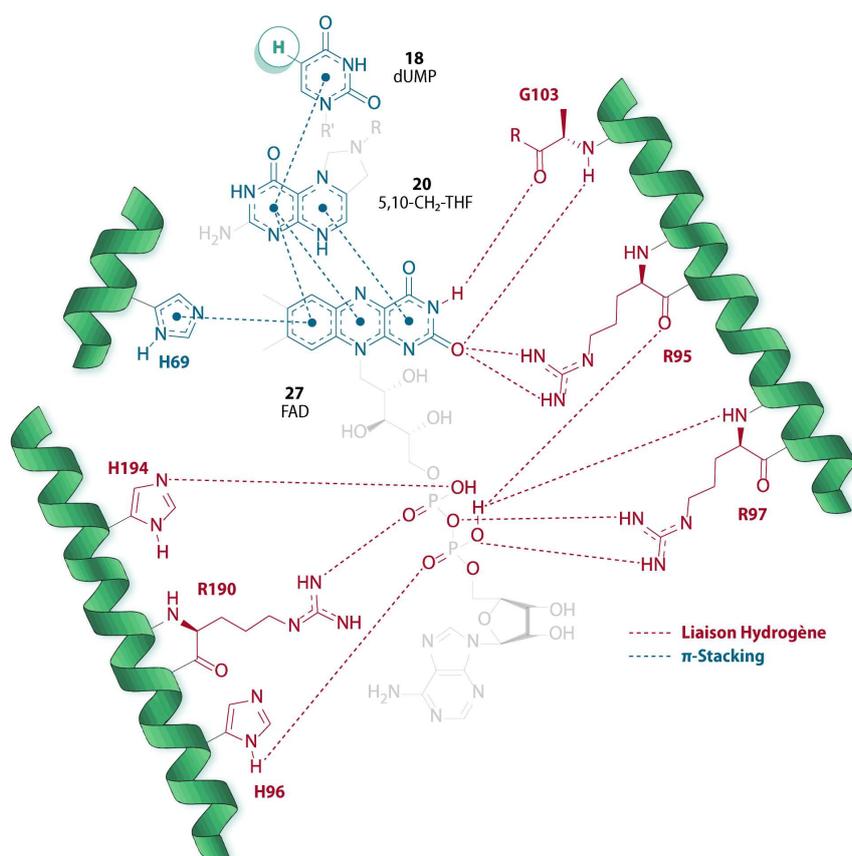


Figure 14 : Interactions du FAD co-cristallisé dans le site actif de la FDTS de Mycobacterium Tuberculosis (PDB : 3HZG).⁵⁸

Comme précédemment, la forte densité électronique du noyau Lumichrome de **27** induit des interactions de type π -stacking avec les autres cofacteurs et **18** mais aussi avec des résidus de type Histidine. De plus, le noyau pyrimidine de ce dernier semble essentiel à la reconnaissance dans le site actif par la formation de liaison hydrogène entre le N₃H et l'amide, mais aussi avec l'oxygène O₂ et l'amine d'une glycine proche et la fonction guanidine de l'arginine R95. Enfin, le groupement pyrophosphate du FAD semble être un point d'ancrage capital avec de multiples liaisons hydrogène avec des résidus du site actif (Figure 14).

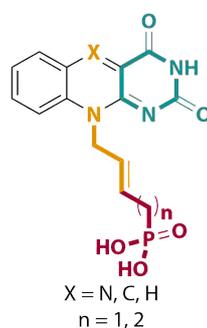


Figure 15 : Structures cibles de la série 1.

⁵⁸ Baugh, L.; Phan, I.; Begley, D. W.; Clifton, M. C.; Armour, B.; Dranow, D. M.; Taylor, B. M.; Muruthi, M. M.; Abendroth, J.; Fairman, J. W.; et al. Increasing the Structural Coverage of Tuberculosis Drug Targets. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 142–148.

Avec ces données, cette première série de nouveaux analogues de la FMN, avec comme tricycle aromatique soit un noyau isoalloxazine ($X = N$, Flavine, Figure 15), un noyau pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4-dione ($X = C$, 5-Déazaflavine, Figure 15) ou une forme ouverte du type 6-anilinouracile ($X = H$, Figure 15), substitués sur l'azote central N_{10} par une chaîne acyclique saturée ou insaturée à 4 ou 5 chaînons et possédant, comme précédemment, un motif acide phosphonique essentiel à la reconnaissance dans le site actif (Figure 15).

2 Série 2 : Analogues du FAD en N_7

Contrairement à la série 1, la seconde famille se concentre sur la substitution sur l'azote N_7 de nouveaux analogues de la FMN dans le but d'empêcher la force motrice du mécanisme enzymatique de la FDTS c'est-à-dire à la réduction du FAD par l'addition d'hydrure provenant du NADPH sur l'azote N_7 (étape 1, Figure 7) mais aussi le transfert d'hydrure vers la dUMP (étape 7, Figure 7). La substitution en N_7 de ces analogues du FAD a pour but l'altération du potentiel d'oxydo-réduction, propriété physico-chimique capitale dans la catalyse des flavoprotéines, et ainsi l'inhibition de ces étapes du mécanisme ce qui provoquerait la suspension totale de la cascade réactionnelle consécutive.

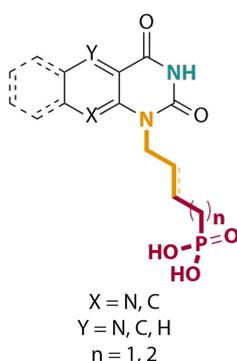


Figure 16 : Structures cibles de la série 2.

Dans le but de conserver les mêmes interactions que la première série d'inhibiteurs, cette famille comportera des bicycles, tricycles hétéroaromatiques ou une forme ouverte de type 6-anilinouracile, où la modulation de la position des azotes sera étudiée dans le but d'en déduire une relation structure-activité, accompagné d'un motif acide phosphonique ou d'un motif acide difluorométhylphosphonique séparé par des chaînes latérales acycliques saturées ou insaturées de 4 à 5 chaînons (Figure 16).

3 Série 3 : Analogues de la dUMP

Une des étapes majeures du mécanisme est le transfert du groupement méthylène sur le C_5 de la dUMP qui, dans la littérature, est une étape intéressante à perturber afin de provoquer l'inhibition de la TS Classique. En effet, la substitution en C_5 de l'hydrogène de la dUMP par un bioisostère connu, le fluor⁵⁹, montre une forte inhibition à la fois de cette enzyme mais aussi de la FDTS, par la stabilisation du pont méthylène empêchant l'élimination d'Hoffman consécutive (étape 5, Figure 2 pour la TSase et étape 5, Figure 8 pour la FDTS).^{26,27}

⁵⁹ Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem Rev* **1996**, 96, 3147–3176.



R = Chaîne propargylique lipophile
ou aryle
X = H, F
Y = H, CH₂OH
Z = CH₂, CF₂
n = 1, 2

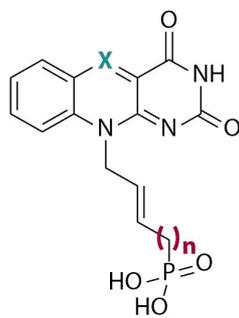
Figure 17 : Structures cibles de la série 3.

Dans cette optique, cette série constitue des analogues de la dUMP fonctionnalisés en C₅, par de longues chaînes lipophiles de type propargyliques ou par des aryles, sous forme acyclonucléosides phosphonates (ANPs) avec des chaînes latérales acycliques saturées ou insaturées de 4 à 5 chainons portant un motif acide phosphonique ou un motif acide difluorométhylphosphonique (Figure 17). Une partie de ces travaux a été développée par le Dr. Romain Laporte en collaboration avec l'équipe du Pr. Thierry Lequeux et du Dr. Emmanuel Pfund, MCU au Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-organique (LCMT) à Caen.⁶⁰

⁶⁰ Thèse du Dr. Romain Laporte, soutenue en Octobre 2016

PARTIE B :

SYNTHÈSE D'ANALOGUES DU FAD EN N_{10}



$X = N, C, H$
 $n = 1, 2$

I. Etat de l'art et potentiel antibactérien des analogues du FAD

Même si le flavoprotéome présente une certaine abondance de cibles enzymatiques et ainsi, un intérêt indéniable, les analogues du FAD, qu'ils soient naturels ou synthétiques, restent des structures antimétaboliques peu exploitées dans la conception de nouvelles chimiothérapies antibactériennes étant donné la difficulté synthétique et la faible sélectivité envers une cible enzymatique unique. A l'exception de la roséoflavine (RoF, **43**, Figure 18), qui constitue un analogue naturel de la riboflavine produit par *Streptomyces davawensis*.⁶¹ Ce dernier ainsi que ces précurseurs sont structurellement similaires (8-déméthyl-8-amino-riboflavine, AF, **44**; 8-déméthyl-8-méthylamino-riboflavine, MAF, **45**, Figure 18) mais diffèrent cependant par le degré de méthylation du groupement amine en position 8. Aussi, ces antimétabolites ont montré des activités antimicrobiennes intéressantes sur des bactéries Gram positive tel que *Bacillus subtilis* (MIC = 1.56 µg.mL⁻¹), *Staphylococcus aureus* (MIC = 0.25 µg.mL⁻¹), *Bacillus cereus* et *Micrococcus luteus*.⁶²

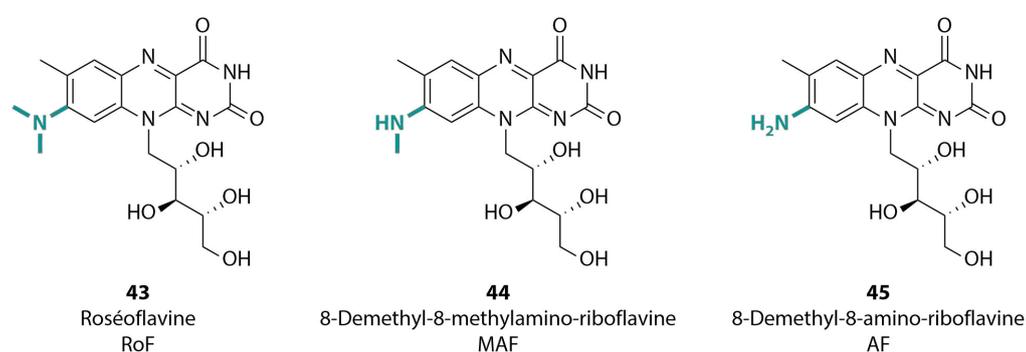


Figure 18 : Analogues naturels de la Riboflavine ayant une activité antibiotique

En tant qu'analogues de la vitamine B₂, ces composés ont de multiples cibles dans le métabolisme bactérien ce qui engendre une plus faible susceptibilité de ces derniers au développement de résistances bactériennes.⁶³ Fort de ce constat, la vitamine B₂ a été testée in vitro et a montré naturellement un effet bactéricide en combinaison avec un rayonnement ultraviolet A chez plusieurs pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus* et sa souche résistante à la méthicilline, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Enterococcus faecalis*.⁶⁴ En conséquence, la riboflavine constitue une preuve de concept en vue de différentes modifications chimiques pour la synthèse de nouveaux antimicrobiens.

⁶¹ Otani, S.; Takatsu, M.; Nakano, M.; Kasai, S.; Miura, R.; Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **1974**, *27*, 88–89.

⁶² a) Kasai, S.; Kubo, Y.; Yamanaka, S.; Anti-riboflavin activity of 8N-alkyl analogues of roseoflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1978**, *24*, 339–350. b) Kasai, S.; Yamanaka, S.; Wang, S.C.; Matsui, K.; Anti-riboflavin activity of 8-O-alkyl derivatives of riboflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1979**, *25*, 289–298.

⁶³ Pedrolli, D. B.; Jankowitsch, F.; Schwarz, J.; Langer, S.; Nakanishi, S.; Mack, E. F. and M. Riboflavin Analogs as Antiinfectives: Occurrence, Mode of Action, Metabolism and Resistance. *Curr Pharm Des* **2013**, *19*, 2552–2560.

⁶⁴ a) Schrier, A.; Greebel, G.; Attia, H.; Trokel, S.; Smith, E. F. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Riboflavin and Ultraviolet Light on *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Refract Surg* **2009**, *25*, S799–802. b) Makdoui, K.; Bäckman, A.; Mortensen, J.; Crafoord, S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Photo-Activated Riboflavin Using Ultraviolet Light (UVA). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2010**, *248*, 207–212. c) Ahgilan, A.; Sabaratnam, V.; Periasamy, V. Antimicrobial Properties of Vitamin B₂. *Int J Food Prop* **2016**, *19*, 1173–1181.

Une grande variété d'analogues de cette dernière a été synthétisée pour diverses applications dont l'étude de mécanismes enzymatiques en raison de l'abondance biochimique des flavoprotéines,⁶⁵ mais aussi pour leurs propriétés d'oxydo-réduction en tant que biocatalyseurs d'oxydation;⁶⁶ certains de ces composés ont montré des activités antibactériennes intéressantes (Schéma 12).

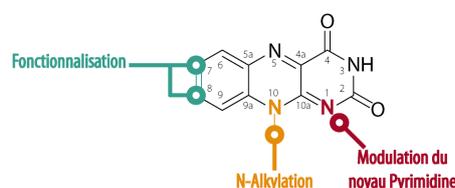


Schéma 12 : Modifications chimiques apportées à la Riboflavine dans la littérature

En réalisant un parallèle avec la roséoflavine, l'équipe de Matusi s'est d'abord intéressée à différentes alkylations du groupement amine en position 8 de **43** (*N*-éthyl, *N*-méthyléthyle et *N*-diéthyle) et a montré que ces composés provoquaient une inhibition de la croissance de plusieurs bactéries Gram positif.⁶⁷ Une autre publication de cette même équipe mentionne aussi une activité anti-riboflavine de ces mêmes dérivés, mais cette fois, 8-*O*-alkylés chez ces mêmes bactéries Gram positif.⁶⁸

Plus récemment dans deux brevets, une équipe de BioRelix, Inc a modulé 3 positions sur le noyau isoalloxazine, décrit dans le Schéma 12, par des fonctionnalisations en C₇ et/ou C₈ de type alcane, une modulation de la chaîne portée par l'azote centrale N₁₀ qui comporte soit une chaîne alcane ramifiée avec un aromatique au bout de cette dernière ou une chaîne latérale acyclique comportant un pont éther et enfin, une modulation du noyau pyrimidine par la présence ou non de l'azote N₁ de ces dérivés. Les tests d'inhibition de ces composés ont montrés une MIC inférieure ou égale à 2 µg.mL⁻¹ et un ratio MIC:CC₅₀ de 1:20 minimum pour tous ces derniers.⁶⁹

⁶⁵ a) Light, D. R.; Walsh, C. Flavin Analogs as Mechanistic Probes of Adrenodoxin Reductase-Dependent Electron Transfer to the Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P-450 of the Adrenal Cortex. *J Biol Chem* **1980**, *255*, 4264–4277. b) Zanetti, G.; Massey, V.; Curti, B. FAD Analogues as Mechanistic and "binding-Domain" Probes of Spinach Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. *Eur J Biochem* **1983**, *132*, 201–205. c) Ghisla, S.; Massey, V. New Flavins for Old: Artificial Flavins as Active Site Probes of Flavoproteins. *Biochem J* **1986**, *239*, 1–12. d) Murthy, Y. V. S. N.; Massey, V. [41] Syntheses and Applications of Flavin Analogs as Active Site Probes for Flavoproteins. In *Methods Enzymol; Vitamins and Coenzymes Part J*; Academic Press, **1997**, *280*, 436–460.

⁶⁶ a) Hasford, J. J.; Rizzo, C. J. Linear Free Energy Substituent Effect on Flavin Redox Chemistry. *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 2251–2255. b) Cibulka, R. Artificial Flavin Systems for Chemoselective and Stereoselective Oxidations. *Eur J Org Chem* **2015**, 915–932. c) Kormányos, A.; Hossain, M. S.; Ghadimkhani, G.; Johnson, J. J.; Janáky, C.; de Tacconi, N. R.; Foss, F. W.; Paz, Y.; Rajeshwar, K. Flavin Derivatives with Tailored Redox Properties: Synthesis, Characterization, and Electrochemical Behavior. *Chem Eur J* **2016**, *22*, 9209–9217.

⁶⁷ Kasai, S.; Kubo, Y.; Yamanaka, S.; Hirota, T.; Sato, H.; Tsuzukida, Y.; Matusi, K., S. Anti-riboflavin activity of 8*N*-alkyl analogues of roseoflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1978**, *24*, 339-350.

⁶⁸ Kasai, S.; Yamanaka, S.; Wang, S.C.; Matsui, K. Anti-riboflavin activity of 8-*O*-alkyl derivatives of riboflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1979**, *25*, 289-298.

⁶⁹ a) Coish, P.; Dixon, B.; Osterman, D.; Aristoff, P.; Navia, M.; Scivolino, F.; Avola, S.; Baboulas, N.; Belliotti, T.; Bello, A.; *et al.* Flavin Derivatives. WO2011126567 (A1), October 13, 2011. b) Coish, P. D. g; Aristoff, P. A.; Dixon, B. R. Flavin Derivatives. WO2012109458 (A1), August 16, 2012.

II. Synthèse convergente des analogues du FAD en N_{10}

1 Structures cibles

Les structures envisagées de ce premier chapitre possèdent la formule générale suivante :

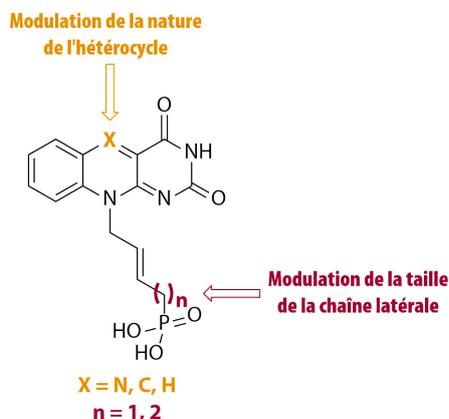


Figure 19 : Structures envisagées comme analogues du FAD en N_{10} .

Ces structures diffèrent par deux types de modifications, d'une part sur la nature de l'hétérocycle avec l'incorporation en position 5 d'un azote pour le noyau isoalloxazine, d'un CH pour le noyau pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(3H,10H)-dione et d'un hydrogène pour les formes ouvertes de type 6-anilinoouracile et d'autre part, par la longueur de la chaîne latérale (Figure 19).

2 Rétrosynthèse envisagée

Sur la base de l'état de l'art concernant les analogues du FAD qui a permis de déduire un potentiel synthétique original et non exploité en matière de nouveaux antimicrobiens, l'objectif est maintenant de concevoir une voie de synthèse efficace permettant l'accès aux structures ciblées. Pour ce faire, il est important de mettre en œuvre des outils synthétiques adaptés qui, à partir d'un même intermédiaire clé, donnent lieu à ces dernières de manière convergente. Ainsi, dans le but d'accéder aux structures visées, la littérature montre qu'à partir d'un intermédiaire commun de type 6-anilinoouracile alkylé sur l'azote central par une chaîne ribityle *per*-acétylée **46**, il est possible d'accéder aux tricycles hétéroaromatiques avec un noyau isoalloxazine **47** ou pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(3H,10H)-dione **48** par 2 cyclisations distinctes (Figure 20).⁷⁰

⁷⁰ a) Yoneda, F.; Sakuma, Y.; Ichiba, M.; Shinomura, K. Syntheses of Isoalloxazines and Isoalloxazine 5-Oxides. A New Synthesis of Riboflavin. *J Am Chem Soc* **1976**, *98*, 830–835. b) Carlson, E. E.; Kiessling, L. L. Improved Chemical Syntheses of 1- and 5-Deazariboflavin. *J Org Chem* **2004**, *69*, 2614–2617.

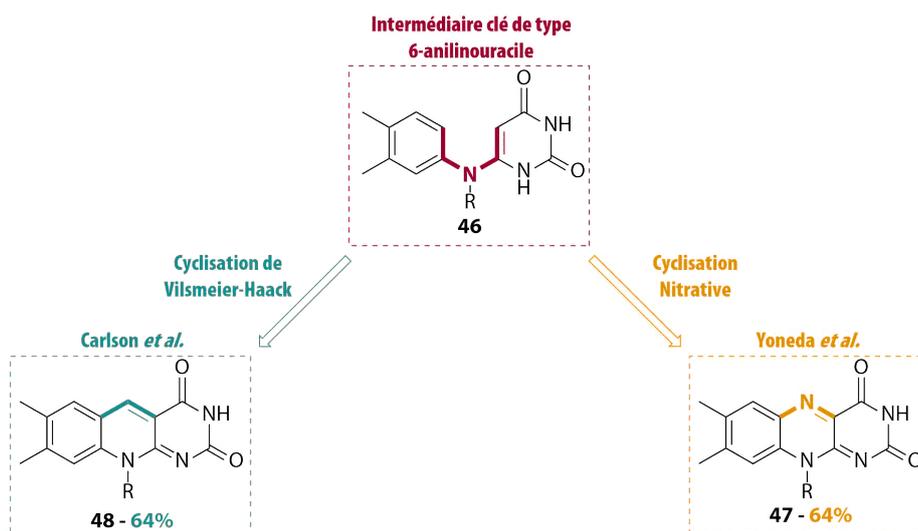


Figure 20 : Stratégie convergente employée dans la littérature.⁷⁰

Le noyau isoalloxazine de **47** est alors obtenu en 2 étapes par la formation d'un intermédiaire isoalloxazine 5-oxide par l'action du sodium nitrite (NaNO_2) puis par la réduction de ce dernier par l'action du dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) avec un rendement de 64% en 2 étapes.⁷⁰ Le noyau 5-déazaflavine de **48** est obtenu quant à lui par une formylation cyclisante en utilisant le réactif de Vilsmeier-Haack avec un rendement de 64%.⁷⁰

Ainsi, avec les objectifs de la thèse présentés précédemment, cet intermédiaire de synthèse commun se révèle central pour l'obtention de nos dérivés cibles sous formes d'ANPs portant 3 bases hétérocycliques différentes.

Aussi, les interactions du FAD dans le site actif de l'enzyme ont montrées que le ribityle ne semble pas essentiel pour la reconnaissance, la chaîne acyclique porté par ce précurseur est alors remplacée par un motif de type but-2'-ényle et pent-2'-ényle sur la base de l'expérience de notre laboratoire dans la synthèse d'alkénylphosphonates.⁷¹

⁷¹ a) Roy, V.; Kumamoto, H.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Topalis, D.; Deville-Bonne, D.; Balzarini, J.; Neyts, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; *et al.* Cross-Metathesis Mediated Synthesis of New Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1399–1402. b) Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232. c) Pradère, U., Clavier, H., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The Shortest Strategy for Generating Phosphonate Prodrugs by Olefin Cross-Metathesis - Application to Acyclonucleoside Phosphonates. *Eur J Org Chem* **2011**, 7324–7330. d) Montagu, A., Pradère, U., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. Expeditious convergent procedure for the preparation of bis(POC) prodrugs of new (E)-4-phosphono-but-2-en-1-yl nucleosides. *Tetrahedron*. **2011**, *67*, 5319–5328. e) Agrofoglio, L.A., Roy, V. Novel antiviral acyclic nucleoside phosphonates, WO2012034719 (A1) 2012-03-22. f) Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408. g) Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Olefin Cross-Metathesis for the Synthesis of Alkenyl Acyclonucleoside Phosphonates. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.

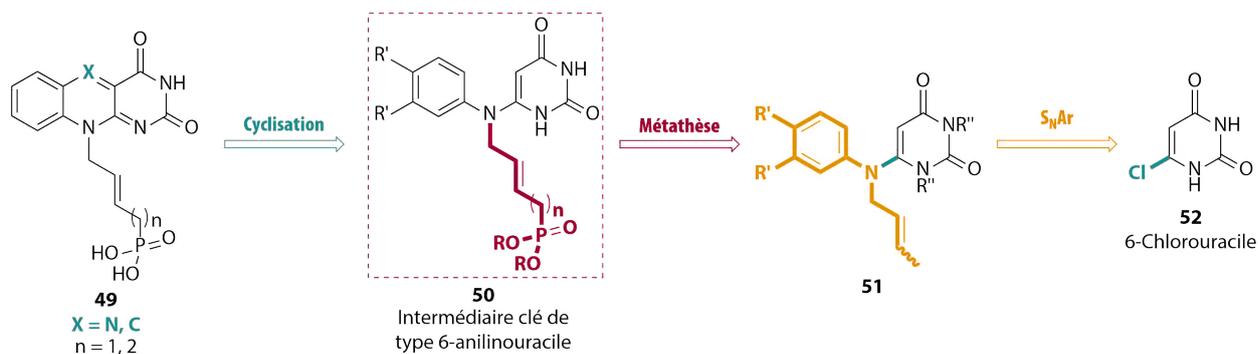


Figure 21 : Rétrosynthèse envisagée.

Dans cette optique, la rétrosynthèse imaginée possède 3 déconnexions importantes. Ainsi, les produits cibles **49** proviendront de l'intermédiaire commun **50** par une étape clé de cyclisation dans le cas des noyaux hétérocycliques isoalloxazine et 5-déazaflavine. Ensuite, **50** résultera d'une étape clé de métathèse entre **51**, possédant sur l'azote N_6 un groupement (*E*)-2'-butène, et le synthon alkénylephosphonate correspondant. Le précurseur **51** provient d'une dernière étape clé, une Substitution Nucléophile Aromatique (S_NAr) entre la 6-chlorouracile **52** et une aniline encombrée (Figure 21).

3 Résultats et discussions

➤ Rappels sur la métathèse des oléfines

Originellement découverte par l'industrie pétrochimique et par la suite, développée pour son application en synthèse organique par les lauréats du Prix Nobel de chimie de 2005 (le Pr. Robert H. Grubbs, Yves Chauvin et le Pr. Richard R. Schrock), la réaction de métathèse des oléfines constitue, de nos jours, une des méthodes synthétiques les plus puissantes qui a, de manière majeure, enrichie le domaine de la synthèse chimique⁷² et plus spécifiquement, la librairie de réactions disponibles permettant la création de liaison carbone-carbone.⁷³ Ainsi, cette dernière possède trois applications principales (Schéma 13) :

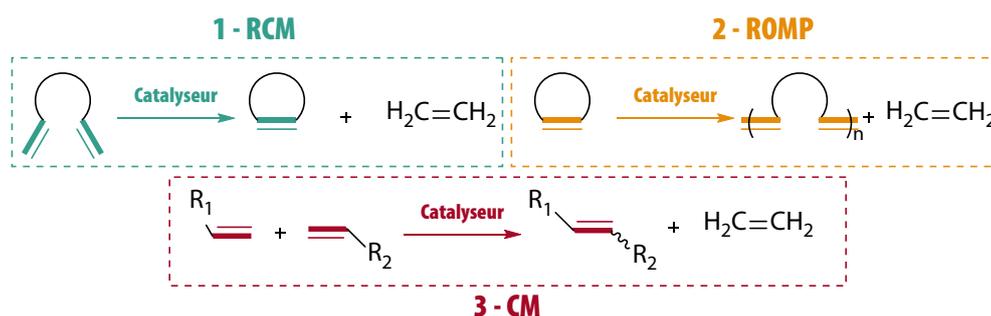


Schéma 13 : Principaux types de métathèse.

⁷² a) Furstner, A. Olefin metathesis and beyond. *Angew Chem Int Ed* **2000**, *39*, 3013-3043. (b) Hoveyda, A. H. & Zhugralin, A. R. The remarkable metal-catalyzed olefin metathesis reaction. *Nature*. **2007**, *450*, 243-251.

⁷³ a) Connon S. J., Blechert S. Recent developments in olefin cross-metathesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 1900-1923. b) Diver, S. T.; Giessert, A. J. Enyne metathesis (enyne bond reorganization). *Chem Rev* **2004**, *104*, 1317-1382. c) Deiters, A.; Martin, S. F. Synthesis of oxygen- and nitrogen-containing heterocycles by ring-closing metathesis. *Chem Rev* **2004**, *104*, 2199-2238. d) Van Otterlo, W. A. L.; De Koning, C. B. Metathesis in the synthesis of aromatic compounds. *Chem Rev* **2009**, *109*, 3743-3782.

1 – La métathèse cyclisante ou Ring-Closing Metathesis (RCM) : cette première application est surtout très employée dans la synthèse de produits naturels comportant, par exemple, des cycles de tailles moyennes ou des macrocycles oléfiniques⁷⁴ et a pour but de réaliser une cyclisation intramoléculaire de deux alcènes terminaux. Cette réaction est sous contrôle thermodynamique par la formation d'un cycle.

2 – La métathèse polymérisante par ouverture de cycle ou Ring-opening Metathesis Polymerization (ROMP) : ce second procédé est caractérisé par deux cycles catalytiques de métathèse consécutifs dont l'un réalise une ouverture de cycle libérant ainsi une oléfine terminale et l'autre réalise la polymérisation de cette dernière. Il est important de noter la presque irréversibilité de cette variante par l'allègement de la contrainte énergétique du cycle.

3 – La métathèse croisée ou Cross-Metathesis (CM) : cette dernière est caractérisée par la mise en réaction de deux partenaires oléfiniques différents ce qui induit alors un problème de sélectivité par des réactions secondaires d'homodimérisation de ces deux alcènes et la formation d'un mélange de stéréoisomères *Z/E* du produit ciblé. Ces différents composés étant en équilibre, l'enjeu de ce procédé est de permettre le réengagement des composés homodimériques dans le cycle catalytique afin de conduire préférentiellement à la formation du produit souhaité.

Concernant le mécanisme général de la réaction de métathèse, il fut proposé en 1971 par Yves Chauvin et Jean-Louis Hérisson (Figure 22).⁷⁵ Ainsi, ce dernier met en jeu, dans un premier temps, la coordination entre le carbène métallique et l'oléfine portant le groupement R_1 formant ainsi un intermédiaire métallocyclobutane via une cycloaddition [2+2] (étape 1). Ce dernier subit alors un réarrangement qui donne lieu à la régénération du catalyseur ainsi qu'à l'élimination d'éthylène (étape 2). L'oléfine portant le groupement R_2 peut, à son tour, réagir avec ce métal alkylidène par cycloaddition [2+2] pour former le métallocyclobutane mixte portant les groupements fonctionnels R_1 et R_2 (étape 3). La cycloréversion du précédent intermédiaire fournit ainsi le produit cible ainsi que l'espèce catalytique qui est réincorporée dans un autre cycle catalytique jusqu'à sa dégradation (étape 4).

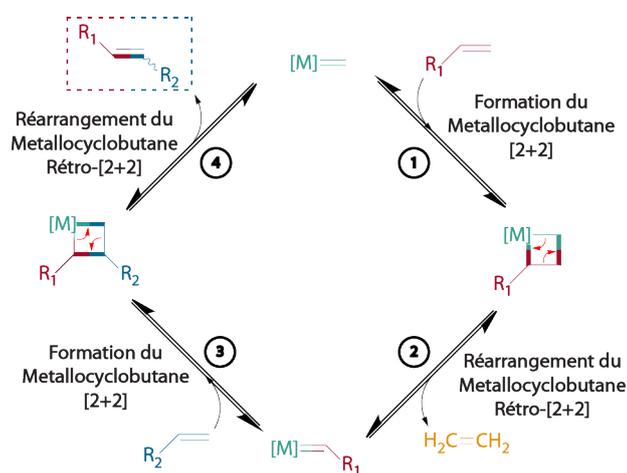


Figure 22 : Mécanisme général de la métathèse croisée.

De par sa diversité de substrats et d'applications, la métathèse des oléfines s'est révélée être un procédé synthétique essentiel par la facilité qu'elle apporte à la synthèse d'oléfines polysubstituées, connues

⁷⁴ Yu, X.; Sun, D. Macrocyclic Drugs and Synthetic Methodologies toward Macrocycles. *Molecules* **2013**, *18*, 6230-6268.

⁷⁵ Hérisson, J.-L.; Chauvin, Y., Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfines acycliques. *Makromol Chem* **1971**, *141*, 161-176.

pour étant compliquées à obtenir par les méthodes d'oléfination classique (Julia, Wittig, Peterson, Takai, Elimination, etc.).

L'enjeu majeur pour conduire aux dérivés ciblés restent la recherche du meilleur catalyseur avec, comme « acteur central », le métal de transition adéquat. Historiquement, un grand nombre de catalyseurs ont été développés dans la littérature à partir de la modulation du métal de transition tel que le titane, le tungstène, le molybdène et enfin, plus récemment le ruthénium. Parmi ces derniers, la première génération de catalyseur efficace et tolérant d'une conséquente variété de fonctions chimiques fut révélée par les travaux de Schrock dans les années 1990 (**Sch-I**, Figure 23).⁷⁶ Ces catalyseurs basés sur le molybdène souffrent cependant d'une faible stabilité à l'air et à l'humidité ayant rendu leur démocratisation compliquée. Dans une moindre mesure, les catalyseurs de première génération basés sur le ruthénium (**Gru-I**, Figure 23), introduits par Grubbs dans les années 1990, possèdent ce même problème même si leur activité catalytique et leur tolérance à un vaste ensemble de fonctions chimiques sont supérieures aux catalyseurs de Schrock.⁷⁷ Afin de résoudre ces difficultés, d'augmenter la réactivité et aussi de faire de la métathèse, la méthode synthétique privilégiée pour la création de liaison carbone-carbone que nous connaissons aujourd'hui, la seconde génération de catalyseur de Grubbs fut introduite avec un changement majeur. Ainsi, le ruthénium était originellement complexé à deux ligands phosphines ce qui conférait à ces derniers, à la fois leur réactivité mais aussi leur instabilité étant donné la labilité des groupement tri-cyclohexylphosphines.

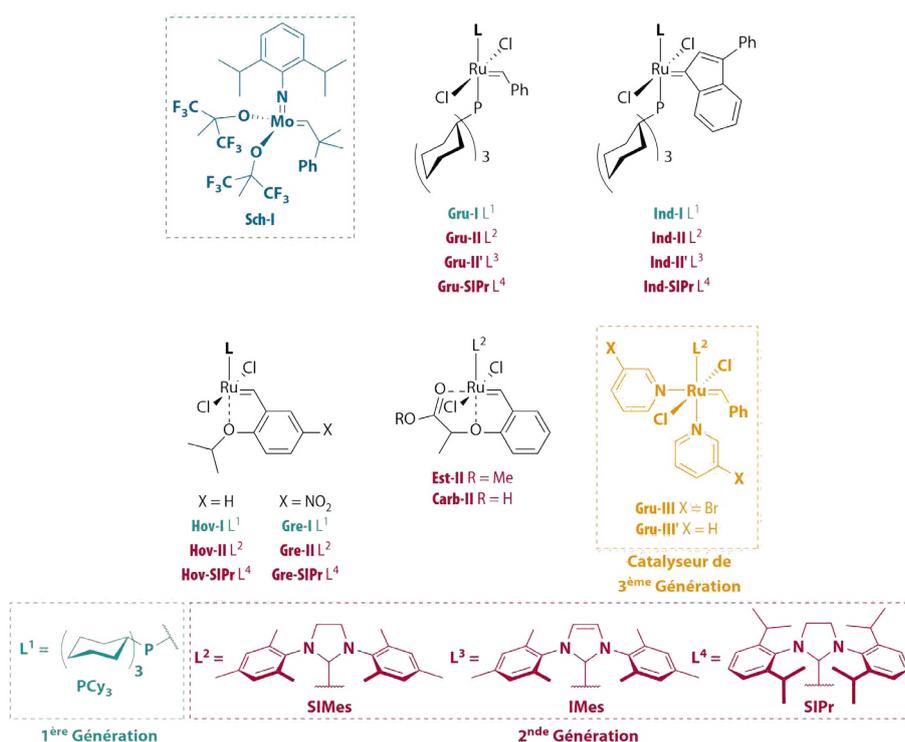


Figure 23 : Structures des principaux catalyseurs de métathèse en fonction de leur génération.

⁷⁶ a) Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Bazan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M.; O'Regan, M. Synthesis of Molybdenum Imido Alkylidene Complexes and Some Reactions Involving Acyclic Olefins. *J Am Chem Soc* **1990**, *112*, 3875–3886. b) Bazan, G. C.; Oskam, J. H.; Cho, H. N.; Park, L. Y.; Schrock, R. R. Living Ring-Opening Metathesis Polymerization of 2,3-Difunctionalized 7-Oxanorbornenes and 7-Oxanorbornadienes by Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-Iso-Pr₂-2,6)(O-Tert-Bu)₂ and Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-Iso-Pr₂-2,6)(OCMe₂CF₃)₂. *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 6899–6907.

⁷⁷ a) Fu, G. C.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. Catalytic ring-closing metathesis of functionalized dienes by a ruthenium carbene complex. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 9856-9857. b) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R.H. A series of well-defined metathesis catalysts-synthesis of [RuCl₂(=CHR')(PR₃)₂] and its reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **1995**, *34*, 2039-2041.

Les catalyseurs de deuxième génération possèdent un carbène N-hétérocyclique (NHC) en place d'un groupement phosphine (**Gru-II**, Figure 23).⁷⁸ Ces derniers montrent une réactivité améliorée envers les oléfines poly-substituées et une stabilité remarquable qui contribuent à leur facilité d'utilisation,⁷⁹ et ce, même en milieux aqueux.⁸⁰ Plusieurs catalyseurs sont maintenant considérés comme des outils synthétiques fondamentaux pour la réalisation de métathèses croisées. Outre le catalyseur de Grubbs de 2nde génération, d'autres équipes se sont intéressées à la synthèse de ces derniers sous formes NHC avec comme exemples connus : le catalyseur de Nolan-Grubbs (**Gru-II'**, Figure 23) dont le noyau imidazolidine du NHC a été remplacé par un noyau imidazole⁸¹ et le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs (**Hov-II**, Figure 23) où le second ligand est remplacé par un groupement ortho-isopropoxybenzylidène dont l'éther chélate le Ruthénium⁸² rendant cette variante plus thermostable. Enfin, dans le but de réduire la contrainte cinétique et énergétique liée à la dissociation d'une phosphine menant à la forme active des catalyseurs de 2nde génération et de permettre à cette nouvelle génération de tolérer des oléfines fonctionnalisées par des groupements coordinants, Grubbs *et al.* a synthétisé un nouveau catalyseur, dit de troisième génération, en remplaçant le ligand phosphine par 2 espèces 3-bromo-pyridine (**Gru-III**, Figure 23).⁸³ La déficience en électrons de ces ligands induit, à la fois, une dissociation très rapide même à basse température et une réassociation très lente contribuant au turn-over favorable à la métathèse croisée de cette génération de pré-catalyseur.

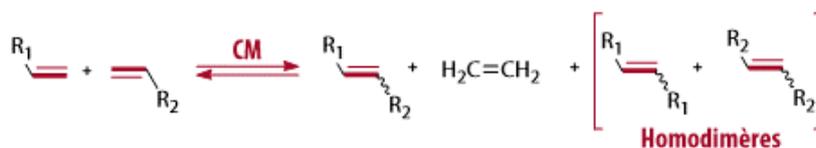


Figure 24 : Equation de la réaction de métathèse croisée.

La métathèse croisée constitue un cas particulier parmi les autres catégories de ce procédé synthétique de par la production concomitante d'hétérodimères souhaités et d'homodimères ainsi que d'éthylène, comme sous-produits de cette réaction (Figure 24). De ce fait, le problème de sélectivité de cette réaction est imputé à la concentration et à la réactivité des oléfines face au catalyseur, qui est directement interdépendante à la fois de leur fonctionnalisation et par conséquent, de leur richesse électronique. Dans le but de prédire cette sélectivité, Grubbs *et al.* a proposé un modèle empirique de réactivité avec différents groupements fonctionnels en fonction du catalyseur employé (Tableau 3) :⁸⁴

1 - Type 1 : ces oléfines sont généralement terminales ou peu substituées et riches en électrons ce qui conduit à une homodimérisation rapide de ces dernières. Leur consommation est effectuée par un réengagement dans le cycle catalytique.

⁷⁸ Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C.W.; Grubbs, R.H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Org Lett* **1999**, *1*, 953–956.

⁷⁹ Scholl, M.; Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Grubbs, R.H. Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazol-2-ylidene ligands. *Tet Lett* **1999**, *40*, 2247–2250.

⁸⁰ Tomasek, J.; Schatz, J. Olefin Metathesis in Aqueous Media. *Green Chem* **2013**, *15*, 2317–2338.

⁸¹ Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L. Olefin metathesis-active ruthenium complexes bearing a nucleophilic carbene ligand. *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 2674–2678.

⁸² Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B.L.; Hoveyda, A. H. Efficient and recyclable monomeric and dendritic Ru-based metathesis catalysts. *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 8168–8179.

⁸³ Love, J. A.; Morgan, J. P.; Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. A Practical and Highly Active Ruthenium-Based Catalyst That Effects the Cross Metathesis of Acrylonitrile. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 4035–4037.

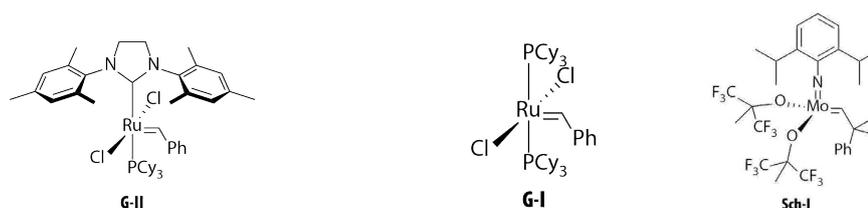
⁸⁴ Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P. & Grubbs, R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 11360–11370.

2 - Type 2 : les alcènes de type 2 sont moins réactives que leurs partenaires de type 1 et donc, conduisent à une homodimérisation plus lente et à un partiel réengagement des dimères dans le processus catalytique.

3 - Type 3 : l'encombrement et/ou la faible réactivité de ce type d'alcène entraîne l'absence de formation d'homodimères. Cependant, ils peuvent être employés dans une réaction de métathèse croisée à la seule condition qu'ils soient mis en réaction avec une espèce plus réactive.

4 - Type 4 : ce dernier type d'alcène constitue des espèces spectatrices de la métathèse croisée résultant d'un encombrement stérique ou d'un appauvrissement en électron trop important.

Tableau 3. Modèle de sélectivité établi par Grubbs *et al.* ⁸⁴



<p>Type 1 (Homodimérisation rapide)</p>	<p>Oléfines terminales, Alcools primaires allyliques et esters, Esters boroniques allyliques, Halogénures d'allyles, Styrènes (Pas de larges substituants en ortho), Phosphonates allyliques, Silanes allyliques, Oxydes de phosphine allyliques, Sulfures allyliques et Amines protégées allyliques.</p>	<p>Oléfines terminales, Silanes allyliques, Alcools, éthers et esters primaires allyliques, Esters boroniques allyliques et Halogénures d'allyles.</p>	<p>Oléfines terminales, Silanes allyliques.</p>
<p>Type 2 (Homodimérisation lente)</p>	<p>Styrènes (Larges substituants en ortho), Acrylates, Acrylamides, Acides Acryliques, Acroléines, Cétones vinyliques, Alcools primaires allyliques non protégés, Epoxydes vinyliques, Alcools secondaires allyliques et Oléfines liées à des alcanes perfluorés.</p>	<p>Styrènes, Alcools secondaires allyliques, Dioxolanes vinyliques et Boronates vinyliques.</p>	<p>Styrènes, Stannanes allyliques.</p>
<p>Type 3 (Pas d'Homodimérisation)</p>	<p>Oléfines 1-disubstituées, Oléfines trisubstituées et non encombrées, Phosphonates vinyliques, Phenylsulfones vinyliques, Alcools quaternaires allyliques (substituants alcanes) et Alcools tertiaires allyliques protégés.</p>	<p>Siloxanes vinyliques.</p>	<p>Amines tertiaires allyliques, Acrylonitrile.</p>
<p>Type 4 (Spectateur de la Métathèse Croisée)</p>	<p>Oléfines nitrovinyliques, Alcools allyliques trisubstitués et protégés.</p>	<p>Oléfines 1-disubstituées, Carbonyles α,β-insaturés, Oléfines liées à des alcanes perfluorés, Oléfines avec une position allylique quaternaire et Amines tertiaires allyliques et protégées.</p>	<p>Oléfines 1-disubstituées.</p>

Le contrôle de la sélectivité conduisant à l'obtention maximale de l'hétérodimère souhaité est effectué par la mise en réaction de partenaires oléfiniques différents, c'est-à-dire, d'une oléfine hautement réactive (Type 1) et d'une oléfine moins réactive (Type 2 ou 3) et par la mise en excès impérative d'une oléfine par rapport à l'autre (Tableau 4).

Tableau 4 : Contrôle de la sélectivité de la métathèse croisée.

	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4
Type 1	Statistique	Sélective	Sélective	Pas de réaction
Type 2	Sélective	Non sélective	Sélective	Pas de réaction
Type 3	Sélective	Sélective	Non sélective	Pas de réaction
Type 4	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction

Par conséquent, les espèces les plus réactives se transforment en homodimères rapidement et sont réengagées dans le cycle catalytique menant à leur réaction, par la suite, avec les oléfines les moins réactives. Enfin, il est capital de noter que le type d'oléfine est directement dépendant du catalyseur employé et que le tableau ci-dessus s'appuie sur des observations expérimentales.

➤ Notre travail

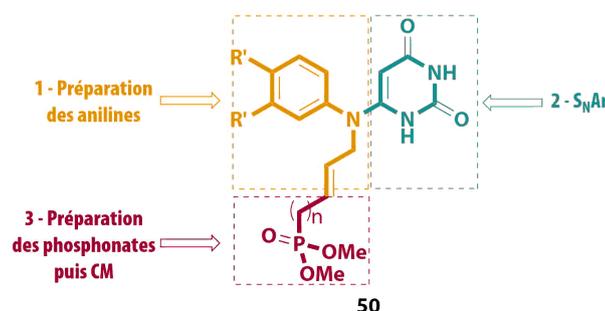


Figure 25 : Stratégie de synthèse de l'intermédiaire clé 50.

Dans cette série, l'objectif est d'accéder au précurseur 50, nous nous intéresserons ainsi dans un premier temps, à la préparation d'analogues d'anilines. Avec ces intermédiaires en main, nous nous pencherons ensuite sur l'étape de S_NAr avec la 6-chlorouracile et son optimisation. Pour finir, une attention particulière sera portée sur la synthèse des partenaires phosphonates et plus particulièrement, sur la réaction de métathèse croisée responsable de la formation de la chaîne aliphatique ciblée.

- Préparation des anilines

Les intermédiaires de type 51 (Figure 21) sont synthétisés par différentes méthodes de la littérature dont la mise en réaction d'un synthon aniline fonctionnalisé, encombré et/ou peu réactif avec la 6-chlorouracile afin de réaliser une substitution nucléophile aromatique.⁸⁵ Ainsi, l'aniline substituée par un groupement allyle ou un groupement (*E*)-but-2-ène est synthétisée par substitution nucléophile de type 2 (S_N2) en présence du bromo-alcène correspondant et d'une base.⁸⁶ Le bromure d'allyle employé dans cette réaction en tant que preuve de concept est obtenu commercialement.

⁸⁵ a) Yoneda, F.; Koga, M. 1,3,9,11,12,14-Hexa-Azapentacene-2,4,8,10(3H,9H,12H,14H)-Tetraones (Doubled 5-Deazaflavins) with Potential for Oxido Reduction. *J Chem Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 7, 1809–1812. b) Kajiki, T.; Moriya, H.; Hoshino, K.; Kuroi, T.; Kondo, S.; Nabeshima, T.; Yano, Y. Functionalized Flavin Receptors. Regulation of Redox Properties of 6-Azaflavin via Hydrogen Bondings with Melamine Derivatives Bearing Guanidinium Ion(s) in Organic Solvents. *J Org Chem* **1999**, 64, 9679–9689. c) Dudkin, S.; Iaroshenko, V. O.; Sosnovskikh, V. Y.; Tolmachev, A. A.; Villinger, A.; Langer, P. Synthesis and Reactivity of 5-Polyfluoroalkyl-5-Deazaalloxazines. *Org Biomol Chem* **2013**, 11, 5351–5361.

⁸⁶ Mizar, P.; Niebuhr, R.; Hutchings, M.; Farooq, U.; Wirth, T. Thioamination of Alkenes with Hypervalent Iodine Reagents. *Chem Eur J* **2016**, 22, 1614–1617.

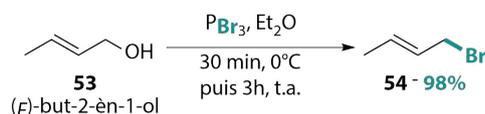


Figure 26 : Synthèse du partenaire oléfinique **54**.

Le (*E*)-1-bromobut-2-ène est synthétisé au laboratoire car il n'est commercialisé que sous forme d'un mélange d'isomère. Ainsi, le (*E*)-but-2-èn-1-ol pur est mis en réaction avec du tribromure de phosphore dans l'éther diéthylique à 0°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 3h.⁸⁷ Le brut de réaction est purifié par distillation sous vide et le produit est obtenu avec un rendement de 98%.

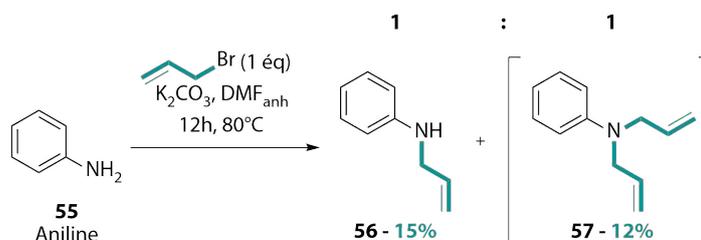


Figure 27 : Substitution de l'aniline de départ **55**.

Cette première méthode permet d'obtenir le produit **56** avec un faible rendement de 15% résultant d'une faible conversion du produit de départ. Aussi, le produit est obtenu en tant que mélange 1:1 avec le sous-produit di-alkylé, du fait que ces deux dérivés possèdent des rapports frontaux équivalents (Rf). Du fait de la séparation difficile de ce mélange et la non-sélectivité de cette méthode, nous avons alors incorporé une étape de protection temporaire avec des groupements trifluoroacétates qui sont clivés dans des conditions douces de *trans*-estérification.⁸⁸

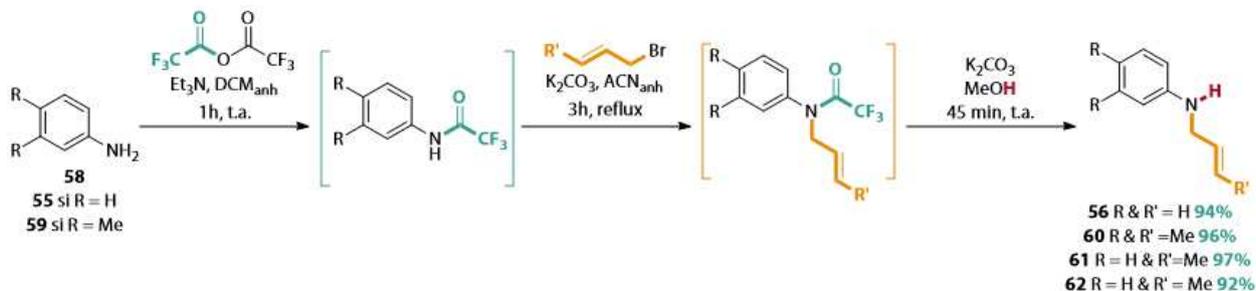


Figure 28 : Préparation des quatre anilines mono-alkylées.

58 est alors mis en réaction avec de l'anhydride trifluoroacétique conduisant à la formation d'un trifluoroacétamide intermédiaire.⁸⁹ Cette aniline protégée est ensuite alkylée par le bromoalcène correspondant par le biais de la méthode publiée par Charrier *et al.*⁹⁰ Une conversion totale est observée après 3h de reflux et ce, en utilisant un excès de l'halogénure d'alkyle (1.5 éq) qui est par la suite éliminé par simple évaporation après extraction. Enfin, des conditions douces de déprotection du groupement trifluoroacétamide conduisent à l'aniline alkylée correspondante.⁹⁰ L'utilisation de cette méthode nous

⁸⁷ Choi, S.; Breugst, M.; Houk, K. N.; Poulter, C. D. δ -Deuterium Isotope Effects as Probes for Transition-State Structures of Isoprenoid Substrates. *J Org Chem* **2014**, *79*, 3572–3580.

⁸⁸ Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protection for the Amino Group. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 2006; pp 696–926.

⁸⁹ Yang, Y.; Chen, Z.; Rao, Y. The Synthesis of Diarylsulfones with Simple Arenes and $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ through Double C–S Bond Formation. *Chem Commun* **2014**, *50*, 15037–15040

⁹⁰ Charrier, N.; Demont, E.; Dunsdon, R.; Maile, G.; Naylor, A.; O'Brien, A.; Redshaw, S.; Theobald, P.; Vesey, D.; Walter, D. Synthesis of Indoles: Efficient Functionalisation of the 7-Position. *Synthesis* **2006**, *20*, 3467–3477.

permet d'obtenir nos quatre dérivés anilines mono-alkylées avec de très bons rendements (94% pour **56**, 92% pour **60** et 97% pour **61** et 97% pour **62** en 3 étapes). Ainsi, les anilines mono-alkylées sont préparées en 3 étapes dont seule la dernière nécessite une purification par chromatographie sur gel de silice et il est à noter que ce procédé de synthèse est répétable sur une échelle de plusieurs grammes.

- Essais de S_NAr

Une fois les anilines **56** et **60** préparées, une recherche bibliographique complète sur cette réaction est effectuée dans l'optique de l'adapter à nos structures d'intérêts, plusieurs conditions sont représentées dans la littérature (Figure 29) :

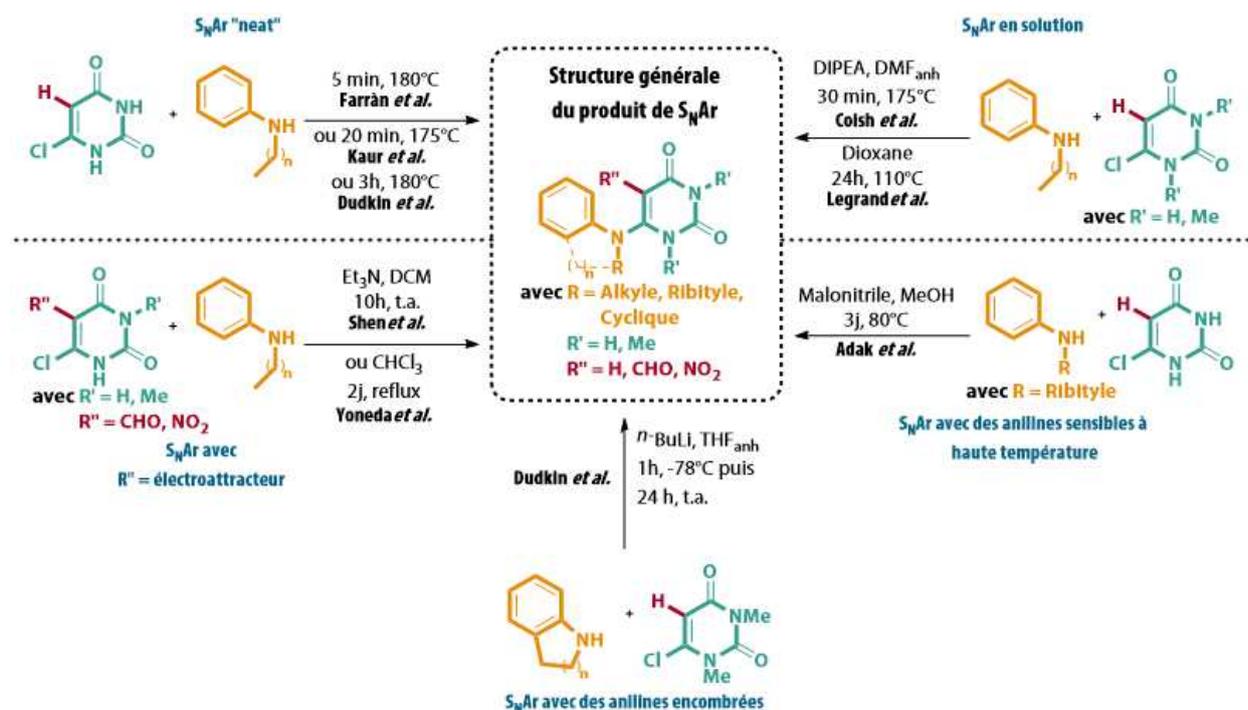


Figure 29 : Panel de conditions de S_NAr provenant de la littérature.

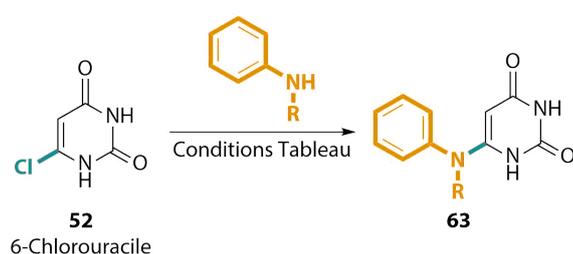
Ainsi, la littérature reporte majoritairement ce type de réaction entre la 6-chlorouracile et des anilines *N*-méthyle, *N*-éthyle ou portant de longues chaînes lipophiles, les réactifs sont alors fusionnés ensemble à haute température (150-180°C). Le temps de réaction est variable du fait de sa forte dépendance à l'encombrement stérique et en conséquence, à la réactivité du partenaire aniline (S_NAr « neat », Figure 29).^{85c),91} La mise en solution des substrats dans le diméthylformamide ou le dioxane est aussi décrite dans le but de réduire, au maximum, la dégradation liée à la fusion des réactifs à haute température (S_NAr en solution, Figure 29).⁹² Pour ce qui est des anilines substituées par des groupements sensibles à la chaleur tels que les sucres, Adak *et al.* réalise la réaction à plus basse température dans le MeOH; cependant cette dernière se révèle plus longue (de 36 à 72h) de par le plus faible apport énergétique

⁹¹ a) Farrán, Á.; Claramunt, R.; López, C.; Pinilla, E.; Torres, R.; Elguero, J. Structural Characterization of Alloxazine and Substituted Isoalloxazines: NMR and X-Ray Crystallography. *Arkivoc* **2006**, 2007, 20. b) Kaur, A.; Haghghatbin, M. A.; Hogan, C. F.; New, E. J. A FRET-Based Ratiometric Redox Probe for Detecting Oxidative Stress by Confocal Microscopy, FLIM and Flow Cytometry. *Chem Commun* **2015**, 51, 10510–10513.

⁹² a) Coish, P. D. g; Aristoff, P. A.; Dixon, B. R. Flavin Derivatives. WO2012109458 (A1), August 16, 2012. b) Legrand, Y.-M.; Gray, M.; Cooke, G.; Rotello, V. M. Model Systems for Flavoenzyme Activity: Relationships between Cofactor Structure, Binding and Redox Properties. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 15789–15795.

(S_NAr avec des anilines sensibles à haute température, Figure 29).⁹³ Aussi, les réactions de S_NAr réalisées à température ambiante ou à plus faible température dans la littérature concernent des dérivés de 6-chlorouracile qui sont « activés » ; ainsi, ces structures présentent, en α du carbone portant le chlore, un groupement très électroattracteur tel qu'un groupement nitro ou encore un groupement formyle (S_NAr avec R''=électroattracteurs, Figure 29).⁹⁴ De ce fait, le facteur limitant de cette méthode semble être la réactivité de l'halogène en position 6 car sa nucléofugacité est dépendante à la fois de son environnement chimique et de la nucléophilie de son partenaire aniline, à défaut, une grande quantité d'énergie sous forme de chaleur doit être apportée. Afin de palier à ce problème, Dudkin *et al.* présente trois méthodes différentes en fonction de la réactivité des anilines employées. Dans le cas d'anilines encombrées ou désactivées, cette équipe montre que la formation de l'amidure correspondant par l'emploi du *n*-BuLi avec la 6-chlorouracile 1,3-diméthylée est le seul moyen afin de former le produit de S_NAr ciblé (S_NAr avec des anilines encombrées, Figure 29).^{85c)} Avec les anilines mono-substituées **56** et **60** en main, les essais de S_NAR sont alors entrepris avec les conditions de la littérature (Tableau 5) :

Tableau 5 : Essais de différentes conditions de S_NAr.



Entrée	R	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	H	/	/ ^a	3h, 175°C	100%	X
2	H	/	/ ^a	20 min, 175°C	100%	89%
3	Allyle	/	/ ^a	20 min, 175°C	<10%	X
4	Allyle	/	/ ^a	3h, 175°C	100%	X
5	Allyle	Malonitrile	MeOH	3j, 90°C	0%	X
6	Crotyle	DIPEA	DMF _{anh}	30 min, 175°C	<5%	X
7	Crotyle	<i>n</i> -BuLi	THF _{anh}	1h, -78°C puis 24h, t.a.	0%	X

^a: Réalisé en condition « neat »

Entrée 1 et 2 : Les premiers essais concernent les conditions classiques de la littérature en fusionnant les deux substrats à 175°C afin d'en déduire une preuve de concept. L'entrée 1 aboutit seulement à des produits de dégradation alors que le second essai à 175°C avec un temps de réaction plus court permet d'obtenir la 6-anilino-1,3-diméthyluracil **64** avec un très bon rendement de 89%.⁹¹

Entrée 3 & 4 : Les mêmes conditions que l'entrée 2 sont utilisées avec l'aniline allylée **56**; cependant, une conversion minime est observée (<10%) accompagnée d'une formation exclusive de produits de

⁹³ Adak, S.; Begley, T. P. Dibenzo-thiophene Catabolism Proceeds via a Flavin-N5-Oxide Intermediate. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 6424–6426.

⁹⁴ Shen, G.-B.; Xia, K.; Li, X.-T.; Li, J.-L.; Fu, Y.-H.; Yuan, L.; Zhu, X.-Q. Prediction of Kinetic Isotope Effects for Various Hydride Transfer Reactions Using a New Kinetic Model. *J Phys Chem A* **2016**, *120*, 1779–1799.

dégradation. Le temps de réaction est alors prolongé à 3h mais seuls des produits de dégradation sont obtenus.⁹¹

Entrée 5 : Du fait de l'observation d'une forte dégradation du milieu réactionnel brut, la fusion à 175°C est remplacée par des conditions plus douces dans le MeOH à reflux pendant 3 jours. Aucune disparition des substrats n'est observée avec ces dernières.⁹³

Entrée 6 : Dans leur brevet, Coish *et al.* réalise la réaction de S_NAr avec des anilines sensibles en solution dans le DMF_{anh} en ajoutant de la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA), réalisant la capture de l'acide chlorhydrique formé pendant la réaction.^{92a)} La nécessité d'ajouter une base pour pousser l'équilibre vers la formation du produit souhaité a été étudiée et résulte en une disparition minime des substrats de départ (<5%) et en une apparition légère de produits de dégradation sur CCM.

Entrée 7 : L'hypothèse de cette entrée est que **60** ne possède pas un caractère nucléophile suffisant et possède un encombrement stérique trop important. Ainsi, dans l'optique d'augmenter la réactivité de cette dernière, la formation d'un amidure intermédiaire est effectuée, sur lequel est ajouté une solution de **52** dans le THF_{anh}. Après traitement, les produits de départ sont récupérés intacts.

En conséquence, l'électrophilie de la position 6 de l'uracile **52** ne semble pas être suffisante et nécessite une activation supplémentaire que le seul effet de la température, la mise en solution ou encore l'ajout d'une base.

- Réaction de Buchwald-Hartwig

Dans l'optique de contourner cet inconvénient, nous nous sommes alors tournés vers la réaction de Buchwald-Hartwig qui apparaît comme le procédé synthétique le plus judicieux afin de réaliser l'activation de la position 6-chloro de notre substrat de départ. Le couplage de Buchwald-Hartwig s'est révélé comme une alternative attrayante grâce à un large éventail d'études mécanistiques et d'optimisations récentes, basées sur l'abondante librairie de nouveaux ligands et pré-catalyseurs disponibles, donnant lieu à une portée de réaction très étendue, avec des substrats halogénés ou sulfonates facilement accessibles couplés à des amines primaires, polysubstituées ou endocycliques.⁹⁵

Plusieurs mécanismes ont été proposés, en premier lieu avec une étape de *trans*-métallation par l'action d'un dérivé organostannique aminé⁹⁶ puis un second mécanisme communément accepté qui émane de l'abandon des composés organostanniques aminés, dû à leur toxicité élevée et leur faible stabilité, dans les couplages pallado-catalysés de *N*-arylation (Figure 30).⁹⁷

⁹⁵ Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L. Applications of Palladium-Catalyzed C–N Cross-Coupling Reactions. *Chem Rev* **2016**, *116*, 12564–12649.

⁹⁶ Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 5969–5970.

⁹⁷ Louie, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Synthesis of Arylamines from Aryl Halides. Mechanistic Studies Lead to Coupling in the Absence of Tin Reagents. *Tet Lett* **1995**, *36*, 3609–3612.

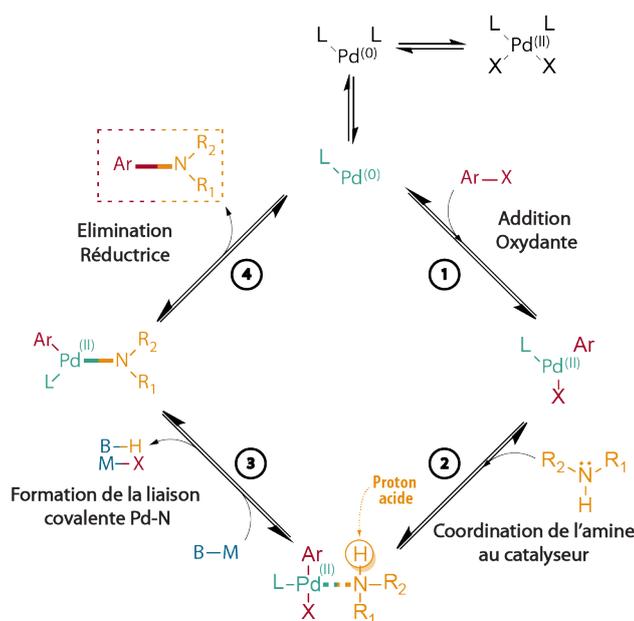


Figure 30 : Mécanisme général du couplage palladé de Buchwald-Hartwig.

La réaction de Buchwald-Hartwig est initiée par la formation de la forme active du catalyseur à l'état d'oxydation 0 par tout d'abord, une réduction puis par une dissociation d'un des ligands de ce dernier. Cette forme activée réagit ensuite avec l'halogénure d'aryle par une addition oxydante, donnant lieu à un complexe tertiaire de palladium à l'état d'oxydation +2 (étape 1). L'amine nucléophile est par la suite complexée à cet intermédiaire ce qui induit l'acidité accrue de ce substrat (étape 2). L'addition d'une base faible dans le milieu réactionnel en combinaison avec un solvant apolaire,⁹⁸ provoque la déprotonation concomitante du complexe stabilisé entre l'amine et palladium, induisant une nouvelle espèce covalente (étape 3). Enfin, l'élimination réductrice du précédent intermédiaire fournit ainsi le produit cible *N*-aryle et régénère l'espèce catalytique qui est, par la suite, réincorporée dans un autre cycle (étape 4).

Dans la littérature, ce procédé synthétique est mentionné dans différents brevets qui réalisent la synthèse de dérivés de type 6-anilinouracile avec comme substrats de départ, différents analogues de 6-chlorouracile et des anilines fonctionnalisées.⁹⁹ Les conditions comportent un léger excès du partenaire aniline (1.2 éq), un large excès de la base (2 éq), le carbonate de césium (Cs_2CO_3), avec comme couple catalytique, l'acétate de palladium ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) à 10 mol % et le Xantphos à 15 mol %, dans le dioxane. Enfin, les conditions de réactions diffèrent par les méthodes d'activation. Ainsi, soit la réaction est réalisée en chauffage classique pendant 1h à 100°C ou sous activation aux micro-ondes avec un temps de chauffe variant de 20 min à 120 min et à une température constante de 120°C. Ces conditions sont alors réutilisées avec comme objectif, la synthèse directe de notre intermédiaire **51** par l'emploi de la 6-chlorouracile et l'aniline crotylée **62** préparée précédemment.

⁹⁸ Sunesson, Y.; Limé, E.; Nilsson Lill, S. O.; Meadows, R. E.; Norrby, P.-O. Role of the Base in Buchwald–Hartwig Amination. *J Org Chem* **2014**, *79*, 11961–11969.

⁹⁹ a) Bergeron, P.; Cohen, F.; Estrada, A.; Koehler, M.; Lau, K.; Ly, C.; Lyssikatos, J.; Ortwine, D.; Pei, Z.; Zhao, X. Pyrimidine Compounds, Compositions and Methods of Use. WO2010014939 (A1), February 4, 2010. b) Kai, H.; Tanaka, S.; Hiramatsu, Y.; Nozu, A.; Nakamura, K. Heterocyclic Ring and Carbocyclic Derivative. US2016024072 (A1), January 28, 2016. c) Tanaka, S.; Tomoyuki, O.; Kai H.; Ogata, Y.; Hirai, K.; Kurosuse, N.; Fujii, Y. 6-Membered Heterocyclic Derivative and Pharmaceutical Composition Comprising Same. WO2016171249 (A1), October 27, 2016.

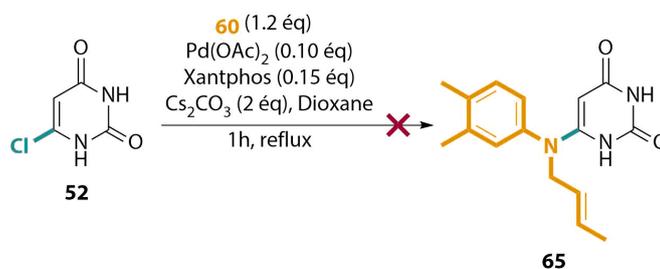
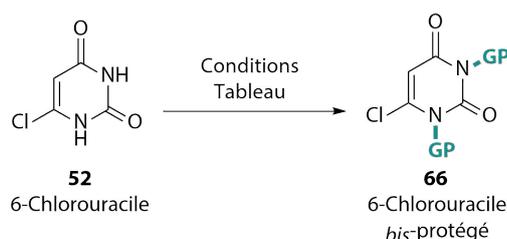


Figure 31 : Essai préliminaire du couplage de Buchwald-Hartwig.

Cette première approche, basée sur les conditions de la littérature décrite par Tanaka *et al.*,^{99b} n'a pas conduit au produit attendu **65**. Aucune disparition des produits de départ n'est constatée, ceci peut être imputé à la fois à la solubilité partielle de la 6-chlorouracile dans le dioxane mais surtout à un probable empoisonnement du catalyseur par cette dernière (étape 2, Figure 30) dû à la présence des deux amides libres du noyau uracile. Dans le but de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, une étape de *per*-protection de cette pyrimidine est mise en place. Aussi, cette étape de protection permettra d'éviter la complexation du catalyseur de métathèse à base de ruthénium,¹⁰⁰ son inhibition et sa décomposition¹⁰¹ par la présence d'amines secondaires libres. Les résultats de cette optimisation sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Optimisation de l'étape de protection.



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	Boc ₂ O (4 éq), DMAP (0.1 éq)	THF _{anh}	8h, t.a.	0%	X
2	PMBOH (2.2 éq+2.2 éq), PPh ₃ , DIAD	THF _{anh}	12h+12h, t.a.	46%	32%
3	PMBCl (2.2 éq), K ₂ CO ₃	DMF _{anh}	35 min, MO 80°C	75%	68%
4	PMBCl (3 éq), K ₂ CO ₃	DMF _{anh}	35 min, MO 80°C	75%	74%
5	PMBCl (3+1.5 éq), K ₂ CO ₃	DMF _{anh}	35+25 min, MO 80°C	100%	76%
6	PMBCl (4.5 éq), K ₂ CO ₃	DMF _{anh}	60 min, MO 80°C	100%	89%

¹⁰⁰ Occhipinti, G.; Bjørsvik, H.-R.; Törnroos, K. W.; Jensen, V. R. Ruthenium Alkylidene Complexes of Chelating Amine Ligands. *Organometallics* **2007**, *26*, 5803–5814.

¹⁰¹ a) Lummiss, J. A. M.; Ireland, B. J.; Sommers, J. M.; Fogg, D. E. Amine-Mediated Degradation in Olefin Metathesis Reactions That Employ the Second-Generation Grubbs Catalyst. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 459–463. b) Ireland, B. J.; Dobbigny, B. T.; Fogg, D. E. Decomposition of a Phosphine-Free Metathesis Catalyst by Amines and Other Bronsted Bases: Metallacyclobutane Deprotonation as a Major Deactivation Pathway. *ACS Catal* **2015**, *5*, 4690–4698.

Entrée 1 : S'inspirant des conditions décrites par Porcheddu *et al.* où est réalisée la *per*-protection de la cytosine par des groupements Boc,¹⁰² cet essai ne montre aucune formation du produit souhaité après 8h.

Entrée 2 : Les 6-halogénouraciles sont protégées par des groupements *p*-méthoxybenzyle (PMB) en conditions de Mitsunobu.¹⁰³ Ainsi, lors de notre essai, la réaction ne montre pas de conversion complète du produit de départ. Le milieu réactionnel est alors chargé avec 2.2 équivalents supplémentaires d'alcool *p*-méthoxybenzyle (PMBOH) et mis en réaction pendant 12h supplémentaire. La conversion n'atteint seulement que 46% et après purification, le produit est obtenu avec un faible rendement de 32%.

Entrée 3 & 4 : Les conditions classiques de réaction pour la bis-protection incluent l'utilisation de chlorure de *p*-méthoxybenzyle (PMBCl) en combinaison avec du carbonate de potassium (K₂CO₃) dans le DMF_{anh}.¹⁰⁴ Dans le but de minimiser les temps de réaction qui varient de 1h à plusieurs jours selon les substrats, nous avons décidé de travailler sous activation micro-ondes pendant 35 min à 80°C avec un mélange équimolaire de PMBCl et de K₂CO₃ (2.2 eq chacun). La conversion ne dépasse pas les 75% et le produit est obtenu avec un rendement satisfaisant de 68%. Les quantités de PMBCl sont alors augmentées (3 eq au lieu de 2.2 eq) ce qui permet d'obtenir une légère augmentation du rendement à 74% mais sans augmentation de la conversion.

Entrée 5 & 6 : Le meilleur résultat (89% de rendement) est obtenu en utilisant un large excès de PMBCl (4.5 eq) et en augmentant le temps d'activation à 60 min. Il est à noter que la conversion du produit de départ est alors totale.

Avec l'intermédiaire *bis*-paraméthoxybenzyle préparé, un essai de *N*-arylation pallado-catalysée est alors effectué entre **67** et **60** avec la méthode de Tanaka *et al.*.^{99b)}

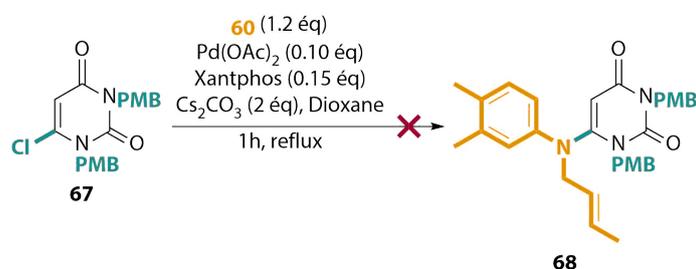


Figure 32 : Second essai de *N*-arylation.

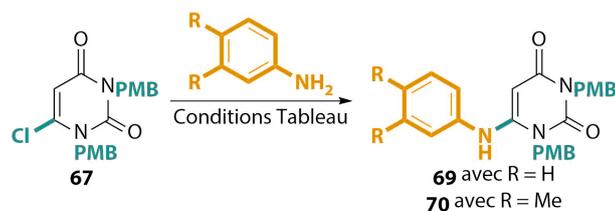
Ce second couplage de Buchwald-Hartwig a pour résultat la récupération des produits de départ sans aucune conversion, comme pour le premier essai, ce qui infirme l'hypothèse précédente imputée à la faible réactivité de **52**. L'encombrement stérique de l'aniline est alors supposé comme étant responsable de sa faible réactivité envers **67**. Les tests suivants sont réalisés alors avec les anilines libres (**55** et **59**) et présentés dans le tableau suivant :

¹⁰² Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Piredda, I.; Carta, M.; Nieddu, G. A Practical and Efficient Approach to PNA Monomers Compatible with Fmoc-Mediated Solid-Phase Synthesis Protocols. *Eur J Org Chem* **2008**, 2008, 5786–5797.

¹⁰³ Flores, C. M.; Wade, P. R. Prokineticin 1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain. US2011319418 (A1), December 29, 2011.

¹⁰⁴ Jakubiec, D.; Walczak, K. Z. Aldimines of 5-Aminouracil as Reagents in 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Monatsh Chem* **2011**, 142, 1155.

Tableau 7 : Optimisations de la réaction de *N*-arylation avec des anilines non-substituées.



Entrée	Aniline	Catalyseur	Ligand	Base	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	55 1.2 éq	Pd(OAc) ₂ 10 mol %	Xantphos 15 mol %	Cs ₂ CO ₃ 2 éq	Dioxane	1h, reflux	55%	41%
2	59 2 éq	Pd(OAc) ₂ 10 mol %	Xantphos 20 mol %	Cs ₂ CO ₃ 2 éq	Dioxane	1h, reflux	100%	65%
3	55 2 éq	Pd(OAc) ₂ 10 mol %	Xantphos 20 mol %	Cs ₂ CO ₃ 2 éq	Dioxane	1h, reflux	100%	63%
4	59 2 éq	Pd(OAc) ₂ 10 mol %	Xantphos 20 mol %	Cs ₂ CO ₃ 2 éq	Dioxane _{anh} + 4Å MS	1h, reflux	100%	81%
5	55 2 éq	Pd(OAc) ₂ 10 mol %	Xantphos 20 mol %	Cs ₂ CO ₃ 2 éq	Dioxane _{anh} + 4Å MS	1h, reflux	100%	79%

Entrée 1 : L'utilisation des conditions précédentes conduit au produit souhaité avec un rendement moyen de 41% accompagné d'une conversion moyenne de 55% du produit de départ, mais permet de confirmer que l'encombrement stérique du partenaire aniline est un facteur limitant à la formation du produit.

Entrée 2 & 3 : Une augmentation du nombre d'équivalents des anilines (2 éq) et du ligand (20 mol %) a pour conséquence une nette amélioration des rendements et une conversion totale du produit de départ. Ainsi, ce couplage de Buchwald-Hartwig permet d'obtenir les produits **70** et **69** avec de bons rendements respectifs de 65% et 63%.

Entrée 4 & 5 : En travaillant dans des conditions anhydres (dioxane_{anh} et tamis moléculaire 4Å), les produits souhaités sont obtenus avec des rendements de 81% et 79% respectivement pour **70** et **69**.

- Greffage de la chaîne latérale

Une fois les synthons 6-anilinoouracile 1,3-*bis*-protégés en main, plusieurs scénarii sont alors possibles en vue d'introduire la chaîne latérale sur ces intermédiaires. Une possibilité est la substitution nucléophile sur le dérivé bromé à 4 ou 5 chainons. Cependant, la présence d'une base nécessaire à cette substitution induit exclusivement une déprotonation en α du phosphore et en conséquence, le départ de l'halogénure, résultant en la seule formation du composé **71** (Figure 33).

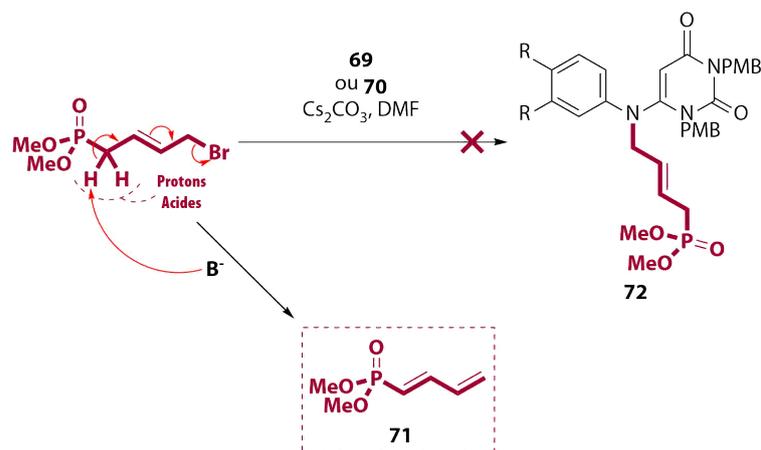


Figure 33 : Réaction secondaire par substitution nucléophile.

Aussi, cette méthode est alors seulement envisageable pour les dérivés à 5 chaînons car la déprotonation en α du phosphore ne provoque pas l'expulsion du bromure par conjugaison des électrons π . Dans l'optique d'une approche convergente pour nos dérivés cibles, l'alkylation suivi de l'étape de métathèse croisée avec les partenaires phosphonates correspondant, apparaît comme la méthode la plus rationnelle. L'alkylation par substitution nucléophile sur l'azote centrale de dérivé 6-anilinopyrimidine est alors effectuée par la formation d'un amidure intermédiaire avec l'hydruide de sodium (NaH) sur lequel est ajouté le bromure d'allyle en léger excès dans le DMF_{anh} pendant 2h à température ambiante.

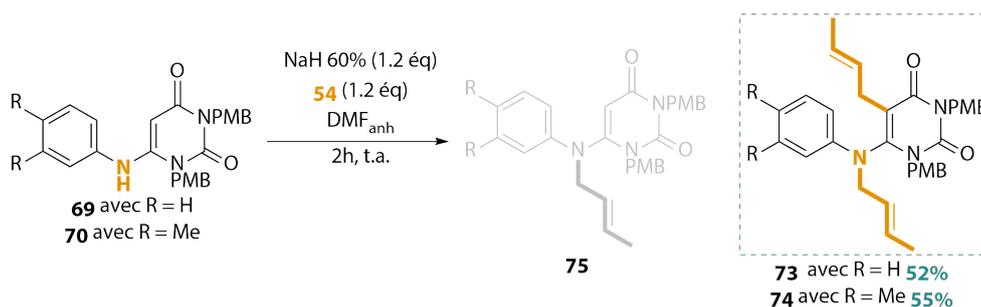


Figure 34 : Alkylation par substitution nucléophile de type 2.

Appliqués à nos substrats **69** et **70**, cette réaction résulte en la formation exclusive de dérivés possédant deux groupements (*E*)-but-2-ène (Figure 35).

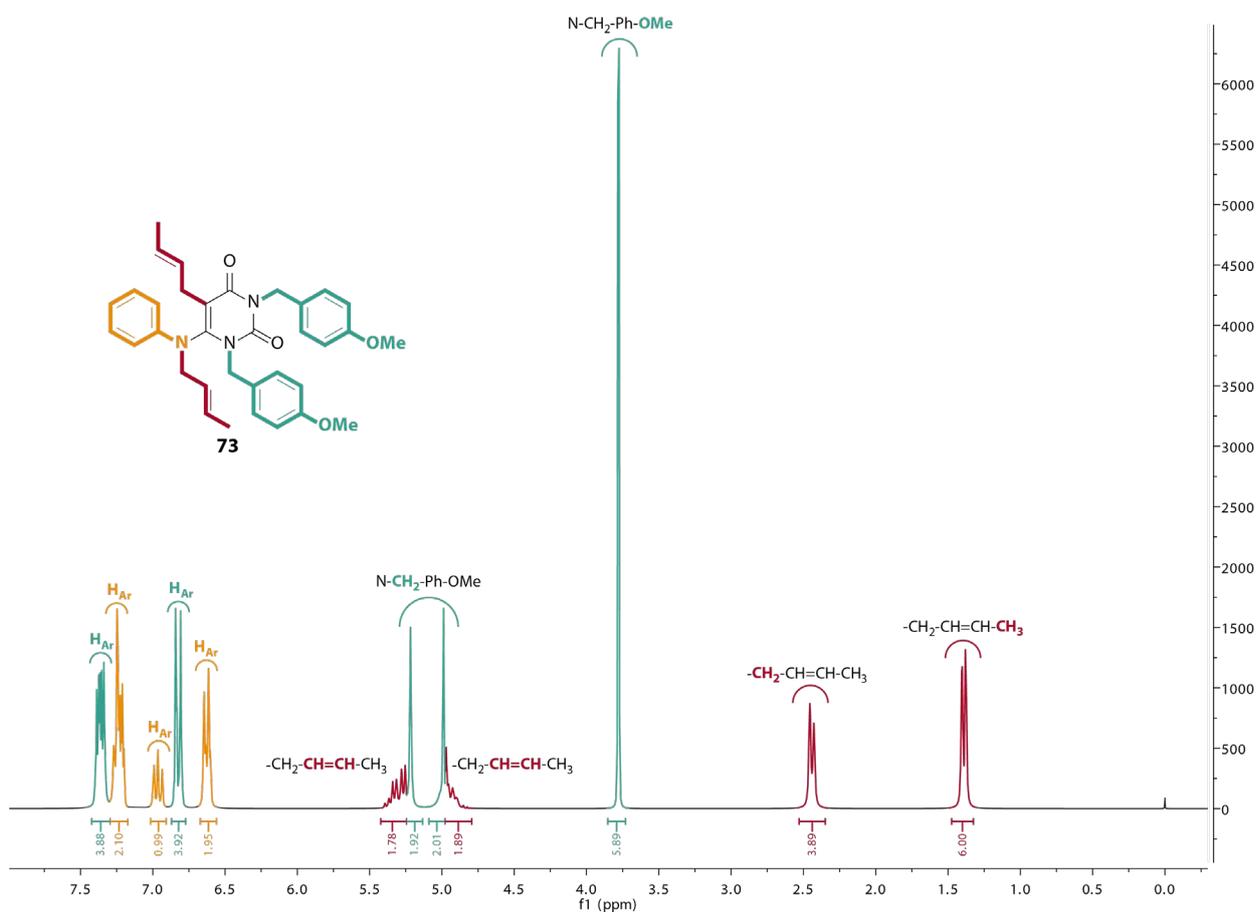


Figure 35 : Spectre RMN de **73** dans le CDCl_3 .

De ce spectre RMN de **73**, il est aussi observé la disparition notable du proton H_5 du noyau pyrimidine ce qui a pour conséquence d'infirmer la possibilité d'une O_4 -alkylation et ainsi, d'émettre l'hypothèse que l'addition du groupement crotyle a probablement eu lieu en C_5 .

La détermination de la structure exacte de ces composés a été réalisée par une expérience à deux dimensions de type Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) où sont interprétés les couplages longues distances entre les différents groupes de protons et les carbones présents dans l'environnement chimique de ces derniers. Ainsi, les signaux ^1H du groupement (*E*)-but-2-ène étant groupés, seules les différences entre les couplages ^1H - ^{13}C des fonctions alcènes de ces derniers peuvent être étudiées. En plus des corrélations communes de ces alcènes avec les méthyles et les CH_2 adjacents, ces deux groupements divergent cependant par les corrélations à longues distances (Figure 36).

Ainsi, il est observé deux couplages notables entre l'alcène d'un groupement crotyle et le C_5 en 3J mais aussi entre cet alcène et le carbonyle en position 4 ($\text{C}_4=\text{O}$) en 4J ce qui, par conséquent, confirme la dialkylation de **69** à la fois sur l'azote en position 6 mais aussi sur le C_5 . L'attribution de la structure du dérivé diméthylé **74** a été réalisée selon la même procédure.

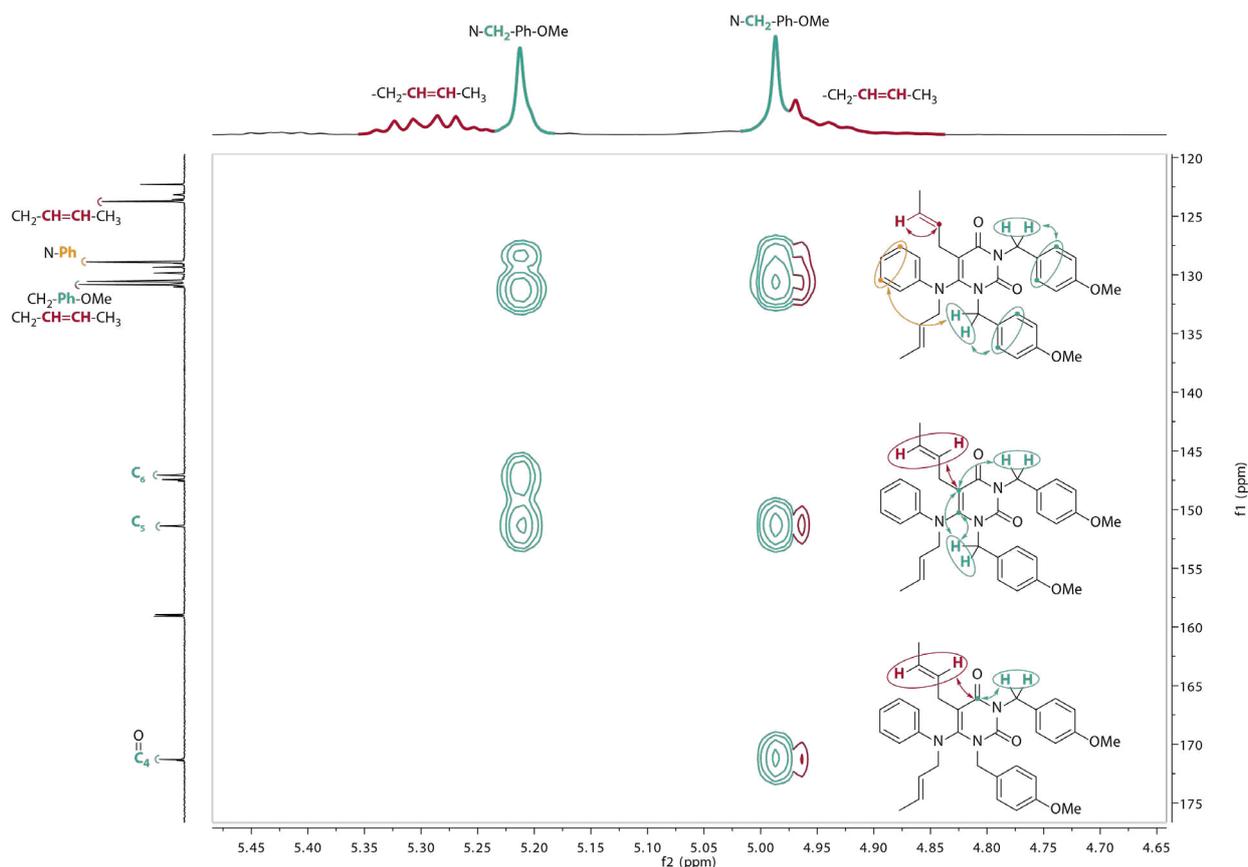


Figure 36 : Corrélation ^1H - ^{13}C à longue distance de **73** dans le CDCl_3 .

Cette alkylation étant limitée par le léger excès d'halogénure d'alkyle, afin de maximiser la formation de ces produits secondaires, les quantités d'hydruure de sodium et de (*E*)-1-bromo-but-2-ène ont alors été augmentées avec respectivement 2 équivalents de ces derniers. **73** et **74** sont alors obtenus avec de très bons rendements de 85% et 88% (Figure 37) :

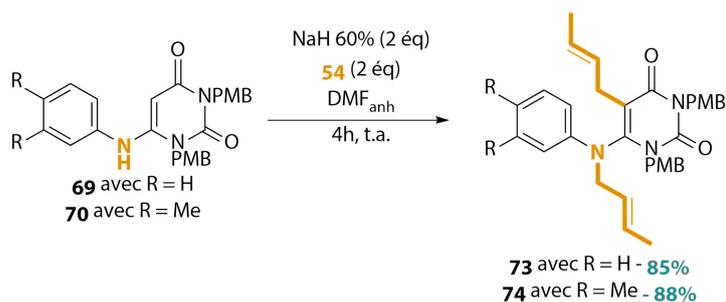


Figure 37 : Optimisation de la di-alkylation.

Le mécanisme proposé pour rendre compte de la formation de ces produits est :

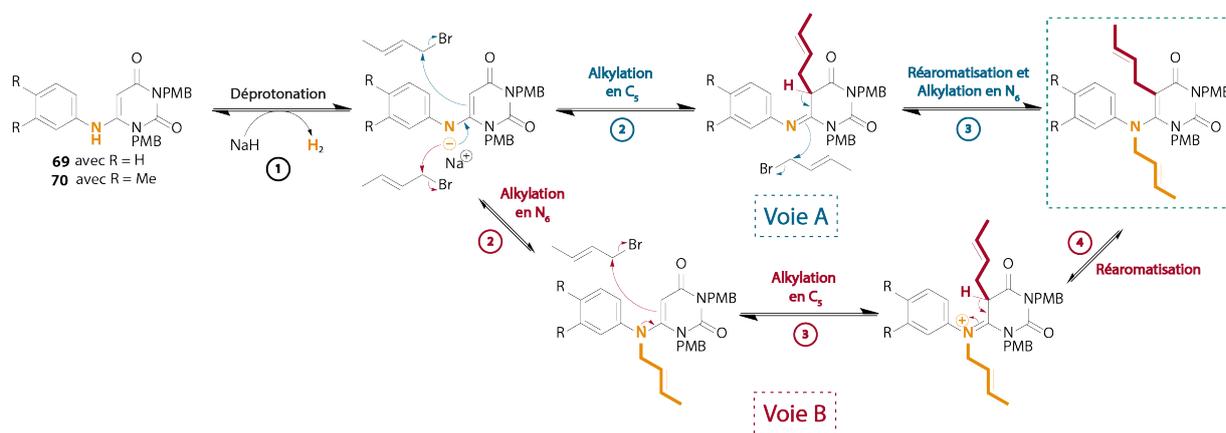


Figure 38 : Mécanisme proposé pour la di-alkylation.

Ce mécanisme débute par de la déprotonation du groupement amine en position 6 conduisant à la formation d'un amidure intermédiaire (Etape 1, Figure 38). Ce dernier peut alors réagir de deux voies distinctes :

1 – Voie A : la conjugaison de ce système provoque l'alkylation première en C₅ puis la réaromatisation du système entraîne la seconde alkylation du groupement amine en position 6 (étape 2 & 3).

2 – Voie B : ce dernier réagit directement avec l'halogénure d'alkyle puis par conjugaison, la position 5, alors nucléophile, attaque un second équivalent de (*E*)-1-bromo-but-2-ène. Le système pour se stabiliser, se réaromatise (étape 2-4).

Sur la base de ces mécanismes, les conditions de réactions ont alors été modifiées afin d'obtenir exclusivement les dérivés mono-alkylés. Ainsi, le diméthylformamide a été remplacé par de l'acétone, de par la facilité de son élimination par évaporation mais aussi pour son pouvoir de solvation qui se révèle suffisant pour nos substrats de départ. La dilution du milieu réactionnel est aussi augmentée par le passage à une concentration du produit de départ dans le solvant à 10⁻⁵ M. La réaction effectuée en milieu plus concentré (10⁻¹ M) donne lieu à un grand nombre de tâches de dégradation observées sur CCM et à un plus faible rendement (39% au lieu de 65% pour **76**). L'hétérocycle de départ est aussi introduit en excès (1 équivalent pour 0.5 équivalent de bromure de crotyle) dans le milieu réactionnel afin de conduire préférentiellement aux produits d'intérêt.

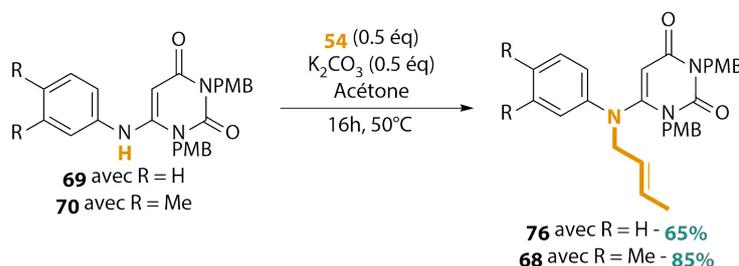
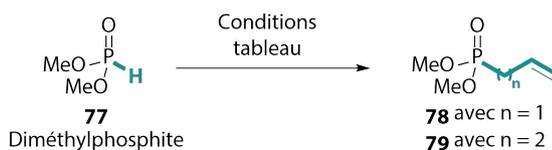


Figure 39 : Mono-alkylation sélective par SN₂.

Les synthons de départ pour la réaction de métathèse croisée **76** et **68** sont alors obtenus avec 65 % et 85 % de rendement respectif.

- Préparation des alkénylphosphonates

La formation des partenaires phosphonates est réalisée par la réaction de Michaelis-Becker dont les rendements sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Préparation des partenaires phosphonates.

Entrée	Halogénure d'alkyle	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	Bromure d'allyle	K ₂ CO ₃ , TBAB	THF _{anh}	12h, reflux	100%	75%
2	Bromure d'allyle	NaH (60%)	THF _{anh}	30 min à 0°C puis 24h à t.a.	100%	98%
3	Bromure de but-1-ènyle	NaH (60%)	THF _{anh}	30 min à 0°C puis 24h à t.a.	100%	85%

Entrée 1 : Le synthon à 4 chaînons est préparé par la mise en réaction du phosphite **77**, déprotoné par du carbonate de potassium, avec le bromure d'allyle en présence de bromure de *tert*-butylammonium (TBAB), agent de transfert de phase de cette réaction. Ces conditions permettent la formation de larges quantités de **78** et ce, sur une échelle de 50 grammes où le produit est purifié par distillation.

Entrée 2 & 3 : Les conditions de André *et al.* sont employées sur une échelle réduite de 5 grammes maximum de produit de départ **77**.¹⁰⁵ Ainsi, les deux dérivés phosphonates sont obtenus avec de très bon rendements de 98% pour **78** et 85% pour **79**. Cependant, l'augmentation de l'échelle de ces conditions provoque une légère diminution de la conversion ce qui complique la purification de **78** du fait des rapports frontaux très proches de ce dernier et de **77**.

- Réaction de métathèse croisée

Avec les synthons disponibles pour cette étape de métathèse croisée, il convient maintenant de s'intéresser à la réactivité des partenaires oléfiniques afin d'en déduire des conditions appropriées dont le choix primordial du catalyseur. Les partenaires phosphonates constituent, selon le modèle de sélectivité de Grubbs décrit dans le Tableau 3, des oléfines de type 1 avec le catalyseur de Grubbs de 2nde génération. Cependant, les synthons **76** et **68** possédant un alcène substitué en position 1 constituent des alcènes de type 2 selon ce même modèle. Ces deux types d'alcènes constituent un cas classique de métathèse croisée déjà décrit par la littérature et par notre équipe auparavant.¹³⁰ Notre attention s'est donc naturellement tournée vers l'emploi du catalyseur de Grubbs de seconde génération (**Gru-II**) avec un mode d'activation de type chauffage classique. L'apport de la cavitation ultrasonique n'est pas nécessaire dans ce cas précis car le produit ciblé ne détient pas un alcène avec une ramification importante. Les métathèses croisées entre des oléfines de type I et de type II reportées dans la littérature montrent que l'utilisation d'un excès du partenaire phosphonate (4 équivalents) s'avère nécessaire afin d'obtenir préférentiellement l'hétérodimère souhaité. Par ailleurs, le passage à 2 équivalents de ce dernier induit une chute de rendement significative.

¹⁰⁵ André, V.; Lahrache, H.; Robin, S.; Rousseau, G. Reaction of Unsaturated Phosphonate Monoesters with Bromo- and Iodo(Bis-Collidine) Hexafluorophosphates. *Tetrahedron* **2007**, 63, 10059–10066.

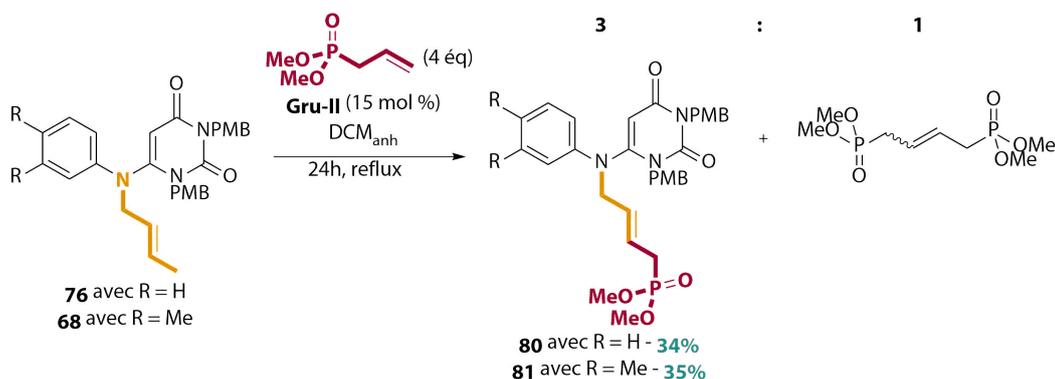


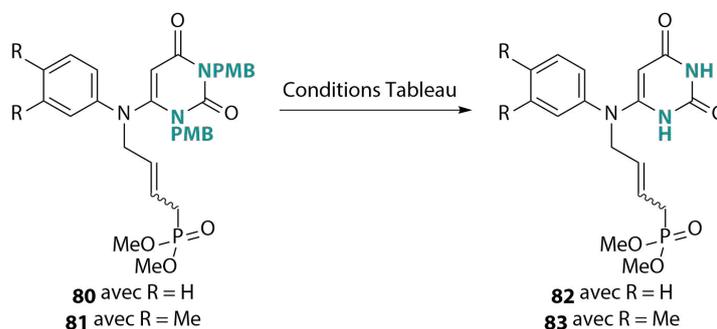
Figure 40 : Essais de métathèse croisée.

Une disparition totale des produits de départ **76** et **68** est observée sur CCM. Après 2 purifications par chromatographie sur gel de silice, les produits **80** et **81** sont obtenus en tant que mélange avec l'homodimère du partenaire phosphonate dans des proportions 3 pour 1 (déterminé par RMN). En conséquence des purifications multiples infructueuses sur ces dérivés, les rendements, aussi déterminés par RMN, sont faibles avec 34% et 35% respectivement pour **80** et **81**.

- Déprotection des groupements para-méthoxybenzyles

L'étape suivante de déprotection sur nos produits de métathèse croisée **80** et **81** est directement entreprise sans purification supplémentaire des substrats de départ :

Tableau 9 : Essais de déprotection des groupements para-Méthoxybenzyles (PMB).



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Disparition	Rendement
1	TFA (10 éq)	DCM _{anh}	30 min, MO 100°C	0%	Produit de départ
2	TFA (100 éq)	DCM _{anh}	30 min, MO 100°C	0%	Produit de départ
3	TFA (150 éq)	DCM _{anh}	30 min, MO 100°C	100%	Mélange complexe
4	CAN (4 éq)	ACN/H ₂ O	15 min, 0°C puis 15h, t.a.	100%	Mélange complexe
5	DDQ (2 éq)	Dioxane	2h, 65°C	100%	Mélange complexe
6	AlCl₃	Anisole	14h, t.a.	100%	Mélange complexe

Entrée 1,2 & 3 : S'inspirant des conditions classiques de déprotection des groupements PMB dans le DCM avec de l'acide trifluoroacétique (TFA), ces conditions sont alors transposées au micro-onde. Le premier essai comporte 10 équivalents de TFA et après activation, le produit de départ est récupéré intact. L'augmentation de la quantité de TFA jusqu'à 100 équivalents résulte aussi à la récupération du produit de départ. Cependant, le passage à 150 équivalents de ce dernier provoque la formation d'un mélange complexe sans l'observation d'une tâche majoritaire sur CCM.

Entrée 4 : Dans leur publication, Lafrate *et al.* réalise la synthèse de la 5,6-dihydro-5-fluorouracile par le biais d'une *per*-protection du noyau uracile avec des groupements PMB suivi d'une hydrofluoration sélective en position 5 et d'une déprotection de ces groupements protecteurs avec l'utilisation de cérium ammonium nitrate (CAN) dans un mélange d'acétonitrile et d'eau (3:1).¹⁰⁶ Ces conditions appliquées sur nos substrats de départ conduisent à la formation d'un mélange complexe.

Entrée 5 : Les déprotections de PMB en conditions oxydantes douces via le CAN comme dans l'entrée 4 ou organique tel que le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ, entrée 5)^{88,107} provoquent la dégradation du milieu réactionnel bien qu'une disparition totale du produit de départ soit observée.

Entrée 6 : L'utilisation de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) dans l'anisole¹⁰⁸ conduit à la dégradation du milieu réactionnel.

Ces différents essais ne permettent pas de récupérer les produits ciblés malgré un nombre d'essais conséquents sur les intermédiaires de métathèse **80** et **81** mais aussi sur **76** et **68** qui sont plus facilement accessibles et préparés dans des quantités supérieures.

4 Conclusions et perspectives

Dans cette première approche, l'intérêt s'est principalement porté sur la mise au point d'un procédé synthétique convergent pour la synthèse de nouveaux ANPs, analogues du FAD, possédant une chaîne latérale de type but-2'-ényle ou pent-2'-ényle. Cette approche s'est appuyée sur deux étapes clés :

1- La réaction de Buchwald-Hartwig, peu reportée en position 6 des noyaux pyrimidines, résultant en la *N*-arylation avec de très bons rendements et permet alors une alkylation sélective sur l'azote central.

2- La réaction de métathèse croisée qui a permis le greffage de la chaîne latérale sur ces bases non canoniques.

Malgré le développement de ces méthodes appliquées à la synthèse convergente de nos dérivés, l'étape de déprotection se révèle inefficace et ne permet pas l'obtention de l'intermédiaire clé permettant l'accès aux deux tricycles aromatiques ciblés. Afin de réaliser la synthèse de ces composés, il serait intéressant d'utiliser un groupement protecteur plus labile.

¹⁰⁶ LaFràte, A. L.; Katzenellenbogen, J. A. Improved Chemical Syntheses of 5,6-Dihydro-5-Fluorouracil. *J Org Chem* **2007**, *72*, 8573–8576.

¹⁰⁷ Doherty, J.; Stelmach, J.; Chen, M.-H.; Liu, L.; Hunt, J.; Ruzek, R.; Goulet, J.; Wisnoski, D.; Natarajan, S. R.; Rupprecht, K.; *et al.* (Halo-Benzo Carbonyl)Heterocyclo Fused Phenyl P38 Kinase Inhibiting Agents. W002058695 (A1), August 1, 2002.

¹⁰⁸ Belaroussi, R.; Bouakher, A. E.; Marchivie, M.; Massip, S.; Jarry, C.; Hakmaoui, A. E.; Guillaumet, G.; Routier, S.; Akssira, M. Convenient Synthesis of New N-3-Substituted Pyrido[1',2':1,5]Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives. *Synthesis* **2013**, *45*, 2557–2566.

III. Synthèse des dérivés portant le noyau isoalloxazine

1 Rétrosynthèse envisagée

Deux protocoles de synthèse des noyaux isoalloxazines ont été mentionnés dans la littérature et font appel soit à la cyclisation nitrative d'un intermédiaire de type 6-anilino-uracile **63**⁷⁰ soit à la condensation en milieu acide d'un dérivé d'*o*-phénylènediamine mono-alkylé **84** avec l'acide 5,5-dihydroxybarbiturique¹⁰⁹ (alloxane monohydrate, **85**) (Figure 41) :

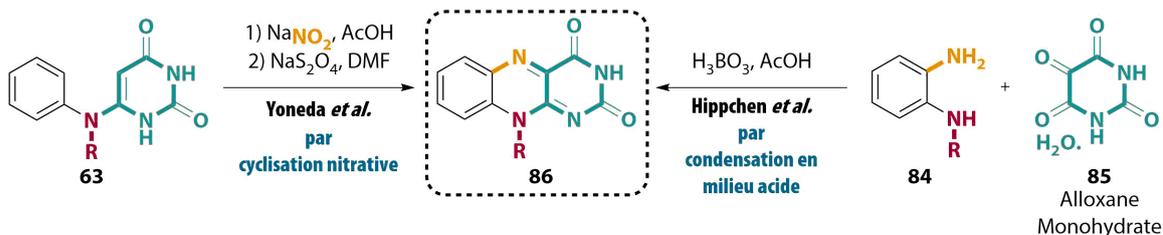


Figure 41 : Protocoles publiés dans la littérature conduisant au noyau isoalloxazine.

L'emploi de la seconde méthode par condensation donne lieu alors à deux stratégies possibles.¹⁰⁹ Ainsi, **87** provient, dans la première stratégie, d'une cyclisation par condensation entre l'alloxane monohydrate et le dérivé d'*o*-phénylènediamine provenant lui-même de **88** par réduction du groupement nitro. Cet intermédiaire est obtenu par réaction de métathèse croisée entre un partenaire phosphonate et la 2-nitroaniline mono-crotylée. La deuxième stratégie diffère par l'emploi de la réaction de métathèse croisée réalisée après la formation du noyau isoalloxazine.

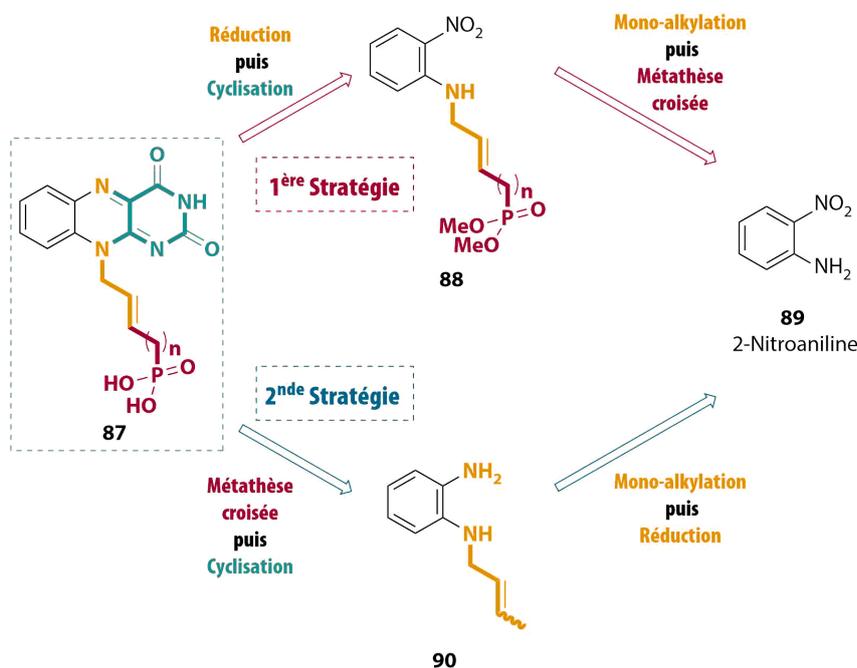


Figure 42 : Rétrosynthèses envisagées des 2 stratégies.

¹⁰⁹ Hippchen, H. Synthesen von 6-Nitro-Flavinen. *Chem Ber* **1947**, *80*, 263–273.

2 Résultats et discussions

➤ Première Approche

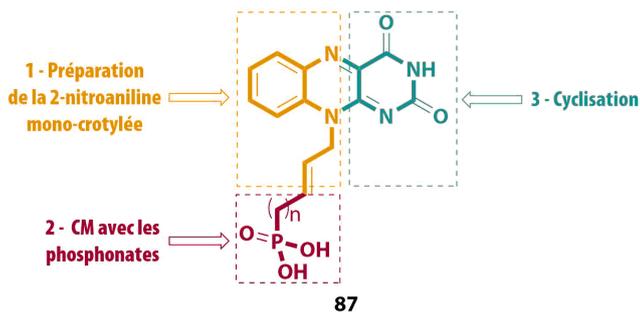


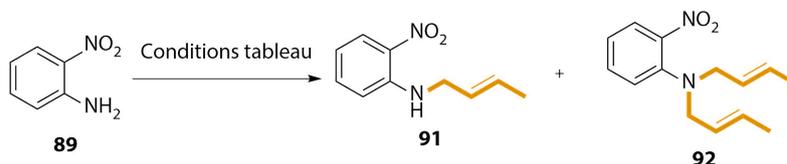
Figure 43 : Stratégie de synthèse de **87**.

Dans cette synthèse, l'objectif étant d'accéder au produit **87**, nous nous intéresserons ainsi dans un premier temps, à la préparation de la 2-nitroaniline mono-substituée par un groupement (*E*)-but-2-ène puis à l'introduction des partenaires phosphonates par métathèse croisée. Enfin, nous nous intéresserons à la réduction du groupement nitro et à la réaction de cyclisation conduisant au noyau isoalloxazine.

- Préparation de la 2-nitroaniline mono-alkylée

La mono-alkylation de dérivé de la 2-nitroaniline est reportée par l'équipe de Fonquerna par la mise en réaction de la 2-nitroaniline **89** avec 1 équivalent de bromure d'allyle, une base en excès, le carbonate de potassium dans le diméthylacétamide (DMA), remplaçant le DMF pour son élimination plus pratique par extraction à l'éther diéthylique.¹¹⁰ Ces conditions ont été appliquées à notre substrat de départ, la 2-nitroaniline (Tableau 10) :

Tableau 10 : Optimisation de la mono-substitution.



Entrée	Réactifs	Equivalents d'halogénure d'alkyle	Solvant	Conditions	Rendement de 91
1	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	1	DMA	36h, 75°C	47%
2	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	1.5	DMA	36h, 75°C	64%
3	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	1.7	DMA	36h, 75°C	54%
4	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	2	DMA	36h, 75°C	Dialkylation exclusive

¹¹⁰ Sole, F.; Carranco, M.; Aiguade, B.; Puig, D.; Fonquerna, P. New Cyclohexyl and Quinuclidinyl Carbamate Derivatives Having Beta2 Adrenergic Agonist and M3 Muscarinic Antagonist Activity. WO2014095920 (A1), June 26, 2014.

Entrée 1 : En appliquant les conditions de Fonquerna *et al.* avec un temps de réactions de 4h, on observe une conversion minimale d'environ 10% (déterminé par RMN). Le temps de réaction est alors prolongé jusqu'à 36h, ce qui n'induit pas une disparition totale du produit de départ mais permet l'obtention du dérivé souhaité avec un rendement modeste de 47%. Ce faible rendement et le temps de réaction assez long s'expliquent par la désactivation de l'amine exocyclique due au fort effet mésomère attracteur du groupement nitro adjacent.

Entrée 2 & 3 : L'augmentation des quantités d'halogénures d'alkyles jusqu'à 1.5 et 1.7 équivalents induisent une disparition plus importante du produit de départ sans permettre sa conversion totale. Les rendements sont alors proportionnellement augmentés à 64% avec 1.5 équivalents et 54% avec 1.7 équivalents. Il est important de noter l'apparition concomitante de quantité significative du dérivé di-alkylé avec ces essais.

Entrée 4 : L'utilisation de 2 équivalents de bromure de crotyle conduit exclusivement à la formation du dérivé di-alkylé.

La préparation de **91** a aussi été effectuée avec les conditions précédemment présentées de mono-alkylation des anilines :

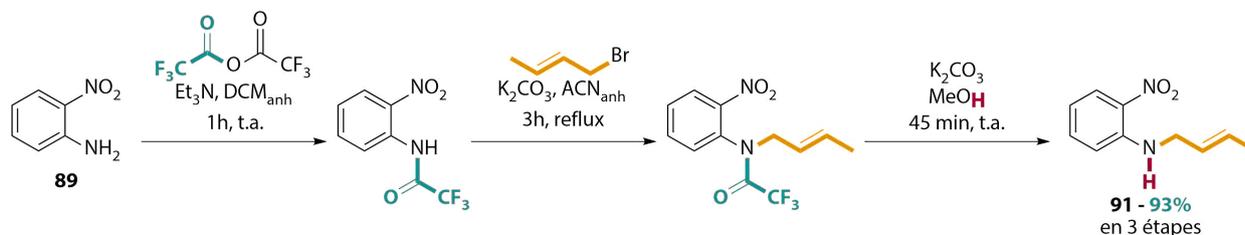


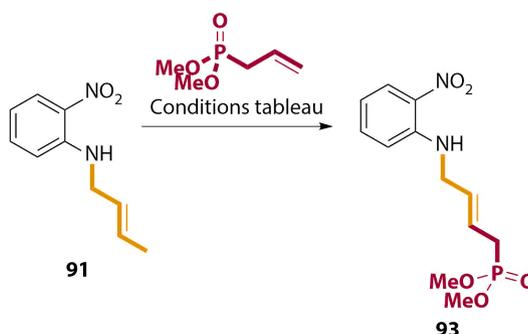
Figure 44 : Mono-alkylation sélective de la 2-nitroaniline.

Ainsi, **89** est protégé par la formation d'un trifluoroacétamide puis l'intermédiaire obtenu réagit avec le (*E*)-1-bromobut-2-ène. La déprotection du trifluoroacétamide permet l'obtention du produit **91** avec un rendement de 93% sur 3 étapes au lieu de 64% en 1 étape.

- Réaction de métathèse croisée

Comme précédemment, le partenaire phosphonate **78** constitue une oléfine de type 1 avec le catalyseur de Grubbs de 2nde génération et le synthon **91** fonctionnalisé par le groupement (*E*)-but-2-ène constitue un alcène de type 2 selon le modèle de Grubbs. La réaction de métathèse croisée entre **91** et l'alkénylphosphonate **78** a nécessité une mise au point (Tableau 11) :

Tableau 11 : Métathèse croisée entre **91** et **78**.



Entrée	Equivalents (Phosphonate-Aniline)	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	2 – 1	Gru-II (15 mol%)	DCM _{anh}	24h, 55°C	0%	X
2	1 – 2	Gru-II (3x5 mol %)	DCM _{anh}	16h,))) 55°C	<20%	5%
3	1 – 2	Gru-II (3x5 mol %)	H ₂ O	16h,))) 55°C	60%	16%
4	1 – 2	APTS (2 éq) Gru-II (15 mol %)	DCM _{anh}	24h, 55°C	100%	42%
5	1 – 2	APTS (2 éq) Gru-II (3x5 mol %)	DCM _{anh}	16h,))) 55°C	100%	49%

Entrée 1 : Le doublet non-liant de l'azote étant délocalisé par effet mésomère attracteur du groupement nitro, les premiers essais ont été effectués sans étape de protection préliminaire et dans les conditions classiques développées par notre équipe pour la métathèse croisée avec des partenaires phosphonates. Ainsi, les substrats **78** et **91** sont mis en réaction avec un ratio de 2 :1 avec l'utilisation du catalyseur de Grubbs de 2^{nde} génération dans le DCM_{anh} à reflux pendant 24h.¹³⁰ Aucune conversion n'est alors observée et le produit de départ est récupéré intact.

Entrée 2 : L'activation ultrasonique est alors employée du fait de l'énergie mécanique apportée par cette activation qui suffit à rompre des liaisons faibles permettant l'activation du catalyseur¹¹¹ mais aussi qui induit une dissociation de notre substrat avec le catalyseur. L'apport des ultrasons allié à un intervertissement du nombre d'équivalent des substrats sont alors entrepris ; la conversion du produit de départ est d'environ de 20% mais le produit ciblé n'est isolé qu'avec un faible rendement de 5%.

Entrée 3 : Les récentes avancées dans le domaine de la métathèse des oléfines montrent que l'utilisation de l'eau comme alternative à des solvants usuels tel que le DCM, le toluène ou le DCE provoque la formation d'une émulsion concentrée avec les substrats et le catalyseur favorisant ainsi la rencontre de ces derniers et se traduisant de manière expérimentale par de très bon rendements de métathèse croisée et cyclisante.^{80,112} Ces conditions sont alors employées et une conversion moyenne de 60% est observée. Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 16% après 2 purifications.

Entrée 4 : Une autre méthode consiste à transformer les amines secondaires en sels d'ammonium avec un acide organique. Ainsi, Robinson *et al.* reporte les meilleurs rendements par l'utilisation d'acide paratoluènesulfonique (APTS) après un screening exhaustif de plusieurs acides.¹¹³ La disparition totale de **78** est observée et après traitement et purification, le produit de couplage est obtenu avec un rendement satisfaisant de 42%.

Entrée 5 : Sous sonication, la conversion est totale et le rendement après work-up et purification sur gel de silice est de 49%.

¹¹¹ Piermattei, A.; Karthikeyan, S.; Sijbesma, R. P. Activating Catalysts with Mechanical Force. *Nat Chem* **2009**, *1*, 133–137.

¹¹² Gułajski, Ł.; Śledź, P.; Lupa, A.; Grela, K. Olefin Metathesis in Water Using Acoustic Emulsification. *Green Chem* **2008**, *10*, 271–274.

¹¹³ Woodward, C. P.; Spiccia, N. D.; Jackson, W. R.; Robinson, A. J. A Simple Amine Protection Strategy for Olefin Metathesis Reactions. *Chem Commun* **2010**, *47*, 779–781.

- Réduction et cyclisation

La réduction consécutive du groupement NO₂ est réalisée en présence de chlorure d'étain dihydraté (SnCl₂.2H₂O) du fait de la compatibilité de cette méthode avec notre groupement (*E*)-but-2-ène. Le mécanisme de cette réaction est rappelé dans la figure suivante :

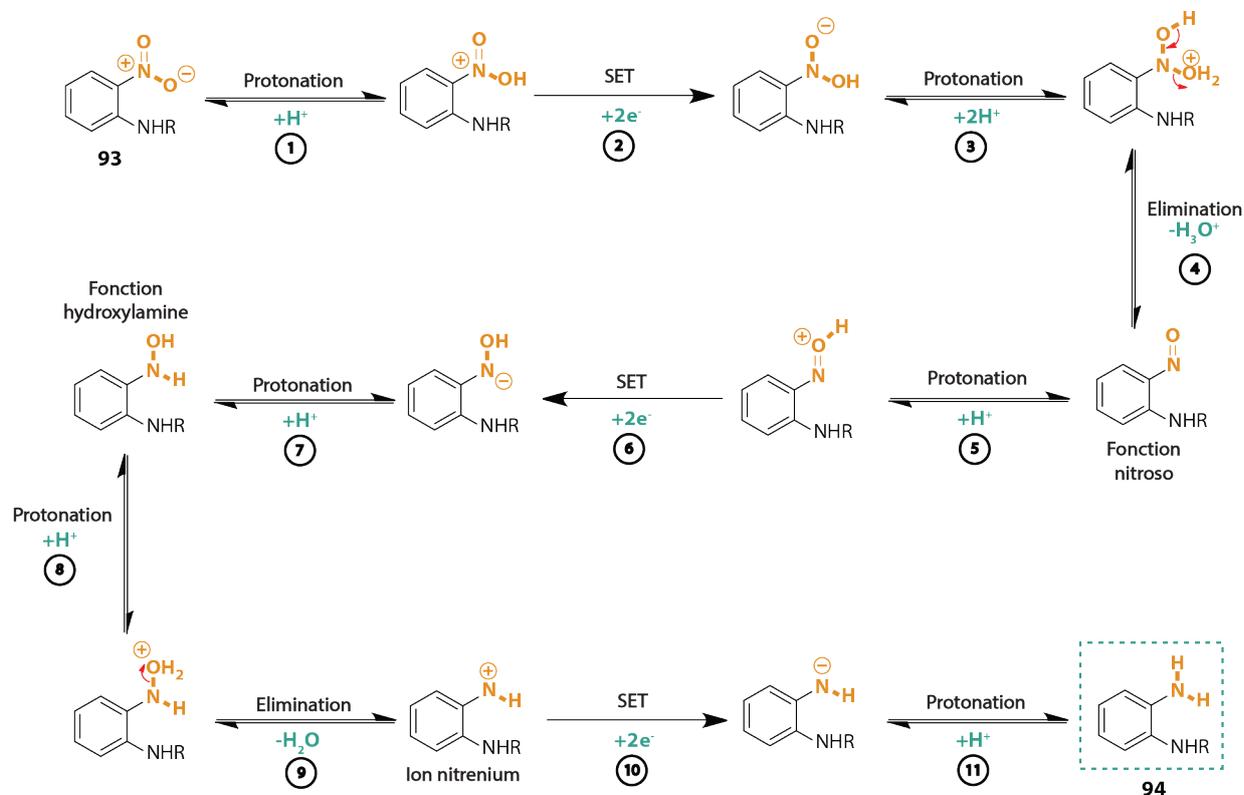
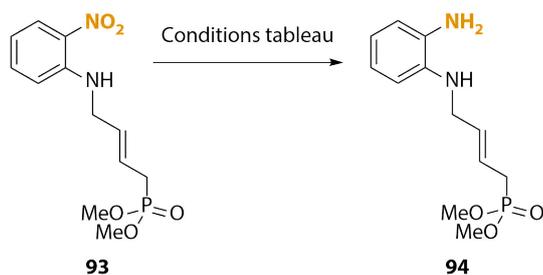


Figure 45 : Mécanisme pour la réduction du groupement NO₂.

Après recherche bibliographique, plusieurs équipes reportent la réduction du groupement nitro de 2-nitroanilines substituées par un groupement allyle dont les résultats sont donnés dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Réduction du groupement nitro de **93**.



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	SnCl ₂ .2H ₂ O	EtOH	10 min, MO 140°C	100%	22% ^a
2	SnCl ₂ .2H ₂ O	EtOH	12h, 90°C	100%	86% ^a

^a: Rendement calculé par RMN dans le DMSO-d₆

Entrée 1 : Le substrat **93** est ainsi solubilisé dans l'EtOH dans un vial micro-onde sur lequel sont ajoutés 5 équivalents de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.¹¹⁴ Le milieu réactionnel est alors irradié pendant 10 min à 140°C ce qui induit une disparition totale du substrat de départ mais aussi une forte présence de tâches de dégradation. Après extraction, le brut obtenu ne subit pas de purification supplémentaire du fait d'une forte propension du produit à la diffusion sur gel de silice. Le produit **94** est alors obtenu avec un faible rendement de 22%.

Entrée 2 : Les conditions de l'entrée 1 sont alors reprises mais l'activation micro-onde est abandonnée au profit d'un reflux pendant 12h en chauffage classique ce qui a pour conséquence une diminution notable des tâches de dégradation sur CCM et une augmentation du rendement qui passe à 86% tout en conservant une conversion totale du produit de départ. **94** est directement employé dans l'étape de condensation suivante avec l'alloxane par catalyse acide.

Les conditions classiques de cette étape consistent en la solubilisation première de l'alloxane monohydrate **85** dans l'acide acétique suivi de l'ajout d'acide borique et enfin de l'analogue d'*o*-phénylènediamine qui sont mis en réaction à température ambiante pendant 4h.¹⁰⁹ Le mécanisme de cette réaction est proposé dans la figure suivante :

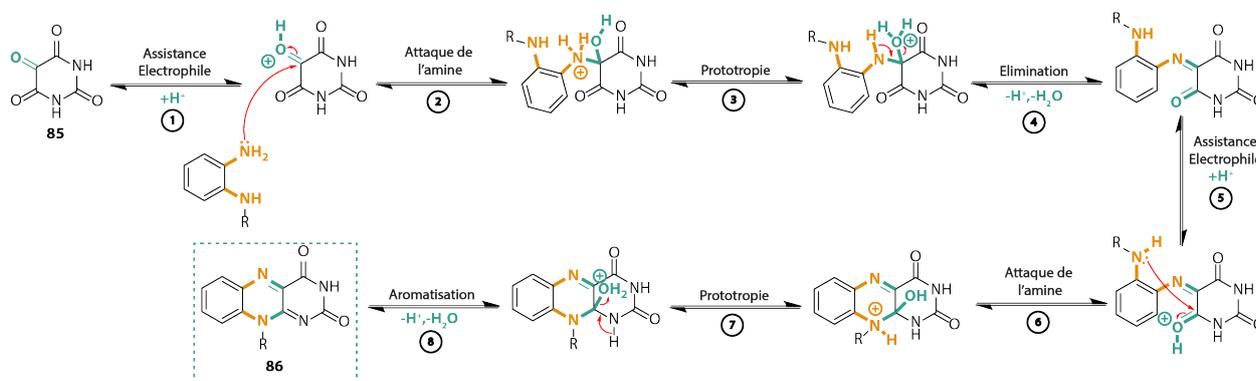


Figure 46 : Mécanisme envisagé pour la formation du noyau isoalloxazine dans les conditions de Hippchen *et al.*

Cette réaction est initiée par l'activation du carbonyle en position 5 de **85** qui est le résultat du milieu fortement acide dans lequel ce substrat est placé. Cet intermédiaire très électrophile est alors attaqué par une fonction amine de l'*o*-phénylènediamine ou d'un de ses dérivés résultant en la formation d'un ammonium ponté qui libère, par prototropie, un de ses protons sur l'alcool adjacent. L'élimination d'eau suivante permet la formation du premier pan du noyau isoalloxazine. Cette série d'étape est alors répétée une seconde fois par la condensation de la seconde amine qui, après aromatisation, fournit le composé **86** (Figure 46).

¹¹⁴ Spinks, D.; Ong, H. B.; Mpamhanga, C. P.; Shanks, E. J.; Robison, D. A.; Collie, I. T.; Read, K. D.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Brenk, R.; *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Inhibitors of Trypanosoma Brucei Pteridine Reductase 1. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 302–308.

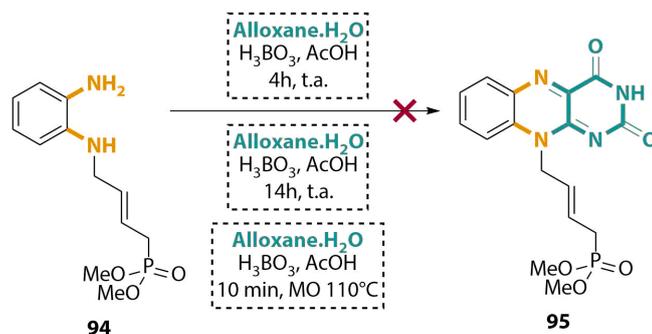


Figure 47 : Essais de formation du noyau isoalloxazine

Tous les essais de condensation n'ont pas permis d'observer la formation de **95** sur CCM, par RMN ou MS que ce soit par les conditions de Hippchen, en allongeant le temps de réaction ou en réalisant une activation au micro-onde (Figure 47). Plusieurs hypothèses sont alors probables permettant l'explication de ces résultats, l'encombrement stérique du dérivé **94** est trop important empêchant alors la condensation ? La réactivité de **94** est trop faible ? Une désactivation de **94** par protonation liée aux conditions acides se produit au cours de la réaction ?

➤ Seconde Approche

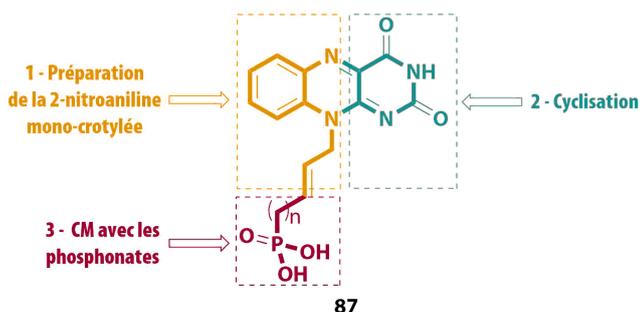


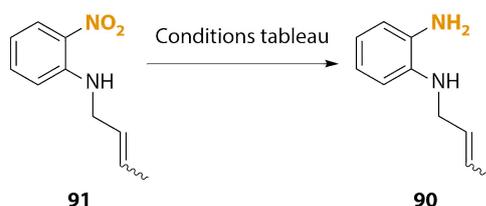
Figure 48 : Seconde stratégie de synthèse de **87**

Contrairement à la première approche, l'étape de métathèse croisée est ainsi placée à la fin du schéma réactionnel. Cette seconde approche débute par la préparation de la 2-nitroaniline mono-substituée par un groupement (*E*)-but-2-ène. Cet intermédiaire subit une réduction du groupement nitro et ce dérivé est directement employé dans la réaction de condensation et enfin, l'étape de métathèse croisée permet le greffage, sur la chaîne latérale, de l'alkénylphosphonate correspondant fournissant les composés **87** avec $n = 1$ ou 2 .

- Réduction et Cyclisation

La réduction de **91** préparé précédemment est effectuée fournissant le substrat de l'étape de condensation (Tableau 13) :

Tableau 13 : Réduction du groupement nitro de **91**



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	SnCl ₂ .2H ₂ O	EtOH	10 min, MO 140°C	100%	19% ^a
2	SnCl ₂ .2H ₂ O	EtOH	10 min, MO 100°C	100%	89% ^a
3	Zn cat	AcOH	14h, t.a.	100%	61% ^a

^a: Rendement calculé par RMN

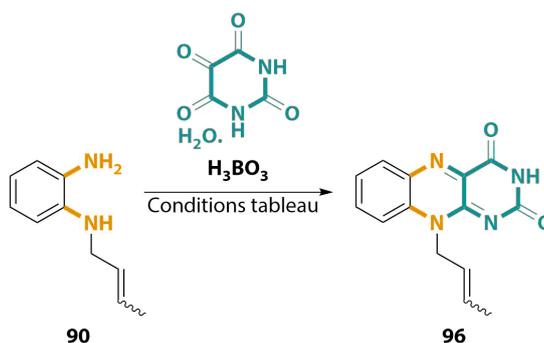
Entrée 1 : La réduction sous activation micro-ondes à 140°C en présence de SnCl₂.2H₂O a conduit à la formation du produit souhaité accompagné d'une forte dégradation observée par CCM. Le rendement de 19% est estimé par RMN car les mêmes problèmes de purification sont observés pour **90**.

Entrée 2 : Une diminution de la température d'activation à 100°C minimise la dégradation et le dérivé **90** souhaité est obtenu avec un très bon rendement de 89%.

Entrée 3 : L'utilisation plus classique de zinc métallique en quantité catalytique dans l'acide acétique conduit au produit souhaité avec un rendement satisfaisant de 61% cependant, sans l'observation de dégradation sur CCM.

La condensation par catalyse acide de **90** sur l'alloxane monohydrate est alors entreprise (Tableau 14) :

Tableau 14 : Formation du noyau isoalloxazine de **96**



Entrée	Equivalents des Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	1 - 1	AcOH	4h, t.a.	<40%	22%
2	1 - 1	AcOH	4h, 50°C	<40%	23%
3	1 - 1	AcOH	10 min, MO 110°C	<40%	22%
4	2 - 2	AcOH	4h, t.a.	<50%	32%

Entrée 1,2 & 3 : L'apport de l'activation est étudié du fait du faible rendement de 22% obtenu avec les conditions classiques de Hippchen. Le chauffage classique ou l'activation micro-onde ne résulte pas, à la fois, en une augmentation significative de la conversion qui reste en dessous des 40% et en une augmentation du rendement qui est constant pour ces 3 entrées.

Entrée 4 : Une augmentation du nombre d'équivalents des réactifs est alors effectuée et a pour conséquence un léger accroissement du rendement qui passe à 32%. La réactivité de **90** semble faire défaut et là encore, la réaction semble suspendue par la faible réactivité de la diamine protonée.

- Réaction de métathèse croisée

Un essai de métathèse croisée est effectué dans les conditions classiques avec 4 équivalents du partenaire phosphonates **78**, 15 mol% du pré-catalyseur (Gru-II) à reflux pendant 24h (Figure 49).

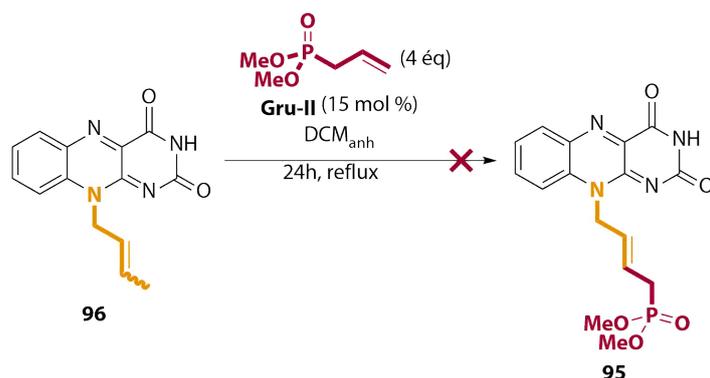


Figure 49 : Essais préliminaire de métathèse croisée avec **96**

Aucune disparition du produit de départ n'est observée en CCM, RMN ou MS et ce, malgré la formation de l'homodimère de **78**. Comme précédemment, la seule hypothèse rationnelle afin d'expliquer cette non-conversion du substrat est l'empoisonnement du catalyseur par la présence d'amides et d'imines. Une étape de protection par un groupement benzoyle est alors mise en place en mettant en réaction notre substrat de départ **96** dans un mélange de pyridine anhydre (Py) et d'acétonitrile anhydre (ACN) avec une proportion de 2:5 et en ajoutant à cette solution, 3 équivalents de chlorure de benzoyle (BzCl), cette dernière est alors agitée pendant 24h à température ambiante (Figure 50).

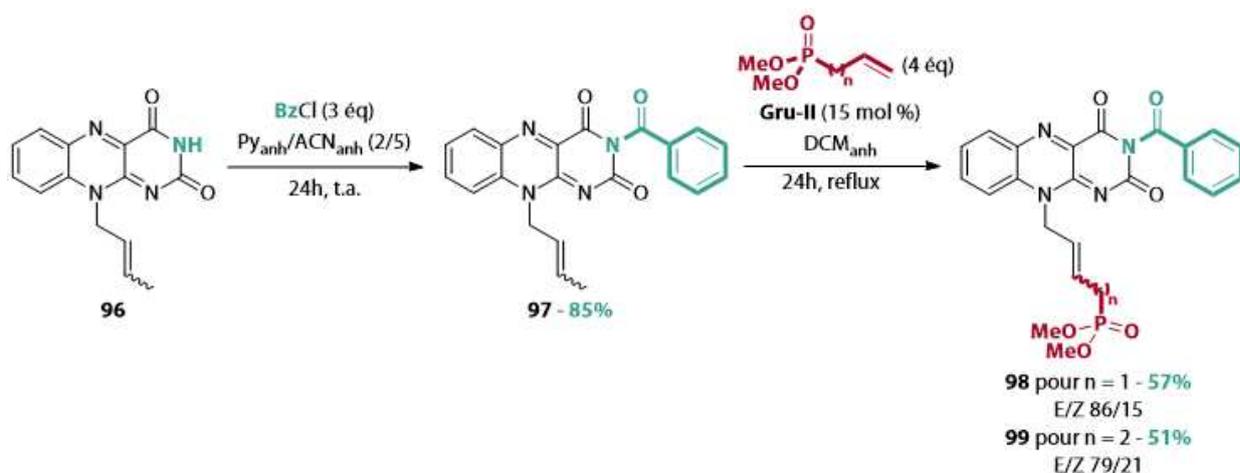


Figure 50 : Protection de l'azote N₃ de **96** puis métathèse croisée avec les partenaires phosphonates

Après traitement et purification, le produit benzoylé **97** est obtenu avec un très bon rendement de 85% et cet intermédiaire est directement engagé dans l'étape de métathèse avec le diméthylallylphosphonate **78** et le diméthylbuténylephosphonate **79**. Les produits de couplage **98** et **99** sont alors obtenus, après deux purifications par chromatographie sur gel de silice, avec des rendements respectifs de 57% pour la chaîne latérale à 4 carbones et 51% pour la chaîne latérale à 5 carbones.

- Déprotections finales

Du fait de la nécessité d'une purification entre ces deux étapes de déprotection, ces dernières sont alors effectuées de manière séquentielle, d'une part, par la déprotection des benzoyles en conditions basiques par l'action d'ammoniaque à 7N dans le MeOH et d'autre part, les éthers méthyliques du phosphonates sont déprotégés par l'action du bromure de triméthylsilane (TMSBr) dans de l'ACN.

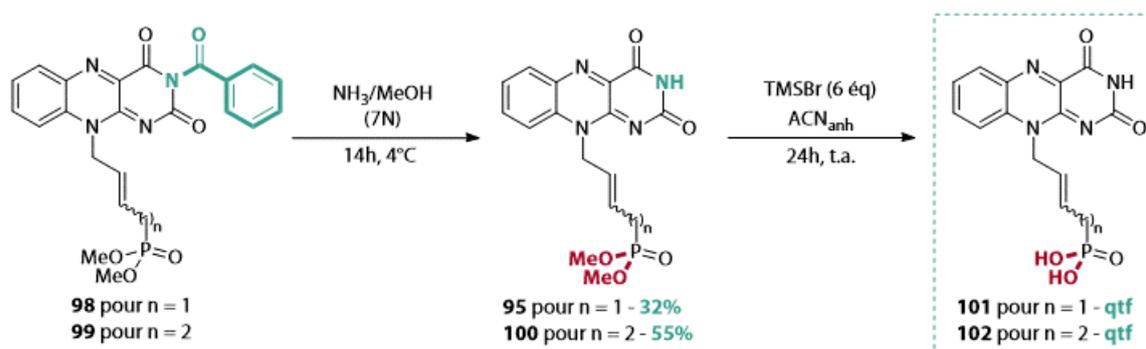


Figure 51 : Déprotections finales conduisant aux produits cibles.

La première étape permet la formation des deux produits débenzoylés **95** et **100** avec de faibles rendements respectifs de 32% pour $n = 1$ et 55% pour $n = 2$. Ces résultats s'expliquent par la séparation difficile du produit avec le benzamide, formé au cours de la réaction, qui montre un R_f très proche des dérivés obtenus ce qui résulte en la nécessité de réaliser deux colonnes chromatographiques sur gel de silice. Dans le cas précis de **95**, il est observé une autre tâche jaune fluorescente sur CCM témoignant de la présence du noyau isoalloxazine dans la structure de ce produit secondaire. Après isolation et analyse RMN, cette tâche correspond au dérivé monobenzoylé **103** dont la chaîne latérale a été éliminée (Figure 52).

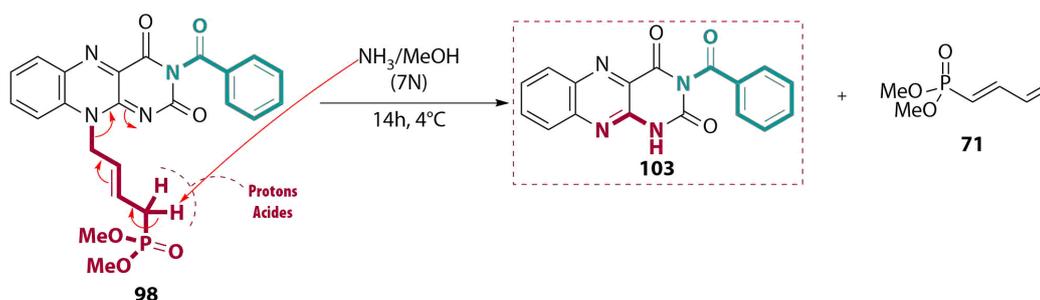


Figure 52 : Mécanisme proposé pour la formation de **103**

L'obtention de ce produit secondaire s'explique par l'acidité des protons en α du phosphonate qui, après être déprotonnés par l'ammoniaque et du fait de la conjugaison des électrons π de ce système, provoque l'élimination de la chaîne latérale par la formation du composé **71**. Les produits déprotégés **95** et **100** sont ensuite traités avec le TMSBr dans l' ACN_{anh} permettant la formation des acides phosphoniques correspondants de manière quantitative. Le traitement de cette réaction est quelque peu modifié, contrairement à la méthode classique qui consiste à solubiliser le produit dans de l'eau et à laver cette phase aqueuse par du DCM ce qui permet de retirer les traces de TMSBr. Dans notre cas, les produits **101** et **102** pouvant être apparentés à des tensioactifs, avec une grosse tête apolaire (noyau isoalloxazine) et une tête très hydrophile (acide phosphonique) séparés par une chaîne latérale, ne se solubilisent seulement que dans du DMSO ou dans un mélange eau:éthanol en proportion 1:1. Les lavages au DCM sont alors remplacés par des sonications dans le mélange eau:éthanol pendant 10 min suivi d'une évaporation comme décrit par Jansa *et al.*¹¹⁵

¹¹⁵ Jansa, P.; Hradil, O.; Baszczyński, O.; Dračinský, M.; Klepetářová, B.; Holý, A.; Balzarini, J.; Janeba, Z. An Efficient Microwave-Assisted Synthesis and Biological Properties of Polysubstituted Pyrimidinyl- and 1,3,5-Triazinylphosphonic Acids. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 865–871.

3 Tests biologiques

Les tests biologiques de ces composés sur la Mtb-ThyX ont été effectués au sein de l'équipe du Pr. Hannu Myllykallio et du Dr. Hubert Becker, MCU au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) à l'Université de Paris-Saclay. L'évaluation biologique de ces derniers a été effectuée par la mesure de l'activité de l'oxydation du NADPH à 37 ° C dans des plaques à 96 puits (Greiner Bio-One). Ainsi, cent microlitres de mélange réactionnel sont placés dans chacun des puits contenant le tampon pH HEPES à 50 mM (pH 8,6), une solution aqueuse de NaCl à 150 mM, de FAD à 50 µM, de β-mercaptoethanol à 1,43 mM, de NADPH à 500 µM et 10 µM de Mtb-ThyX purifié. La concentration de dUMP reste constante à 100 µM dans le milieu réactionnel, cependant, celle de nos composés a varié entre 50 et 200 µM. Après l'ajout dans chaque puit de ces différentes solutions sur les plaques de microtitrage, ces dernières ont été transférées sur le lecteur de microplaques Chameleon II (Hidex). Les réactions sont initiées par l'injection automatique du NADPH dans les puits individuels, limitant ainsi le nombre de puits pour chaque manipulation, et l'activité de ThyX a été mesurée en suivant une diminution de l'absorbance à 340 nm. Un coefficient d'extinction molaire de 6220 M⁻¹.cm⁻¹ à 340 nm (ϵ_{340}) a été utilisé pour quantifier l'oxydation du NADPH. Des échantillons avec des réactions sans DMSO et sans enzyme ont été utilisés comme contrôles de ces évaluations.

Tableau 15 : Résultats de l'évaluation anti-FDTS sur Mtb-ThyX

Entrée	Composé	[I] = 200 µM + FAD		[I] = 200 µM + FAD	
		$V_i \times 10^{-2}$ ($\delta DO.s^{-1}$)	% inhibition	$V_i \times 10^{-2}$ ($\delta DO.s^{-1}$)	% inhibition
1	Sans enzyme	0.0083	X	0.0109	X
2	101	0.1315	-4.5	0.1114	-2.0
3	102	0.1068	15.1	0.1095	-0.3
4	Composé Témoin	0.0041	96.7	0,0001	99.9
5	Contrôle sans composé	0.1258	/	0.1092	/

Avec une concentration de 200 µM de nos composés dans le milieu réactionnel, les 2 études cinétiques ne révèlent qu'une légère inhibition de la FDTS, inférieure à 20%, pour le composé **102**.

4 Conclusions et perspectives

Le développement de deux approches synthétiques différentes pour l'obtention des dérivés souhaités **101** et **102** de type flavine substituée sur l'azote N_{10} par une chaîne latérale à 4 ou 5 chaînons sous forme d'acide phosphonique a été entrepris. La première approche caractérisée par son étape de métathèse croisée préalable à la formation du noyau isoalloxazine n'a pas permis l'obtention de nos produits. La seconde approche caractérisée par l'étape de formation du noyau isoalloxazine effectuée avant l'étape clef de métathèse croisée nous a conduit à mettre en place une étape de protection par un groupement benzoyle de l'azote N_3 afin d'empêcher l'empoisonnement du catalyseur. Les tests biologiques de ces composés n'ont pas montré d'inhibition significative sur Mtb-ThyX mais il serait intéressant de tester ces composés *in-vivo* par analogie avec la roséoflavine qui cible une multitude d'étapes biochimiques bactériennes.

IV. Synthèse des dérivés portant le noyau 5-déazaflavine

1 Rétrosynthèse envisagée

Comme pour les dérivés tricycliques de type flavine, la littérature mentionne trois méthodes principales dont la cyclisation par l'emploi du réactif de Vilsmeier-Haack à partir d'un intermédiaire de type 6-anilinouracile **63**, une réaction de Friedländer entre l'acide barbiturique **105** et un dérivé de 2-aminobenzaldéhyde **106** qui permet la construction du noyau quinoline central¹¹⁶ et enfin, la construction du noyau pyrimidine avec une cyclisation en présence d'urée sur un analogue de **107**¹¹⁷ (Figure 53) :

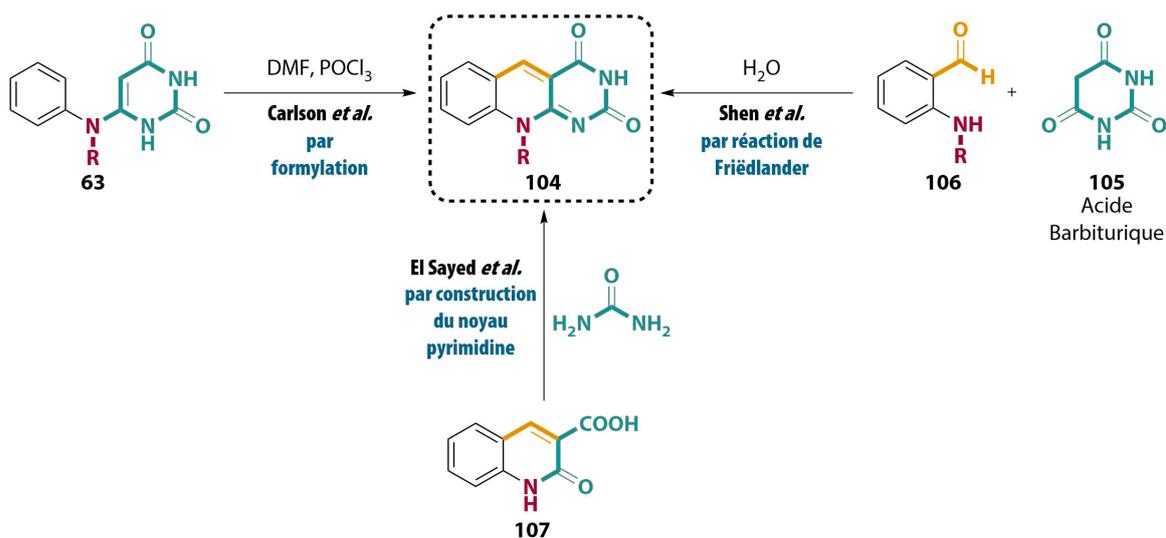


Figure 53 : Protocoles reportés dans la littérature conduisant au noyau 5-déazaflavine.

N'ayant pas pu obtenir un intermédiaire de type **63** (Cf Partie II) et les conditions rudes permettant la cyclisation avec de l'urée, notre intérêt s'est porté alors sur la réaction de Friedländer qui est réalisée dans l'eau pendant 3h à 70°C.¹¹⁶ La formation du noyau quinoline central nécessite l'obtention du dérivé **106** substitué par la chaîne latérale de type butèn-2-yle ou pentèn-2-yle phosphonate. Par conséquent, deux stratégies sont alors imaginables afin d'obtenir cet intermédiaire de synthèse clé (Figure 54) :

¹¹⁶ Shen, Q.; Wang, L.; Yu, J.; Liu, M.; Qiu, J.; Fang, L.; Guo, F.; Tang, J. Synthesis of Quinolines via Friedländer Reaction in Water and under Catalyst-Free Conditions. *Synthesis* **2012**, *44*, 389–392.

¹¹⁷ el-Sayed, O. A.; el-Bieh, F. M.; el-Aqeel, S. I.; al-Bassam, B. A.; Hussein, M. E. Novel 4-Aminopyrimido[4,5-b]Quinoline Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Boll Chim Farm* **2002**, *141*, 461–465.

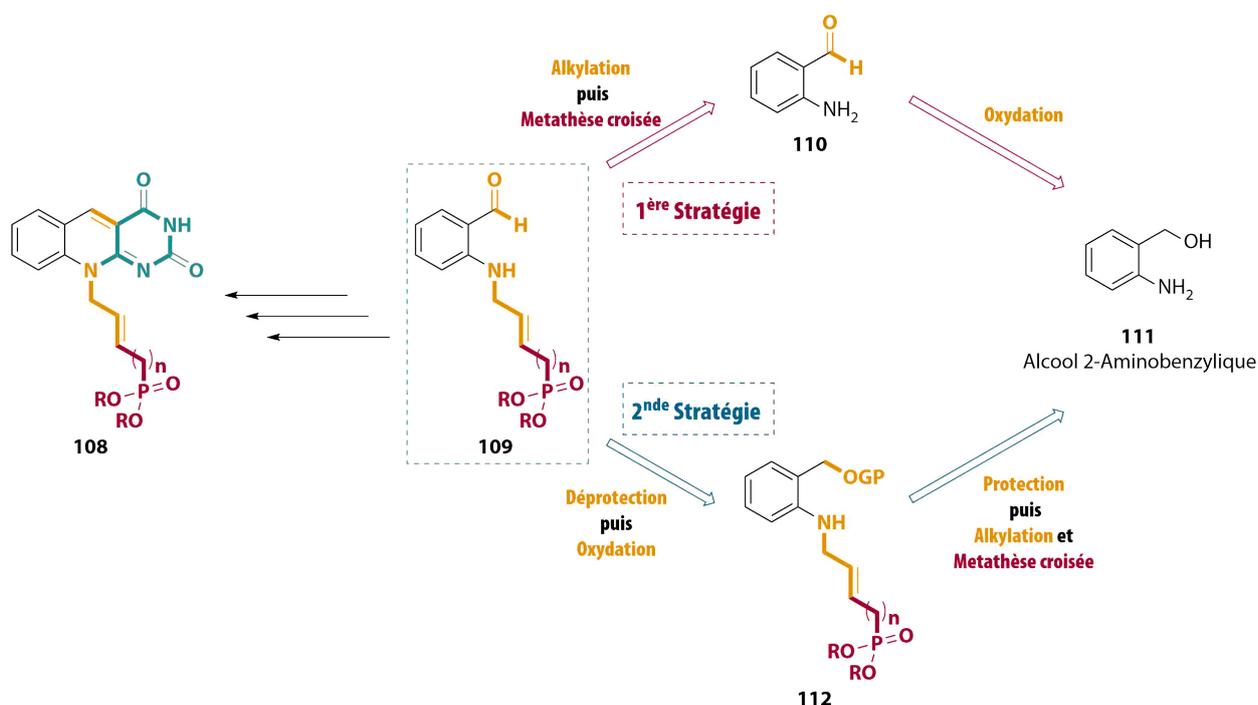


Figure 54 : Rétrosynthèses envisagées pour les deux approches.

La première stratégie consiste à obtenir **109** par une étape de mono-alkylation sélective suivi d'une étape de métathèse croisée sur le dérivé **110**, ce dernier provenant de l'oxydation de la fonction alcool en aldéhyde de l'alcool 2-aminobenzyle **111**. Le second schéma réactionnel est moins convergent du fait que la cyclisation est effectuée post-métathèse croisée. Ainsi, **109** provient du composé **112** par déprotection puis oxydation. Le greffage de la chaîne latérale est donc effectué en premier dans le schéma réactionnel après la protection de l'alcool benzylique qui assure une *N*-alkylation sélective de **111**.

2 Résultats et discussions

➤ Première Approche

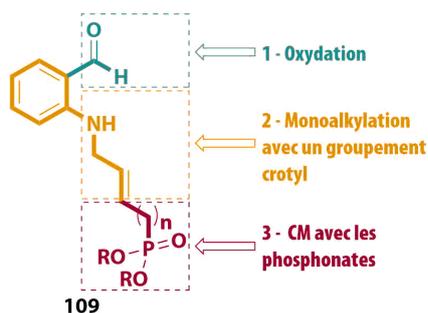


Figure 55 : Stratégie de synthèse de **109**.

L'objectif est d'accéder au produit **109** et dans cette optique, nous nous intéresserons ainsi dans un premier temps, à l'oxydation de l'alcool benzylique en aldéhyde puis à des essais de mono-substitution par un groupement (*E*)-but-2-ène de cet intermédiaire par plusieurs méthodes.

- Oxydation

L'oxydation de l'alcool benzylique de **111** est réalisée classiquement par l'emploi d'un excès d'oxyde de manganèse (MnO_2) dans du DCM_{anh} à température ambiante et pendant un temps de réaction de quelques heures. Cette oxydation douce nous permet l'obtention du dérivé aldéhyde **110** avec un excellent rendement de 97% en 24h à température ambiante. Dans le but de réduire les temps de réaction, l'activation micro-onde a donné lieu à une conversion totale du substrat de départ en 45 min à 100°C avec un rendement plus faible de 51% lié à l'observation de tâches de dégradation :

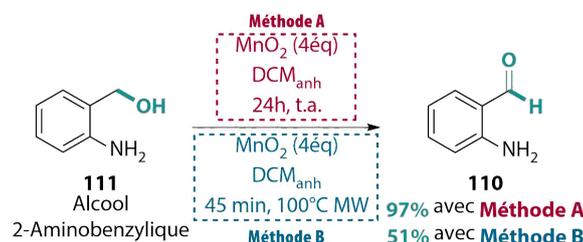
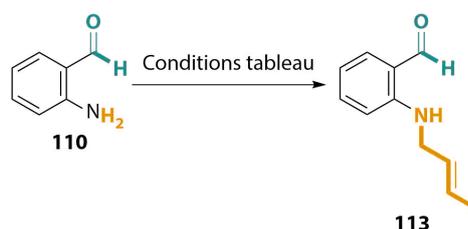


Figure 56 : Oxydation de l'alcool benzylique.

- Alkylation directe

Tout comme avec l'intermédiaire 2-nitroaniline dans la synthèse des dérivés flavines, la présence d'une fonction aldéhyde devrait conduire à une faible nucléophilie de l'amine de **110** et permettre ainsi une mono-alkylation sélective. Les conditions de mono-alkylation d'aniline par S_N2 sont alors reprises de la littérature :

Tableau 16 : Essais préliminaires de mono-substitution de **110**.



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	Bromure de crotyle (1.2 éq), Na_2CO_3	DMF_{anh}	16h, t.a.	<30%	X
2	Bromure de crotyle (1.2 éq), KOH, CTAB	H_2O	10 min, MO 80°C	<20%	X
3	NaH, Bromure de crotyle (1.2 éq), 18-crown-6	THF_{anh}	14h, t.a.	<30%	X

Entrée 1, 2 & 3 : Des conditions classiques avec une base de type carbonate dans du DMF sont alors entreprises¹¹⁸ et conduisent à une faible conversion avec la formation exclusive de produits de polymérisation de la fonction aldéhyde dont le proton correspondant disparaît sur le spectre RMN de ces dérivés. Les secondes conditions sous activation micro-onde à 80°C¹¹⁹ fournissent les mêmes résultats bien qu'un nombre supérieur de tâches de dégradation soit observé. Enfin, pour augmenter la

¹¹⁸ Martínez, W. R.; Militão, G. C. G.; Silva, T. G. da; Silva, R. O.; Menezes, P. H. Synthesis of Novel [3,1]-Benzothiazepine and [3,1]-Benzoxazepine Derivatives with Antitumoral Activity. *RSC Adv* **2014**, *4*, 14715–14718.

¹¹⁹ Liu, M.; Wang, X.; Sun, X.; He, W. Highly Selective N-Allylation of Anilines under Microwave Irradiation. *Tet Lett* **2014**, *55*, 2711–2714.

réactivité de l'hydruire de sodium (NaH) et pour complexer **113**, l'emploi d'un éther couronne a été effectué. L'ajout de 18-crown-6 dans ces conditions provoquent le même résultat que les autres entrées.

En conséquence, des problèmes de réactivité et de non-stabilité par polymérisation lié au 2-aminobenzaldéhyde **110**, cette première stratégie de synthèse a été abandonnée.

➤ Seconde approche

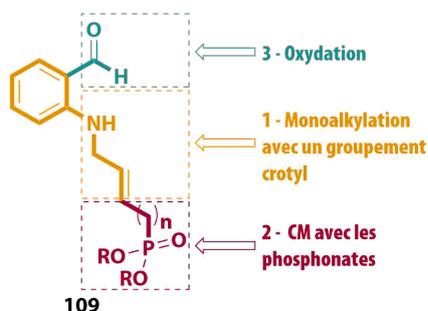
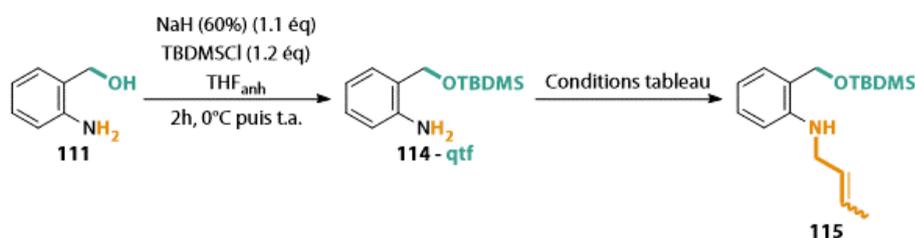


Figure 57 : Seconde stratégie de synthèse de **109**.

- Protection puis alkylation

Afin d'éviter les réactions secondaires de O-alkylation, une étape de protection de l'alcool benzylique est effectuée par la formation d'un éther silylé dans les conditions de Williamson avec la déprotonation première de l'alcool par l'hydruire de sodium suivi par l'introduction du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane (TBDMSCl). L'éther silylé est alors obtenu après purification de manière quantitative et les essais de substitution nucléophile sont alors entrepris :

Tableau 17 : Essais de mono-alkylation de **114**



Entrée	Réactifs	Equivalents d'halogénure d'alkyle	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	1.5	DMA	4h, 75°C	100%	X
2	Bromure de crotyle, NaHCO ₃	1.2	Acétone, H ₂ O	6h, 70°C	100%	X
3	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	1.0	DMF	14h, 70°C	100%	X

Entrée 1 : A l'image de la mono-alkylation de la 2-nitroaniline, les conditions de Sole *et al.* sont reprises avec la mise en réaction de **114** dans le DMA en présence de 1.5 équivalents de bromure de crotyle et d'un excès de carbonate de potassium.¹¹⁰ Une conversion totale est observée mais seul le produit di-alkylé est formé.

Entrée 2 : Dans leur publication, Bandini *et al.* réalise la mono-alkylation d'une aniline 2-iodo avec un léger excès de l'halogénure d'alkyle (1.2 éq) dans un mélange acétone:eau 4:1 avec des conditions douces à 70°C et avec de très bon rendement.¹²⁰ L'application de ces dernières sur notre substrat de départ provoque la formation d'un mélange inséparable du produit mono et di-substitué malgré une conversion totale.

Entrée 3 : L'utilisation de 1 équivalent dans des conditions équivalentes à celle de l'entrée 1 conduit à mélange inséparable du produit mono et di-substitué.

Suite à ces échecs, nous nous sommes tournés vers une méthode plus sélective afin de parvenir au synthon **116**. Une réaction d'amination réductrice en présence de crotonaldéhyde suivi de la réduction de l'imine couplée à la déprotection de l'éther silylé par l'action de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) en milieu acide et aqueux est réalisée.¹²¹

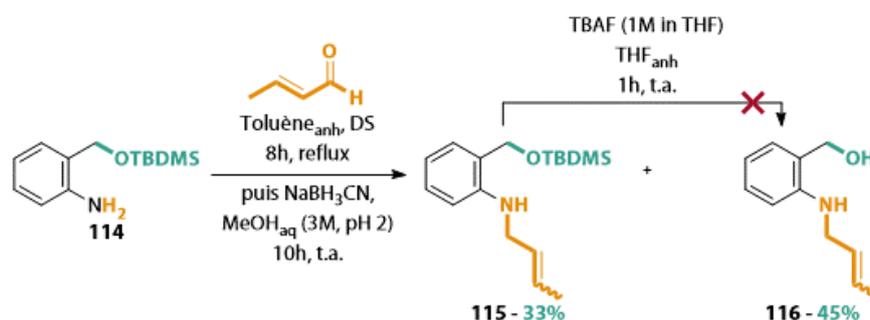


Figure 58 : Amination réductrice avec la méthode de Bala *et al.*

L'application de ces conditions résultent en la formation d'un mélange séparable du dérivé mono-substitué et protégé **115** et du dérivé déprotégé et mono-crotylé **116** avec des rendements respectifs de 33% et 45%. Afin d'obtenir le composé **116** avec une quantité suffisante, une déprotection au fluorure de tert-butylammonium (TBAF) a été engagée mais a provoqué la dégradation du produit.

- Oxydation puis Cyclisation

116 est directement engagé dans l'étape d'oxydation de l'alcool benzylique par le biais du pyridinium chlorochromate (PCC). La formation de l'aldéhyde correspondant est observée en RMN et ce dernier est utilisé sans purification supplémentaire dans la cyclisation suivante.

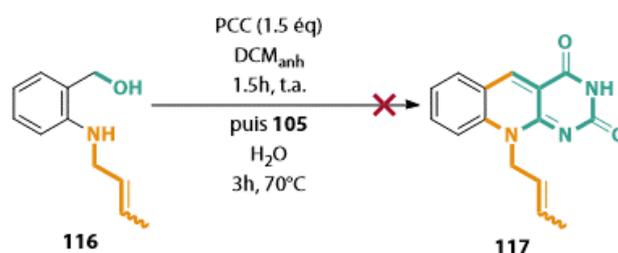


Figure 59 : Essai de cyclisation en noyau 5-deazaflavine

¹²⁰ Chiarucci, M.; Mocci, R.; Syntrivanis, L.-D.; Cera, G.; Mazzanti, A.; Bandini, M. Merging Synthesis and Enantioselective Functionalization of Indoles by a Gold-Catalyzed Asymmetric Cascade Reaction. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 10850–10853.

¹²¹ Bala, K.; Hailes, H. C. Nitrile Oxide 1,3-Dipolar Cycloadditions in Water: Novel Isoxazoline and Cyclophane Synthesis. *Synthesis* **2005**, *19*, 3423–3427.

Toutefois, la cyclisation ne permet pas de synthétiser le produit souhaité **117** malgré une disparition totale sur CCM, une tâche majoritaire est cependant observée. Après isolation et analyse RMN, il semble que ce produit soit un adduit de deux substrats de départ du fait du dédoublement des signaux des protons aromatiques avec un seul groupement crotyle observé.

3 Conclusions et perspectives

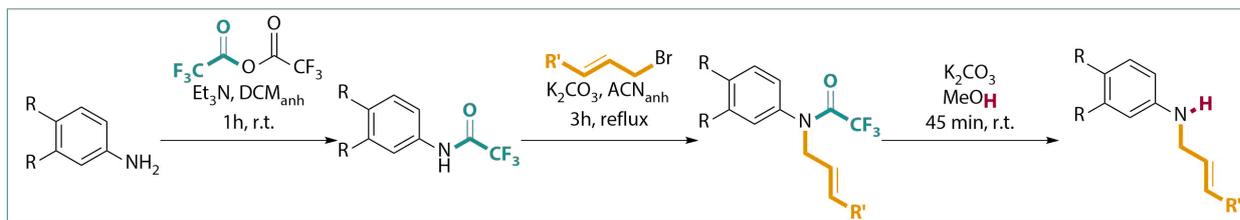
Le développement de deux approches synthétiques différentes pour l'obtention de nos dérivés ciblés **108** de type déazaflavine substitué sur l'azote N_{10} par une chaîne latérale à 4 ou 5 chaînons sous forme acide phosphonique a été entrepris. L'exploration de ces deux schémas réactionnels n'a pas donné les résultats escomptés c'est-à-dire l'accès à ces produits d'intérêt. Afin d'accéder à ces dérivés, il serait intéressant d'imaginer un schéma réactionnel en travaillant sur le noyau quinolone **107** en réalisant une alkylation sélective du groupement (*E*)-but-2-ène sur l'azote suivi par la cyclisation à l'urée. Aussi, le développement de la synthèse exposée dans la première partie pourrait permettre l'accès direct à partir de l'intermédiaire clé **50** via une formylation de Vilsmeier-Haack.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

GENERAL

Commercially available chemicals were of reagent grade and used as received. All reactions requiring anhydrous conditions were carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry Ar or N₂. Microwave reactions were carried out in a Biotage Initiator apparatus. The reactions under ultrasound were carried out with Elmasonic P30H apparatus with a frequency of 80 kHz and effective power of 100 W. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with phosphomolybdic acid (PMA) stain, potassium permanganate solution, para-anisaldehyde stain or ninhydrin stain, followed by charring at around 200°C. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040-0.063 mm, E. Merck). Melting points were determined with a Kofler Heizbank Reichert Type 7841 apparatus and are uncorrected. The infrared spectra were measured with Perkin–Elmer Spectrometer. The ¹H, ¹³C, ¹⁹F and ³¹P NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 or Bruker Avance 400 Spectrometers. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the residual deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d(doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. ¹H and ¹³C signals were attributed based on H–H and H–C correlations. High Resolution Mass spectra were performed on a Bruker Q-TOF MaXis spectrometer by the “Fédération de Recherche” ICOA/CBM (FR2708) platform.

GENERAL PROCEDURE 1 : Mono-alkylation of aniline analogs



Step 1: Formation of trifluoroacetamide

Triethylamine (2 eq) was added to a solution of aniline derivative (16.5 mmol, 1 eq) in DCM_{anh} (85 mL) cooled at 0°C. Subsequently, trifluoroacetic anhydride (2 eq) was added dropwise at 0°C, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1h. After completion of reaction (checked by TLC), the resulting transparent solution was partitioned between DCM (20 mL) and brine (20 mL). The aqueous layer was separated and extracted twice with DCM (40 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to yield pure *N*-(phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide derivative which was used without further purification.

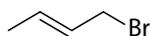
Step 2: Alkylation with crotyl bromide

To a solution of *N*-(phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide derivative (16.5 mmol, 1 eq) in ACN_{anh} (72 mL) under N₂ was added K₂CO₃ (2.74 g, 1.2 eq) and crotyl bromide (3 mL, 1.5 eq) at room temperature and the resulting suspension was refluxed for 3h. The resulting mixture was filtered on kieselgühr using EtOAc (50 mL) as eluent. The filtrate was evaporated under vacuum, dissolved in EtOAc (200 mL) and was washed with brine (75 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to yield pure *N*-(but-2-en-1-yl)-*N*-(phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide derivative which was used in the next step without further purification.

Step 3: Deprotection of trifluoroacetamide

To a solution of *N*-(but-2-en-1-yl)-*N*-(phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide derivative (16.5 mmol, 1 eq) in MeOH (173 mL) and H₂O (70 mL) was added K₂CO₃ (14.38 g, 6.3 eq) and the resulting red solution was stirred at room temperature for 45 min. The resulting mixture was filtered on kieselgühr using MeOH (250 mL) as eluent. The filtrate was evaporated under vacuum, dissolved in EtOAc (200 mL), washed with brine (2 × 75 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 100% to 8/2) to afford *N*-(but-2-en-1-yl)-aniline derivative as a yellow oil.

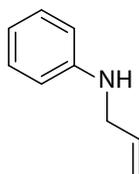
(E)-1-bromobut-2-ene - 54



Procedure : (E)-But-2-en-1-ol (30 g, 0.416 mol) was dissolved in anhydrous Et₂O (1 L, 0.4 M) at 0°C followed by dropwise addition of PBr₃ (19.74 mL, 0.208 mol, 0.5 eq). The solution was then stirred at 0°C for 30 min, allowed to warm at room temperature and further stirred for 3 hours. The mixture was quenched with ice and the organic layer was separated, washed with brine (200 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated carefully under reduced pressure & temperature. The crude product was distilled at 60°C under 60 mmHg to yield 54.62 g of pure (E)-1-Bromobut-2-ene. Yield : 98%, colorless liquid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 5.85-5.61 (m, 2H, CH=CH), 3.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Br-CH₂), 1.74 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H, CH-CH₃). **CAS :** 4784-77-4

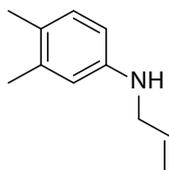
N-(allyl)-aniline - 56



Procedure : The title compound was obtained from aniline following general procedure 1. Yield : 94%, yellow oil.

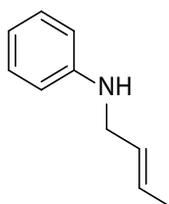
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.50 – 6.55 (m, 5H, H_{Ar}), 6.38 – 5.67 (m, 1H, CH=CH₂), 5.50 – 5.00 (m, 2H, CH=CH₂), 3.85 (m, 2H, N-CH₂), 3.62 (bs, 1H, NH). **R_f :** 0.67 (PE/EtOAc 8/2). **CAS :** 589-09-3.

N-(allyl)-3,4-dimethylaniline - 61



Procedure : The title compound was obtained from 3,4-dimethylaniline following general procedure 1. Yield : 97%, yellow oil. **R_f :** 0.68 (PE/EtOAc 8/2). **CAS :** 1225758-88-2

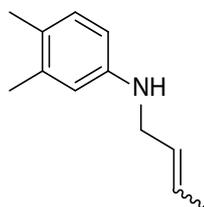
N-(but-2-en-1-yl)-aniline - 62



Procedure : The title compound was obtained as a pure E isomer starting from aniline following general procedure 1. Yield : 92%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 7.19 - 7.10 (m, 2H, H_{Ar}), 6.68 (tt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.62 - 6.56 (m, 2H, H_{Ar}), 5.74 - 5.63 (m, 1H, CH=CH), 5.61 - 5.52 (m, 1H, CH=CH), 3.65 (dd, *J* = 5.7, 1.2 Hz, 2H, N-CH₂), 3.61 (bs, 1H, NH), 1.69 (m, 3H, CH-CH₃). **Rf** : 0.70 (PE/EtOAc 8/2). **CAS** : 35755-80-7

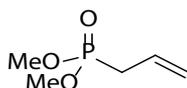
***N*-(but-2-en-1-yl)-3,4-dimethylaniline - 60**



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 in 3 steps starting from 3,4-dimethylaniline. Yield : 96%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 6.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₅), 6.38 (s, 1H, H₂), 6.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁), 5.73 - 5.40 (m, 2H, CH=CH), 5.29 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.62 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, N-CH₂ major), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6})** : δ 146.9 (C_{quat}), 136.0 (C_{quat}), 129.7 (C₅), 129.1 (C_{quat}), 125.7 (CH=CH major), 125.0 (CH=CH minor), 122.9 (CH=CH minor), 122.7 (CH=CH major), 113.9 (C₂), 109.7 (C₆), 44.9 (N-CH₂ major), 40.6 (N-CH₂ minor), 19.8 (CH₃), 18.3 (CH₃), 17.5 (CH-CH₃ major), 12.9 (CH-CH₃ minor). **Rf** : 0.71 (PE/EtOAc 8/2). **CAS** : 1704431-71-9

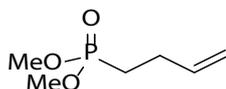
Dimethyl allylphosphonate - 78



Procedure : Under inert atmosphere, allyl bromide (51 mL, 1.25 eq., 0.57 mol) was dissolved in THF_{anh} (400 mL). To this mixture were added potassium carbonate (94 g, 1.5 eq., 0.68 mol), tert-butylammonium bromide (2.9 g, 2 mol%, 9.1 mmol) and finally dimethylphosphite (41.2 mL, 1 eq., 0.45 mol). The resulting solution was stirred for 36 hours at room temperature, followed by filtration on kieselg uhr using EtOAc as eluent. The filtrate was then evaporated under reduced pressure, and the crude mixture was then distilled at 130°C under 40 mm/Hg. After collection of the different fractions, the clean product was obtained as a colorless liquid. Yield : 75%, colorless liquid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.80 (m, 1H, CH=CH₂), 5.23 (m, 2H, CH₂=CH), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.62 (ddt, 2H, *J* = 22.0, 7.4, 1.3 Hz, CH₂-P). **CAS** : 757-54-0

Dimethyl but-3-en-1-ylphosphonate - 79

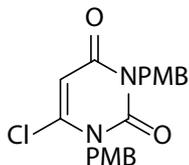


Procedure : Commercially available dimethyl phosphite (4 g, 36.4 mmol, 1 eq) was added dropwise to a solution of NaH (60% in oil, 1.45 g, 36.4 mmol, 1 eq) in THF_{anh} (40 mL) at 0°C. After 30 min. stirring at 0°C, 4-bromo-1-butene (3.7 mL, 36.4 mmol, 1 eq) was added dropwise, and the reaction was stirred 24h at room temperature. To the resulting solution was added 20 mL of H₂O which was extracted 3 times with dichloromethane (3 x 20 mL) and dried over MgSO₄. The mixture was filtrated and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography (AcOEt/MeOH 95:5) affording desired compound as a colorless liquid. Yield : 85%, colorless liquid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.80 (ddt, *J* = 16.6, 10.1, 6.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.01 (m, 2H, CH₂=CH), 3.73 (s, 3H, CH₃-O), 3.68 (s, 3H, CH₃-O), 2.31 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂-P). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 137.0 (d, *J* =

17.4 Hz, CH=CH₂), 115.3 (d, *J* = 1.2 Hz, CH₂=CH), 52.3 (d, *J* = 6.6 Hz, OMe), 26.4 (d, *J* = 4.5 Hz, CH-CH₂), 24.0 (d, *J* = 140.9 Hz, P-CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 34.09. CAS : 205644-46-8.

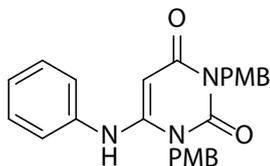
6-Chloro-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 67



Procedure : A 10-20 mL vial was charged with 6-chlorouracile (1 g, 6.83 mmol) in DMF_{anh} (15 mL). To this suspension was added K₂CO₃ (2.83 g, 20.5 mmol, 3 eq) and *p*-methoxybenzoyl chloride (4.2 mL, 30.74 mmol, 4.5 eq). The vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 60 min at 80°C. The volatiles were then removed in vacuum, and the obtained yellow oil was dissolved in 200 mL of solution of H₂O and 200 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 50 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with H₂O (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 8/2) to afford desired compound. Yield : 89%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 – 7.21 (m, 2H, H_{Ar}), 6.84 (dd, *J* = 11.7, 8.7 Hz, 4H, H_{Ar}), 5.92 (s, 1H, H₅), 5.18 (s, 2H, N-CH₂), 5.04 (s, 2H, N-CH₂), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.7 (C_{quat}), 159.6 (C_{quat}), 159.4 (C_{quat}), 151.4 (C_{quat}), 145.8 (C_{quat}), 130.8 (CH_{Ar}*2), 129.3 (CH_{Ar}*2), 128.8 (CH_{Ar}), 127.6 (C_{quat}), 114.3 (CH_{Ar}*2), 113.9 (CH_{Ar}*2), 102.7 (C₅), 55.4 (OMe), 55.4 (OMe), 49.6 (N-CH₂), 44.5 (N-CH₂). HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₁₉ClN₂O₄ 387.1106 found 387.1103. Rf : 0.21 (PE/EtOAc 9/1).

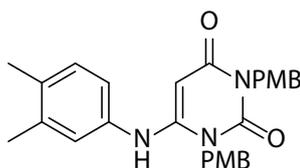
1,3-bis(4-Methoxybenzyl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 69



Procedure : Under Ar atmosphere, an oven dried round bottomed flask was charged with 6-chloro-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (2 g, 5.18 mmol) in dioxane_{anh} (62 mL). To this mixture was added a spatula of 4Å molecular sieves, aniline (0.946 mL, 10.4 mmol, 2 eq), Cs₂CO₃ (3.38 g, 10.4 mmol, 2 eq), Xantphos (599 mg, 1.04 mmol, 0.2 eq) and Pd(OAc)₂ (116 mg, 0.52 mmol, 0.1 eq) under vigorous stirring. The flask was then purged with Ar for 15 min and the solution was stirred under reflux for 1h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 7/3) to afford desired compound. Yield : 79%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.35 – 7.13 (m, 5H, H_{Ar}), 7.01 – 6.76 (m, 6H, H_{Ar}), 5.85 (s, 1H, NH), 5.23 (s, 2H, N-CH₂), 5.10 (s, 2H, N-CH₂), 5.10 (s, 1H, H₅), 3.83 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.8 (C_{quat}), 160.0 (C_{quat}), 159.1 (C_{quat}), 152.8 (C_{quat}), 152.5 (C_{quat}), 137.1 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}*2), 129.9 (C_{quat}), 129.8 (CH_{Ar}*2), 127.9 (CH_{Ar}*2), 127.1 (C_{quat}), 126.4 (CH_{Ar}), 124.2 (CH_{Ar}*2), 115.2 (CH_{Ar}*2), 113.8 (CH_{Ar}*2), 80.2 (C₅), 55.5 (OMe), 55.4 (OMe), 46.3 (N-CH₂), 44.0 (N-CH₂). HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₂₆H₂₆N₃O₄ 444.1917 found 444.1917. Rf : 0.14 (PE/EtOAc 8/2).

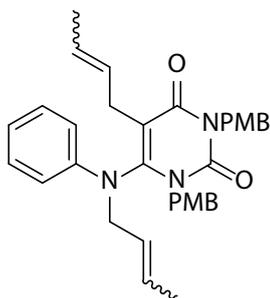
6-((3,4-Dimethylphenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 70



Procedure : Under Ar atmosphere, an oven dried round bottomed flask was charged with 6-chloro-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (2 g, 5.18 mmol) in dioxane_{anh} (62 mL). To this mixture was added a spatula of 4Å molecular sieves, 3,4-dimethylaniline (1.26 g, 10.4 mmol, 2 eq), Cs₂CO₃ (3.38 g, 10.4 mmol, 2 eq), Xantphos (599 mg, 1.04 mmol, 0.2 eq) and Pd(OAc)₂ (116 mg, 0.52 mmol, 0.1 eq) under vigorous stirring. The flask was then purged with Ar for 15 min and the solution was stirred under reflux for 1h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 7/3) to afford desired compound. Yield : 81%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.69 (s, 1H, H_{Ar}), 6.62 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.79 (s, 1H, NH), 5.21 (s, 2H, N-CH₂), 5.09 (s, 2H, N-CH₂), 5.02 (s, 1H, H₅), 3.83 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 2.21 (s, 3H, Me), 2.18 (s, 3H, Me). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 162.8 (C_{quat}), 159.9 (C_{quat}), 159.0 (C_{quat}), 153.2 (C_{quat}), 152.5 (C_{quat}), 138.3 (C_{quat}), 135.3 (C_{quat}), 134.5 (C_{quat}), 130.8 (C_{quat}), 130.6 (CH_{Ar}* 2), 130.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}* 2), 127.1 (C_{quat}), 125.8 (CH_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 113.8 (CH_{Ar}), 79.7 (C_s), 55.5 (OMe), 55.4 (OMe), 46.1 (N-CH₂), 43.9 (N-CH₂), 19.9 (CH₃), 19.3 (CH₃). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₈H₃₀N₃O₄ 472.2219 found 472.2219. **Rf :** 0.14 (PE/EtOAc 8/2).

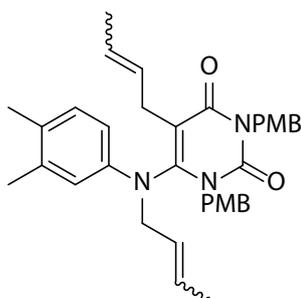
5-(but-2-en-1-yl)-6-(but-2-en-1-yl(phenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 73



Procedure : To a solution of 1,3-bis(4-methoxybenzyl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (0.2 g, 0.451 mmol, 1 eq) in DMF_{anh} (1.9 mL) was added NaH (60%, 22 mg, 0.902 mmol, 2 eq) and crotyl bromide (109 μL, 0.902 mmol, 2 eq) and the solution was stirred at rt for 2h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was diluted in AcOEt (10 mL). The organic layer was washed twice with brine (15 mL) was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 95/5) to afford desired compound as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 85%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, H_{Ar}), 7.24 (m, 2H, H_{Ar}), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, H_{Ar}), 6.63 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.48 – 5.24 (m, 2H, CH=CH), 5.21 (s, 2H, N-CH₂), 4.99 (s, 2H, N-CH₂), 4.98 – 4.83 (m, 2H, CH=CH), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 2.53 – 2.29 (m, 4H, N-CH₂), 1.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH-CH₃ major), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH-CH₃ minor). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 171.3 (C_{quat}), 159.1 (C_{quat}), 159.0 (C_{quat}), 151.4 (C_{quat}), 147.4 (C_{quat}), 147.1 (C_{quat}), 130.9 (CH=CH), 130.8 (CH_{Ar}), 130.6 (C_{quat}), 130.5 (CH_{Ar}), 129.9 (C_{quat}), 129.4 (C_{quat}), 128.9 (CH_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 122.3 (CH_{Ar}), 118.0 (CH_{Ar}), 113.8 (C_{quat}), 113.7 (C_{quat}), 113.6 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 55.4 (OMe), 55.4 (OMe), 45.8 (N-CH₂), 44.5 (N-CH₂), 41.4 (N-CH₂), 18.0 (CH-CH₃ major), 13.1 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₃₄H₃₈N₃O₄ 552.2856 found 552.2853. **Rf :** 0.46 (PE/EtOAc 95/5).

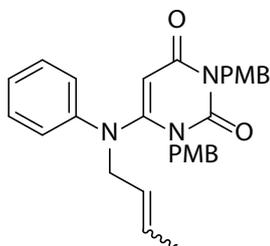
5-(but-2-en-1-yl)-6-(but-2-en-1-yl(3,4-dimethylphenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 74



Procedure : To a solution of 6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (0.2 g, 0.424 mmol, 1 eq) in DMF_{anh} (1.8 mL) was added NaH (60%, 20 mg, 0.848 mmol, 2 eq) and crotyl bromide (103 μ L, 0.848 mmol, 2 eq) and the solution was stirred at rt for 2h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was diluted in AcOEt (10 mL). The organic layer was washed twice with brine (15 mL), dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 95/5) to afford desired compound as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 88%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (t, *J* = 8.7 Hz, 4H, H_{Ar}), 7.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.83 (dd, *J* = 8.7, 3.4 Hz, 4H, H_{Ar}), 6.43 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.37 (dd, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.32 (m, 2H, CH=CH), 5.20 (s, 2H, N-CH₂), 4.99 (s, 2H, N-CH₂), 4.98 – 4.77 (m, 2H, CH=CH), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.46 (tdd, *J* = 25.1, 15.9, 8.7 Hz, 4H, N-CH₂), 2.21 (s, 6H, Me), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, CH-CH₃ major), 1.34 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH-CH₃ minor). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 171.5 (C_{quat}), 159.1 (C_{quat}), 158.9 (C_{quat}), 151.5 (C_{quat}), 147.4 (C_{quat}), 145.0 (C_{quat}), 137.1 (C_{quat}), 130.9 (CH=CH), 130.8 (CH_{Ar}), 130.6 (C_{quat}), 130.4 (C_{quat}), 130.0 (C_{quat}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.5 (C_{quat}), 123.9 (CH=CH), 119.2 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 113.8 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 56.8 (OMe), 55.4 (OMe), 45.8 (N-CH₂), 44.5 (N-CH₂), 41.4 (N-CH₂), 20.1 (Me), 19.1 (Me), 18.1 (CH-CH₃ major), 13.1 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₃₆H₄₂N₃O₄ 580.3169 found 580.3165. **Rf :** 0.46 (PE/EtOAc 95/5).

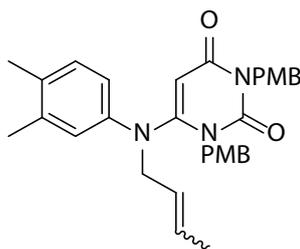
6-(But-2-en-1-yl(phenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 75



Procedure : To a solution of 1,3-bis(4-methoxybenzyl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (1 g, 2.26 mmol, 1 eq) in acetone (161 mL) was added K₂CO₃ (234 mg, 1.69 mmol, 0.75 eq) and crotyl bromide (137 μ L, 1.13 mmol, 0.5 eq) and the solution was stirred at 60°C for 12h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 8/2) to afford desired compound as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 65%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32 – 7.23 (m, 2H, H_{Ar}), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82 (dd, *J* = 17.8, 8.6 Hz, 5H, H_{Ar}), 6.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.34 (dq, *J* = 10.1, 4.7, 4.3 Hz, 2H, CH=CH), 5.12 (s, 2H, N-CH₂), 4.86 (s, 2H, N-CH₂), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.12 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 3.05 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.57 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, CH-CH₃ major), 1.50 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH-CH₃ minor). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 163.3 (C_{quat}), 159.1 (C_{quat}), 152.4 (C_{quat}), 146.8 (C_{quat}), 141.8 (C_{quat}), 130.8 (CH_{Ar}*2), 130.8 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}*2), 129.6 (C_{quat}), 129.1 (C_{quat}), 128.7 (CH_{Ar}*2), 127.7 (CH=CH), 126.6 (CH=CH), 122.6 (CH_{Ar}), 116.5 (CH_{Ar}*2), 114.2 (CH_{Ar}*2), 113.8 (CH_{Ar}*2), 104.7 (C_{quat}), 55.4 (OMe), 55.3 (OMe), 47.4 (N-CH₂), 44.7 (N-CH₂), 28.1 (N-CH₂ major), 22.8 (N-CH₂ minor), 17.8 (CH-CH₃ major), 12.8 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₃₀H₃₂N₃O₄ 498.2387 found 498.2385. **Rf :** 0.52 (PE/EtOAc 8/2).

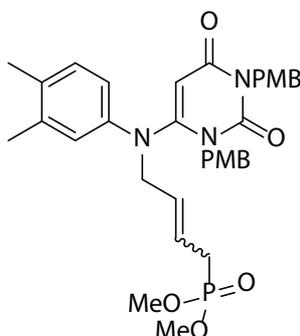
6-(But-2-en-1-yl(3,4-dimethylphenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 76



Procedure : To a solution of 1,3-bis(4-methoxybenzyl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (1 g, 2.26 mmol, 1 eq) in acetone (161 mL) was added K_2CO_3 (234 mg, 1.69 mmol, 0.75 eq) and crotyl bromide (137 μ L, 1.13 mmol, 0.5 eq) and the solution was stirred at 60°C for 12h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 8/2) to afford desired compound as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 85%, yellow oil.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 21.9, 8.7$ Hz, 5H), 6.59 – 6.48 (m, 2H), 5.55 – 5.25 (m, 2H, CH=CH), 5.15 (s, 2H, N- CH_2), 4.89 (s, 2H, N- CH_2), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, N- CH_2 minor), 3.08 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, N- CH_2 major), 2.22 (s, 6H, CH_3^*2), 1.60 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, CH- CH_3 major), 1.55 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH- CH_3 minor). **^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 163.2 (C_{quat}), 159.1 (C_{quat}), 159.0 (C_{quat}), 152.4 (C_{quat}), 147.4 (C_{quat}), 139.4 (C_{quat}), 138.3 (C_{quat}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.7 (CH_{Ar}^*2), 130.5 (CH_{Ar}), 129.6 (C_{quat}), 129.1 (C_{quat}), 128.6 (CH_{Ar}^*2), 127.8 (CH=CH), 126.3 (CH=CH), 118.4 (CH_{Ar}), 114.5 (CH_{Ar}), 114.0 (CH_{Ar}^*2), 113.7 (CH_{Ar}^*2), 103.4 (C_{quat}), 55.2 (OMe), 55.2 (OMe), 47.4 (N- CH_2), 44.6 (N- CH_2), 27.9 (N- CH_2 major), 22.7 (N- CH_2 minor), 19.9 (CH_3), 19.0 (CH_3), 17.8 (CH- CH_3 major), 12.8 (CH- CH_3 minor). **HRMS-ESI (m/z) :** $[M+H]^+$ calculated for $C_{32}H_{36}N_3O_4$ 526.2700 found 526.2695. **Rf :** 0.52 (PE/EtOAc 8/2).

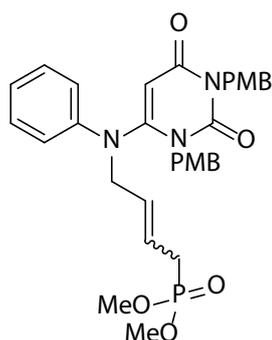
Dimethyl 4-((1,3-bis(4-methoxybenzyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)(3,4-dimethylphenyl)amino)but-2-en-1-yl)phosphonate - 81



Procedure : To a solution of 6-(but-2-en-1-yl(3,4-dimethylphenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (0.42 g, 0.8 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.1M) was added dimethylallyl phosphonate (4 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was twice purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 100 % to 96:4 and toluene/acetone 9:1 to 6:4) to yield the desired bis-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of homodimer of dimethylallylphosphonate and *E/Z* isomers in the proportion of 80/20. Yield : 56%, brown oil.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 – 7.40 (m, 2H, H_{Ar}), 7.18 – 7.03 (m, 4H, H_{Ar}), 6.90 – 6.69 (m, 4H, H_{Ar}), 6.62 – 6.41 (m, 2H, H_{Ar}), 5.62 – 5.28 (m, 2H, CH=CH), 5.10 (s, 2H, N- CH_2), 4.86 (s, 2H, N- CH_2), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.64 (s, 3H, CH_3), 3.60 (s, 3H, CH_3), 3.10 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, N- CH_2), 2.49 (dd, $J = 21.6, 7.5$ Hz, 2H, P- CH_2), 2.33 (s, 6H, CH_3^*2). **HRMS-ESI (m/z) :** $[M+H]^+$ calculated for $C_{34}H_{41}N_3O_7P$ 634.2676 found 634.2676. **Rf :** 0.26 (DCM/MeOH 97/3).

Dimethyl (4-((1,3-bis(4-methoxybenzyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)(phenyl)amino)but-2-en-1-yl)phosphonate - 80

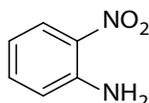


Procedure : To a solution of 6-(but-2-en-1-yl(phenyl)amino)-1,3-bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (0.4 g, 0.8 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.1M) was added dimethylallyl phosphonate (4 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was twice purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 100 % to 96:4 and toluene/acetone 9:1 to 6:4) to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of homodimer of dimethylallylphosphonate and *E/Z* isomers in the proportion of 80/20. Yield : 59%, brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.52 – 7.39 (m, 2H, H_{Ar}), 7.37 – 7.16 (m, 3H, H_{Ar}), 7.15 – 7.03 (m, 2H, H_{Ar}), 7.02 – 6.87 (m, 1H, H_{Ar}), 6.88 – 6.66 (m, 6H, H_{Ar}), 5.65 – 5.18 (m, 2H, CH=CH), 5.09 (s, 2H, N-CH₂), 4.86 (s, 2H, N-CH₂), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.59 (s, 3H, OMe), 3.08 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, N-CH₂), 2.57 – 2.38 (m, 2H, P-CH₂).

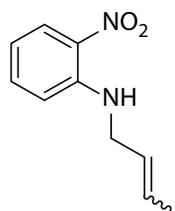
HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₃₂H₃₇N₃O₇P 606.2376 found 606.2376. **Rf :** 0.27 (DCM/MeOH 97/3).

2-Nitroaniline - 89



¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz, 1H, H₃), 7.33 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.6 Hz, 1H, H₄), 6.80 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H, H₆), 6.67 (ddd, *J* = 8.5, 7.0, 1.3 Hz, 1H, H₅), 6.12 (bs, 2H, NH₂). **Rf :** 0.54 (PE/EtOAc 8/2). **CAS :** 88-74-4

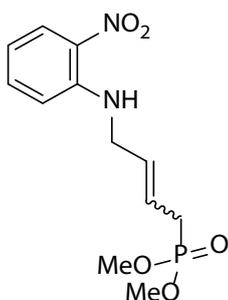
***N*-(but-2-en-1-yl)-2-nitroaniline - 91**



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 starting from 2-nitroaniline following general procedure 1. Yield : 93%, yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H₃), 8.08 (bs, 1H, NH), 7.42 (m, 1H, H₄), 6.84 (dd, *J* = 8.7, 1.2 Hz, H₆), 6.74 – 6.48 (m, 1H, H₅), 5.96 – 5.34 (m, 2H, CH=CH), 4.01 – 3.93 (m, 1H, N-CH₂ minor), 3.89 (m, 2H, N-CH₂ major), 1.77 (m, 3H, CH-CH₃ minor), 1.73 (m, 3H, CH-CH₃ major). **Rf :** 0.82 (PE/EtOAc 8/2). **CAS :** 148160-37-6.

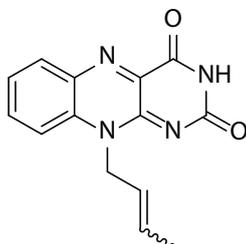
Dimethyl (4-((2-nitrophenyl)amino)but-2-en-1-yl)phosphonate - 93



Procedure : To a solution of *N*-(but-2-en-1-yl)-2-nitroaniline (0.2 g, 1.04 mmol, 1 eq) in DCM_{anh} (0.05 M) was added pTSA (0.198 g, 1.04 mmol, 1 eq) and the resulting mixture was stirred for 1h. To the resulting ammonium salt was added dimethyl allylphosphonate (0.312 g, 2.08 mmol, 2 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (132 mg, 0.156 mmol, 15 mol%) and the solution was refluxed for 24h. Volatiles were evaporated and to the residue was added aqueous saturated NaHCO₃ solution (20 mL) and the product was extracted with DCM (3 x 20 mL). The organic layers were combined and washed with H₂O (20 mL), and brine (20 mL) then dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (100 % to 96:4) to afford desired compound. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 86/14. Yield : 49%, dark yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.10 (bs, 1H, NH), 7.41 (m, 1H, H_{Ar}), 6.81 (dd, *J* = 8.7, 1.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.64 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.89 – 5.59 (m, 2H, CH=CH), 4.58 (m, 2H, N-CH₂ minor), 4.07 – 3.89 (m, 2H, N-CH₂ major), 3.77 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe minor), 3.71 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe major), 2.69 – 2.53 (m, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 136.3 (CH_{Ar}), 135.0 (C_{quat}), 130.9 (CH=CH), 128.7 (CH=CH), 127.8 (C_{quat}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 114.2 (CH_{Ar}), 52.9 (d, *J* = 6.8 Hz, OMe), 44.7 (N-CH₂), 28.7 (P-CH₂). **R_f :** 0.28 (DCM/MeOH 97/3)

10-(But-2-en-1-yl)benzo[*g*]pteridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione - 96



Procedure :

Step 1 Reduction:

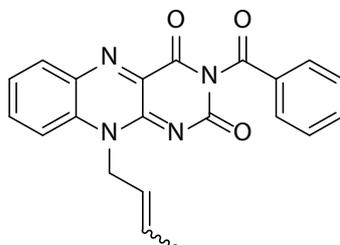
A 10-20 mL vial was charged with 2-nitro-aniline derivative **91** (0.4 g, 2.4 mmoles) and SnCl₂·2H₂O (2.282 g, 5 eq) in ethanol (17 mL). The vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 10 min at 100°C. The resulting orange solution was then poured into aqueous saturated NaHCO₃ solution (70 mL) and the product was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were combined and washed with aqueous saturated Na₂CO₃ solution (30 mL), H₂O (30 mL), and brine (2x40 mL) before being dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure affording desired derivative as a pale-yellow gum.

Step 2 Cyclization:

A 10-20 mL vial was charged with *o*-phenylene diamine derivative **90** (5 mmol) in AcOH (15 mL). To this solution was added alloxan monohydrate (2 eq) and boric acid (2 eq) and then, the vial was sealed and the solution was stirred for 4h at room temperature. The formed yellow precipitate was filtered off with suction and washed successively with H₂O and Et₂O to yield the desired alloxazine derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 32%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.39 (s, 1H, N₃H), 8.13 (dt, *J* = 8.0, 2.2 Hz, 1H, H₆), 8.01 – 7.78 (m, 2H, H₈ & H₇), 7.70 – 7.47 (m, 1H, H₉), 5.90 – 5.49 (m, 2H, CH=CH), 5.32 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, N-CH₂ minor), 5.20 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.98 – 1.75 (m, 3H, CH-CH₃ minor), 1.69 – 1.54 (m, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 164.2 (C=O), 159.7 (C=O), 155.7 (C_{quat}), 150.4 (C_{quat}), 138.9 (C_{quat}), 134.8 (C₇), 132.3 (C₆), 131.7 (C_{quat}), 129.4 (CH=CH major), 128.9 (CH=CH minor), 125.9 (C₉), 123.6 (CH=CH major), 123.1 (CH=CH minor), 116.7 (C₈), 45.6 (N-CH₂ major), 41.9 (N-CH₂ minor), 17.5 (CH-CH₃ major), 13.4 (CH-CH₃ minor). **Rf** : 0.28 (DCM/MeOH 97/3).

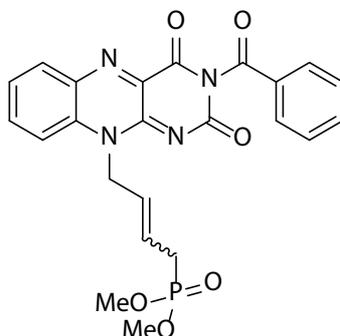
3-Benzoyl-10-(but-2-en-1-yl)benzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione - 97



Procedure : To a solution of 10-(but-2-en-1-yl)benzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione (1 g) in a 2/5 mixture of dry pyridine and dry acetonitrile (20 mL) was added benzoylchloride (3 eq). The reaction mixture was stirred 24h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 200 mL of solution of saturated NaHCO₃ and 200 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 50 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with HCl 1M (50 mL) and H₂O (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 100% to 98/2). The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 85%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H₆), 8.10 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.94 (ddd, *J* = 8.7, 7.2, 1.4 Hz, 1H, H₈), 7.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₉), 7.71 – 7.62 (m, 2H, H₇ & H_{Ar}), 7.49 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.01 – 5.61 (m, 2H, CH=CH), 5.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.37 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, N-CH₂ major), 2.02 – 1.93 (m, 3H, CH-CH₃ minor), 1.74 (dd, *J* = 6.5, 1.4 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** 169.1 (C=O), 158.5 (C=O), 154.1 (C=O), 137.3 (C_{quat}), 136.5 (C₈), 136.3 (C_{quat}), 135.1 (CH_{Ar}), 133.8 (CH_{Ar}), 133.7 (C₆), 132.9 (C_{quat}), 132.8 (CH=CH), 131.8 (C_{quat}), 131.0 (C_{quat}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 127.2 (C₇), 121.9 (CH=CH), 116.1 (C₉), 47.2 (N-CH₂ major), 43.3 (N-CH₂ minor), 18.0 (CH-CH₃ major), 14.0 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₁₇N₄O₃ 373.1295 found 373.1288. **Rf** : 0.76 (DCM/MeOH 97/3).

Dimethyl (4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-10(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 98

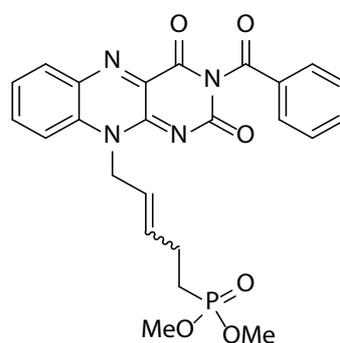


Procedure : To a solution of 3-benzoyl-10-(but-2-en-1-yl)benzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione (1 eq) in DCM_{anh} (0.1M) was added dimethylallyl phosphonate (4 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was twice purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 100 % to 96:4 and then by toluene/acetone 9:1 to 6:4)

to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 86/14. Yield : 57%, yellow-green solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 8.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.92 (dt, *J* = 18.2, 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.68 (dt, *J* = 24.3, 8.2 Hz, 3H, H_{Ar}), 7.50 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.03 – 5.66 (m, 2H, CH=CH), 5.60 – 5.51 (m, 2H, N-CH₂ minor), 5.42 (m, 2H, N-CH₂ major), 3.79 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe minor), 3.69 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe major), 3.04 (dd, *J* = 22.6, 8.0 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.63 (dd, *J* = 22.4, 4.7 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 169.0 (C=O), 158.4 (C=O), 154.0 (C=O), 149.8 (C_{quat}), 136.6 (CH), 136.2 (CH), 135.2 (CH), 133.8 (CH), 132.7 (C_{quat}), 131.7 (C_{quat}), 130.8 (CH), 129.2 (CH), 127.3 (CH), 126.1 (d, *J* = 12.6 Hz, CH=CH), 116.0 (C_{quat}), 53.0 (OMe minor), 52.9 (OMe major), 47.0 (N-CH₂ major), 30.3 (P-CH₂ minor), 28.8 (P-CH₂ major). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 28.95 (P minor), 28.26 (P major). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₃H₂₂N₄O₆P 481.1271 found 481.1269. **Rf** : 0.45 (DCM/MeOH 97/3).

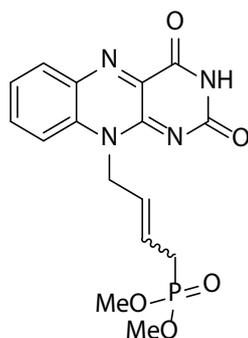
Dimethyl (5-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[*g*]pteridin-10(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 99



Procedure : To a solution of 3-benzoyl-10-(but-2-en-1-yl)benzo[*g*]pteridine-2,4(3H,10H)-dione (1 eq) in anhydrous DCM (0.1M) was added Dimethyl but-3-en-1-ylphosphonate (4 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%) and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was twice purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (100 % to 96:4) and then by toluene/acetone (9:1 to 6:4) as eluant to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 79/21. Yield : 51%, yellow-green solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H₆), 8.02 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.94 (ddd, *J* = 8.7, 7.2, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.76 – 7.60 (m, 3H, H_{Ar}), 7.50 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.05 – 5.66 (m, 2H, CH=CH), 5.49 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.39 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.78 (s, 3H, OMe minor), 3.75 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe major), 3.69 (s, 3H, OMe major), 2.69 (dq, *J* = 15.7, 8.0, 7.5 Hz, 2H, CH-CH₂ minor), 2.37 (dt, *J* = 14.3, 6.6 Hz, 2H, CH-CH₂ major), 2.08 – 1.88 (m, 2H, P-CH₂ minor), 1.88 – 1.74 (m, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 169.0 (C=O), 158.3 (C=O), 153.9 (C=O), 149.6 (C_{quat}), 137.2 (C_{quat}), 136.4 (CH_{Ar}), 136.1 (C_{quat}), 135.6 (CH=CH), 135.5 (CH_{Ar}), 135.0 (CH_{Ar}), 133.6 (CH_{Ar}), 132.6 (C_{quat}), 131.6 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 121.7 (CH=CH), 115.9 (CH_{Ar}), 52.4 (OMe), 52.4 (OMe), 46.8 (N-CH₂), 26.5 (CH-CH₂ minor), 25.2 (d, *J* = 4.7 Hz, CH-CH₂ major), 24.6 (P-CH₂ major), 23.2 (P-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 33.34 (P minor), 33.08 (P major). **Rf** : 0.45 (DCM/MeOH 97/3).

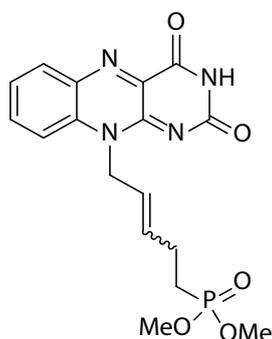
Dimethyl (4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[*g*]pteridin-10(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 95



Procedure : The debenzoylation of *N*₃-benzoylated heterocyclic base derivatives (100 mg) was carried out at 4 °C overnight in a 7N methanol solution of ammonia (5 mL). After evaporation of all the volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography DCM/MeOH (99:1 to 95:5) to yield the desired debenzoylated derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 86/14. Yield : 67%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.86 (s, 1H, N₃H), 8.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 7.91 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₈), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₉), 7.64 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₇), 5.98 – 5.72 (m, 2H, CH=CH), 5.55 – 5.46 (m, 2H, N-CH₂ minor), 5.37 (s, 2H, N-CH₂ major), 3.82 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe minor), 3.69 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe major), 3.02 (dd, *J* = 22.7, 8.7 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.61 (dd, *J* = 22.4, 4.5 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 159.2 (C=O), 155.1 (C=O), 150.4 (C_{quat}), 137.8 (C_{quat}), 136.3 (C₈), 136.0 (C_{quat}), 133.6 (C₆), 132.7 (C_{quat}), 127.1 (C₇), 126.2 (d, *J* = 14.5 Hz, CH=CH minor), 125.9 (d, *J* = 11.2 Hz, CH=CH major), 115.9 (C₉), 53.0 (OMe minor), 52.9 (OMe major), 46.9 (N-CH₂), 30.6 (d, *J* = 140.5 Hz, P-CH₂ minor), 29.5 (d, *J* = 140.5 Hz, P-CH₂ major). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 28.99 (P minor), 28.34 (P major). **Rf :** 0.28 (DCM/MeOH 95/5).

Dimethyl (5-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[*g*]pteridin-10(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 100

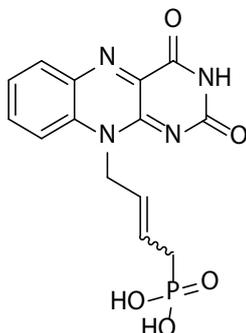


Procedure : The debenzoylation of *N*₃-benzoylated heterocyclic base derivatives (100 mg) was carried out at 4 °C overnight in a 7N methanol solution of ammonia (5 mL). After evaporation of all the volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography DCM/MeOH (99:1 to 95:5) to yield the desired debenzoylated derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 79/21. Yield : 58%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.23 (s, 1H, N₃H), 8.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₆), 7.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₈), 7.76 – 7.55 (m, 2H, H₇ & H₉), 6.09 – 5.59 (m, 2H, CH=CH), 5.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.33 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.78 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe minor), 3.68 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe major), 2.67 (dq, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 2H, CH-CH₂ minor), 2.34 (dq, *J* = 14.2, 6.9 Hz, 2H, CH-CH₂ major), 2.05 – 1.87 (m, 2H, P-CH₂ minor), 1.89 – 1.69 (m, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 159.3 (C=O), 155.4 (C=O), 150.3 (C_{quat}), 137.7 (C_{quat}), 136.2 (C₈), 135.9 (C_{quat}), 135.4 (d, *J* = 15.8 Hz, CH=CH), 133.5 (C₆), 132.8 (C_{quat}), 127.0 (C₇), 121.9 (CH=CH), 116.0 (C₉), 52.7 (d, *J* = 6.5 Hz, OMe minor), 52.5 (d, *J* = 6.7 Hz, OMe major), 46.8 (N-CH₂ major), 43.1 (N-CH₂ minor), 25.3 (d, *J* = 4.6 Hz, CH-CH₂ major),

24.1 (d, $J = 141.2$ Hz, P-CH₂ minor), 24.0 (d, $J = 141.4$ Hz, P-CH₂ major), 21.5 (d, $J = 4.8$ Hz, CH-CH₂ minor). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 33.51 (P minor), 33.20 (P major). Rf : 0.27 (DCM/MeOH 95/5).

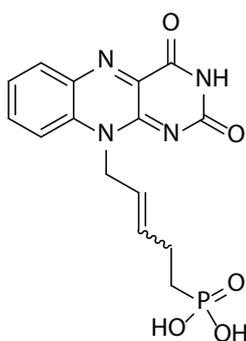
(4-(2,4-Dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-10(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 101



Procedure : In a 2-5mL vial, *bis*-(OMe) phosphonate derivative (20 mg, 1 eq, 0.053 mmol) was dissolved in acetonitrile (1 mL). Trimethylsilyl bromide (42 μL, 6 eq, 0.319 mmol) was then added to the solution, and the sealed tube was stirred at rt for 24h. After evaporation of all volatiles, the mixture was dissolved in 10 mL EtOH and 10 mL H₂O. The solution was then sonicated at 80 KHz during 10 minutes, followed by evaporation under reduced pressure. The residue was again dissolved in a mixture EtOH/H₂O (10 mL/10 mL), sonicated and evaporated to afford desired compound. Yield : 99%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.41 (s, 1H, N₃H), 8.15 (dd, $J = 13.2, 8.2$ Hz, 1H, H₆), 8.02 – 7.82 (m, 2H, H₇ & H₉), 7.66 – 7.62 (m, 1H, H₈), 5.99 – 5.61 (m, 2H, CH=CH), 5.27 – 5.23 (m, 2H, N-CH₂), 2.37 (dd, $J = 21.7, 7.4$ Hz, 2H, P-CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.7 (C=O), 155.6 (C=O), 150.1 (C_{quat}), 138.8 (C_{quat}), 134.8 (C₈), 132.3 (C₆), 131.7 (C_{quat}), 128.4 (C_{quat}), 126.9 (C₇), 126.0 (CH=CH), 125.3 (d, $J = 13.6$ Hz, CH=CH), 116.7 (C₉), 45.7 (N-CH₂), 32.9 (P-CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.50 (P minor), 20.94 (P major). HRMS-ESI (m/z) : [M-H]⁻ calculated for C₁₄H₁₂N₄O₅P 347.0550 found 347.0546.

(5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-10(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 102

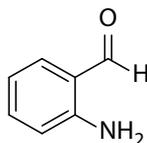


Procedure : In a 2-5mL vial, *bis*-(OMe) phosphonate derivative (30 mg, 1 eq, 0.24 mmol) was dissolved in acetonitrile (1 mL). Trimethylsilyl bromide (61 μL, 6 eq, 0.461 mmol) was then added to the solution, and the sealed tube was stirred at rt for 24h. After evaporation of all volatiles, the mixture was dissolved in 10 mL EtOH and 10 mL H₂O. The solution was then sonicated at 80 KHz during 10 minutes, followed by evaporation under reduced pressure. The residue was again dissolved in a mixture EtOH/H₂O (10 mL/10 mL), sonicated and evaporated to afford desired compound. Yield : 99%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, 1H, N₃H), 8.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₆), 7.96 – 7.81 (m, 2H, H₇ & H₉), 7.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₈), 5.87 – 5.57 (m, 2H, CH=CH), 5.37 – 5.27 (m, 2H, N-CH₂ minor), 5.27 – 5.13 (m, 2H, N-CH₂ major), 2.16 (q, $J = 13.1, 10.5$ Hz, 2H, CH-CH₂ major), 1.90 – 1.75 (m, 2H, CH-CH₂ minor), 1.74 – 1.62 (m, 2H, P-CH₂ minor), 1.51 (m, 2H, P-CH₂ major). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.8 (C=O), 155.7 (C=O), 150.4 (C_{quat}), 138.9 (C_{quat}), 134.9 (C₈), 134.2 (d, $J = 16.9$ Hz, CH=CH), 132.3 (C₆), 131.7 (C_{quat}), 126.0 (C₇), 121.8 (CH=CH), 116.8 (C₉), 45.6 (N-CH₂),

27.0 (d, $J = 135.7$ Hz, P-CH₂ major), 26.9 (P-CH₂ minor), 25.5 (d, $J = 3.3$ Hz, CH-CH₂ major). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.28 (P minor), 25.17 (P major). HRMS-ESI (m/z): [M-H]⁻ calculated for C₁₅H₁₄N₄O₅P 361.0707 found 361.0699.

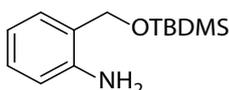
2-Aminobenzaldehyde - 110



Procedure: To a solution of 2-aminobenzyl alcohol derivative (1 g) in DCM_{anh} (50 mL) was added MnO₂ (4 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred until full disappearance of the starting material checked by TLC (eluent: DCM 100%, typically 24h). The resulting mixture was filtered on kieselgühr using DCM as eluent. The filtrate was evaporated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography through silica gel using DCM 100% as eluent. The yellow-orange liquid obtained was kept at -20°C to yield the desired product. Yield: 97%, yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 9.87 (s, 1H, CHO), 7.48 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_{Ar}), 7.34 – 7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 6.77 – 6.73 (m, 1H, H_{Ar}), 6.65 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H_{Ar}), 6.11 (bs, 2H, NH₂). Rf: 0.91 (DCM 100%). CAS: 529-33-7.

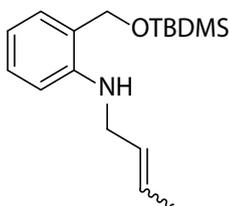
2-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)aniline - 114



Procedure: To a cooled suspension of NaH (60% dispersion in mineral oil, 2.3 g, 1.1 eq) in THF_{anh} (10 mL) was added dropwise a solution of 2-aminobenzyl alcohol (6.5 g, 52.8 mmol, 1 eq) in THF_{anh} (15 mL) and the mixture was stirred at 0 °C for 15 min under nitrogen atmosphere. To the resulting suspension was added dropwise a solution of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (9.5 g, 1.2 eq) in THF_{anh} (15 mL) and the reaction mixture was gradually warmed to room temperature and stirred for 2 h. The reaction mixture was cooled to 0 °C and crushed ice was carefully added to quench the reaction. The resulting aqueous phase was extracted with EtOAc (3×20 mL) and the combined extracts were washed with brine (2×10 mL), dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (PE/EtOAc 100% to 9/1) to yield the title compound. Yield: 99%, yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.04–6.94 (m, 2H, H_{Ar}), 6.64–6.54 (m, 2H, H_{Ar}), 4.61 (s, 2H, O-CH₂), 4.07 (br s, 2H, NH₂), 0.83 (s, 9H, TBDMS), 0.00 (s, 6H, TBDMS). Rf: 0.92 (PE/EtOAc 9/1). CAS: 68847-33-6.

N-(but-2-en-1-yl)-2-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)aniline - 115



Procedure:

Step 1: Formation of Schiff Base

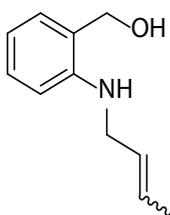
A solution of 2-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (1 g, 4.21 mmol) and crotonaldehyde (0.295 g, 1 eq) in toluene_{anh} (10.52 mL) was heated at reflux for 14 h using a Dean-Stark trap. Subsequent evaporation of toluene afforded the Schiff base as a brown oil which was used without further purification.

Step 2: Reduction

To a solution of NaBH₃CN (0.28 g, 4.44 mmol) in methanolic 3M HCl (10 mL) was added (1E,2E)-N-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)but-2-en-1-imine (1.00 g, 2.96 mmol). The mixture was stirred at rt for 10 h and the solvent removed in vacuo. On addition of H₂O (10 mL), the crude product was extracted with EtOAc (3 × 20 mL) and the combined extracts were washed with H₂O (20 mL), brine (2 × 20 mL) and dried over MgSO₄. The solvent was removed in vacuo and the product was purified using flash column chromatography (PE/EtOAc 1/0 to 9/1). The compound **115** was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 33%, yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.12 – 6.90 (m, 1H), 6.67 (dtd, *J* = 7.4, 3.4, 1.1 Hz, 2H), 6.04 – 5.50 (m, 2H, CH=CH), 4.98 (s, 2H, O-CH₂), 3.82 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 3.77 – 3.67 (m, 2H, N-CH₂), 1.79 – 1.70 (m, 3H, CH-CH₃), 0.92 (s, 9H, tBu), 0.09 (s, 6H, CH₃*2). **Rf** : 0.51 (PE/EtOAc 100%). **CAS** : 955092-31-6.

(2-(but-2-en-1-ylamino)phenyl)methanol - 116



Procedure :

Step 1: Formation of Schiff Base

A solution of 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (1 g, 4.21 mmol) and crotonaldehyde (0.295 g, 1 eq) in toluene_{anh} (10.52 mL) was heated at reflux for 14 h using a Dean-Stark trap. Subsequent evaporation of toluene afforded the Schiff base as a brown oil which was used without further purification.

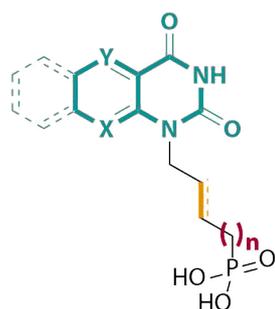
Step 2: Reduction

To a solution of NaBH₃CN (0.28 g, 4.44 mmol) in methanolic 3M HCl (10 mL) was added (1E,2E)-N-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)but-2-en-1-imine (1 g, 2.96 mmol). The mixture was stirred at r.t. for 10 h and the solvent removed in vacuo. On addition of H₂O (10 mL), the crude product was extracted with EtOAc (3 × 20 mL) and the combined extracts were washed with H₂O (20 mL), brine (2 × 20 mL) and dried over MgSO₄. The solvent was removed in vacuo and the product was purified using flash column chromatography (PE/EtOAc 1/0 to 9/1). The compound **116** was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 45%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.21 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.05 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.69 – 6.60 (m, 2H, H_{Ar}), 5.79 – 5.55 (m, 2H, CH=CH), 4.47 (s, 1H, OH), 3.72 (dt, *J* = 5.6, 1.5 Hz, 2H, N-CH₂), 3.31 (s, 2H, CH₂-OH), 2.17 (s, 1H, NH), 1.71 (dq, *J* = 6.3, 1.4 Hz, 3H, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 147.8 (C_{quat}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 128.3 (CH=CH), 127.5 (CH=CH), 121.7 (C_{quat}), 116.4 (CH_{Ar}), 110.8 (CH_{Ar}), 57.3 (CH₂-OH), 45.6 (N-CH₂), 17.9 (CH-CH₃). **HRMS-ESI (m/z)** : [M-H]⁺ calculated for C₁₁H₁₄N 160.1120 found 160.1121. **Rf** : 0.34 (PE/EtOAc 9/1).

PARTIE C :

SYNTHESE D'ANALOGUES DU FAD EN N_1



X = N, C
Y = N, C, H
n = 1, 2

I. Potentiel de ces structures et contexte

Contrairement aux molécules présentées dans le premier chapitre qui se restreignent aux tricycles aromatiques analogues du FAD induit par la substitution sur l'azote centrale N_{10} , cette seconde famille se caractérise par un choix plus vaste des bases hétérocycliques du fait de la translation de la chaîne latérale diacide phosphonique en série but-2'-ényle et pent-2'-ényle sur l'azote N_1 . Les systèmes polyhétéroaromatiques choisis, partageant en commun un noyau pyrimidine, conservent alors les mêmes interactions essentielles de π -stacking et de liaisons hydrogènes que le FAD avec les résidus du site actif. En conséquence, les structures visées dans cette 3^{ème} série constituent à la fois de potentiels inhibiteurs du transfert de méthylène tel que la série 1 mais aussi de potentiels inhibiteurs de la réduction initiale du FAD par le fait qu'ils empêchent l'addition concomitante des hydrures en N_1 et N_5 (Figure 60).

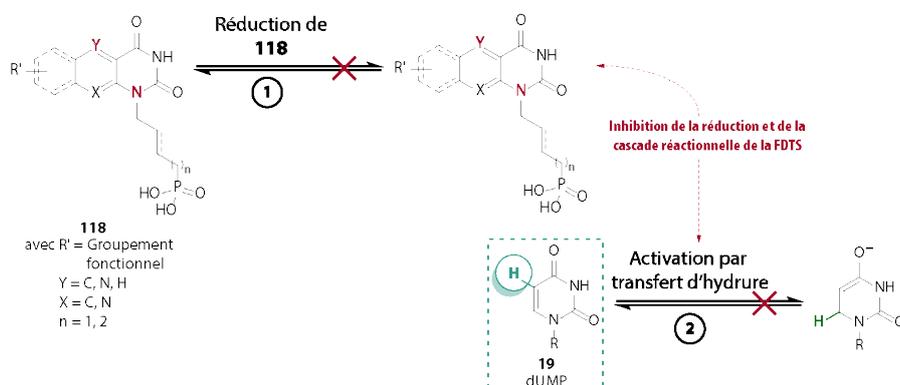


Figure 60 : Mécanisme proposé pour l'inhibition de nos dérivés ciblés.

Nos structures cibles sous la forme d'ANPs à bases polycycliques non canoniques analogues du FAD présentent un potentiel novateur et inexploré en tant qu'inhibiteur de la FDTS et le développement de cette famille s'inscrit dans une forte expérience concernant la synthèse d'ANPs de notre équipe depuis plus de 10 ans. En conséquence, plusieurs méthodes de synthèses convergentes d'ANPs ont été développées dont la principale repose sur une étape clé de métathèse croisée entre une base pyrimidique N_3 -protégée et N_1 -crotylée **120** et l'alkénylephosphonate correspondant **121** (Figure 61).

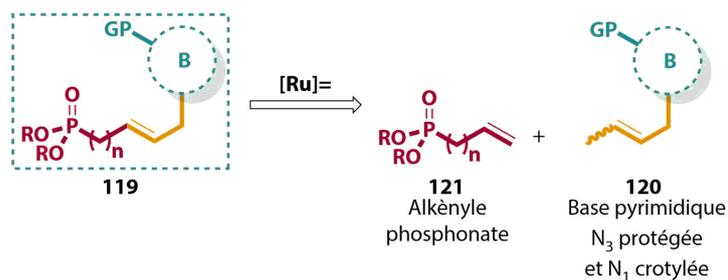


Figure 61 : Stratégie de synthèse des ANPs avec bases pyrimidiques.

Par ce procédé synthétique, les trois séries suivantes ont été explorées avec une modulation de la chaîne latérale (Figure 62) :

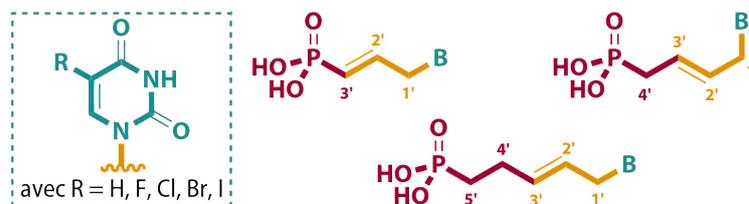


Figure 62 : Chaîne latérale explorée en série propèn-2-yle, butèn-2-yle et pentèn-2-yle.

Les pyrimidines nécessaires à la réaction de métathèse sont préparées séquentiellement par protection sélective en N_3 avec un groupement benzoyle ou Boc (tert-Butyloxycarbonyle) puis le groupement (*E*)-but-2-ène est introduits par substitution nucléophile en N_1 . Les partenaires phosphonates sont préparées par réaction de Mickaelis-Becker entre le diméthylphosphite et l'halogénure d'alkyle correspondant. Les 2 partenaires **122a-e** et **121** synthétisés sont alors directement engagés dans l'étape clé de métathèse croisée permettant l'obtention des produits de couplage **125a-e** et **127a-e** avec de bons rendements de 64 à 94%. A l'inverse, la chaîne latérale à 3 chaînons est préparée par métathèse croisée entre les pyrimidines non-protégées en N_3 et le diéthylvinyle phosphonate fournissant les produits ciblés **123a-e** avec des rendements de 37 à 71%. Enfin, les diacides phosphoniques **126a-e** et **128a-e** sont obtenus par déprotection séquentielle des groupements protecteurs et des méthoxyphosphonates par l'action du TMSBr alors que les produits à chaînes latérales à 3 chaînons **124a-e** sont obtenus par seule déprotection des phosphonates.

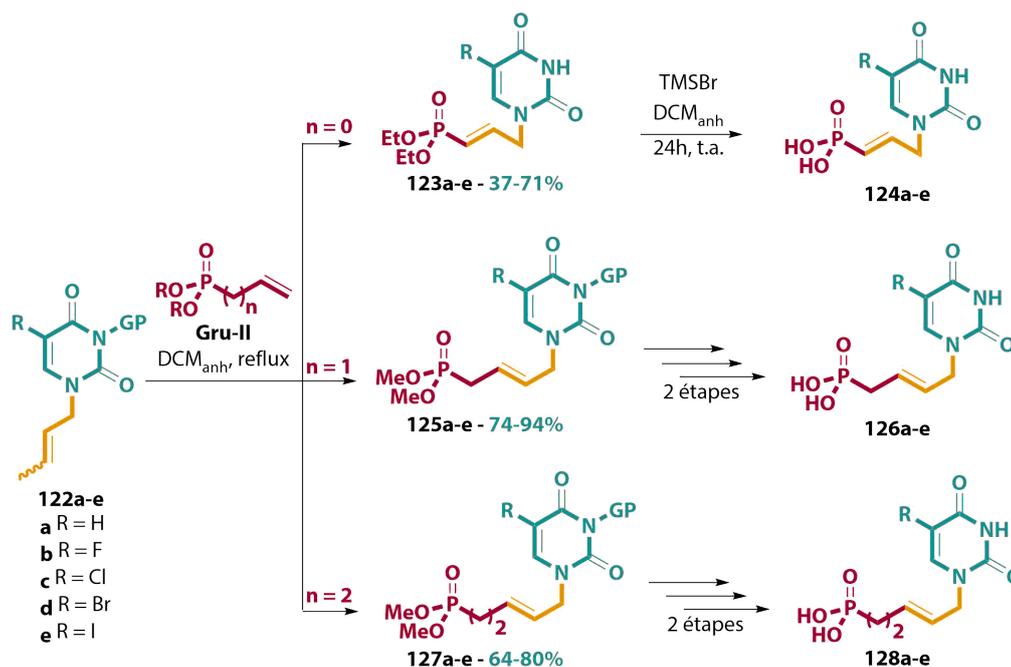


Figure 63 : Synthèse des acides phosphoniques ciblées avec modulation de la chaîne latérale.

Les tests enzymatiques de ces dérivés sur la thymidine monophosphate kinase humaine (*h*TMPK) ont révélé une catalyse plus efficace sur les analogues substitués par la chaîne latérale à 4 chaînons (Figure 64).¹²² Aussi, l'influence de la stéréochimie de la double liaison a été évaluée comme second paramètre influençant la phosphorylation de *h*TMPK. Les études cinétiques ont alors montré une meilleure affinité

¹²² Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232.

pour les stéréoisomères *E* de la série butèn-2-yle par les taux de phosphorylation plus élevés qu'ils montrent, comme représentée sur la Figure 65.

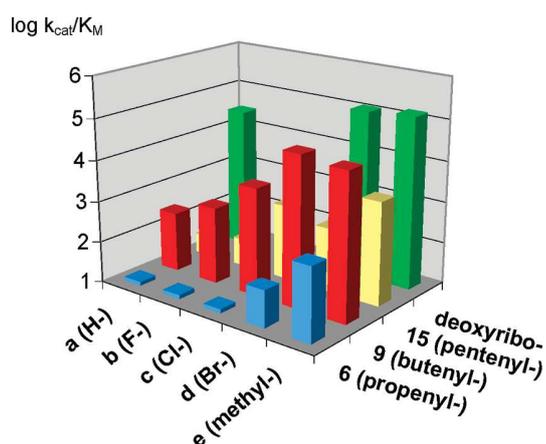


Figure 64 : Influence de la longueur de la chaîne acyclique sur l'efficacité de la phosphorylation par la *h*TMPK.

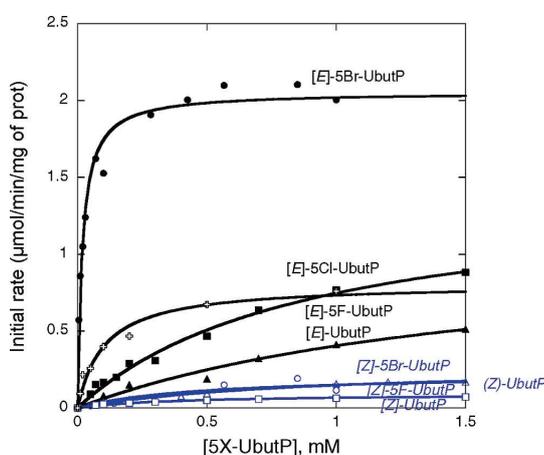


Figure 65 : Influence de la stéréochimie sur l'efficacité de la phosphorylation par la *h*TMPK.

Le lead de cette série, le composé **126e**, a alors été cristallisé dans le site actif de la *h*TMPK, et a montré une superposition de la chaîne acyclique (*E*)-butèn-2'-yle avec le pont étheré C_{1'}-O-C_{4'}-C_{5'} de la partie osidique du substrat naturel, la thymidine diphosphate. Ces résultats prouvent que cette longueur de chaîne et la stéréochimie de l'alcène associés à ces composés sont alors des mimes géométriques du ribose des nucléosides.

Dans ce contexte, cette chaîne latérale possède alors un intérêt indéniable pour nos dérivés cibles. Ces derniers montrent un potentiel rôle de doubles inhibiteurs du transfert de méthylène comme les dérivés nucléosidiques de la première série mais aussi comme inhibiteurs de la réduction du FAD du fait de la synthèse en parallèle de mimes structuraux de ce cofacteur avec une chaîne latérale à 5 chaînons, permettant une longueur de chaîne équivalente à celle de la FMN.

II. Synthèse par formation finale du noyau 1,3-diazine

1 Structures cibles

Les structures cibles de cette seconde famille possèdent la formule générale suivante :

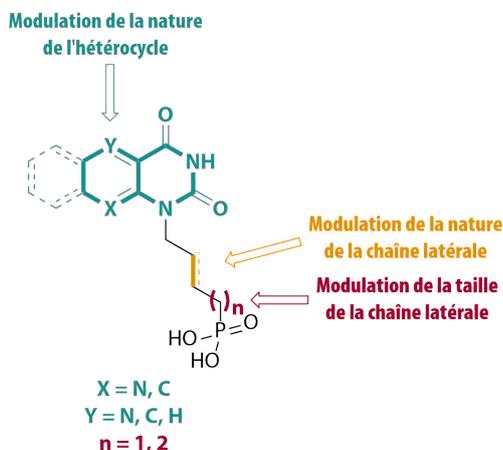


Figure 66 : Structures envisagées comme analogues du FAD en N_i .

Trois modulations principales seront explorées dans ce chapitre pour ces analogues du FAD fonctionnalisés en N_i avec une multitude de bases hétérocycliques de type bicyclique, tricyclique et à forme ouverte, avec la saturation ou non de la chaîne latérale et avec la modulation de la taille de cette dernière (Figure 66).

2 Rétrosynthèse envisagée

Ce premier schéma synthétique se concentre sur une étape finale de construction du noyau 1,3-diazine à partir d'un synthon portant la chaîne latérale alkénylephosphonate de type but-2'-ényle et pent-2'-ényle dont l'apport est très explicité dans la littérature pour la synthèse de dérivés polycycliques détenant ce même noyau d'intérêt.¹²³

¹²³ a) Peet, N. P.; Sunder, S.; Barbuch, R. J. A Novel Oxamide Rearrangement. *J Het Chem* **1980**, *17*, 1513–1518. b) Schwinn, D.; Glatz, H.; Bannwarth, W. Multistep Parallel Synthesis of Quinazoline-2,4-Diones by a Fluorous Biphasic Concept without Perfluorinated Solvents. *HCA* **2003**, *86*, 188–195. c) Hartopp, P.; Johnson, T.; Sanganee, H. Combination Comprising 6-Fluoro-N-((1*s*,4*s*)-4-(6-Fluoro-2,4-Dioxo-1-(4'-(Piperazin-1-ylmethyl)Biphenyl-3-yl)-1,2-Dihydropyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin-3(4H)-yl)Cyclohexyl)Imidazo-[1,2-*a*]-Pyridine-2-Carboxamide or a Salt. WO2010004319 (A1), January 14, 2010. d) Kamal, Ä.; Ashraf, M.; Vishnu Vardhan, M. V. P. S.; Faazil, S.; Nayak, V. L. Synthesis and Anticancer Potential of Benzothiazole Linked Phenylpyridopyrimidinones and Their Diones as Mitochondrial Apoptotic Inducers. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 147–151. e) Cheng, V. W. T.; Piragasam, R. S.; Rothery, R. A.; Maklashina, E.; Cecchini, G.; Weiner, J. H. Redox State of Flavin Adenine Dinucleotide Drives Substrate Binding and Product Release in Escherichia Coli Succinate Dehydrogenase. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1043–1052. f) Piotrowska, D. G.; Andrei, G.; Schols, D.; Snoeck, R.; ?ysakowska, M. Synthesis, Anti-Varicella-Zoster Virus and Anti-Cytomegalovirus Activity of Quinazoline-2,4-Diones Containing Isoxazolidine and Phosphonate Substructures. *Eur J Med Chem* **2017**, *126*, 84–100.

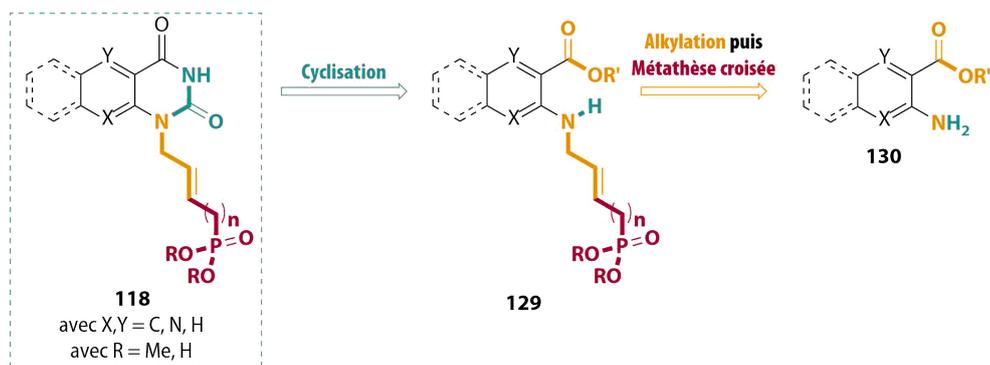


Figure 67 : Rétrosynthèse de la première approche.

La rétrosynthèse imaginée possède alors deux déconnexions importantes dont la première consiste au greffage de la chaîne latérale sur un analogue d'acide anthranilique ou d'ester **130** par alkylation suivi d'une étape clé de métathèse croisée. Enfin, les différents dérivés hétéroaromatiques **118** proviennent alors d'une cyclisation à l'urée sur le synthon précédant (Figure 67).

3 Résultats et discussions

➤ Première approche

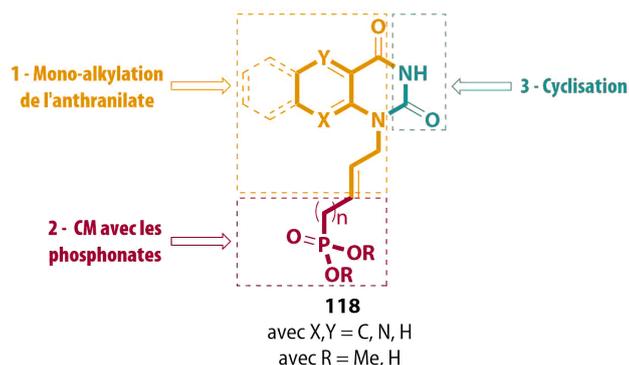


Figure 68 : Stratégie de synthèse des composés **118**.

Dans cette synthèse, l'objectif est d'accéder au produit **118**, nous nous intéresserons ainsi, à la mono-alkylation de l'ester de type anthranilate et à ses résultats sur des dérivés choisis qui serviront alors de preuves de concept. Avec ces intermédiaires en main, une étape clé de métathèse croisée est alors envisagée suivi par la cyclisation à l'urée responsable de la construction finale du noyau 1,3-diazine de nos bases hétéroaromatiques non canoniques.

- Formation des esters et essais d'alkylation

Tout d'abord, un dérivé d'anthranilate d'alkyle est choisit en tant que preuve de concept pour ce schéma réactionnel. Cet ester est un précurseur du noyau 5-déazaflavine visée dans cette série et est synthétisé à partir de produits commerciaux. Ainsi, le composé **133** est préparé en 2 étapes avec de très bons rendements. La synthèse de ce dernier débute par une condensation de Knoevenagel sur le 2-nitrobenzaldéhyde **131** en présence d'éthylcyanoacétate selon deux méthodes. La première décrite par Chen *et al.* reporte cette réaction en conditions « vertes » par l'action d'un catalyseur enzymatique, la Porcine Pancreatic Lipase (PPL) responsable de la condensation de l'éthylcyanoacétate sur **131** en

solution dans l'éthanol.¹²⁴ L'équipe de Menegatti reporte quant à eux une méthode en milieu aqueux couplée à une catalyse basique dont le screening de plusieurs bases faibles a été réalisé.¹²⁵ Bien que leurs conditions emploient la morpholine en quantité catalytique (5 mol %), ils montrent des rendements sensiblement équivalents en employant la pipéridine et la triéthylamine (Et₃N).

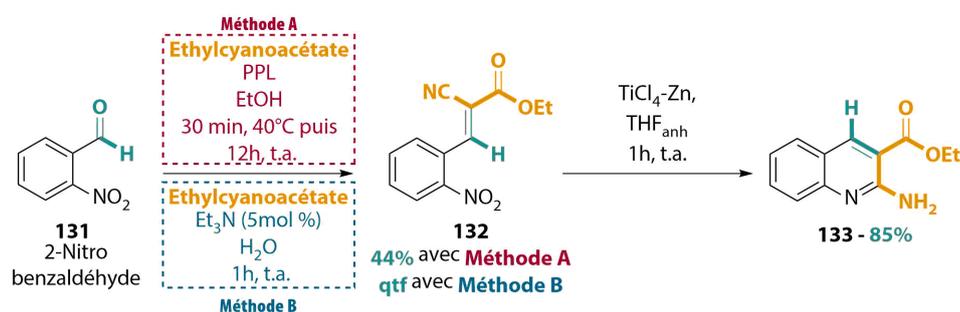
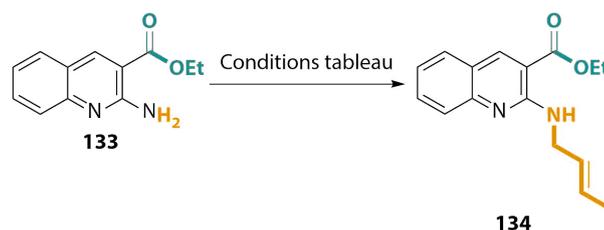


Figure 69 : Réaction de Knoevenagel et cyclisation réductrice fournissant **133**.

La méthode B permet d'obtenir le cyanoester **132** de manière quantitative alors que la méthode A forme cet intermédiaire avec un rendement de 44% (Figure 69). Le composé **133** est alors synthétisé par cyclisation réductrice intramoléculaire résultant de l'action du couple tétrachlorure de titane (TiCl₄) – zinc métallique avec un très bon rendement de 85% selon la méthode publiée par Chen *et al.*¹²⁶ La réactivité de l'amine en position 2 de cette quinoline **133** est alors étudiée dans différentes conditions d'alkylation présentées dans le Tableau 18 :

Tableau 18 : Essais d'alkylation de **133** par un groupement (*E*)-but-2-ène.



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion	Rendement
1	Bromure de crotyle, K ₂ CO ₃	DMF _{anh}	14h, 70°C	<20%	10%
2	Bromure de crotyle, <i>t</i> -BuOK	THF _{anh}	2h, t.a.	0%	X
3	Bromure de crotyle, <i>n</i> -BuLi	THF _{anh}	30 min, -78°C puis 14h, t.a.	0%	X
4	(<i>E</i>)-But-2-èn-1-ol, PPh ₃ , DIAD	THF _{anh}	14h, t.a.	0%	X
5	(<i>E</i>)-But-2-èn-1-ol, PPh ₃ , DIAD	THF _{anh}	14h, reflux	0%	X

¹²⁴ Lai, Y.-F.; Zheng, H.; Chai, S.-J.; Zhang, P.-F.; Chen, X.-Z. Lipase-Catalysed Tandem Knoevenagel Condensation and Esterification with Alcohol Cosolvents. *Green Chem* **2010**, *12*, 1917–1918.

¹²⁵ Gomes, M. N.; Oliveira, C. M. A. de; Garrote, C. F. D.; Oliveira, V. de; Menegatti, R. Condensation of Ethyl Cyanoacetate with Aromatic Aldehydes in Water, Catalyzed by Morpholine. *Synth Commun* **2010**, *41*, 52–57.

¹²⁶ Zhou, L.; Tu, S.; Shi, D.; Dai, G.; Chen, W. Low-Valent Titanium Induced Novel Reductive Cyclization of α,β -Unsaturated Nitrile Compounds. *Synthesis* **1998**, *6*, 851–854.

Entrée 1 : Les conditions sont employées sur notre intermédiaire quinoline **133** et il en résulte une disparition minimale (mesurée par RMN) de ce dernier. Le produit désiré est alors isolé avec un faible rendement de 10%.

Entrée 2 : L'emploi de *t*-BuOK n'induit aucune conversion du produit de départ.

Entrée 3 : L'hypothèse de cette entrée concerne la réactivité de l'amine et afin de palier à ce problème, la formation de l'amidure correspondant est entreprise mais après traitement, seul le produit de départ est isolé.

Entrée 4 & 5 : La réaction de Mitsunobu est une méthode très populaire dans la littérature qui permet le couplage de différents substrats et plus spécifiquement, d'amine peu réactives avec des partenaires alcools d'une grande variété.¹²⁷ Ainsi, **133** est mis en réaction avec le (*E*)-but-2-èn-1-ol, la triphénylphosphine (PPh₃) et le diisopropylazodicarboxylate (DIAD) dans un premier temps pendant la nuit ou aucune conversion du substrat de départ **133** n'est observé. Un apport énergétique par le chauffage à reflux du THF_{anh} pendant la nuit ne permet pas non plus la formation du produit ciblé.

Dans l'optique d'une approche efficace et d'un rendement global élevé de nos dérivés *N*₁-alkylés en série bicyclique et tricyclique, l'impossibilité d'obtenir le synthon **134** en quantité suffisante et avec des rendements satisfaisants, empêche la validation de cette méthode comme preuve de concept.

➤ Seconde approche

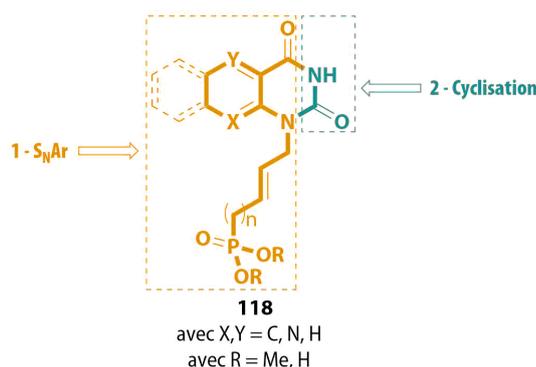


Figure 70 : Modification de la synthèse des composés **118**.

Une modification de notre approche est alors apportée par la fonctionnalisation par S_NAr sur des analogues d'acides benzoïques ortho-chlorés.¹²⁸ Il convient alors de préparer le partenaire phosphonate à 4 et 5 chaînons portant un groupement amine en bout de chaîne. Les conditions classiques de formation des amines sont alors employées avec d'une part, la première méthode qui consiste à employer la synthèse de Gabriel des amines et la seconde dont l'amine origine d'un groupement azoture qui est réduit en fin de synthèse dans les conditions de Staudinger (Figure 71).

¹²⁷ Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem Rev* **2009**, *109*, 2551–2651.

¹²⁸ a) Burgess, J.; Callahan, J.; Hamajima, T.; Ida, S.; Tang, J.; Mori, I. Chemical Compounds. WO2004034985 (A2), April 29, 2004. b) Liu, S.; Pestano, J. P. C.; Wolf, C. Regioselective Copper-Catalyzed C-N and C-S Bond Formation Using Amines, Thiols and Halobenzoic Acids. *Synthesis* **2007**, *22*, 3519–3527.

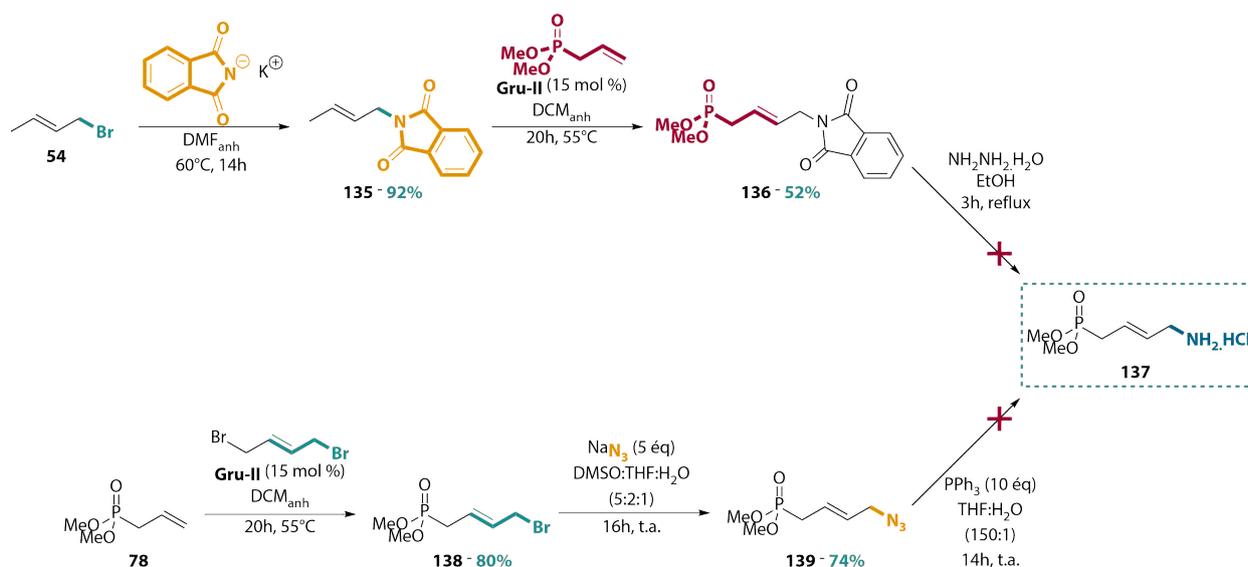


Figure 71 : Essais de formation du partenaire de S_NAr **137**.

Par une première approche, la condensation du phthalimide de potassium sur le bromure de crotyle **54** permet d'obtenir **135** avec un très bon rendement de 92%. L'intermédiaire **135** est alors directement engagé dans une réaction de métathèse croisée avec un excès du partenaire phosphonate (4 équivalents) dans les conditions classiques développées par notre équipe. Le produit de couplage **136** est obtenu avec un rendement satisfaisant de 52% après purification. La déprotection du phthalimide est effectuée par l'utilisation d'hydrazine monohydrate ($NH_2NH_2 \cdot H_2O$) à reflux dans l'éthanol pendant 3h. Cependant, cette méthode fournit après neutralisation en milieu acide (HCl 6M), le sel d'ammonium correspondant **137** qui par sa forte polarité empêche son extraction en phase organique. Un traitement en milieu basique afin de libérer l'amine libre provoque les mêmes difficultés d'extraction. En parallèle, la deuxième voie de synthèse est réalisée par le biais d'une étape primordiale de métathèse croisée entre **78** et le *trans*-1,4-dibromobut-2-ène fournissant le produit de couplage **138** avec un bon rendement de 80%. Ce dernier de type buténylephosphonate bromé en position 4 est engagé dans une substitution nucléophile avec l'azoture de sodium (NaN_3) dans un mélange de solvant tertiaire selon les conditions publiées récemment par notre équipe.¹²⁹ L'addition de l'azoture fournit le précurseur de la réaction de Staudinger **139** avec un bon rendement de 74%. Comme précédemment dans la voie de synthèse par réaction de Gabriel, la forme saline et la forme libre de l'amine, étant donné leur polarité élevée, restent en phase aqueuse ce qui empêche leur isolation et leur purification.

4 Conclusions & Perspectives

Dans cette première rétrosynthèse imaginée, l'intérêt s'est principalement porté sur la mise au point d'un procédé synthétique, basé sur la littérature, ou la formation du noyau 1,3-diazine est réalisé en fin de synthèse. Deux approches ont alors été explorées d'une part, par l'alkylation d'un dérivé d'acide anthranilique et d'autre part, par S_NAr d'un partenaire phosphonate aminé sur un dérivé acide benzoïque ortho-chloré mais ces dernières n'ont pas permis l'obtention des résultats escomptés malgré les différents développements quant à ces deux procédés synthétiques.

¹²⁹ Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408.

III. Synthèse par mono-protection régiosélective

1 Rétrosynthèse envisagée

Étant donné la présence commune d'un noyau pyrimidine, essentiel à la reconnaissance dans le site actif de la FdTS, sur tous les inhibiteurs potentiels ciblés dans la troisième série, cette seconde synthèse se base sur les résultats récents reportés par notre équipe concernant la synthèse d'ANPs basé sur les pyrimidines canoniques. Ainsi, deux approches ont été employées afin de conduire au greffage spécifique de la chaîne latérale sur l'azote N_7 des pyrimidines par la monoprotection régiosélective de l'azote N_3 ou par *per*-protection suivi d'une déprotection sélective de l'azote N_7 .¹³⁰ Ces régioisomères N_3 protégés permettent l'accès à une fonctionnalisation sélective des bases pyrimidiques par différents procédés synthétiques tels que la réaction de Mitsunobu, par substitution nucléophile ou encore par glycosylation.

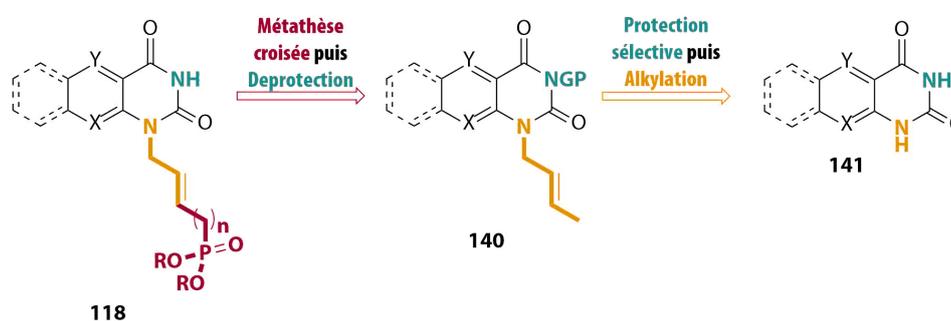


Figure 72 : Rétrosynthèse de la seconde approche.

Pour ce faire, les ANPs cibles **118** subiront une réaction de métathèse croisée des oléfines avec les partenaires alkénylesphosphonates suivi du clivage du groupement protecteur en N_3 . Pour obtenir le groupement crotyle sélectivement sur l'azote N_7 , **140** proviendra d'une protection sélective de l'azote N_3 nécessaire à l'introduction concomitante de ce dernier sur les bases hétérocycliques **141** préparées au préalable.

¹³⁰ a) Roy, V.; Kumamoto, H.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Topalis, D.; Deville-Bonne, D.; Balzarini, J.; Neyts, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; *et al.* Cross-Metathesis Mediated Synthesis of New Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1399–1402. b) Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232. c) Pradère, U., Clavier, H., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The Shortest Strategy for Generating Phosphonate Prodrugs by Olefin Cross-Metathesis - Application to Acyclonucleoside Phosphonates. *Eur J Org Chem* **2011**, 7324–7330. d) Montagu, A., Pradère, U., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. Expedient convergent procedure for the preparation of bis(POC) prodrugs of new (E)-4-phosphono-but-2-en-1-yl nucleosides. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5319–5328. e) Agrofoglio, L.A., Roy, V. Novel antiviral acyclic nucleoside phosphonates, WO2012034719 (A1) 2012-03-22. f) Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408. g) Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Olefin Cross-Metathesis for the Synthesis of Alkenyl Acyclonucleoside Phosphonates. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.

2 Résultats et discussions

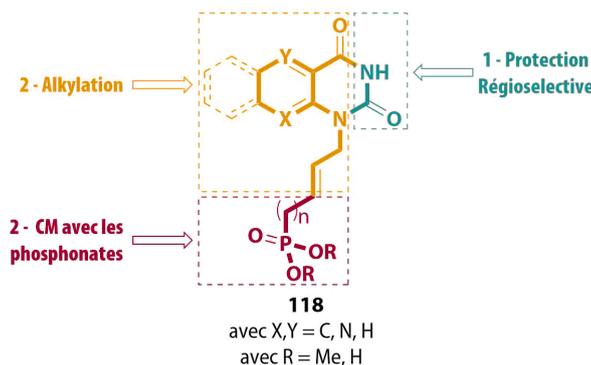


Figure 73 : Stratégie de synthèse par protection régiosélective de **118**.

Les efforts de cette stratégie se concentrent sur la préparation des bases hétérocycliques par diverses méthodes puis, plus spécifiquement, sur les différents essais conduisant aux dérivés de ces bases dont l'azote N_3 a été régiosélectivement protégé.

➤ Préparation des bases hétéroaromatiques

Etant donné la grande variété structurale des bases hétérocycliques visées dans la 2^{ème} série, différents protocoles synthétiques sont alors entrepris. Ainsi, les noyaux de types isoalloxazine **143** et son dérivé diméthylé en position 7 et 8 **37** sont préparées en 2 étapes décrites dans la littérature (Figure 74).^{131,132}

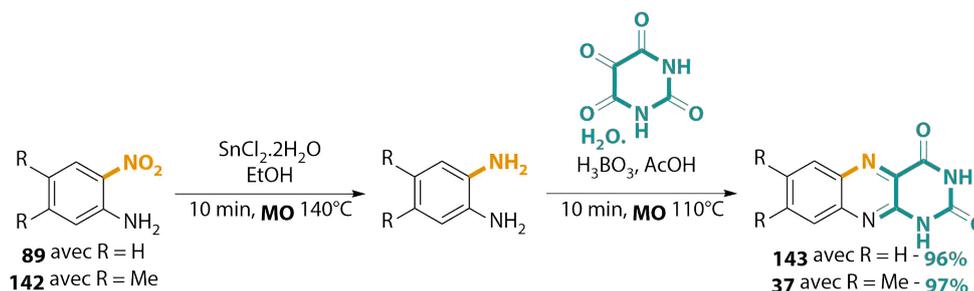


Figure 74 : Préparation des flavines au MO.

La première étape décrite par Spinks *et al.* consiste en la réduction du groupement nitro de dérivés de la 2-nitroaniline au micro-ondes puis les ortho-phénylènediamines résultantes sont engagées dans une réaction de condensation avec l'alloxane monohydrate par catalyse acide sous activation micro-onde. Bien que les quantités utilisées par cette méthode soient limitées par la taille des vials (échelle de 400 mg pour la première étape), ce procédé a permis d'obtenir les tricycles de type flavines avec d'excellents rendements et avec des temps de réaction courts (96% en 2 étapes pour **143** et 97% en 2 étapes pour **37**). De la même manière, le tricycle pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione (5-déazaflavine, **144**) est synthétisé en 2 étapes séquentielles :

¹³¹ Spinks, D.; Ong, H. B.; Mpamhanga, C. P.; Shanks, E. J.; Robinson, D. A.; Collie, I. T.; Read, K. D.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Brenk, R.; *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Inhibitors of Trypanosoma Brucei Pteridine Reductase 1. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 302–308.

¹³² Chauhan, S. M. S.; Singh, R.; Geetanjali. Microwave-Assisted Synthesis of 10-Substituted Isoalloxazines in the Presence of Solid Acids. *Synth Commun* **2003**, *33*, 1179–1184.

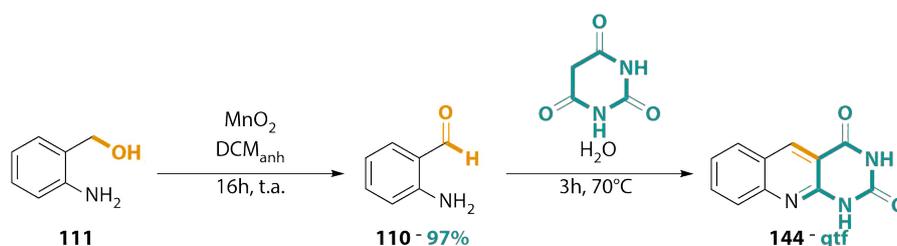


Figure 75 : Préparation de la 5-déazaflavine.

Ainsi, la fonction aldéhyde de **110** nécessaire à la formation du noyau quinoline central est obtenue par une oxydation douce à l'oxyde de manganèse dans le DCM pendant une nuit avec un très bon rendement de 97%.¹³³ L'hétérocycle **144** est formé quantitativement par réaction de Friedländer entre **110** et l'acide barbiturique selon la méthode décrite par Tang *et al.* dans l'eau en 3h à 70°C.¹³⁴

Seuls les hétérocycles de type bicyclic ou tricyclic dont les précurseurs sont exclusivement disponibles commercialement sous la forme d'analogues d'acides anthraniliques, sont synthétisés par fermeture de cycle selon le protocole décrit par Li *et al.* en présence d'urée à 150°C pendant 12h.¹³⁵ La construction du noyau 1,3-diazine sur un panel étendu de divers hétérocycles est alors entreprise (Figure 76) :

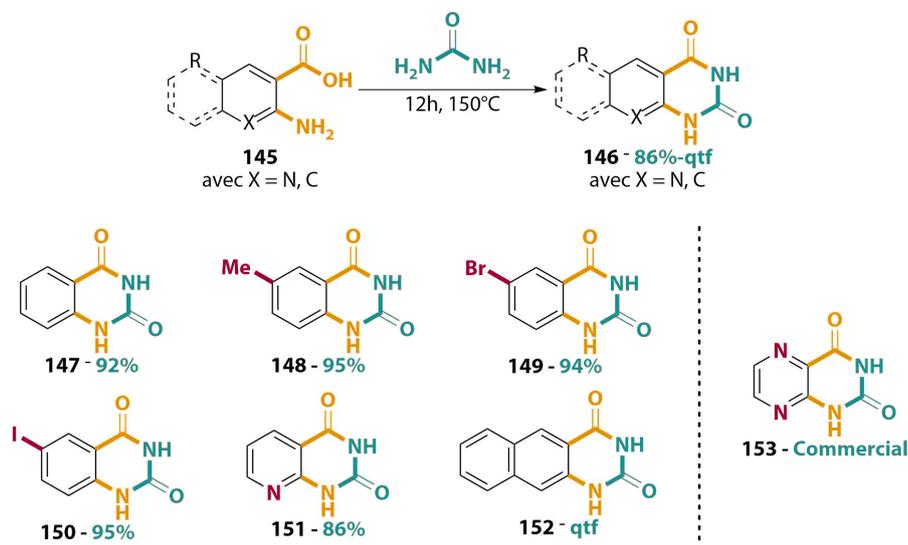


Figure 76 : Cyclisation à l'urée de **145**.

Par cette méthode, une librairie de divers hétérocycles a été préparée avec de très bons rendements de 86% à quantitatif (Figure 76) dont une quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (**147**, 92%), des analogues de cette dernière substitués en position 6 par un méthyl (**148**, 95%) ou des halogènes (**149** avec Br, 94% et **150** avec I, 95%) permettant une fonctionnalisation postérieure par couplage pallado-catalysé mais aussi l'analogue bicyclic de la 5-déazaflavine, la pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (**151**, 86%) et l'analogue 5,10-didéazaflavine (benzo[g]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione, **152**, qtf).

¹³³ Ida, Y.; Matsubara, A.; Nemoto, T.; Saito, M.; Hirayama, S.; Fujii, H.; Nagase, H. Synthesis of Quinolinomorphinan Derivatives as Highly Selective δ Opioid Receptor Ligands. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 5810–5831.

¹³⁴ Shen, Q.; Wang, L.; Yu, J.; Liu, M.; Qiu, J.; Fang, L.; Guo, F.; Tang, J. Synthesis of Quinolines via Friedländer Reaction in Water and under Catalyst-Free Conditions. *Synthesis* **2012**, *44*, 389–392.

¹³⁵ Li, P.; Zhan, C.; Zhang, S.; Ding, X.; Guo, F.; He, S.; Yao, J. Alkali Metal Cations Control over Nucleophilic Substitutions on Aromatic Fused Pyrimidine-2,4-[1H,3H]-Diones: Towards New PNA Monomers. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8908–8915.

Il est important de noter que l'analogue bicyclique du noyau isoalloxazine **153** est disponible commercialement. Comme précédemment, les analogues en forme ouverte de type 6-anilinoouraciles sont synthétisés par la mise en fusion de la 6-chlorouracile avec les anilines à 175°C pendant 20 min (Figure 77) :¹³⁶

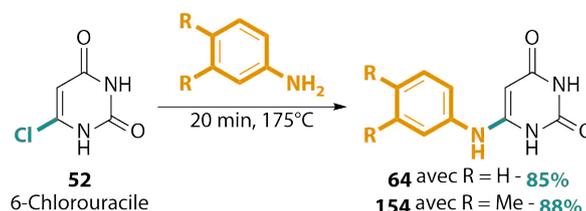


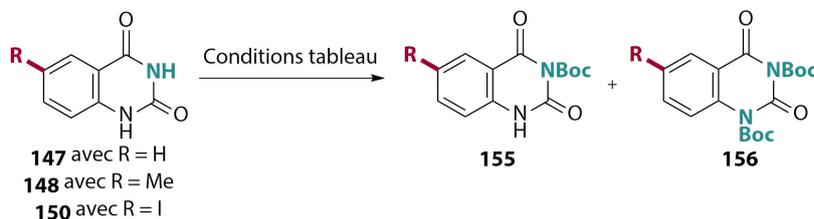
Figure 77 : S_NAr avec la 6-chlorouracile.

Après traitement, les deux produits **64** et **154** sont obtenus sous la forme de solides blancs avec des rendements respectifs de 85% et 88%.

➤ Protection régiosélective

Classiquement, l'isolation de l'azote N₁ des noyaux pyrimidines en vue d'une future fonctionnalisation de ce dernier est effectuée par une méthodologie de perprotection suivi par une mono-déprotection régiosélective de l'azote N₁. Par analogie structurale, les essais de mono-protection avec un groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) sont alors entrepris sur trois bicycles de notre panel **147**, **148** et **150** afin d'étudier la répétabilité de la méthode et l'effet de la substitution en position 5 :

Tableau 19 : Essais de mono-protection par un groupement Boc.



Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Rendement de 155	Rendement de 156
1	Boc ₂ O, DMAP puis SiO ₂ (60% w/w)	THF _{anh} Puis DCM/MeOH 9/1	7 min, MO 70°C puis 2 min, MO 70°C	4%	96%
2	Boc ₂ O (2 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min,))) 55°C	X	100%
3	Boc ₂ O (1 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min,))) 55°C	X	50%
4	Boc ₂ O (2 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min, 60°C	X	100%
5	Boc ₂ O (1 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min, 60°C	X	50%
6	Boc ₂ O (2 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min, 5°C	X	100%
7	Boc ₂ O (1 éq), DMAP	THF _{anh}	30 min, 5°C	X	50%

¹³⁶ Wilson, J. M.; Henderson, G.; Black, F.; Sutherland, A.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H.; Robins, D. J. Synthesis of 5-Deazaflavin Derivatives and Their Activation of P53 in Cells. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 77–86.

Entrée 1 : Ce premier essai consiste à la reproduction des conditions de mono-protection par un groupement Boc développées récemment par notre équipe.¹³⁷ Le produit mono-protégé est obtenu avec un faible rendement de 4% en mélange avec une quantité majoritaire de produit di-alkylé. La présence de l'halogène en position 6 induit la formation du produit secondaire *tert*-butylé sur l'azote N₃ du fait des effets électroniques liées à ce dernier, ce qui induit la libération du groupement Boc en N₃ et l'amine très réactive, ainsi obtenue, attaque les résidus d'*isobutène* libérés dans le milieu.

Entrée 2 & 3 : Le passage à l'activation par ultrason par son effet dissociant lié à la cavitation acoustique ne permet pas la formation des dérivés mono-protégés désirés et ce, même par la réduction du nombre d'équivalent de di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) à 1 équivalent. Un contrôle CCM après 30 min de réaction ne montre la présence exclusive que des dérivés di-protégés.

Entrée 4 & 5 : Le chauffage classique à 60°C induit de la même manière la formation exclusive des dérivés di-protégés.

Entrée 6 & 7 : Nous émettons l'hypothèse que la température de réaction augmente la réactivité des amines en position 1 et 3, nous décidons alors de plonger le milieu réactionnel dans un bain de glace et de contrôler sur CCM au bout de 30 min de réaction. Ce contrôle révèle le même résultat qu'aux entrées précédentes, c'est-à-dire, la présence exclusive des dérivés di-protégés.

Cette stratégie par un groupement Boc est ainsi abandonnée face aux résultats infructueux obtenus, notre intérêt se porte alors sur des essais de mono-benzoylation reportée sur les pyrimidines canoniques par mono-protection sélective¹³⁸ ou par *per*-protection et déprotection régiosélective¹³⁹ :

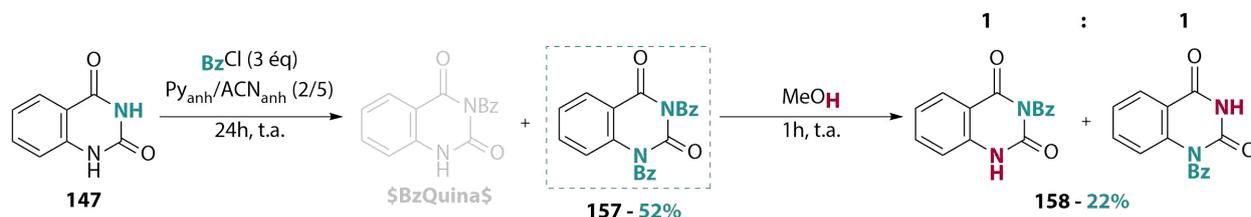


Figure 78 : Essais de mono-benzoylation.

L'essai de mono protection conduit seulement à la formation du produit dibenzoylée **157** contrairement à l'uracile ou la thymine et ce dernier est alors engagé dans une déprotection régiosélective au méthanol, qui résulte en la formation d'un mélange équimolaire **158** de N₁-monobenzoylé et de N₃-monobenzoylé avec un faible rendement de 22%.

En parallèle, les mêmes essais de mono-protection ont été aussi entrepris sur les tricycles hétéroaromatiques **143**, **144** et **152** et conduisent exclusivement aux produits *per*-protégés sans que la déprotection régiosélective ne fonctionne (Figure 79) :

¹³⁷ Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. A Convenient, Highly Selective and Eco-Friendly N-Boc Protection of Pyrimidines under Microwave Irradiation. *RSC Adv* **2014**, *4*, 59747–59749.

¹³⁸ Weaver, D.; Guillain, B. Pyrimidine Compounds as Anti-Ictogenic and/or Anti-Epileptogenic Agents. WO2006070292 (A2), July 6, 2006.

¹³⁹ Ludek, O. R.; Meier, C. Influence of the N3-Protection Group on N1- vs. O2-Alkylation in the Mitsunobu Reaction. *Eur J Org Chem* **2006**, *4*, 941–946.

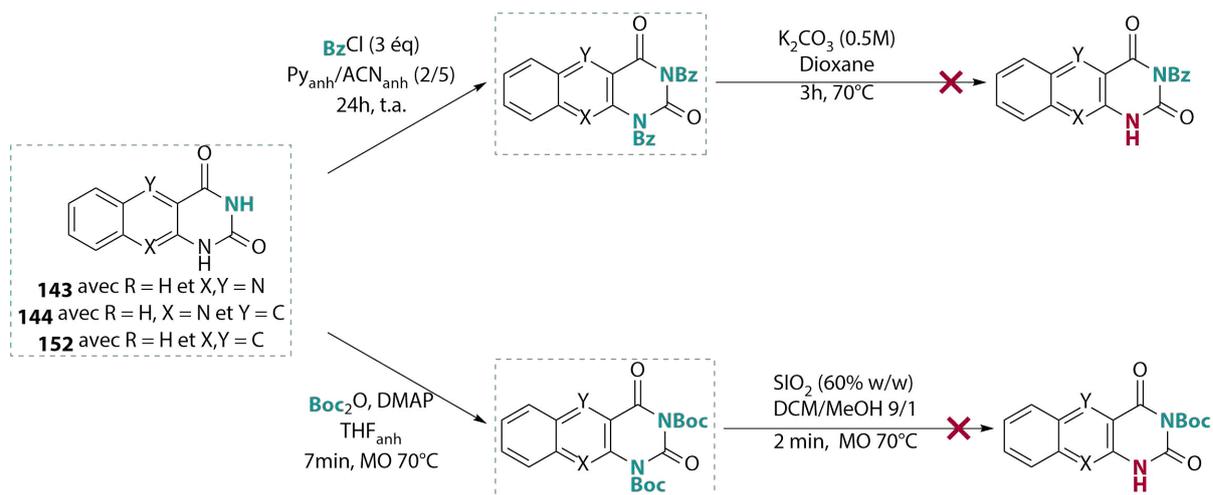


Figure 79 : Essais de mono-protection sur les tricycles hétéroaromatiques.

3 Conclusions & Perspectives

Dans cette seconde approche, la préparation des différents bases hétérocycliques a été entreprise et réalisée avec des rendements de bons à excellents par diverses méthodes en essayant de réduire les temps de réaction par le biais de l'activation micro-ondes dès que possible. Deux approches basées sur deux groupements protecteurs *tert*-butyloxycarbonate et benzoyle ont alors été explorées afin de synthétiser ces nouveaux ANPs cibles mais les dérivés mono-protégés n'ont pas pu être isolés. Ces mono-protections ne sont alors pas une stratégie viable et nécessiteraient un changement de groupement protecteur tel que le SEM connu par sa protection sélective d'amine et sa stabilité élevée.

IV. Synthèse par alkylation régiosélective

1 Rétrosynthèse envisagée

Par extension de la réaction de Hilbert-Johnson qui réalise le couplage de 2,4-alkoxyypyrimidines et d'halogénure de glycosyle protégé, la réaction de Vorbrüggen permet le couplage des nucléobases canoniques avec des sucres *per*-protégés par des acétates ou benzoates de manière efficace et stéréosélective dans des conditions relativement douces.¹⁴⁰ Ainsi, la supériorité de cette méthode se traduit par l'emploi d'un agent de silylation résultant en la formation des éthers silylés labiles sur ces noyaux puis par l'emploi d'un acide de Lewis, classiquement, le tétrachlorure d'étain (SnCl₄) ou le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) qui réalise l'activation du sucre *per*-protégé utilisé mais aussi, qui est responsable du couplage avec la nucléobase employée. Par ailleurs, le potentiel de cette réaction a aussi été mis à profit dans la littérature pour la fonctionnalisation régiosélective d'une grande variété d'hétérocycles dérivés des bases canoniques et plus spécifiquement des pyrimidines en N1.

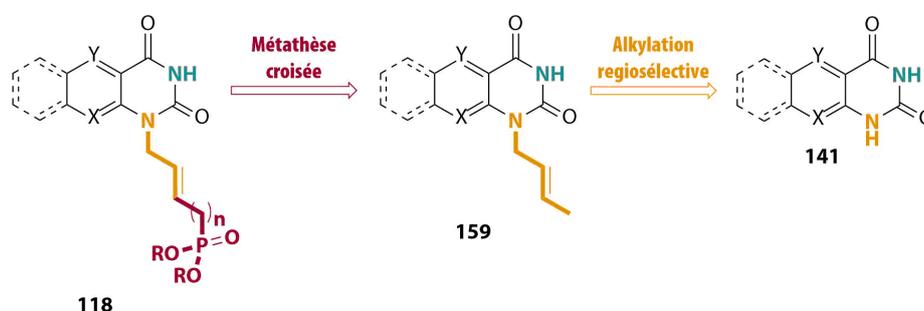


Figure 80 : Rétrosynthèse envisagée de la quatrième approche.

La rétrosynthèse imaginée s'appuie alors encore sur les hétérocycles précédemment préparés **141** où **118** provient alors d'une étape de métathèse croisée entre les alkényles phosphonates allyle et butényle et un intermédiaire commun **159**. Ce dernier provient alors d'une alkylation régiosélective dans les conditions de Vorbrüggen réalisée sur nos hétérocycles **141**.

2 Résultats & Discussions

➤ Notre travail

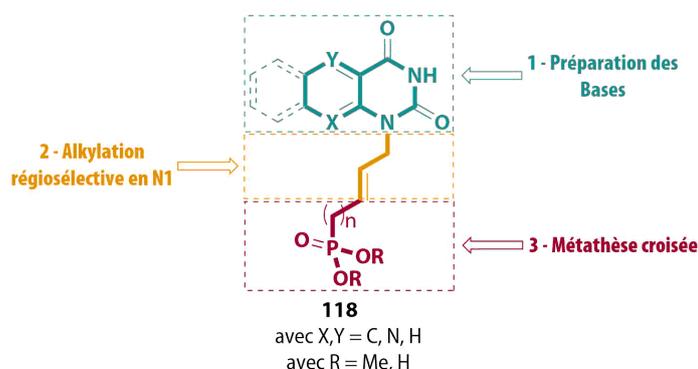


Figure 81 : Stratégie de synthèse par alkylation régiosélective de **118**.

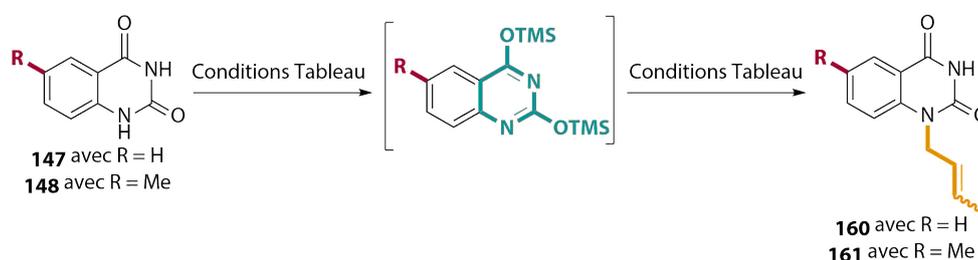
¹⁴⁰ Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. A General Synthesis of Pyrimidine Nucleosides. *Ang Chem Int Ed Eng* **1970**, *9*, 461–462.

Dans cette approche finale, l'objectif est d'accéder à **118** par le biais de deux étapes clés sur les bases hétérocycliques précédemment préparées. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'optimisation et à la généralisation sur tous les hétérocycles choisis dans cette série de l'alkylation régiosélective dérivée de la réaction de Vorbrüggen. Dans un second temps, notre regard se portera sur la seconde étape clé de métathèse croisée où nous explorerons le choix du catalyseur et des meilleures conditions selon les hétérocycles retenus.

- Préparation des nucléobases N_7 -substituées

Dans la littérature, le noyau pyrimidine d'analogues polycycliques d'uraciles est mis à profit afin de réaliser des alkylations sélectives en position N_7 dans les conditions de Vorbrüggen.¹⁴¹ Ainsi, la préparation des synthons hétérocycliques fonctionnalisés en N_7 par un groupement crotyle est alors entreprise dans l'optique d'effectuer l'étape de métathèse croisée directe entre ces derniers et les partenaires phosphonates sans la nécessité d'ajouter des étapes de protection et déprotection. Ces différents essais d'optimisation sont compilés dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Optimisation des conditions de fonctionnalisation régiosélective en N_7 .



Entrée	Conditions de silylation	Conditions d'alkylation	Rendement de	
			160	161
1	HMDS (2.5 éq), H ₂ SO ₄ cc	Bromure de crotyle (4 éq) 3h, 100°C	24%	X
	Toluène 8h, reflux			
2	BSA (2.5 éq), DCM _{anh}	Bromure de crotyle (2 éq), TBAI _{cat} , DCM _{anh} , 48h, t.a.	30%	25%
	24h, reflux			
3	BSA (2.5 éq), ACN _{anh}	Bromure de crotyle (2 éq) TMSOTf (3 éq)	53%	67%
	5 min, t.a.			

¹⁴¹ a) Godde, F.; Toulmé, J.-J.; Moreau, S. Benzoquinazoline Derivatives as Substitutes for Thymine in Nucleic Acid Complexes. Use of Fluorescence Emission of Benzo[g]Quinazoline-2,4-(1H,3H)-Dione in Probing Duplex and Triplex Formation. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13765–13775. b) Goto, S.; Tsuboi, H.; Kanoda, M.; Mukai, K.; Kagara, K. The Process Development of a Novel Aldose Reductase Inhibitor, FK366. Part 1. Improvement of Discovery Process and New Syntheses of 1-Substituted Quinazolinodiones. *Org Process Res Dev* **2003**, *7*, 700–706. c) Bookser, B. C.; Raffaele, N. B. High-Throughput Five Minute Microwave Accelerated Glycosylation Approach to the Synthesis of Nucleoside Libraries. *J Org Chem* **2007**, *72*, 173–179. d) Mata, G.; Luedtke, N. W. Stereoselective N-Glycosylation of 2-Deoxythioribosides for Fluorescent Nucleoside Synthesis. *J Org Chem* **2012**, *77*, 9006–9017. e) Song, L.; Risseuw, M.; Karalic, I.; Barrett, M.; Brown, K.; Harden, T.; Van Calenbergh, S. Synthesis of Extended Uridine Phosphonates Derived from an Allosteric P2Y2 Receptor Ligand. *Molecules* **2014**, *19*, 4313–4325. f) Yao, H.; Ji, M.; Zhu, Z.; Zhou, J.; Cao, R.; Chen, X.; Xu, B. Discovery of 1-Substituted Benzyl-Quinazoline-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives as Novel Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 681–693. g) Zhao, H.; Ji, M.; Cui, G.; Zhou, J.; Lai, F.; Chen, X.; Xu, B. Discovery of Novel Quinazoline-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives as Potent PARP-2 Selective Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 4045–4054.

30 min, MW 80°C				
4	BSA (2.5 éq), ACN _{anh}	Bromure de crotyle (2 éq)		
	5 min, t.a.	TMSCI (1 éq), NaI (1.12 éq)	54%	70%
5	BSA (2.5 éq), ACN _{anh}	Bromure de crotyle (2 éq)		
	Tamis Moléculaire 4Å	TMSCI (1 éq), NaI _{act} (1.12 éq)	78%	90%

Entrée 1 : La *per*-silylation de **147** est réalisée par l'utilisation de hexaméthylidisilazane (HMDS) catalysée par l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Cette silylation résulte en la formation d'une solution claire par la solubilisation totale de l'hétérocycle *per*-silylé dans le toluène après 8h de reflux. La température de réaction est abaissée à 100°C étant donné la forte volatilité du bromure de crotyle. Le produit désiré **160** est obtenu avec un faible rendement de 24% après précipitation dans un mélange MeOH/Dioxane.

Entrée 2 : Du fait du faible rendement obtenu à l'entrée précédente, nous émettons l'hypothèse que ce résultat est la conséquence du chauffage à reflux de l'étape d'alkylation précédente. Ainsi, suivant la publication de Monneret *et al.* où la synthèse d'ANPs est effectuée avec des uraciles modifiées, l'alkylation est ainsi réalisée en solution à température ambiante pendant 48h et avec l'ajout d'une quantité catalytique de iodure de tétra-*n*-butylammonium (TBAI) qui initie cette étape par échange d'halogène.¹⁴² Les rendements sont sensiblement équivalents aux conditions précédentes pour les deux composés ciblés **160** et **161** (30% et 25% respectivement).

Entrée 3 : Plusieurs modifications sont effectuées pour cette entrée dont le dichlorométhane qui est remplacé par l'acétonitrile ce qui induit une solubilisation totale de la base *per*-silylée après 5 min à température ambiante. Aussi, un acide de Lewis est ajouté afin de favoriser le couplage entre nos substrats en palliant à la faible réactivité manifeste de l'intermédiaire *per*-silylé. Enfin, le passage à l'activation micro-onde permet la réduction du temps de réaction à 30 min. Il est important de noter l'efficacité de ces conditions relativement douces (53% de rendement pour **160** et 67% de rendement pour **161**) et la propreté de cette réaction car les produits ne nécessitent pas de purification supplémentaire après extraction.

Entrée 4 & 5 : La sensibilité des acides de Lewis à l'humidité résiduelle dans le milieu réactionnel est un problème majeur pour les réactions de Vorbrüggen. Ainsi, une solution afin de pallier à ce dernier est de former *in-situ* l'acide de Lewis comme décrit dans la littérature sur des noyaux uraciles à température ambiante.¹⁴³ Ainsi, la formation *in-situ* du très réactif et très sensible à l'humidité iodure de triméthylesilyle (TMSI) est réalisée par l'utilisation d'un équivalent de chlorure de triméthylesilyle (TMSCI) accompagné d'un léger excès d'iodure de sodium (NaI), qui permet aussi un échange d'halogène avec

¹⁴² Benhida, R.; Aubertin, A.-M.; Grierson, D. S.; Monneret, C. A Convenient Synthesis of 1-Ethoxymethyl-5-Nitro-6-Substituted Uracils. *Tet Lett* **1996**, *37*, 1031–1034.

¹⁴³ a) Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K. A Convenient One-Pot Synthesis of Acyclonucleosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43* (1), 142–143. b) Hernández-Reyes, C. X.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; González-Zamora, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Morales-Serna, J. A.; Negrón-Silva, G. E. Synthesis of Azanucleosides through Regioselective Ring-Opening of Epoxides Catalyzed by Sulphated Zirconia under Microwave and Solvent-Free Conditions. *Molecules* **2012**, *17*, 3359–3369.

l'halogénure d'alkyle employé.¹⁴⁴ Après activation micro-onde, les produits **160** et **161** sont obtenus avec des rendements satisfaisants de 54% et 70% respectivement. Enfin, afin de retirer toute trace résiduelle d'humidité dans le milieu réactionnel, l'ajout de tamis moléculaire 4Å et l'activation du NaI en chauffant sous-vide sont effectués, ce qui a pour conséquence, l'obtention de nos produits souhaités avec de très bons rendements de 78% et 90% respectivement.

Après cette optimisation de nos conditions d'alkylation régiosélective avec le groupement (*E*)-1-bromo-but-2-ène comme preuve de concept, des essais de greffage de notre chaîne par ces mêmes conditions sont alors effectués :

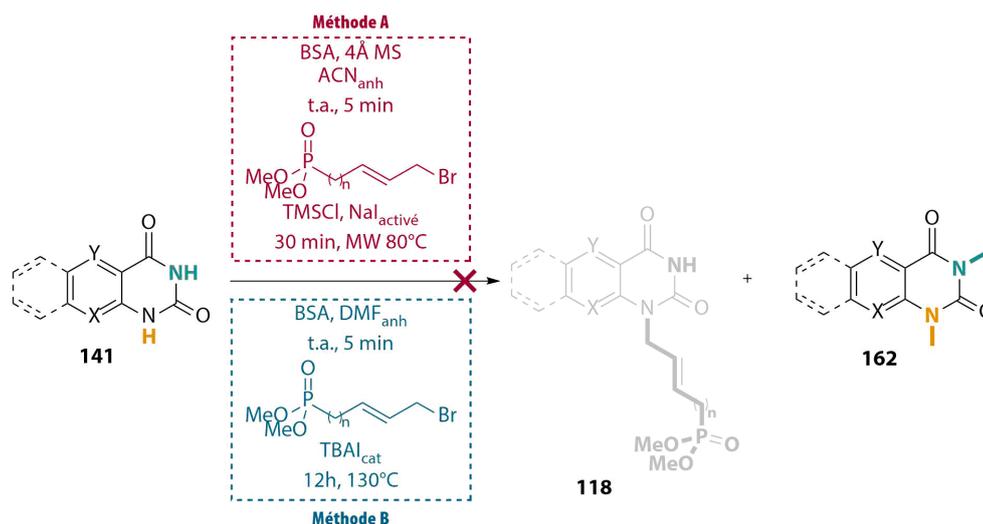
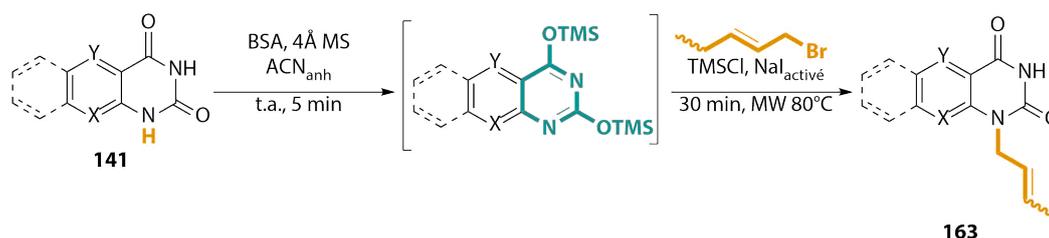


Figure 82 : Greffage de la chaîne latérale directe.

Ces derniers résultent en la récupération du produit de départ accompagnée de la formation de la base hétérocyclique diméthylée en N_1 et N_3 dû à la formation in-situ de TMSI qui déprotège le phosphonate et libère dans le milieu de l'Iodure de méthyle (MeI). Des conditions alternatives décrites par Herdewijn *et al.* sont aussi examinées mais conduisent au même résultat (Méthode B, Figure 82).¹⁴⁵

La généralisation sur les différents hétérocycles visés est alors effectuée dans les conditions de l'entrée 5 du Tableau 20 :¹⁴⁶



¹⁴⁴ Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A. Sonication-Assisted Synthesis of (*E*)-2-Methyl-but-2-Enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3108–3113.

¹⁴⁵ Parchina, A.; Froeyen, M.; Margamuljana, L.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Briers, Y.; Lavigne, R.; Herdewijn, P.; Lescrinier, E. Discovery of an Acyclic Nucleoside Phosphonate That Inhibits Mycobacterium Tuberculosis ThyX Based on the Binding Mode of a 5-Alkynyl Substrate Analogue. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1373–1383.

¹⁴⁶ Chevrier, F.; Biteau, N.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Regioselective N_1 Alkylation of Quinazolinone derivatives under microwave irradiation. Manuscript under construction.

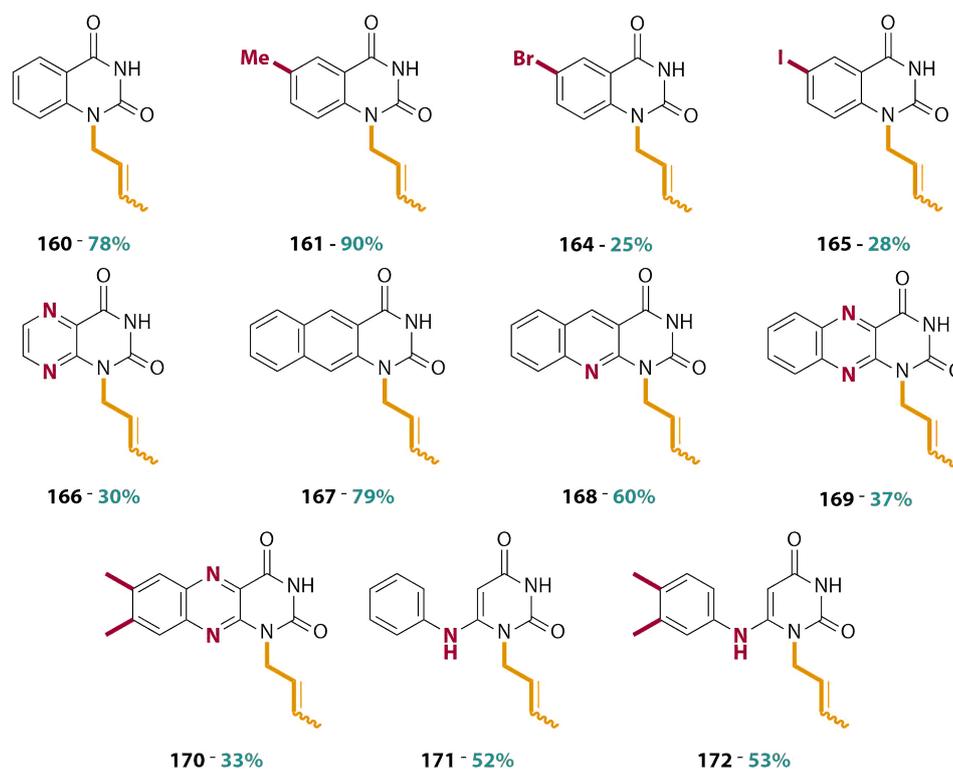


Figure 83 : Exemplification avec le groupement *(E)*-but-2-ène sur les différentes bases hétérocycliques.

Lors de cette généralisation, plusieurs observations peuvent être extraites des résultats reportés dans la Figure 83. Ainsi, l'alkylation régiosélective sur les dérivés non azotés basés sur le noyau quinazoline-2,4(1H,3H)-dione s'effectue avec de très bons rendements (78% pour **160**, 90% pour **161** et 79% pour **167**). Une chute considérable des rendements est observée avec la présence d'un halogène en position 6 des noyaux quinazoline-2,4(1H,3H)-dione dûs aux effets électroniques liés à ces substituants et par la présence d'un acide de Lewis très réactif provoquant la formation de multiples tâches de dégradation. Les dérivés 6-bromo **164** et 6-iodo **165** sont alors synthétisés avec de faibles rendements de 25% et 28% respectivement après purification. Cependant, leur obtention peut être optimisée par l'emploi de conditions distinctes. Ainsi, le composé **164** est obtenu avec un rendement amélioré de 67% par l'emploi des conditions de la méthode B sur la Figure 82 où la température a été abaissée à 100°C.¹⁴⁵ De plus, ce même effet est observé avec la présence d'hétérocycles azotés adjacents au noyau pyrimidine et par conséquent, plus le nombre d'azotes augmentent et plus le rendement obtenu de ces dérivés ciblés décroît. Aussi, les produits sont accompagnés de la présence encore supérieure de tâches de dégradation sur CCM et de la formation de produits de poly-alkylations. Ainsi, les meilleurs rendements sont obtenus avec les hétérocycles les moins azotés avec 60% pour le composé **168**. De ce fait, l'introduction d'un noyau pyrazine adjacent à la pyrimidine induit directement une chute significative des rendements (37% pour **169**, 33% pour **170** et 30% pour **166**). Enfin, les dérivés à forme dite « libre », à squelette 6-anilino-uracile, sont obtenus avec des rendements satisfaisants (52% pour **171**, 33% pour **172**) mais de la même manière que précédemment, des tâches de dégradation sont aussi observées.

Par conséquent, le passage à une activation sous-ultrasons pendant 12h à 55°C permet d'obtenir des rendements équivalents pour ces synthons sans apparition de tâche de dégradation, la conversion n'est cependant pas totale (65%, déterminé par RMN). Enfin, sur le dérivé **151**, les produits de poly-alkylations sur les différents azotes de cet hétérocycle sont formés en quantité majoritaire. Plusieurs tâches sont alors observées sur CCM et cette réaction résulte en l'obtention d'un mélange de produits poly-alkylés et du produit désiré inséparable (Figure 84).

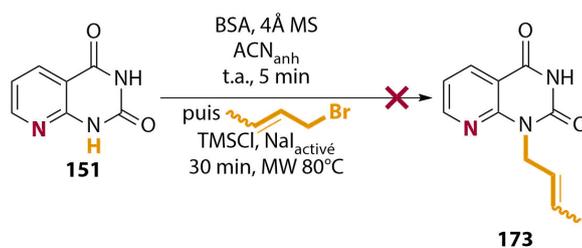


Figure 84 : Alkylation régiosélective de **151**.

La régiosélectivité de cette alkylation a été confirmée pour chaque synthon par une expérience à deux dimensions de type HMBC comme sur les 2 exemples suivants :

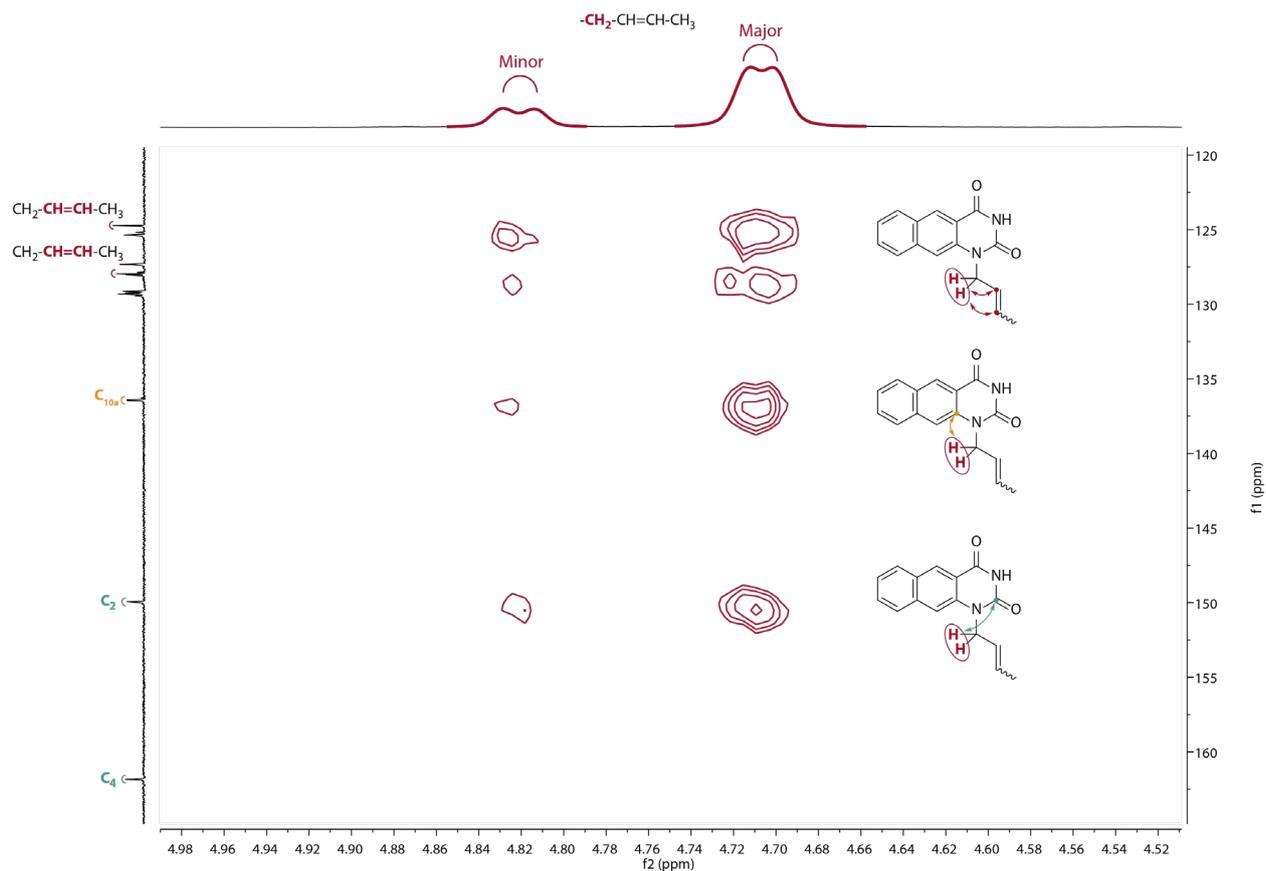


Figure 85 : Corrélation ¹H-¹³C à longue distance de **167** dans le CDCl₃.

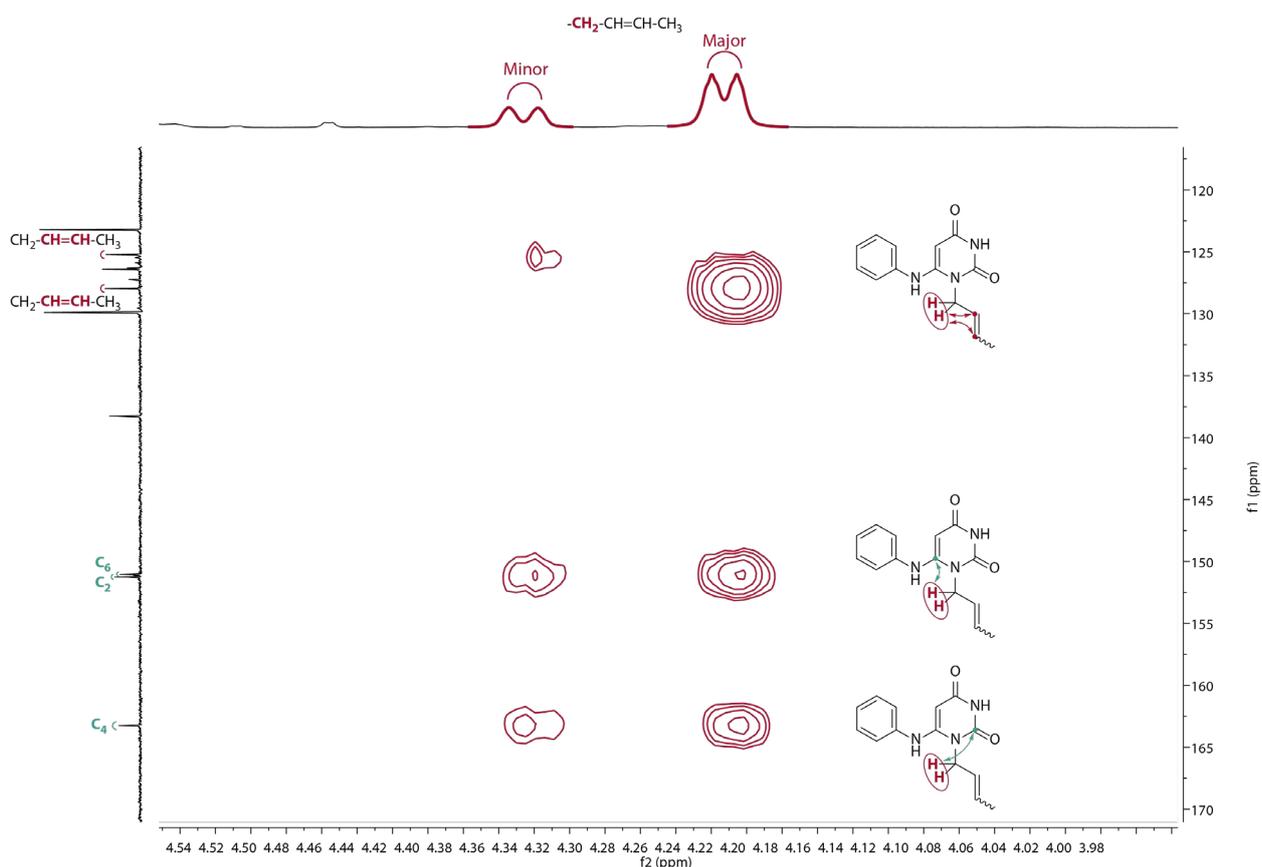


Figure 86 : Corrélation ^1H - ^{13}C à longue distance de **171** dans le CDCl_3 .

Pour chaque produit obtenu, il est observé trois couplages dont une corrélation entre le CH_2 du groupement crotyle et l'oléfine adjacente en 2J et 3J , mais aussi entre ce CH_2 et le carbonyle en position 2 (C_2) en 3J et le carbone quaternaire adjacent au N_1 en 3J (C_{10a} pour **167** et C_6 pour **171**) ce qui, par conséquence, confirme la régiosélectivité de notre alkylation par ces conditions dérivées de la réaction de Vorbrüggen.

- Métathèse croisée directe

Avec les synthons alkylés en N_1 par un groupement crotyle et les partenaires alkényles phosphonates en main, nous avons cherché les conditions les plus appropriées afin de favoriser la formation majoritaire des hétérodimères ciblés. Comme précédemment, les partenaires phosphonates constituent, selon le modèle de sélectivité de Grubbs, des oléfines de type 1 avec le catalyseur de Grubbs de 2^{nde} génération et les synthons hétérocycliques fonctionnalisés en N_1 constituent des alcènes de type 2. Un modèle de réactivité similaire a été reporté par notre équipe, dans le cas de métathèses croisées, entre des noyaux pyrimidines substitués en N_1 par ce même groupement crotyle et avec les mêmes substrats phosphonates.¹²² Par analogie structurale de ce modèle et avec une réactivité équivalente des oléfines employées, les mêmes conditions sont réappliquées. Ainsi, un large excès des phosphonates (4 équivalents) est employé avec un seul équivalent des bases hétérocycliques alkylées. Comme précédemment, la faible ramification des oléfines visées induit aussi l'utilisation du catalyseur de Grubbs de seconde génération (**Gru-II**) avec un mode d'activation de type chauffage classique.

Les premiers essais concernent les deux bicycles précédemment alkylés **160** et **161** :

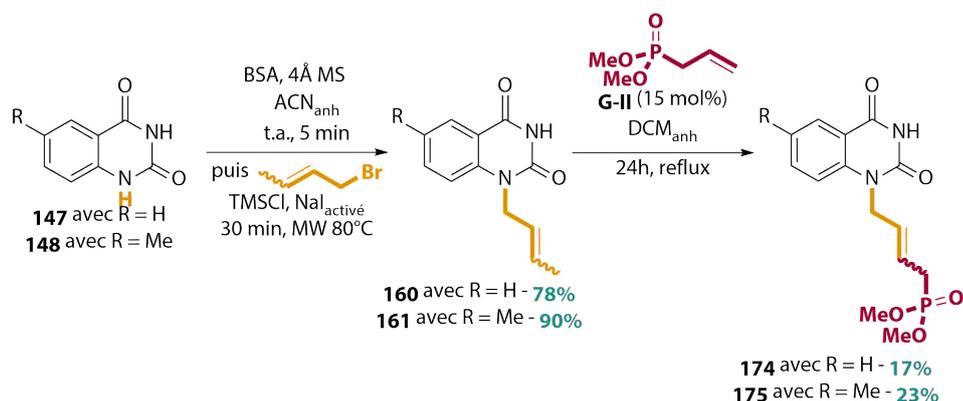


Figure 87 : Essais de métathèse croisée préliminaire sur les dérivés bicycliques.

La mise en réaction avec le composé **78** de ces dérivés montrent la formation des composés souhaités accompagnés d'un grand nombre de produits secondaires (homodimères, produits de dégradation) observés par CCM. Après plusieurs purifications sur chromatographie sur gel de silice, les produits de couplage sont isolés avec de faible rendement de 17% pour le produit **174** et 23% pour **175**.

La généralisation de cette méthode est alors entreprise sur les tricycles hétéroaromatiques analogues du FAD **167**, **168** et **169** :

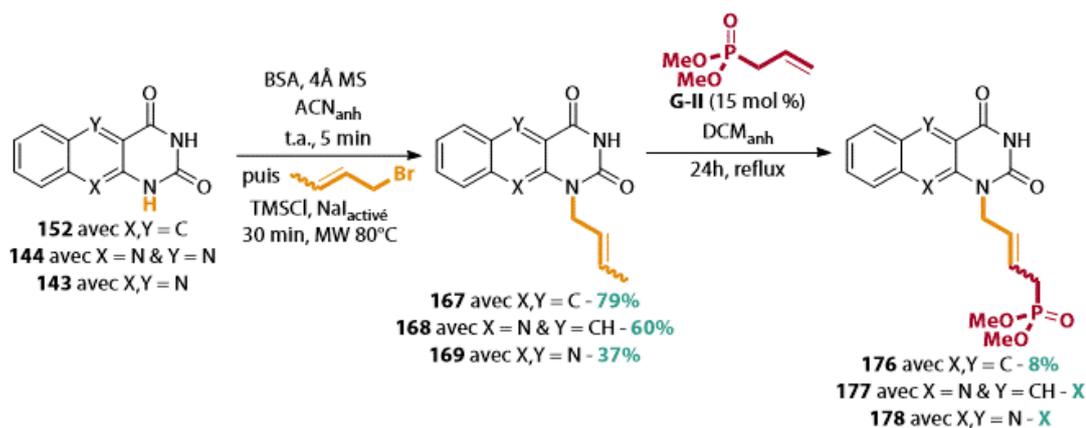


Figure 88 : Extension aux dérivés tricycliques.

Comme précédemment, la polyazotation de nos hétérocycles, par la présence d'amines libres secondaires connues comme résultant en la formation d'adduits avec le catalyseur et en la dégradation de ce dernier,¹⁴⁷ ne montrent pas de tâches majoritaires parmi tous les produits de dégradation observés sur CCM. Dans le cas de la base hétérocyclique **167**, le produit de couplage est isolé après plusieurs purifications avec un faible rendement de 8% contrairement aux substrats de départ **168** et **169**, qui ne montrent aucune conversion. Avec ces faibles rendements et ces difficultés de purification, nous avons évalué le catalyseur de Grubbs de troisième génération (**Gru-III**) qui présente certains avantages : une plus grande réactivité, un cycle d'activation plus rapide et une sensibilité moindre aux amines libres et/ou aux doublets non liants d'amines endocycliques (Figure 89).

¹⁴⁷ a) Occhipinti, G.; Bjørsvik, H.-R.; Törnroos, K. W.; Jensen, V. R. Ruthenium Alkylidene Complexes of Chelating Amine Ligands. *Organometallics* **2007**, *26*, 5803–5814. b) Lummiss, J. A. M.; Ireland, B. J.; Sommers, J. M.; Fogg, D. E. Amine-Mediated Degradation in Olefin Metathesis Reactions That Employ the Second-Generation Grubbs Catalyst. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 459–463. c) Ireland, B. J.; Dobigny, B. T.; Fogg, D. E. Decomposition of a Phosphine-Free Metathesis Catalyst by Amines and Other Bronsted Bases: Metallacyclobutane Deprotonation as a Major Deactivation Pathway. *ACS Catal* **2015**, *5*, 4690–4698.

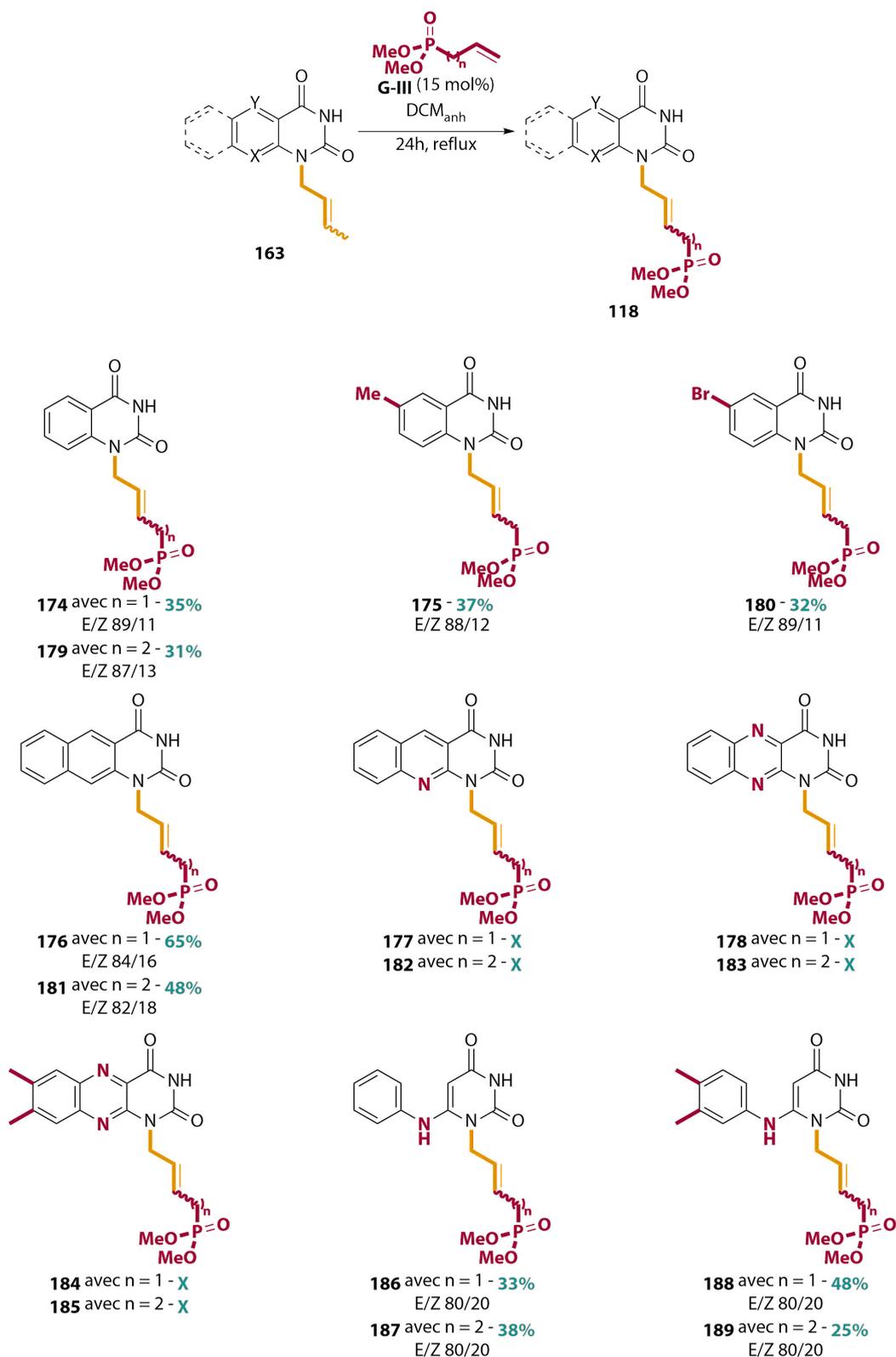
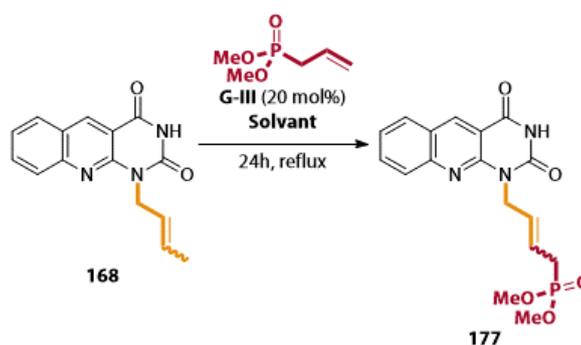


Figure 89 : Essais de métathèse croisée après changement de catalyseur.

Les bicycles sont obtenus avec de meilleurs rendements que précédemment : **174** avec 35% de rendement au lieu de 17% et **175** avec 37% rendement au lieu de 23%. Un essai de couplage est entrepris avec le dérivé 6-bromo qui permet de greffer la chaîne butèn-2-yle phosphonate sur ce dernier avec un rendement moyen de 32%. De plus, ce couplage est aussi employé de manière convergente avec la synthèse en parallèle du produit **179** portant la chaîne alkényle phosphonate à 5 chaînons avec un rendement de 31%. Il est observé un accroissement significatif des rendements pour les produits

comportant l'hétérocycle benzo[g]quinazoline-2,4-dione, car le composé **176** est obtenu avec un bon rendement de 65% et son partenaire à 5 carbones est obtenus aussi avec un rendement satisfaisant de 48%. La généralisation décrite dans la figure précédente reste cohérente avec les précédentes conditions employées dans la mesure où ce couplage montrent des résultats encourageants avec les dérivés bicycliques mais à l'inverse, aucune conversion des dérivés tricycliques azotés (Les substrats **168**, **169** et **170**) n'est constatée quel que soit le partenaire phosphonate utilisé. La cause de ces résultats semble être la faible solubilité de ces dérivés dans le solvant de réaction qui est le dichlorométhane. L'augmentation de la polarité des solvants, la formation préalable d'un ammonium organique par l'action de l'acide trifluoroacétique ou même la réalisation de cette réaction dans l'eau¹⁴⁸ résultent aussi en l'échec de ces essais (Tableau 21).

Tableau 21 : Essais de métathèse avec changement de solvants.



Entrée	Solvants utilisés	Disparition de 168	Rendement de 177
1	DCM _{anh}	0%	X
2	DCE	0%	X
3	TFA (3 éq)	0%	X
	DCM _{anh}		
4	TFA (3 éq)	0%	X
	DCE		
5	DCM/AcOH 9/1	0%	X
6	EtOAc	0%	X
7	CHCl ₃ /iPrOH	0%	X
8	EtOAc/MeOH 9/1	0%	X
9	H ₂ O 2.5% PTS	0%	X
	(0.5 M)		

Enfin, dans le cas des squelettes 6-anilinouraciles, les produits sont synthétisés avec des rendements de faibles à moyens variant de 25 à 48%. Etant donné la forte affinité de ces derniers pour le gel de silice, ces dérivés traînent sur colonnes chromatographiques et ont tendance à co-éluer avec d'autres impuretés si l'élution est poursuivie. De plus, une des raisons des faibles rendements obtenus pour cette étape est la nécessité de purifier à plusieurs reprises les bruts réactionnels dans l'optique de retirer les

¹⁴⁸ Bessières, M.; Hervin, V.; Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohier, J.-F.; Agrofoglio, L. A. Highly Convergent Synthesis and Antiviral Activity of (E)-but-2-Enyl Nucleoside Phosphonoamidates. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 678–686.

restes de catalyseurs et les produits secondaires. En ce qui concerne les substrats tricycliques, la solution afin de palier au problème manifeste de solubilité et d'empêcher toute formation probable d'adduits avec le catalyseur, est d'introduire une étape de mono-protection de l'azote N_3 après la crotylation de ces hétérocycles.

- Métathèse croisée après protection initiale de l'azote N_3

Comme précédemment, le groupement benzoyle est choisi pour sa compatibilité avec notre voie de synthèse et dans la synthèse d'ANPs pyrimidiques développés par notre équipe. Afin de montrer la nette amélioration des rendements et afin d'avoir une référence visuelle sur CCM, le développement de cette nouvelle méthodologie est alors réalisé sur le composé **167** :

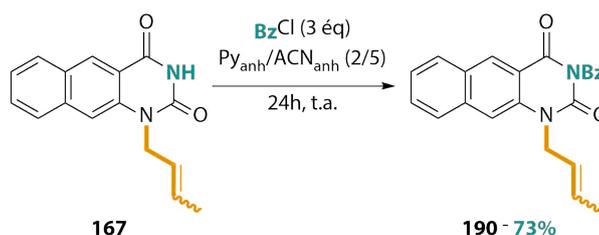


Figure 90 : Protection de l'azote N_3 de **167**.

Les conditions classiques employés pour la mono-benzylation des pyrimidines sont alors appliquées sur le substrat **167** et permettent après agitation à température ambiante pendant 24h, l'observation d'une disparition totale de ce dernier. Après évaporation des volatiles et traitement aqueux, le produit est isolé par colonne chromatographique sur gel de silice avec un bon rendement de 73%.

Etant donné l'étape de protection préliminaire, nous décidons de réutiliser le catalyseur de Grubbs de seconde génération (**Gru-II**) avec ce dérivé protégé **190** :

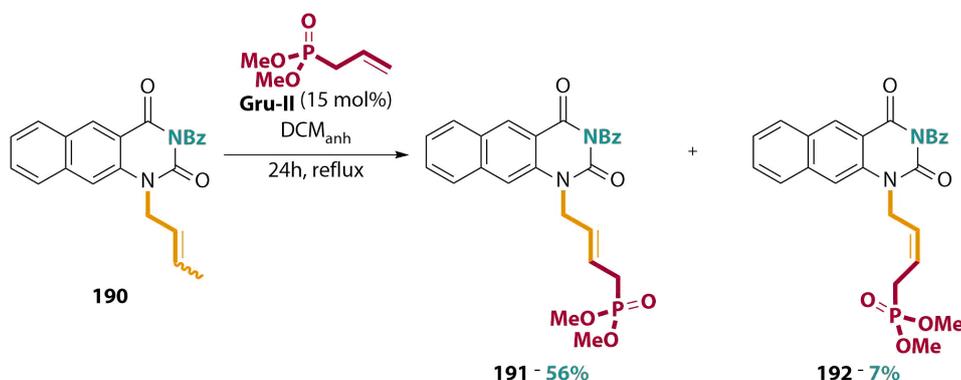


Figure 91 : Essais de métathèse croisée avec **190**.

Ce premier test confirme alors l'hypothèse de l'empoisonnement lié à l'amine libre en position 3 sur le complexe ruthénique. Sa protection par un groupement benzoyle induit alors un fort accroissement des rendements qui passe alors de 8% à 63% pour la réaction de métathèse croisée. A la différence des essais précédents avec le catalyseur de Grubbs de 3^{ème} génération, les isomères sont séparables dans ce cas. La stéréosélectivité de cette étape est alors en faveur de l'isomère E avec un ratio *E/Z* de 85/15. Ce dernier est alors isolé comme produit majoritaire avec un rendement de 56%.

Cette voie de synthèse est alors appliquée aux autres substrats poly-azotés :

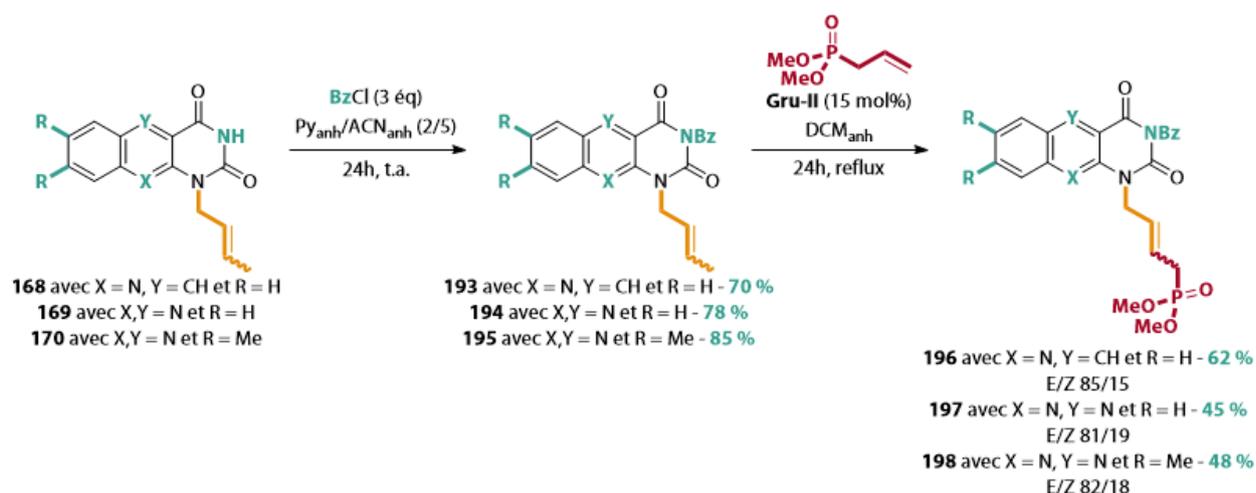


Figure 92 : Généralisation sur les hétérocycles tricycliques poly-azotés.

Pour les trois hétérocycles de départ, les protections fournissant les produits **193**, **194** et **195** conduisent à de bons rendements de 70, 78 et 85% respectivement. Ces derniers sont alors directement engagés dans le couplage avec le diméthylallylphosphonate **78** ce qui permet l'obtention des produits attendus avec des rendements de 62, 45 et 48% respectivement. Pour les noyaux alloxazines, il est important de noter une légère baisse de rendement résultant probablement encore de la nature de ces hétérocycles qui possèdent des azotes où les doublets non liants sont dirigés et ainsi, nucléophiles. Concernant la stéréosélectivité de cette généralisation, le stéréoisomère *E* est formé majoritairement avec des ratios supérieurs à 80/20 pour les trois substrats. Afin de synthétiser les dérivés à 5 chaînons, la même stratégie est appliquée en utilisant le butène phosphonate **79** :

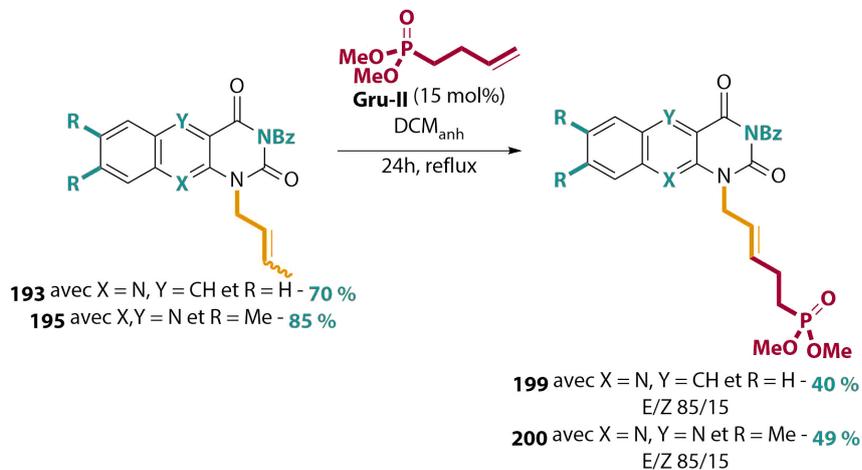


Figure 93 : Extrapolation avec la chaîne latérale pent-2-èneyle.

Afin de s'assurer de la pureté des produits en vue de la déprotection finale des éthers méthyliques des phosphonates, nous réalisons les déprotections de manière séquentielle. Ainsi, nos dérivés sont traités par de l'ammoniaque méthanolique 7N pendant 14h à basse température :

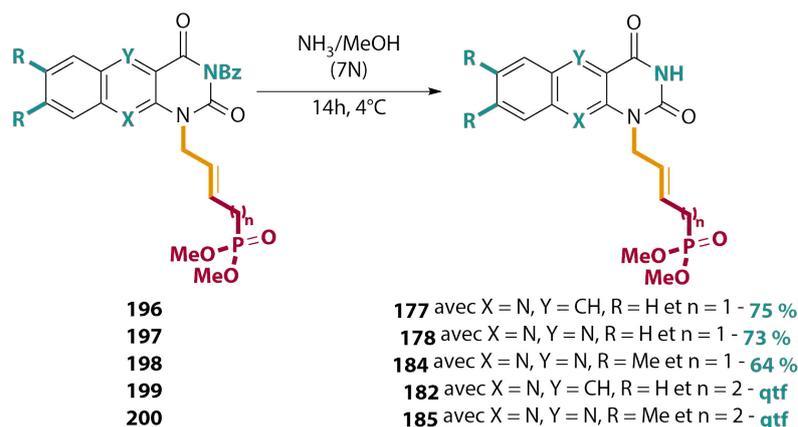


Figure 94 : Déprotection des groupements benzyles sur les dérivés à 4 chaînons.

Cette étape de clivage des groupements benzyles est caractérisée par la formation secondaire de benzamide qui est retiré après 2 colonnes chromatographiques. Le rapport frontal de ce produit secondaire est très proche de ceux des produits désirés. Les dérivés sont déprotégés en N_3 sont isolés avec de bons rendements (75% pour **177**, 73% pour **178** et 64% pour **184**). Le clivage des benzoates est réalisé par les mêmes conditions sur les substrats à 5 chaînons et une plus grande différence de rapports frontaux est observée sur CCM, ce qui a pour résultat de faciliter les purifications et donc d'obtenir de meilleurs rendements (quantitatif pour **182** et **185**).

Ce schéma réactionnel a été alors appliqué aux deux bicycles précédemment synthétisés :

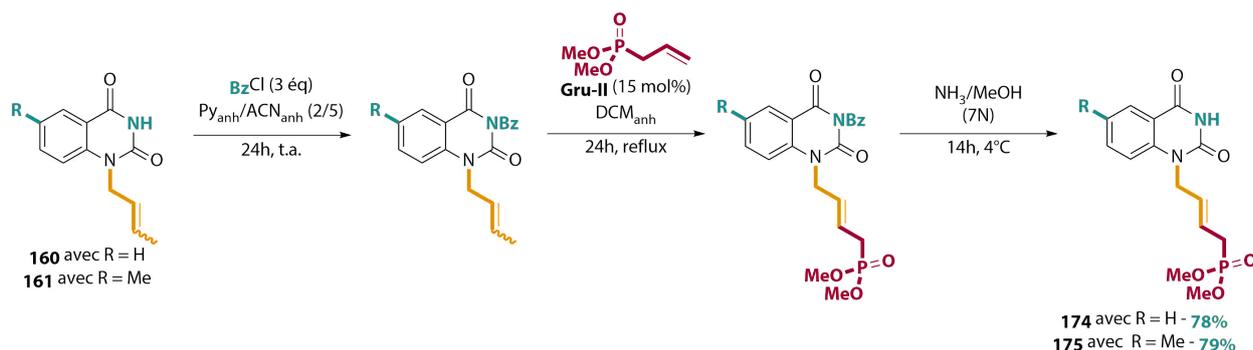


Figure 95 : Extension sur les bicycles **160** et **161**.

Cette méthodologie est efficace compte tenu des rendements globaux obtenus (78% pour **174** et 79% pour **175**).

- Déprotection finale

Les produits sont finalement traités par l'action du TMSBr dans l' ACN_{anh} pendant 24h à température ambiante de la même manière que leurs homologues substitués en N_{10} :

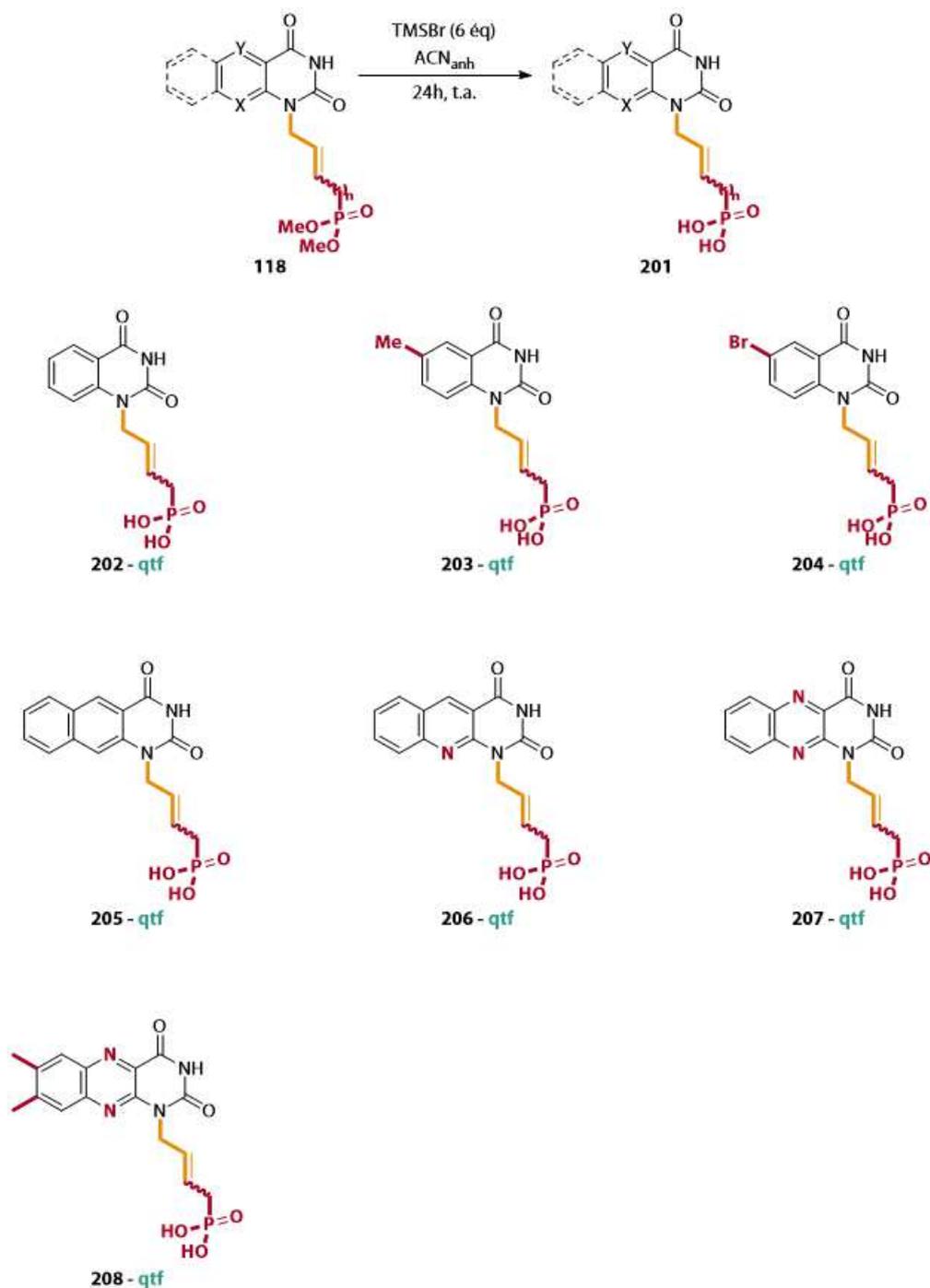


Figure 96 : Déprotection finale par l'action du TMSBr.

Afin de retirer les différentes traces de TMSBr et pour palier à la faible solubilité de ces produits, les bruts réactionnels sont alors placés dans un mélange éthanol:eau 1:1 sous cavitation acoustique pendant 10 min suivi d'évaporation et ce processus est répété jusqu'à l'obtention de solides amorphes. Les différents produits sont obtenus de manière quantitative.

- Passage aux chaînes aliphatiques saturées

La première approche consiste à reproduire la méthode décrite par Herdewijn pour la synthèse d'inhibiteurs de la FdTS de type ANPs à noyaux uraciles fonctionnalisés en position 5 et substitués par différentes chaînes aliphatiques à 5 et 6 carbones (Figure 97).¹⁴⁵

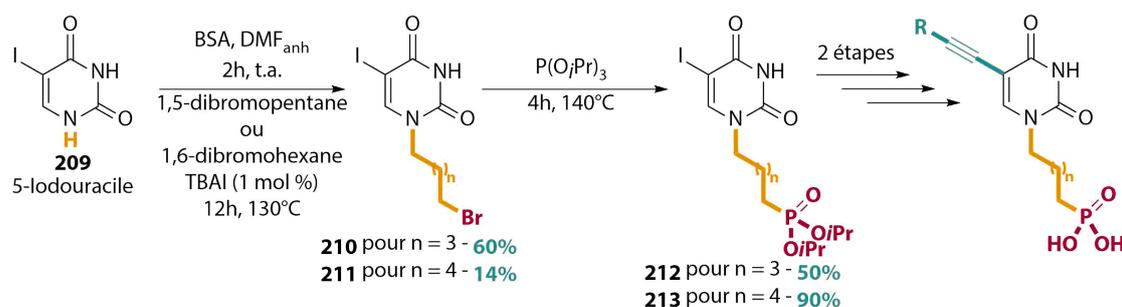
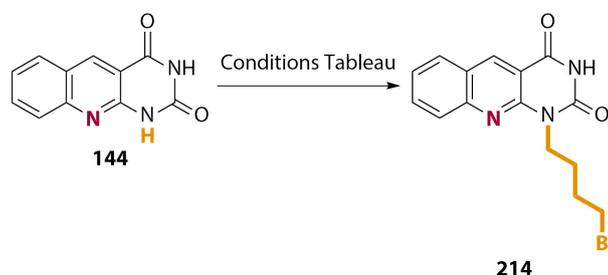


Figure 97 : Synthèse décrite par Herdewijn *et al.*

Ainsi, ces dérivés sont synthétisés en 3 étapes par une alkylation régiosélective dans les conditions de Vorbrüggen avec les dérivés dibromoalkanes, puis par une réaction d'Arbuzov avec le tri-*iso*-propylphosphite ($P(OiPr)_3$) fournissant les phosphonates correspondants et enfin, par déprotection au TMSBr de ces derniers en acides phosphoniques, après une fonctionnalisation par un couplage de Sonogashira en position 5. Cette séquence réactionnelle a été appliquée au tricycle **144** :

Tableau 22 : Essais d'alkylation régiosélective avec le 1,4-dibromobutane.



Entrée	Conditions	Conversion	Rendement
1	BSA, 4Å MS ACN _{anh} 1,4-Dibromobutane Na _{lact} , TMSCl 30 min, MO 80°C	<5%	X
2	BSA, DMF _{anh} 2h, t.a. 1,4-Dibromobutane TBAI (1 mol%) 12h, 130°C	100%	32% ^a + Dégradation

^a: Rendement calculé par RMN

Entrée 1 : Les conditions développées précédemment pour le greffage régiosélectif en N_1 du groupement (*E*)-but-2-ène sont employées pour fonctionnaliser **144** avec le 1,4-dibromobutane. Cependant, une conversion minimale est observée et sans nouvelle tâche majoritaire.

Entrée 2 : Selon le protocole de Herdewijn *et al.*, nous observons un grand nombre de produits de dégradation sur CCM ce qui empêche l'isolation des produits mais la fluorescence liée au produit ciblé nous permet de l'isoler, sans parvenir à avoir une pureté suffisante pour le décrire. Le rendement est alors faible et est calculé par RMN malgré une conversion totale.

Une fois les 2 dérivés à 4 et 5 chaînons synthétisés, nous procédons à la réaction d'Arbuzov afin d'obtenir les phosphonates correspondants :

Malgré les craintes d'effectuer cette hydrogénation catalytique directement sur les substrats non protégés, aucun empoisonnement du catalyseur n'est observé. Par faute de temps, la généralisation sur tous les produits n'a pu être réalisée. L'ensemble des produits réduits sont obtenus de manière quantitative après une simple filtration sur célite et ne nécessitent aucune purification supplémentaire pour permettre de les décrire.

Enfin, la déprotection des groupements phosphonates est alors entrepris sur les substrats aliphatiques :

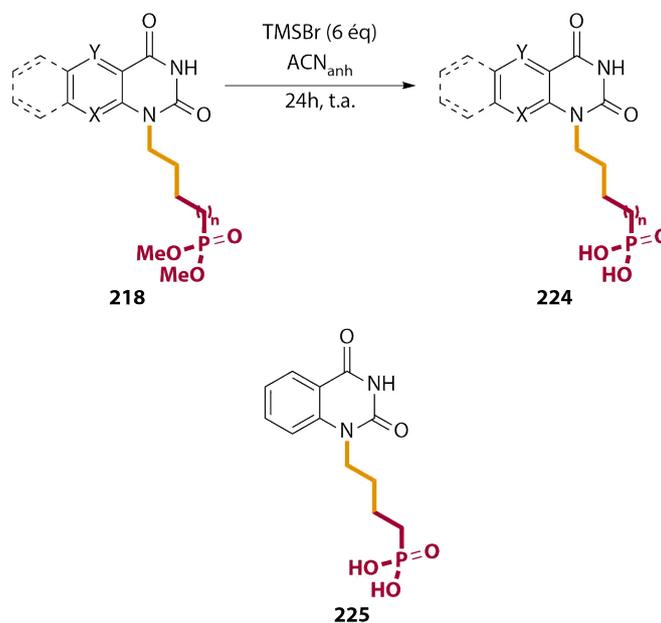


Figure 100 : Déprotection des substrats aliphatiques

3 Tests Biologiques

Les tests biologiques de ces composés sur la Mtb-ThyX ont aussi été effectués au sein de l'équipe du Pr. Hannu Myllykallio et du Dr. Hubert Becker, MCF au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) à l'Université de Paris-Saclay dont les résultats sont conférés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Résultats de l'évaluation anti-FDTS sur Mtb-ThyX

Entrée	Composé	[I] = 50 μ M + FAD		[I] = 200 μ M + FAD		[I] = 200 μ M sans FAD	
		$V_i \times 10^{-2}$ (δ DO.s ⁻¹)	% inhibition	$V_i \times 10^{-2}$ (δ DO.s ⁻¹)	% inhibition	$V_i \times 10^{-2}$ (δ DO.s ⁻¹)	% inhibition
1	Sans enzyme	0,0004	X	0,0028	X	0,0040	X
2	208	0,1442	-8,2	0,1313	1,5	0,108	-19,3
3	207	0,1474	-10,6	0,1453	-9,0	0,1125	-24,2
4	203	0,1633	-22,6	0,1349	-1,2	0,0933	-3,1
5	206	0,1483	-11,3	0,1389	-4,2	0,0843	6,9
6	205	0,1526	-14,5	0,1188	10,8	0,0791	12,6
7	202	0,1475	-10,7	0,1414	-6,1	0,0820	9,4
8	225	0,1471	-10,4	0,1434	-7,6	0,0947	-4,7
9	204	/	/	/	/	0,1137	-10,0
10	Composé Témoin	/	/	0,0037	97,2	/	/
11	Contrôle sans composé	0,1332	/	0,1335	/	0,0905	/

Avec une concentration de 50 μ M de nos composés dans le milieu réactionnel, l'étude cinétique ne révèle aucune inhibition significative de la FDTS liée à l'oxydation du NADPH. La concentration de nos composés est alors augmentée à 200 μ M, ce qui permet d'observer une légère inhibition, inférieure à 20%, pour le composé **205**. Lors de la synthèse biochimique de Mtb-ThyX, notre équipe partenaire a démontré qu'au moins un site actif de cette enzyme tétramérique est dépourvu de FAD ce qui justifie l'ajout d'un excès de ce cofacteur dans le milieu réactionnel afin que l'enzyme soit pleinement fonctionnelle et que les résultats d'inhibition soient précis. Du fait que nos composés soient conçus dans l'optique de mimer les interactions du FAD dans le site actif, nous émettons l'hypothèse que l'excès de FAD dans le milieu réactionnel empêche nos composés d'interagir avec le site actif et ainsi, en retirant l'ajout supplémentaire de FAD, l'inhibition de ces derniers doit être supérieure. En conséquence, il est observé un effet positif mais limité de ce choix car un nombre plus important de composé montre une inhibition encore légère sur Mtb-ThyX. Parallèlement à la roséoflavine qui possède plusieurs cibles enzymatiques pour son activité antibactérienne, il serait intéressant d'incorporer sur ces composés les formes prodrogues d'acide phosphonique connues afin d'évaluer leur potentielle activité antibactérienne sur différentes espèces de bactéries.

4 Conclusions & Perspectives

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux ANPs à nucléobases non canoniques portant des chaînes latérales aliphatiques à 4 ou 5 chainons sous forme d'acide phosphonique.

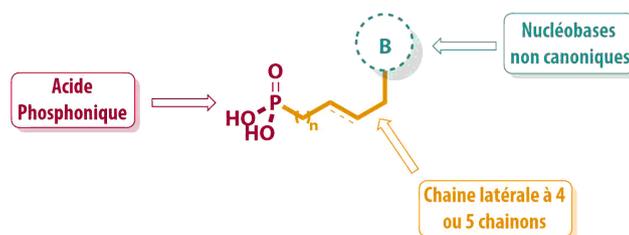


Figure 101 : Formule des ANPs synthétisés

La synthèse de ces composés repose sur une approche convergente basée sur deux réactions clés :

1 - L'alkylation régiosélective en position *N*, qui a permis le greffage du groupement (*E*)-but-2-ènyle sélectivement.

2 - La réaction de métathèse croisée ou l'optimisation des conditions a mis en évidence deux approches avec deux catalyseurs différents pour la synthèse de nos composés d'intérêt. Ainsi, 2 protocoles synthétiques ont été définis de cette optimisation avec une méthode rapide, incluant l'utilisation du catalyseur de Grubbs de troisième génération, limitée principalement aux dérivés bicycliques et une méthode distinguée par ses hauts rendements liée à une étape de protection préalable.

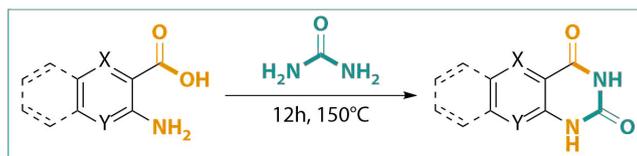
Au cours de ce chapitre, nous avons décrit une nouvelle famille d'ANPs par la synthèse de plus d'une dizaine de molécules possédant différents hétérocycliques aromatiques poly-azotés non explorés, pour lesquelles des modulations ont été effectuées :

- La taille de la chaîne acyclique entre le phosphonate et les bases nucléiques.
- La nature de cette chaîne acyclique.
- La nature des différents hétérocycles.

L'évaluation biologique anti-FDTS a montré de légères activités de ces produits finaux lorsque l'excès de FAD est retiré du milieu réactionnel. Dans le cas contraire, nos composés d'intérêt ne démontrent pas d'activités significatives sur cette enzyme. Pour tracer un parallèle avec la roséoflavine **43**, il serait intéressant de tester ces derniers *in-vivo*, directement sur des cultures bactériennes afin de pouvoir exclure une inhibition sur d'autres enzymes. Du fait que les squelettes de type 6-anilinouracile ont montrés des activités inhibitrices sur la polymérase du VIH et que les analogues du FAD ont aussi montrés de bonnes activités antibactériennes, le passage en forme prodrogue de ces composés permettrait d'évaluer l'activité antivirale et antibactérienne *in-vivo* de ces derniers, étant donné la faible pénétration cellulaire des nucléotides sous forme acide phosphonique.

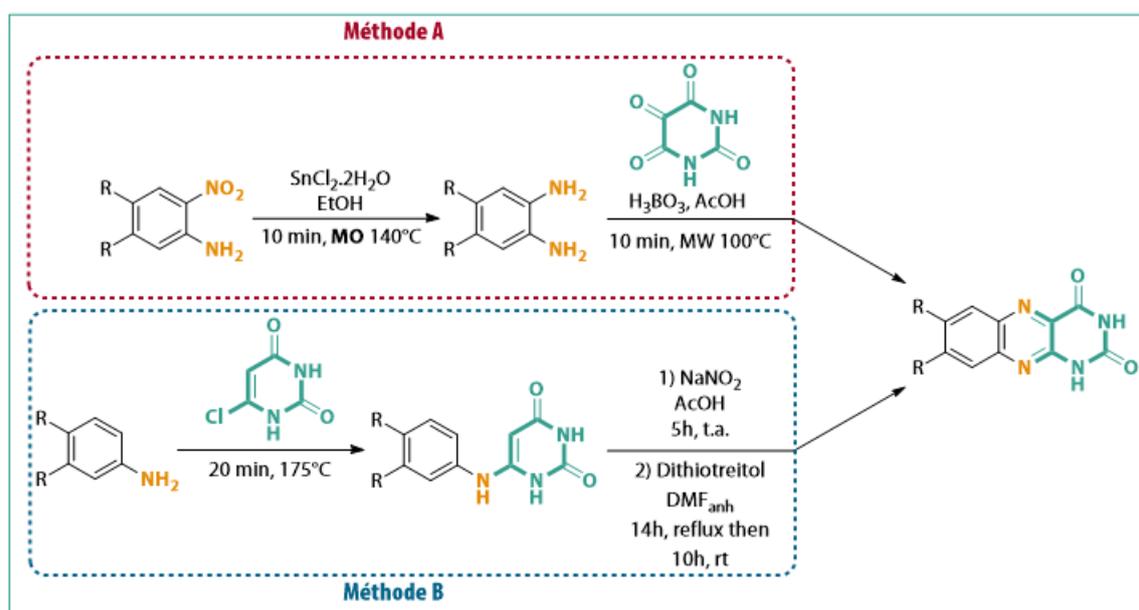
PARTIE EXPÉRIMENTALE

GENERAL PROCEDURE 1 : Formation of pyrimidine rings



3-Amino-2-carboxylic acid derivative (5 g) and urea (20 eq) were both ground in a mortar, transferred to a round bottomed flask and fused at 150°C for 12 h. The mixture was then cooled down at 100°C, 40 mL of H₂O was added and the resulting mixture was kept at the same temperature for another 10 min to dissolve the unreacted urea. The resulting suspension was cooled down at room temperature, 400 mL of 1M NaOH aqueous solution was then added and the mixture was left stirring for an hour. After that time, 55 mL of AcOH was added dropwise and one hour later, the resulting precipitate was filtered, washed with H₂O, Et₂O and pentane and further dried in a vacuum oven to yield the desired product.

GENERAL PROCEDURE 2 : Synthesis of alloxazine core



Method A (Via cascade cyclization) :

Step 1 : A 10-20 mL vial was charged with 2-nitro-aniline derivative (0.4 g, 2.4 mmol) and tin(II) chloride dihydrate (2.28 g, 5 eq) in ethanol (17 mL). The vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 10 min at 140°C. The resulting orange solution was then poured into aqueous saturated NaHCO₃ solution (70 mL) and the product was extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The organic layers were combined and washed with aqueous saturated Na₂CO₃ solution (30 mL), H₂O (30 mL), and brine (2 x 40 mL) before being dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure affording desired derivative as a pale-yellow gum.

Step 2 : A 10-20 mL vial was charged with *o*-phenylene diamine derivative (5 mmol) in AcOH (15 mL). To this solution was added alloxan monohydrate (1.1 eq) and boric acid (1.1 eq) and then, the vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 10 min at 100°C. The formed yellow precipitate was filtered off with suction and was washed successively with AcOH, H₂O and Et₂O to yield the desired alloxazine derivative.

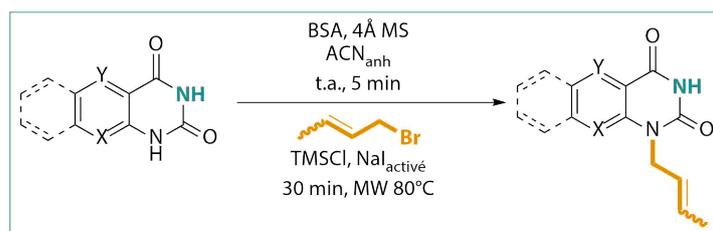
Method B (Via *N*-oxide intermediate):

Step 1: 6-chlorouracil (1 eq) and aniline derivative (3 eq) were fused at 175°C under gentle nitrogen flow for 20 min. The mixture was cooled and Et₂O was added (50 mL). The resulting mixture was sonicated at 35 °C (37 kHz, 100 W) for 20 min. The black suspension was filtered by suction, washed with H₂O, with MeOH (until the feed becomes white) and with Et₂O. The desired product was used in the next step without further purification.

Step 2: Sodium nitrite (2 eq) was added in the dark to a solution of the corresponding 4,5-substituted phenylamino pyrimidine-2,4-(1H,3H)-dione (2 mmol) in glacial AcOH (10 mL) cooled in an ice bath. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h and then 2 mL of water was added. The suspension was further stirred at room temperature for 3h and then, evaporated to dryness. After addition of water and filtration, the precipitate was washed with H₂O, Et₂O and further dried in a vacuum oven to yield the desired product as an orange solid.

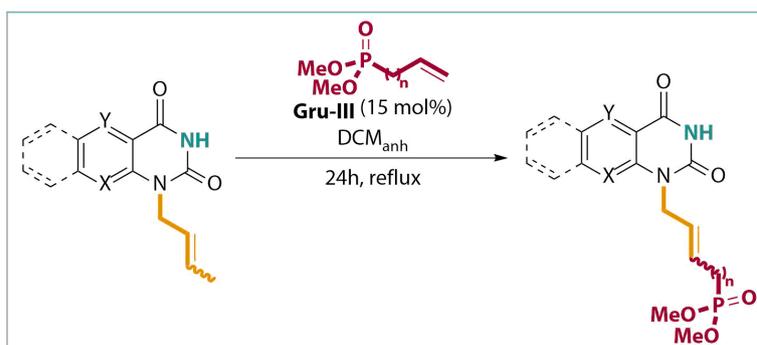
Dithiotreitol (5.5 eq) was added to a solution of corresponding *N*-oxide derivative (3 mmol) in DMF (60 mL). The resulting mixture was then refluxed overnight under gentle nitrogen flow and then was cooled at room temperature and further stirred at the same temperature for 10h. The volatiles were evaporated in vacuum and the residue was dissolved in 7 mL of an aqueous 3M NaOH solution. The resulting solution was then acidified with an aqueous 6M HCl solution and the formed bright yellow precipitate was filtered with suction, washed with H₂O and Et₂O.

GENERAL PROCEDURE 3 : *N*₇-alkylation of heterocyclic bases



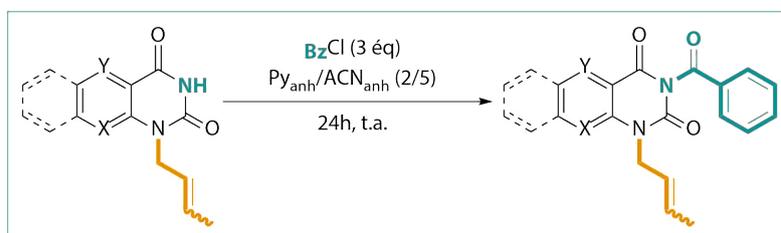
A 10-20 mL vial was charged with heterocyclic base (1 eq) in ACN_{anh} (0.5 M). To this suspension was added BSA (2.5 eq) and a spatula of 4 Å molecular sieves. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 5 minutes at room temperature until a clear solution was observed. To this resulting solution was added TMSCl (1 eq), freshly activated NaI (1.12 eq) and crotyl bromide (2 eq). The vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 30 - 60 min at 80°C. The volatiles were then removed in vacuum, and the obtained brown oil was dissolved in 200 mL of solution of saturated NaHCO₃ and 200 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 50 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with H₂O (50 mL), Na₂S₂O₃ solution (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM 100% to DCM/MeOH 97:3) to afford desired compounds as solids.

GENERAL PROCEDURE 4 : Cross metathesis with *bis*-(OMe) phosphonate derivatives



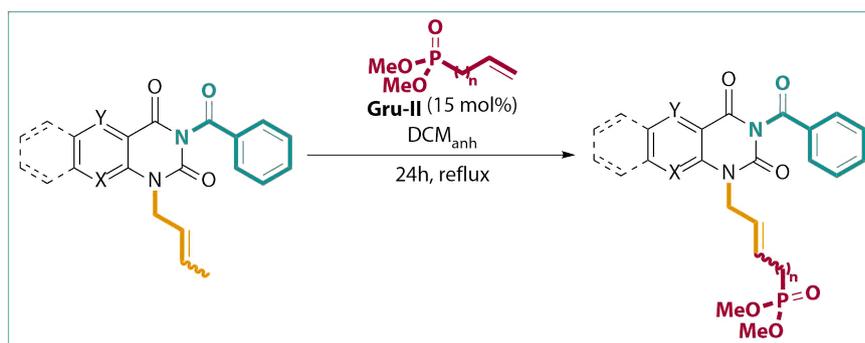
To a solution of dimethyl allylphosphonate / dimethyl buten-3-ylphosphonate (4 eq) and N_I -crotylated heterocyclic base (1 eq) in DCM_{anh} (0.1 M) was added Grubbs 3rd generation catalyst (15 mol%). This solution was gently refluxed for indicated time under positive pressure of dry Ar. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (97:3 to 95:5) and then by toluene/acetone (4:6 to 2:8) as eluant to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative.

GENERAL PROCEDURE 5 : Benzoylation of N_I -alkylated heterocyclic bases



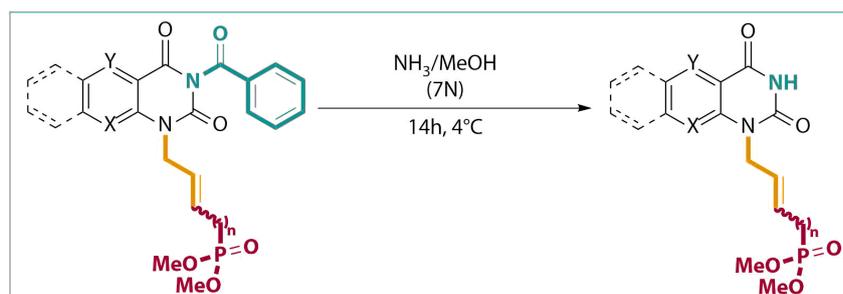
To a solution of N_I -crotylated heterocyclic base (1 g) in a 2/5 mixture of pyridine_{anh} and ACN_{anh} (20 mL) was added benzoylchloride (3 eq). The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 200 mL of solution of saturated NaHCO_3 and 200 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 50 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with HCl 1M (50 mL) and H_2O (50 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Petroleum ether 100% to PE/EtOAc 8/2).

GENERAL PROCEDURE 6 : Cross metathesis with *bis*-(OMe) phosphonate derivatives



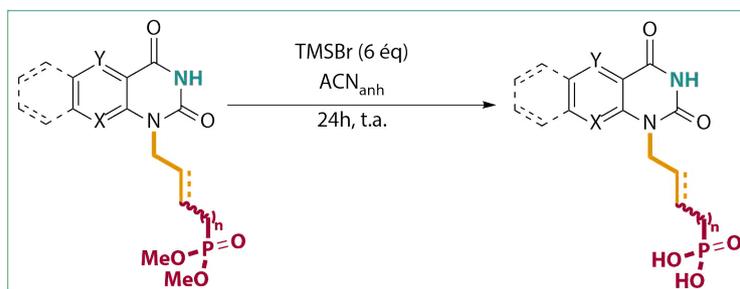
To a solution of dimethyl allylphosphonate / dimethyl buten-3-ylphosphonate (4 eq) and N_3 -protected- N_I -crotylated heterocyclic base (1 eq) in DCM_{anh} (0.05 M) was added Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%). This solution was gently refluxed for indicated time under positive pressure of dry Ar. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (100 % to 96:4) and then by toluene/acetone (9:1 to 6:4) as eluant to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative.

GENERAL PROCEDURE 7 : Deprotection of N_3 -benzoylated heterocyclic base derivatives



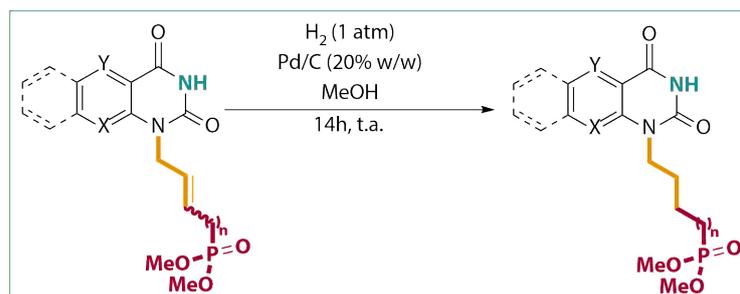
The debenzoylation of *N*₃-benzoylated heterocyclic base derivatives (100 mg) was carried out at 4 °C overnight in a 7N methanol solution of ammonia (5 mL). After evaporation of all the volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography DCM/MeOH (99:1 to 95:5) to yield the desired debenzoylated derivative as solids.

GENERAL PROCEDURE 8 : Deprotection of *bis*-(OMe) phosphonate derivatives



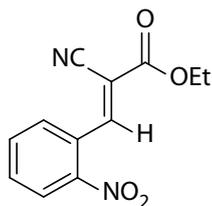
A 2-5 mL vial was charged with dimethyl phosphonate derivative (1 eq) in ACN_{anh} (0.1 M). To this solution was added TMSBr (6 eq) and the vial was sealed. The resulting red solution was stirred at room temperature for 24h. After evaporation of all volatiles, the mixture was dissolved in 10 mL EtOH and 10 mL H₂O. The solution was then sonicated at 80 KHz during 10 minutes, followed by the concentration of the solution under reduced pressure. The residue was once again dissolved in a mixture EtOH/H₂O (10 mL/10 mL), sonicated and evaporated to yield the expected phosphonic acid derivative.

GENERAL PROCEDURE 9 : Catalytic hydrogenation



To a solution of dimethyl phosphonate derivative (1 eq) in methanol (0.035 M) was added palladium on charcoal (20% w/w). The solution was first flushed with Ar atmosphere and then with hydrogen gas. A reservoir of hydrogen was provided with a balloon. After completion of the reaction (TLC), the reaction mixture was filtered through celite, which was washed with additional MeOH. After evaporation of all the volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography DCM/MeOH (97/3) to yield the desired alkane derivative as solids.

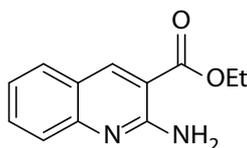
Ethyl (*E*)-2-cyano-3-(2-nitrophenyl)acrylate - 132



Procedure : 2-nitrobenzaldehyde (1 g, 6.6 mmol) was dissolved in H₂O (5 mL) followed by addition of ethyl cyanoacetate (0.702 ml, 6.6 mmol, 1 eq). To this suspension was added Et₃N (46 μ L, 0.33 mmol, 0.05 eq) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1h. The residue was partitioned between 25 mL of DCM and 25 mL of H₂O and the organic layer was separated and was washed with H₂O (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 8/2). Yield : 99%, orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 8.70 (s, 1H, H β), 8.29–8.25 (m, 1H, H_{Ar}), 7.88–7.67 (m, 3H, H_{Ar}), 4.40 (q, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 1.40 (t, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃). **CAS :** 5470-58-6.

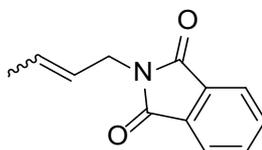
Ethyl 2-aminoquinoline-3-carboxylate - 133



Procedure : Titanium tetrachloride (2.2 mL, 20 mmol) was added slowly to a stirring suspension of zinc powder (2.6 g, 40 mmol) in THF_{anh} (20 mL). The reaction mixture was cooled at 0°C followed by a dropwise addition of a solution of ethyl (*E*)-2-cyano-3-(2-nitrophenyl)acrylate (2.46 g, 10 mmol) in THF_{anh} (20 mL). The reaction mixture was stirred for 1h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between 50 mL of DCM and 50 mL of an aqueous solution of K₂CO₃ 10% and the organic layer was separated, was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure and the residue was purified by recrystallization with EtOH. Yield : 85%, yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 8.69 (s, 1H, H₄), 7.70 – 7.50 (m, 3H, H_{Ar}), 7.30 – 7.10 (m, 1H, H_{Ar}), 6.23 (bs, 2H, NH₂), 4.40 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, Me). **CAS :** 36926-83-7.

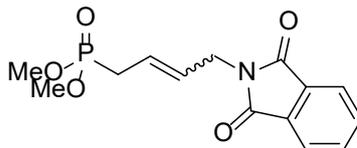
2-(but-2-en-1-yl)isoindoline-1,3-dione - 135



Procedure : To a round-bottom flask was added crotyl bromide (0.76 mL, 7.407 mmol), potassium phthalimide (1.65 g, 8.89 mmol) in DMF_{anh} (19 mL, 0.4M). The reaction mixture was stirred at 60°C for 14 h, was allowed to cool at room temperature and then was poured into 50 mL ice and water with vigorous stirring until the ice melted. The resulting white precipitate was isolated by filtration and dissolved in DCM. The solution was dried over MgSO₄, and the solvent was evaporated to yield the desired product without further purification. Yield : 92%, white solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 7.84 – 7.70 (m, 2H, H_{Ar}), 7.68 – 7.54 (m, 2H, H_{Ar}), 5.84 – 5.33 (m, 2H, CH=CH), 4.24 (ddd, J = 6.9, 1.4, 0.8 Hz, 2H, CH₂ minor), 4.13 (dp, J = 6.0, 1.2 Hz, 2H, CH₂ major), 1.75 (ddt, J = 6.9, 1.7, 0.8 Hz, 3H, CH₃ minor), 1.59 (dq, J = 6.4, 1.3 Hz, 3H, CH₃ major). **CAS :** 66784-19-8.

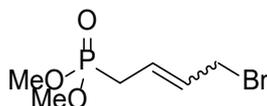
Dimethyl-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 136



Procedure : To a solution of (*E*)-2-(but-2-en-1-yl)isoindoline-1,3-dione (1.15 g, 5.73 mmol, 2 eq) in DCM_{anh} (26 mL, 0.1M) was added dimethylallyl phosphonate (0.43 g, 2.86 mmol, 1 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (0.121 g, 0.05 eq) and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/Acetone (100 % to 9:1) to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 81/19. Yield : 52%, brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 7.84 – 7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.72 – 7.60 (m, 2H, H_{Ar}), 5.84 – 5.51 (m, 2H, CH=CH), 4.96 – 4.67 (m, 2H, N-CH₂ minor), 4.34 – 4.17 (m, 2H, N-CH₂ major), 3.71 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe minor), 3.68 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe major), 2.85 (dd, *J* = 22.2, 6.9 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.54 (dd, *J* = 22.2, 5.6 Hz, 2H, P-CH₂ major). **Rf :** 0.38 (DCM/Acetone 9/1).

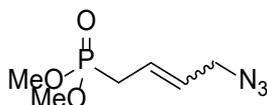
Dimethyl (4-bromobut-2-en-1-yl)phosphonate - 138



Procedure : To a solution of *trans*-1,4-dibromo-2-butene (5.70 g, 26.66 mmol, 4 eq) in DCM_{anh} (67 mL, 0.1M) was added dimethylallyl phosphonate (1 g, 6.66 mmol, 1 eq) and Grubbs 2nd generation catalyst (0.306 g, 0.05 eq) and the resulting solution was refluxed for 24h. The volatiles were then removed in vacuum, and the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/Acetone (100 % to 8:2) to yield the desired *bis*-(OMe) phosphonate derivative. The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 88/12. Yield : 80%, brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 6.03 – 5.51 (m, 2H, CH=CH), 4.11 – 3.81 (m, 2H, N-CH₂ major & minor), 3.73 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe minor), 3.72 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe major), 2.81 – 2.45 (m, 2H, P-CH₂ major & minor). **Rf :** 0.34 (DCM/Acetone 8/2). **CAS :** 1448163-48-1.

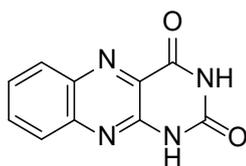
Dimethyl (4-azidobut-2-en-1-yl)phosphonate - 139



Procedure : To a solution of dimethyl (4-bromobut-2-en-1-yl)phosphonate (1.29 g, 5.33 mmol, 1.0 eq) in a mixture of DMSO (53.4 mL), THF (21.3 mL) and H₂O (10.7 mL) was added NaN₃ (1.734 g, 26.67 mmol, 5.0 eq). After 24 h stirring at room temperature, the mixture was partitioned between EtOAc and H₂O and then extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography, eluting with DCM/Acetone (100% to 8/2) to yield the desired compound. Yield : 74%, brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ 5.90 – 5.59 (m, 2H, CH=CH), 3.94 – 3.62 (m, 8H, OMe & N-CH₂), 2.65 (dddd, *J* = 22.1, 4.8, 1.8, 0.8 Hz, 2H, P-CH₂). **Rf :** 0.33 (DCM/Acetone 8/2).

Isoalloxazine - 143



Procedure : The title compound was obtained from *o*-phenylene diamine following the general procedure 2. Yield : 96%, yellow powder.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.94 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH), 8.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.94 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.87 - 7.69 (m, 1H, H_{Ar}). **CAS :** 490-59-5.

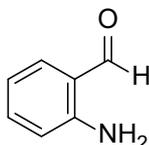
6,7-Dimethylisoalloxazine - 37



Procedure : The title compound was obtained from 4,5-dimethyl-*o*-phenylene diamine following the general procedure 2. Yield : 97%, yellow powder.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.80 (s, 1H, NH), 11.63 (s, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, H₇), 7.68 (s, 1H, H₉), 1.88 (s, 6H, CH₃*2). **CAS :** 1086-80-2.

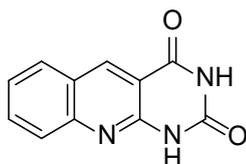
2-Aminobenzaldehyde - 110



Procedure : To a solution of 2-aminobenzyl alcohol derivative (1g) in DCM_{anh} (50 mL) was added MnO₂ (4 eq) at r.t. The reaction mixture was stirred until full disappearance of the starting material checked by TLC (eluent: DCM 100%, typically 24h). The resulting mixture was filtered on celite using DCM as eluent. The filtrate was evaporated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography through silica gel using pure DCM as eluent. The obtained yellow-orange liquid was kept at -20°C to yield the desired product as a yellow solid. Yield : 97%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.87 (s, 1H, CHO), 7.48 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H_{Ar}), 7.34 - 7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 6.77 - 6.73 (m, 1H, H_{Ar}), 6.65 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H_{Ar}), 6.11 (bs, 2H, NH₂). **CAS :** 529-23-7.

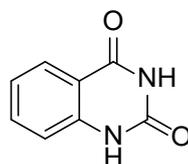
Pyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1H,3H)-dione - 144



Procedure : 2-Aminobenzaldehyde (0,2 mmol) and barbituric acid (1 eq) were suspended in H₂O (1 mL) in a round bottomed flask. The mixture was stirred at 70 °C for 3 h and then, the white suspension was filtered by suction, washed with H₂O (2 mL), with MeOH (2 mL) and with Et₂O (2 mL). Yield : 99%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 14.75 (s, 1H, NH), 13.18 (s, 1H, NH), 8.98 (s, 1H, H₅), 8.08-8.05 (d, 1H, *J* = 5.82 Hz, H₆), 7.91-7.77 (t, 1H, *J* = 6.12, 6.08 Hz, H₇), 7.51-7.47 (d, 1H, *J* = 5.76 Hz, H₉), 7.42-7.38 (t, 1H, *J* = 6.04, 6.00 Hz, H₈).
CAS : 26908-38-3.

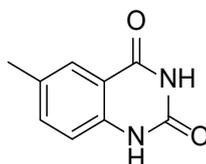
Quinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 147



Procedure : The title compound was obtained from anthranilic acid following general procedure 1. Yield : 92%, white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 11.21 (s, 1H, NH), 11.10 (s, 1H, NH), 8.00 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₆), 7.71 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₇), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₉), 7.30 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₈). **CAS** : 86-96-4.

6-Methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 148



Procedure : The title compound was obtained from 6-methylantranilic acid following general procedure 1. Yield : 95 %, white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-_{d6}) δ 11.21 (s, 1H, NH), 11.05 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, H₅), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₈), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₇), 2.32 (s, 3H, CH₃). **CAS** : 62484-16-6.

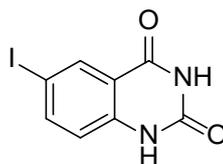
6-Bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 149



Procedure : The title compound was obtained from 6-bromoantranilic acid following general procedure 1. Yield : 94 %, white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-_{d6}) δ 11.43 (s, 1H, NH), 11.27 (s, 1H, NH), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.48 Hz, H_{Ar}), 7.78 (dd, 1H, *J* = 2.36, 8.63 Hz, H_{Ar}), 7.11 (d, 1H, *J* = 8.65 Hz, H_{Ar}). **CAS** : 88145-89-5.

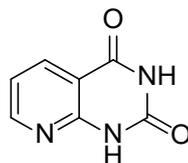
6-Iodoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 150



Procedure : The title compound was obtained from 6-iodoantranilic acid following general procedure 1. Yield : 95 %, white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.39 (s, 1H, NH), 11.24 (s, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, *J* = 1.92 Hz, H_{Ar}), 7.92 (dd, 1H, *J* = 2.00, 8.55 Hz, H_{Ar}), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.56 Hz, H_{Ar}). **CAS** : 16353-27-8.

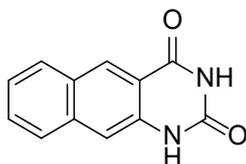
Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione - 151



Procedure : The title compound was obtained from 2-aminonicotinic acid following general procedure 1. Yield : 86 %, yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.8 (bs, 2H, OH), 8.35 (d, 1H, *J* = 5 Hz, H_{Ar}), 7.99 (d, 1H, *J* = 8 Hz, H_{Ar}), 6.76 (dd, 1H, *J* = 5, 8 Hz, H_{Ar}). **CAS** : 21038-66-4.

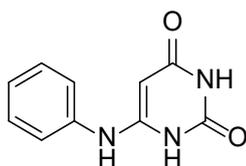
1,3-Diaza-1,3-dihydroanthracene-2,4-dione - 152



Procedure : The title compound was obtained from 3-amino-2-naphthoic acid following the general procedure 1. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.31 (s, 1H, NH), 11.20 (s, 1H, NH), 8.64 (s, 1H, H_{Ar}), 8.10 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{Ar}), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H_{Ar}), 7.61 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{Ar}), 7.52 (s, 1H, H_{Ar}), 7.47 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{Ar}). **CAS** : 13898-60-7.

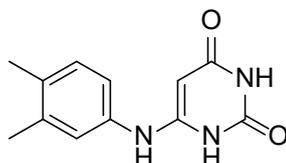
6-Anilinouracil - 64



Procedure : The title compound was obtained from 6-chlorouracil following the general procedure 2 (Method B, step 1). Yield : 85%, white solid.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.50 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H_{Ar}), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H_{Ar}), 7.23 – 7.15 (m, 3H, H_{Ar}), 4.70 (s, 1H, NH). **CAS** : 7269-15-0.

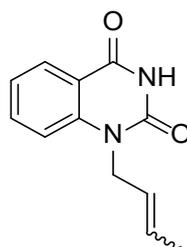
6-(3,4-Dimethylanilino)uracil - 154



Procedure : The title compound was obtained from 6-chlorouracil following the general procedure 2 (Method B, step 1). Yield : 88%, white solid.

CAS : 41648-10-6

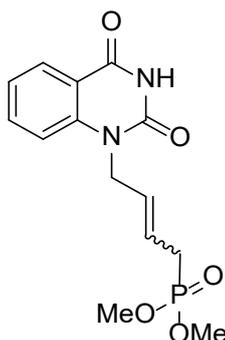
1-(but-2-en-1-yl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 160



Procedure : The title compound was obtained from quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 78%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) : δ 11.60 (s, 1H, N₃H), 8.02 (dd, 1H, *J* = 1.66, 7.84 Hz, H₆), 7.78-7.69 (m, 1H, H₈), 7.68-7.62 (m, 1H, H₇), 7.31-7.23 (m, 1H, H₉), 5.64-5.55 (m, 2H, CH=CH), 4.70 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, N-CH₂), 1.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) :** δ 162.2 (C=O), 150.4 (C=O), 141.0 (C_{quat}), 135.7 (C₈), 128.4 (CH=CH), 127.9 (C₆), 125.2 (CH=CH), 122.7 (C₉), 116.1 (C_{quat}), 115.4 (C₉), 43.9 (N-CH₂), 17.7 (CH-CH₃). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+Na]⁺ calculated for C₁₂H₁₂N₂NaO₃ 239.0791, found 239.0789. **Rf :** 0.61 (DCM/MeOH 97/3).

Dimethyl 4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-ylphosphonate - 174



Procedure A : To a solution of dimethyl allylphosphonate / dimethyl buten-3-ylphosphonate (4 eq) and 1-(but-2-en-1-yl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (1 eq) in DCM_{anh} (0.1 M) was added Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%). This solution was gently refluxed for precise indicated time under positive pressure of dry Ar. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (97:3 to 95:5) and then by toluene/acetone (4:6 to 2:8) as eluant to yield the desired coupling product as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 84/16. Yield : 17%, white solid.

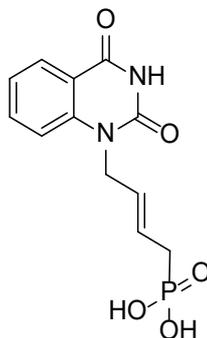
Procedure B : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 89/11 from 1-(but-2-en-1-yl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 35%, white solid.

Procedure C : The title compound was obtained from 1-(but-2-en-1-yl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 5, 6 & 7. Yield : 78%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.17 (s, 1H, N₃H), 8.22 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.75 – 7.58 (m, 1H, H₈), 7.33 – 7.15 (m, 2H, H₇ & H₉), 5.85 – 5.60 (m, 2H, CH=CH), 4.86 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.76 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.83 (s, 3H, OMe minor), 3.80 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe major), 3.68 (s, 3H, OMe major), 2.89 (dd, *J* = 22.5, 7.5 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.62 (dd, *J* = 21.7, 6.0 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 161.9 (C=O), 150.2 (C=O), 141.0 (C_{quat}), 135.6 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (d, *J* = 14.5 Hz, CH=CH), 123.3 (CH_{Ar}), 123.2 (CH=CH), 116.2 (C_{quat}), 114.7 (CH_{Ar}), 53.1 (OMe minor), 53.0 (OMe minor), 52.9 (OMe major), 52.9 (OMe major), 44.5 (N-CH₂ major), 40.4 (N-CH₂ minor), 29.4 (d, *J* = 140.5 Hz, P-CH₂ major), 25.7 (d, *J* = 140.4 Hz, P-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz,**

CDCl₃) δ 29.19 (P minor), 28.87 (P major) **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₈N₂O₅P 325.0947 found 325.0947. **Rf** : 0.37 (DCM/MeOH 95/5).

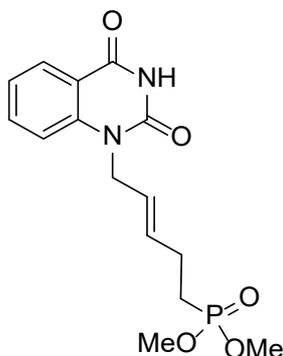
(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 202



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 11.58 (s, 1H, N₃H), 8.06 – 7.93 (m, 1H, H_{Ar}), 7.79 – 7.64 (m, 1H, H_{Ar}), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.63 (m, 2H, CH=CH), 4.75 (s, 2H, N-CH₂ minor), 4.65 (s, 2H, N-CH₂ major), 2.65 (dd, *J* = 22.0, 7.8 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.37 (dd, *J* = 21.4, 6.6 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆)** : δ 161.8 (C=O), 150.0 (C=O), 140.9 (C_{quat}), 135.3 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.0 (d, *J* = 14.0 Hz, CH=CH), 125.3 (d, *J* = 10.3 Hz, CH=CH), 122.6 (CH_{Ar}), 115.7 (C_{quat}), 115.2 (CH_{Ar}), 43.5 (N-CH₂), 32.2 (d, *J* = 134.6 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆)** δ 21.48. **HRMS-ESI (m/z)** : [M-H]⁻ calculated for C₁₂H₁₂N₂O₅P 295.0489 found 295.0487.

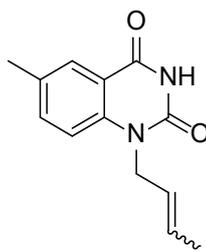
Dimethyl (E)-(5-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 179



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 87/13 from 1-(but-2-en-1-yl)-quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 31%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H, N₃H), 8.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.33 – 7.14 (m, 2H, H_{Ar}), 5.73 (m, 2H, CH=CH), 4.75 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, N-CH₂), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.62 (dd, *J* = 21.7, 5.9 Hz, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 161.9 (C=O), 150.2 (C=O), 141.0 (C_{quat}), 135.6 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.7 (d, *J* = 3.28 Hz, CH=CH), 123.4 (CH_{Ar}), 123.3 (CH=CH), 116.2 (C_{quat}), 114.7 (CH_{Ar}), 52.9 (OMe), 52.9 (OMe), 44.5 (N-CH₂), 29.4 (d, *J* = 140.4 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 28.87. **Rf** : 0.39 (DCM/MeOH 95/5).

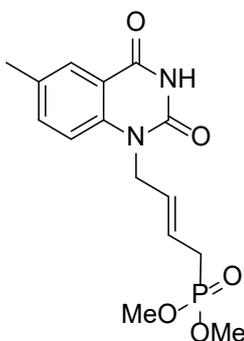
1-(but-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 161



Procedure : The title compound was obtained from 6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 90%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, Acetone-_{d6}) : δ 10.13 (s, 1H, N₃H), 7.88 (s, 1H, H₆), 7.59-7.55 (m, 1H, H₈), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.58, 19.59 Hz, H₉), 5.80-5.39 (m, 2H, CH=CH), 4.67 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, N-CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.68 (d, 3H, *J* = 1.33 Hz, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-_{d6}) :** 162.4 (C=O), 150.8 (C=O), 140.2 (C_{quat}), 134.8 (C₈), 133.0 (C_{quat}), 129.4 (CH=CH), 129.2 (C_{quat}), 128.4 (C₆), 125.8 (CH=CH), 115.9 (C₉), 40.5 (N-CH₂), 20.4 (CH₃), 17.8 (CH-CH₃). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+Na]⁺ calculated for C₁₃H₁₄N₂NaO₂ 253.0957 found 253.0957. **Rf :** 0.62 (DCM/MeOH 97/3).

Dimethyl 4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-ylphosphonate - 175



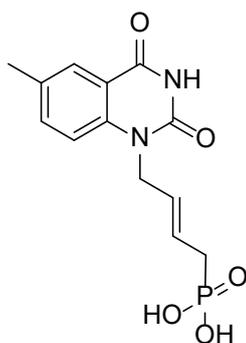
Procedure A : To a solution of dimethyl allylphosphonate / dimethyl buten-3-ylphosphonate (4 eq) and 1-(but-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (1 eq) in DCM_{anh} (0.1 M) was added Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%). This solution was gently refluxed for precise indicated time under positive pressure of dry Ar. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (97:3 to 95:5) and then by toluene/acetone (4:6 to 2:8) as eluant to yield the desired coupling product as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 88/12. Yield : 23%, white solid.

Procedure B : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 88/12 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 37%, white solid.

Procedure C : The title compound was obtained from 1-(but-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 5, 6 & 7. Yield : 79%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 10.39 (s, 1H, N₃H), 7.86 (s, 1H, H₆), 7.54 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H, H₈), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₉), 5.99 – 5.54 (m, 2H, CH=CH), 4.74 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, N-CH₂), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.61 (s, 3H, OMe), 2.63 (dd, *J* = 21.5, 6.3 Hz, 2H, P-CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6}) :** δ 160.6 (C=O), 150.9 (C=O), 143.2 (C_{quat}), 136.8 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 128.4 (CH=CH), 123.8 (CH=CH), 117.0 (C_{quat}), 116.0 (CH_{Ar}), 52.7 (OMe), 44.5 (N-CH₂), 28.9 (P-CH₂), 20.4 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-_{d6}) :** δ 28.13. **Rf :** 0.37 (DCM/MeOH 95/5).

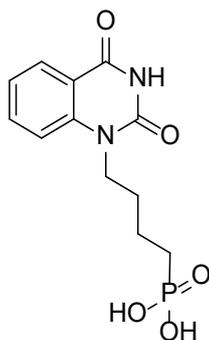
(*E*)-(4-(6-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 203



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (E)-4-(6-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-ylphosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 11.51 (s, 1H, N₃H), 7.78 (s, 1H, H₅), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₇), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₈), 5.60 (s, 2H, CH=CH), 4.62 (s, 2H, N-CH₂), 2.36 (m, 5H, CH₃ et P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6}) :** δ 161.84 (C=O), 149.99 (C=O), 138.75 (C_{quat}), 136.17 (C₈), 131.91 (C_{quat}), 127.25 (d, *J* = 14.5 Hz, CH=CH), 127.14 (C₅), 124.89 (d, *J* = 10.0 Hz, CH=CH), 115.53 (C_{quat}), 115.20 (C₇), 43.46 (N-CH₂), 32.04 (d, *J* = 134.4 Hz, P-CH₂), 20.01 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 21.49. **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₃H₁₄N₂O₅P 309.0645 found 309.0645.

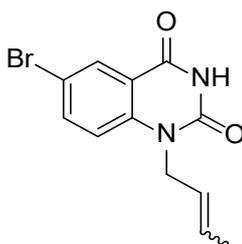
Dimethyl 4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-ylphosphonate - 225



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl 4-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-ylphosphonate following general procedure 8 & 9. Yield : qtf, white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 11.54 (s, 1H, N₃H), 8.00 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.84 – 7.66 (m, 1H, H_{Ar}), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.80 – 1.62 (m, 2H, CH₂), 1.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 161.8 (C=O), 150.1 (C=O), 140.8 (C_{quat}), 135.4 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 122.4 (CH_{Ar}), 115.7 (C_{quat}), 114.8 (CH_{Ar}), 41.6 (N-CH₂), 27.9 (P-CH₂), 26.6 (CH₂), 20.1 (d, *J* = 4.5 Hz, CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 21.48 **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₂H₁₄N₂O₅P 297.0645 found 297.0643.

1-(but-2-en-1-yl)-6-bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 164

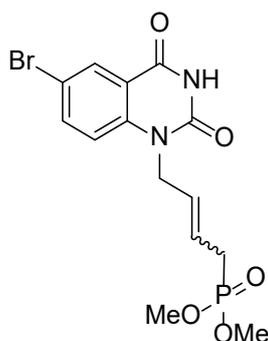


Procedure A : The title compound was obtained from 6-bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 25%, yellow solid.

Procedure B : To a DMF_{anh} (20.7 mL) suspension of 6-bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (5 g, 20.7 mmol, 1 eq) was added BSA (11.16 mL, 45.6 mmol, 2.2 eq) and a spatula of 4 Å molecular sieves. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 5 minutes at r.t. until a clear solution was observed. To this resulting solution was added TBAI (catalytic) and crotyl bromide (7.53 mL, 62.23 mmol, 3 eq) and the resulting mixture was heated at 100°C overnight. The volatiles were then removed in vacuum, and the obtained brown oil was dissolved in 200 mL of solution of saturated NaHCO₃ and 200 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 50 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with H₂O (50 mL), Na₂S₂O₃ solution (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (pure DCM to DCM/MeOH 97:3) to afford desired compound. Yield : 67%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.73 (s, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.88 (dd, *J* = 2.5, 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.34 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.70 – 5.45 (m, 2H, CH=CH), 4.71 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.59 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.81 – 1.76 (dd, *J* = 1.5, 7 Hz, 3H, CH₃ minor), 1.64 – 1.56 (dd, *J* = 1.5, 7 Hz, 3H, CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 161.1 (C=O), 150.3 (C_{quat}), 150.2 (C=O), 140.6 (C_{quat}) 138.0 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.4 (CH=CH), 125.0 (CH=CH), 118.2 (CH_{Ar}), 114.8 (C_{quat}), 44.0 (N-CH₂ major), 43.20 (N-CH₂ minor), 17.4 (CH₃ major), 13.1 (CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₂H₁₂BrN₂O₂ 295.0076 found 295.0072. **Rf :** 0.27 (DCM/MeOH 98/2).

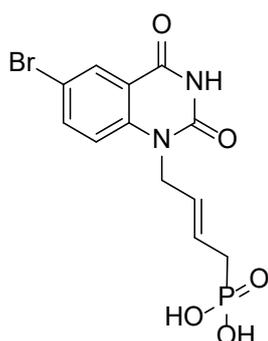
Dimethyl (E)-(4-(6-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate
– 180



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 89/11 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 32%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.00 (s, 1H, NH), 8.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.10 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.82 – 5.56 (m, 2H, CH=CH), 4.83 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.71 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.82 (s, 3H, OMe minor), 3.79 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe major), 3.69 (s, 3H, OMe major), 2.85 (dd, *J* = 22.7, 8.2 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.61 (dd, *J* = 22.0, 5.8 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 160.6 (C=O), 149.8 (C=O), 140.0 (C_{quat}), 138.4 (CH_{Ar}), 131.4 (CH_{Ar}), 128.2 (d, *J* = 14.4 Hz, CH=CH), 123.7 (d, *J* = 11.2 Hz, CH=CH), 117.8 (C_{quat}), 116.7 (CH_{Ar}), 116.5 (C_{quat}), 52.9 (OMe), 52.9 (OMe), 44.7 (d, *J* = 2.2 Hz, N-CH₂), 29.4 (d, *J* = 140.5 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 28.98 (P minor), 28.72 (P major). **Rf :** 0.22 (DCM/MeOH 97/3)

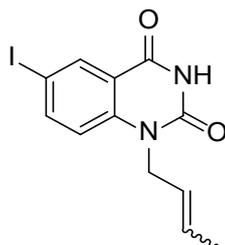
(E)-(4-(6-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 204



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (E)-(4-(6-bromo-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 11.75 (s, 1H, N₃H), 8.03 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.85 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.63 (dtd, *J* = 30.9, 15.8, 15.1, 5.3 Hz, 2H, CH=CH), 4.73 (s, 2H, N-CH₂ major), 4.63 (s, 2H, N-CH₂ minor), 2.63 (dd, *J* = 21.6, 8.4 Hz, 2H, P-CH₂ major), 2.36 (dd, *J* = 21.4, 6.0 Hz, 2H, P-CH₂ minor). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6}) :** δ 160.67 (C=O), 149.75 (C=O), 140.09 (C_{quat}), 137.53 (C₈), 129.33 (C_{quat}), 126.06 (d, *J* = 124.0 Hz, CH=CH), 117.83 (C₅), 117.61 (C_{quat}), 114.42 (C₇), 43.67 (N-CH₂), 32.16 (d, *J* = 133.9 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 20.91.

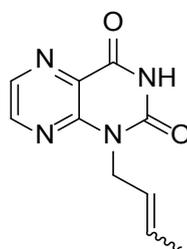
1-(but-2-en-1-yl)-6-iodoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 165



Procedure : The title compound was obtained from 6-iodoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 28%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 9.40 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H_{Ar}), 7.90 (m, 1H, H_{Ar}), 6.98 (m, 1H, H_{Ar}), 5.77 – 5.45 (m, 2H, CH=CH), 4.64 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, N-CH₂), 1.68 (d, *J* = 1.36 Hz, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6}) :** δ 161.3 (C=O), 150.3 (C=O), 141.1 (C_{quat}), 137.5 (CH_{Ar}), 137.6 (CH_{Ar}), 130.4 (CH=CH), 123.9 (CH=CH), 118.3 (C_{quat}), 117.2 (CH_{Ar}), 86.2 (C_{quat}), 45.1 (N-CH₂), 18.1 (CH₃ major). **R_f :** 0.43 (DCM/MeOH 97/3).

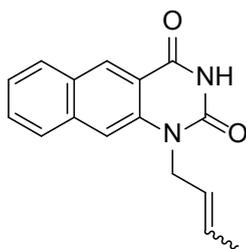
1-(but-2-en-1-yl)pteridine-2,4(1H,3H)-dione - 166



Procedure : The title compound was obtained from pteridine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 30%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, Acetone-_{d6}) : δ 10.65 (s, 1H, NH), 8.64 (d, *J* = 2.31 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.58 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.87 – 5.56 (m, 2H, CH=CH), 4.79 (d, *J* = 6.13 Hz, 2H, N-CH₂), 1.66 – 1.63 (m, 3H, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone-_{d6}) :** δ 160.3 (C=O), 150.3 (C=O), 148.2 (C_{quat}), 140.6 (C_{quat}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.9 (CH=CH), 128.5 (CH_{Ar}), 125.8 (CH=CH), 43.4 (N-CH₂), 17.8 (CH₃ major). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+Na]⁺ calculated for C₁₀H₁₀NaN₂O₂ 241.0696 found 241.0694. **R_f :** 0.32 (DCM/MeOH 97/3).

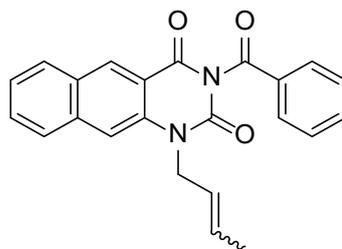
1-(but-2-en-1-yl)benzo[*g*]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione - 167



Procedure: The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from benzo[g]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 79 %, brown solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}): δ 11.60 (s, 1H, N₃H), 8.72 (s, 1H, H₅), 8.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₇), 7.79 (s, 1H, H₁₀), 7.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₉), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₈), 5.91 – 5.37 (m, 2H, CH=CH), 4.83 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.71 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.87 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.64 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6}):** δ 161.8 (C=O), 149.9 (C=O), 136.4 (C_{quat}), 131.2 (C_{quat}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH=CH), 127.95 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 125.4 (CH_{Ar}), 124.7 (CH=CH), 116.1 (C_{quat}), 110.9 (C_{quat}), 43.6 (N-CH₂ major), 17.5 (CH-CH₃ major), 13.2 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₁₅N₂O₂ 267.1055 found 267.1057. **Rf:** 0.62 (DCM/MeOH 95/5).

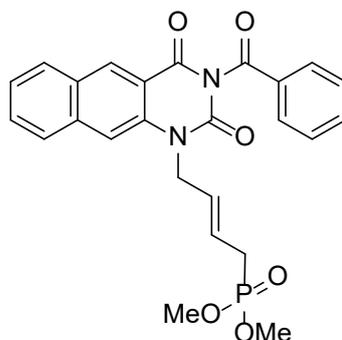
3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]quinazolin-2,4(1H,3H)-dione -190



Procedure: The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 starting from 1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]quinazolin-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 5. Yield : 73%, beige solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 8.80 (s, 1H, H_{Ar}), 8.21 – 7.37 (m, 10H, H_{Ar}), 5.97 – 5.47 (m, 2H, CH=CH), 4.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.78 (dt, *J* = 5.4, 1.3 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.92 (dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.72 (dd, *J* = 6.4, 1.5 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₂₃H₁₉N₂O₃ 371.1390 found 371.1391. **Rf:** 0.94 (DCM 100%).

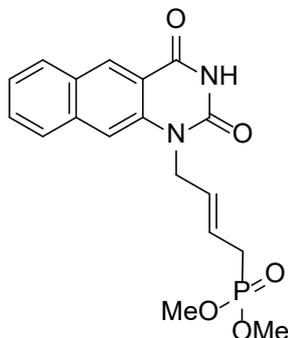
Dimethyl (*E*)-(4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]quinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 191



Procedure: The title compound was obtained from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]quinazolin-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 6. Yield : 56%, brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 8.81 (s, 1H, H_{Ar}), 8.06 – 7.82 (m, 4H, H_{Ar}), 7.73 – 7.56 (m, 3H, H_{Ar}), 7.57 – 7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 5.96 – 5.71 (m, 2H, CH=CH), 4.95 – 4.73 (m, 2H, N-CH₂), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.59 (s, 3H, OMe), 2.68 – 2.55 (m, 2H, P-CH₂). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₅H₂₄N₂O₆P 479.1366 found 479.11367. **Rf** : 0.23 (DCM/Acetone 9/1).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]quinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 176



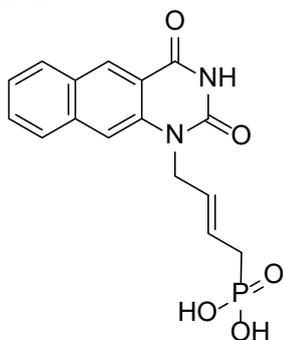
Procedure A : To a solution of dimethyl allylphosphonate / dimethyl buten-3-ylphosphonate (4 eq) and 1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (1 eq) in DCM_{anh} (0.1 M) was added Grubbs 2nd generation catalyst (15 mol%). This solution was gently refluxed for precise indicated time under positive pressure of dry Ar. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography with DCM/MeOH (97:3 to 95:5) and then by toluene/acetone (4:6 to 2:8) as eluant to yield the desired coupling product as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15. Yield : 8%, white solid.

Procedure B : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 84/16 from 1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 65%, white solid.

Procedure C : The title compound was obtained from 1-(but-2-en-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 5, 6 & 7. Yield : 46%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.82 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.67 – 7.58 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 5.92 – 5.67 (m, 3H), 4.86 (t, *J* = 3.8 Hz, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.63 (dd, *J* = 21.2, 5.2 Hz, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 161.8 (C=O), 149.9 (C=O), 137.0 (C_{quat}), 136.4 (C_{quat}), 131.1 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (C_{quat}), 128.7 (d, *J* = 14.4 Hz, CH=CH), 127.6 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 123.4 (d, *J* = 11.3 Hz, CH=CH), 115.9 (C_{quat}), 111.4 (CH_{Ar}), 52.9 (OMe), 52.8 (OMe), 44.9 (N-CH₂), 29.5 (d, *J* = 140.3 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 28.89. **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₂₀N₂O₅P 375.1104 found 375.1104. **Rf** : 0.26 (DCM/MeOH 97/3).

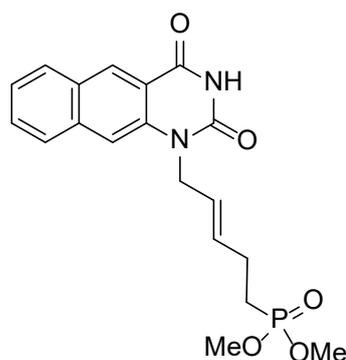
(E)-(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]quinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 205



Procedure : The title compound was obtained from Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]quinazolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.61 (s, 1H, N₃H), 8.71 (s, 1H, H_{Ar}), 8.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.80 (s, 1H, H_{Ar}), 7.64 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.87 – 5.64 (m, 2H, CH=CH), 4.75 (s, 2H, N-CH₂), 2.39 (dd, *J* = 21.4, 6.9 Hz, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 162.3 (C=O), 150.4 (C=O), 136.9 (C_{quat}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.5 (d, *J* = 13.9 Hz, CH=CH), 125.9 (CH_{Ar}), 125.7 (d, *J* = 10.1 Hz, CH=CH), 116.5 (C_{quat}), 111.6 (CH_{Ar}), 44.2 (N-CH₂), 32.6 (d, *J* = 134.4 Hz, P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 21.52. **HRMS-ESI (m/z)** : [M-H]⁻ calculated for C₁₆H₁₄N₂O₅P 345.0645 found 345.0646.

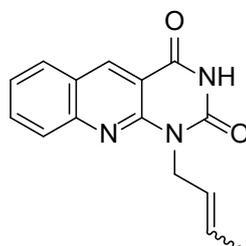
Dimethyl (E)-(5-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[*g*]quinazolin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 182



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 82/18 from 1-(but-2-en-1-yl)benzo[*g*]quinazoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 48%, beige solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.13 (s, 1H, N₃H), 8.82 (s, 1H, H₅), 7.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₆), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₉), 7.61 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, 1H, H₈), 7.55 – 7.41 (m, 2H, H₁₀ & H₇), 6.03 – 5.40 (m, 2H, CH=CH), 4.91 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.81 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.81 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe minor), 3.68 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe major), 2.65 (m, 2H, CH-CH₂ minor), 2.36 (m, 2H, CH-CH₂ major), 2.08 – 1.89 (m, 2H, P-CH₂ minor), 1.87 – 1.64 (m, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 162.1 (C=O), 150.2 (C=O), 137.0 (C_{quat}), 136.5 (C_{quat}), 132.9 (d, *J* = 16.5 Hz, CH=CH major), 132.6 (d, *J* = 15.0 Hz, CH=CH minor), 131.0 (C₅), 129.9 (C₈), 129.5 (C₆), 128.9 (C_{quat}), 127.5 (C₉), 126.0 (C₇), 124.0 (CH=CH), 115.9 (C_{quat}), 111.2 (C₁₀), 52.6 (d, *J* = 6.5 Hz, OMe minor), 52.5 (d, *J* = 6.6 Hz, OMe major), 44.7 (N-CH₂ major), 40.6 (N-CH₂ minor), 25.3 (d, *J* = 4.6 Hz, CH-CH₂ major), 25.0 (P-CH₂ minor), 24.0 (P-CH₂ major), 21.1 (d, *J* = 4.5 Hz, CH-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 33.52 (P major), 33.14 (P minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₂₀N₂O₅P 375.1104 found 375.1104. **Rf** : 0.44 (DCM/MeOH 95/5).

1-(but-2-en-1-yl)pyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1H,3H)-dione - 168

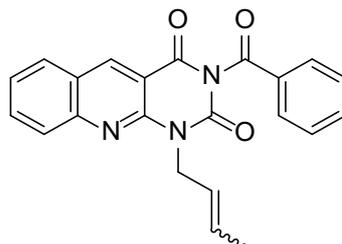


Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from pyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 60%, yellow powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.75 (s, 1H, N₃H), 9.07 (s, 1H, H₅), 8.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 7.90 (dt, *J* = 15.4, 8.4 Hz, 2H, H₇ & H₉), 7.58 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₈), 6.00 – 5.39 (m, 2H, CH=CH), 4.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.83 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.62 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 161.1 (C=O), 150.3 (C=O), 149.0 (C_{quat}), 148.9 (C_{quat}), 139.4 (C₅), 133.2 (C₇), 129.6 (C₆), 127.5 (C₉), 125.6 (d, *J* = 5.53 Hz, CH=CH), 125.5 (C₈), 125.3 (CH=CH), 124.2 (C_{quat}), 111.8 (C_{quat}), 42.3 (N-CH₂ major), 17.5 (CH-

CH₃ major), 13.1 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₅H₁₄N₃O₂ 268.1080 found 268.1077. **Rf** : 0.36 (DCM/MeOH 97/3).

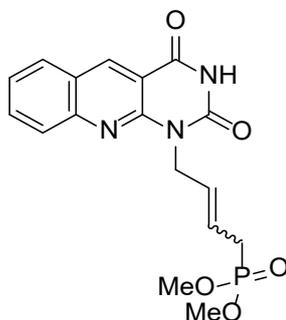
3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione - 193



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 1-(but-2-en-1-yl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione following the general procedure 5. Yield : 70%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.04 (s, 1H, H₅), 8.20 – 7.92 (m, 4H, H_{Ar}), 7.88 (ddd, *J* = 8.5, 7.0, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (ddt, *J* = 23.2, 15.4, 7.8 Hz, 3H, H_{Ar}), 5.97 - 5.62 (m, 2H, CH=CH), 5.14 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.97 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.69 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 168.5 (C=O), 160.6 (C=O), 150.3 (C=O), 149.6 (C_{quat}), 148.2 (C_{quat}), 140.7 (CH_{Ar}), 135.3 (CH_{Ar}), 133.8 (CH_{Ar}), 131.8 (C_{quat}), 131.5 (CH=CH), 130.7 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{quat}), 124.6 (CH=CH), 124.1 (CH_{Ar}), 111.0 (C_{quat}), 43.8 (N-CH₂ major), 39.4 (N-CH₂ minor), 18.0 (CH-CH₃ major), 13.5 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₂H₁₈N₃O₃ 372.1342 found 372.1342. **Rf** : 0.35 (PE/EtOAc 8/2).

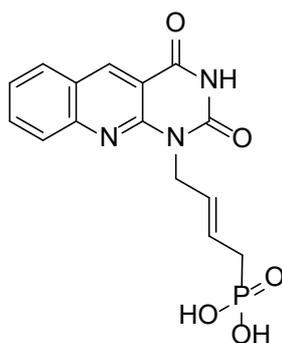
Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 177



Procedure : The title compound was obtained in 2 steps as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione following the general procedure 6 & 7. Yield : 66%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.66 (s, 1H, N₃H), 8.99 (s, 1H, H₅), 8.07 – 7.72 (m, 3H, H₆, H₇ & H₉), 7.47 (dt, *J* = 35.2, 7.2 Hz, 1H, H₈), 5.91 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH=CH), 5.19 – 4.84 (m, 2H, N-CH₂ major + minor), 3.78 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe minor), 3.68 (d, *J* = 10.9 Hz, 6H, OMe major), 3.17 (dd, *J* = 22.3, 7.9 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.60 (dd, *J* = 22.2, 5.0 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 161.4 (C=O), 150.5 (C=O), 150.0 (C_{quat}), 148.8 (C_{quat}), 140.2 (C₅), 133.5 (C₇), 129.4 (d, *J* = 14.7 Hz, CH=CH), 129.4 (C₆), 128.4 (C₈), 126.2 (C₉), 124.7 (C_{quat}), 123.9 (d, *J* = 11.1 Hz, CH=CH), 111.3 (C_{quat}), 53.0 (d, *J* = 6.8 Hz, OMe minor), 52.9 (d, *J* = 6.7 Hz, OMe major), 43.1 (N-CH₂ major), 38.8 (N-CH₂ minor), 29.6 (d, *J* = 139.9 Hz, P-CH₂ major), 25.6 (d, *J* = 140.5 Hz, P-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 30.07 (P minor), 29.37 (P major). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₁₉N₃O₅P 376.1056 found 376.1053. **Rf** : 0.21 (DCM/MeOH 97/3).

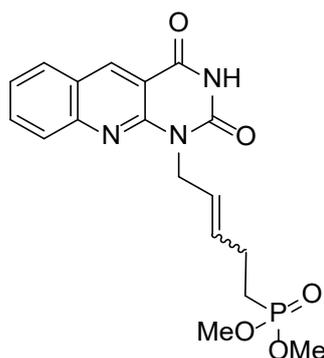
(*E*)-(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 206



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (*E*)-(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.73 (s, 1H, N₃H), 8.97 (s, 1H, H₅), 8.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.85 (d, *J* = 18.1 Hz, 2H, H₇ & H₉), 7.53 (s, 1H, H₈), 5.74 (s, 2H, CH=CH), 4.82 (s, 2H, N-CH₂), 2.33 (d, *J* = 24.6 Hz, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 161.1 (C=O), 150.3 (C=O), 148.9 (C_{quat}), 148.8 (C_{quat}), 139.3 (C₅), 133.2 (C₈), 129.6 (C₉), 127.5 (C₇), 126.5 (d, *J* = 12.4 Hz, CH=CH), 125.6 (C₆), 124.2 (C_{quat}), 111.6 (C_{quat}), 42.5 (N-CH₂), 33.3 (P-CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 20.89. **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₅H₁₃N₃O₅P 346.0598 found 346.0596.

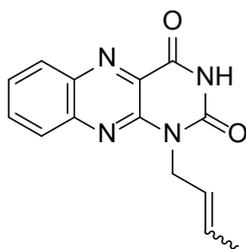
Dimethyl-(5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 182



Procedure : The title compound was obtained in two steps as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione following the general procedure 6 & 7. Yield : 40%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.27 (s, 1H, N₃H), 9.02 (s, 1H, H₅), 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₆), 7.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₇), 7.84 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₉), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₈), 6.02 – 5.59 (m, 2H, CH=CH), 5.10 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.01 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.80 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe minor), 3.69 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, OMe major), 2.87 – 2.71 (m, 2H, CH-CH₂ minor), 2.32 (tt, *J* = 11.4, 6.9 Hz, 2H, CH-CH₂ major), 1.95 (dt, *J* = 16.8, 8.1 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 1.81 (ddd, *J* = 16.9, 9.6, 6.6 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 161.3 (C=O), 150.4 (C=O), 150.1 (C_{quat}), 148.8 (C_{quat}), 140.3 (C₅), 134.0 (C_{quat}), 133.8 (d, *J* = 17.55 Hz, CH=CH), 133.6 (C₉), 129.4 (C₇), 128.5 (C₆), 126.3 (C₈), 124.7 (d, *J* = 5.22 Hz, CH=CH), 111.3 (C_{quat}), 52.6 (OMe minor), 52.5 (OMe minor), 52.5 (OMe major), 52.4 (OMe major), 43.2 (N-CH₂ major), 39.0 (N-CH₂ minor), 25.2 (d, *J* = 4.74 Hz, CH-CH₂ major), 24.3 (d, *J* = 140.95 Hz, P-CH₂ major), 24.2 (P-CH₂ minor), 21.0 (CH-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 34.01 (P minor), 33.90 (P major). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₂₁N₃O₅P 390.1213 found 390.1210. **Rf :** 0.21 (DCM/MeOH 97/3).

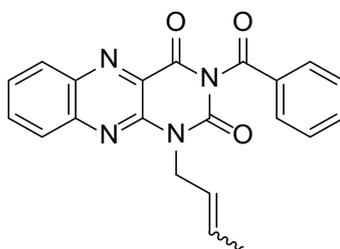
1-(but-2-en-1-yl)-benzo[*g*]pteridine-2,4(1H,3H)-dione - 169



Procedure: The title compound was obtained from Alloxazine following general procedure 3. Yield : 37 %, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-_{d6}) : δ 12.00 (s, 1H, NH), 8.19 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.11 – 7.57 (m, 3H, H_{Ar}), 5.90 – 5.29 (m, 2H, CH=CH), 4.91 – 4.48 (m, 2H, N-CH₂), 1.74 (dd, *J* = 105, 6.2 Hz, 3H, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-_{d6})** : δ 170.8 (C_{quat}), 160.0 (C=O), 148.2 (C=O), 145.2 (C_{quat}), 142.5 (C_{quat}), 133.9 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH=CH), 127.9 (CH_{Ar}), 125.7 (CH=CH), 92.1 (C_{quat}), 18.0 (CH-CH₃ major), 13.6 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₃N₄O₂ 269.1033 found 269.1033. **Rf** : 0.33 (DCM/MeOH 97/3).

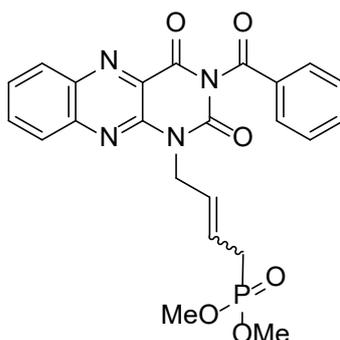
3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione - 194



Procedure: The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 1-(but-2-en-1-yl)-benzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione following the general procedure 5. Yield : 78%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.07 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.95 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.80 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.08 – 5.58 (m, 2H, CH=CH), 5.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.99 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂ major), 1.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.69 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 167.7 (C=O), 158.7 (C=O), 148.8 (C=O), 145.4 (C_{quat}), 143.6 (C_{quat}), 140.3 (CH_{Ar}), 135.5 (CH_{Ar}), 134.6 (CH_{Ar}), 132.3 (CH=CH), 131.4 (C_{quat}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.7 (C_{quat}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 123.8 (CH=CH), 44.0 (N-CH₂ major), 39.5 (N-CH₂ minor), 18.0 (CH-CH₃ major), 13.6 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₁₇N₄O₃ 373.1295 found 373.1295. **Rf** : 0.33 (PE/EtOAc 8/2).

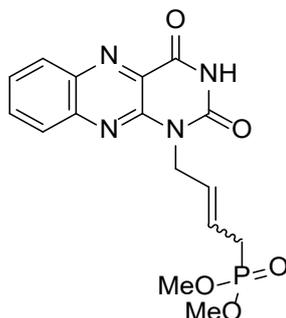
Dimethyl (4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 197



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 81/19 from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)benzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 6. Yield : 45%, dark green oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.96 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.03 – 5.82 (m, 2H, CH=CH), 5.16 – 5.07 (m, 2H, N-CH₂ minor), 5.05 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.73 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe minor), 3.68 (s, 3H, OMe major), 3.66 (s, 3H, OMe major), 3.06 (dd, *J* = 22.4, 8.0 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.60 (dd, *J* = 21.9, 6.4 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 167.6 (C=O), 158.6 (C=O), 148.8 (C=O), 145.3 (C_{quat}), 143.5 (C_{quat}), 140.3 (C_{quat}), 135.6 (CH_{Ar}), 134.7 (CH_{Ar}), 131.4 (CH_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.9 (C_{quat}), 129.8 (C_{quat}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.2 (d, *J* = 14.6 Hz, CH=CH), 125.5 (d, *J* = 11.2 Hz, CH=CH), 53.0 (OMe), 52.9 (OMe), 43.7 (N-CH₂ major), 39.3 (N-CH₂ minor), 29.6 (d, *J* = 140.0 Hz, P-CH₂ major), 22.1 (d, *J* = 133.5 Hz, P-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 29.50 (P minor), 28.96 (P major). **Rf :** 0.33 (Toluène/Acétone 7/3).

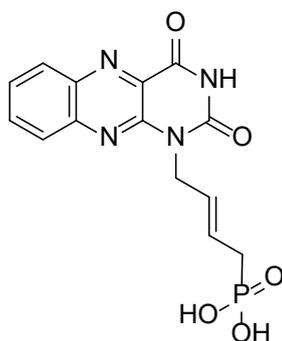
Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate -178



Procedure : The title compound was obtained in two steps as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 73/27 from dimethyl (4-(3-benzoyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following the general procedure 7. Yield : 73%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.02 (s, 1H, N₃H), 8.02 – 7.95 (m, 1H, H_{Ar}), 7.91 – 7.85 (m, 2H, H_{Ar}), 7.73 (ddd, *J* = 8.5, 6.7, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.89 – 5.52 (m, 2H, CH=CH), 4.73 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, N-CH₂), 3.68 (s, 3H, OMe minor), 3.63 (s, 3H, OMe major), 3.57 (s, 3H, OMe major), 3.53 (s, 3H, OMe major), 3.12 – 2.93 (m, 2H, P-CH₂ minor), 2.75 – 2.54 (m, 2H, P-CH₂ major). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 29.39 (P minor), 29.21 (P major). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₁₈N₄O₅P 377.1009 found 377.1004. **Rf :** 0.31 (DCM/MeOH 97/3).

(*E*)-(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 207

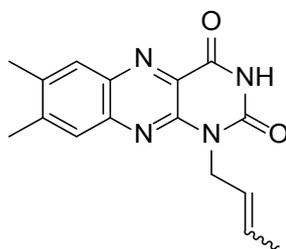


Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (*E*)-(4-(2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 12.05 (s, 1H, N₃H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.97 (dt, *J* = 15.5, 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.73 (s, 2H, CH=CH), 4.79 (s, 2H, N-CH₂), 2.36 (dd, *J* = 21.2, 5.7 Hz, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 160.0 (C=O), 150.2 (C=O), 146.6 (C_{quat}), 142.5 (C_{quat}), 139.0 (C_{quat}), 134.0 (CH_{Ar}), 132.4 (CH_{Ar}),

130.4 (C_{quat}), 129.3 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 127.3 (d, *J* = 14.3 Hz, CH=CH), 125.5 (d, *J* = 10.4 Hz, CH=CH), 42.7 (N-CH₂), 32.1 (d, *J* = 134.3 Hz, P-CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.62. HRMS-ESI (m/z) : [M-H]⁻ calculated for C₁₄H₁₂N₄O₅P 347.0550 found 375.0550.

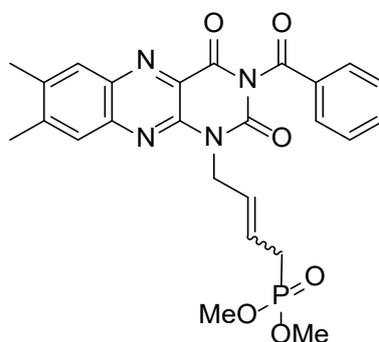
1-(but-2-en-1-yl)-7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione - 170



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 33 %, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.71 (s, 1H, N₃H), 8.05 (s, 1H, H₇), 7.81 (s, 1H, H₉), 6.13 – 5.51 (m, 2H, CH=CH), 5.05 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.97 – 4.85 (m, 2H, N-CH₂ major), 2.54 (s, 3H, Me), 2.51 (s, 3H, Me), 1.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH₃ major). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) : δ 159.6 (C=O), 149.3 (C=O), 146.2 (C_{quat}), 145.7 (C_{quat}), 142.6 (C_{quat}), 140.5 (C_{quat}), 139.2 (C_{quat}), 131.3 (CH=CH), 129.6 (C₇), 127.2 (C₉), 124.2 (CH=CH), 123.7 (C_{quat}), 43.6 (N-CH₂ major), 39.2 (N-CH₂ minor), 21.0 (CH₃), 20.5 (CH₃), 17.9 (CH-CH₃ major), 13.6 (CH-CH₃ minor). HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₁₇N₄O₂ 297.1346 found 297.1346. Rf : 0.35 (DCM/MeOH 97/3).

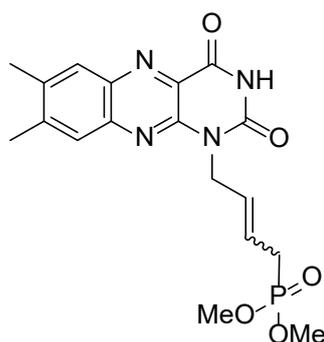
Dimethyl (4-(3-benzoyl-7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 198



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 82/18 from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 6. Yield : 48%, dark green oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H, H₇), 8.01 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.83 (s, 1H, H₉), 7.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.04 – 5.82 (m, 2H, CH=CH), 5.06 (dd, *J* = 7.3, 2.7 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 5.02 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.74 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe minor), 3.69 (s, 3H, OMe major), 3.66 (s, 3H, OMe major), 2.78 (dd, *J* = 22.2, 7.6 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.66 – 2.57 (m, 2H, P-CH₂ major), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.8 (C=O), 159.0 (C=O), 148.8 (C=O), 146.7 (C_{quat}), 145.0 (C_{quat}), 142.5 (C_{quat}), 140.9 (C_{quat}), 139.5 (C_{quat}), 135.4 (CH_{Ar}), 131.5 (C_{quat}), 130.8 (CH_{Ar}*2), 129.6 (CH_{Ar}*2), 129.4 (C₇), 128.4 (d, *J* = 14.54 Hz, CH=CH), 127.1 (C₉), 126.4 (C_{quat}), 125.2 (d, *J* = 10.79 Hz, CH=CH), 53.0 (OMe), 52.9 (OMe), 43.5 (N-CH₂ major), 39.1 (N-CH₂ minor), 30.3 (d, *J* = 140.4 Hz, P-CH₂ minor), 29.6 (d, *J* = 138.6 Hz, P-CH₂ major), 21.1 (CH₃), 20.5 (CH₃). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) 29.35 (P minor), 29.00 (P major). HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₂₅H₂₆N₄O₆P 509.1584 found 509.1577. Rf : 0.35 (Toluène/Acétone 7/3).

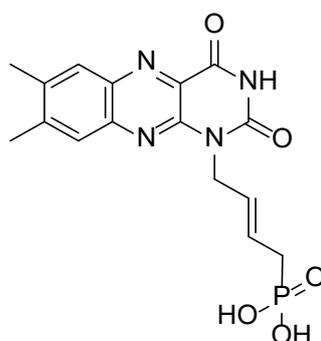
Dimethyl (4-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 184



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 84/16 from dimethyl (4-(3-benzoyl-7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 7. Yield : 65%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.38 (s, 1H, N₃H), 8.02 (s, 1H, H_{A7}), 7.78 (s, 1H, H_{A7}), 5.98 – 5.81 (m, 2H, CH=CH), 5.03 (dd, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.98 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.79 (s, 3H, OMe minor), 3.76 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe major), 3.68 (s, 3H, OMe major), 3.13 (dd, *J* = 22.8, 7.6 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.60 (dd, *J* = 21.8, 6.1 Hz, 2H, P-CH₂ major), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.49 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 159.7 (C=O), 149.4 (C=O), 146.2 (C_{quat}), 145.5 (C_{quat}), 142.4 (C_{quat}), 140.6 (C_{quat}), 139.2 (C_{quat}), 130.2 (C_{quat}), 129.5 (CH_{A7}), 128.8 (d, *J* = 14.7 Hz, CH=CH), 127.1 (CH_{A7}), 124.5 (d, *J* = 11.1 Hz, CH=CH), 53.0 (OMe), 52.9 (OMe), 43.3 (d, *J* = 2.4 Hz, N-CH₂), 29.6 (d, *J* = 140.1 Hz, P-CH₂), 21.0 (CH₃), 20.4 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 29.88 (P minor), 29.28 (P major). **Rf :** 0.29 (DCM/MeOH 97/3).

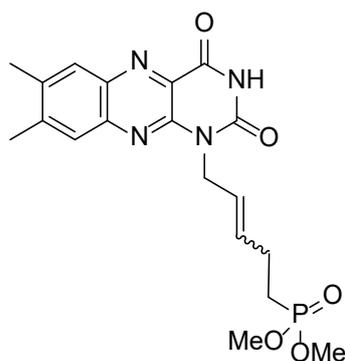
(E)-(4-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonic acid - 208



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (*E*)-(4-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 8. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 11.96 (s, 1H, N₃H), 7.89 (s, 1H, H₉), 7.76 (s, 1H, H₆), 5.72 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH=CH), 4.75 (s, 2H, N-CH₂), 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.36 (dd, *J* = 21.3, 4.2 Hz, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 160.1 (C=O), 150.1 (C=O), 146.1 (C_{quat}), 145.4 (C_{quat}), 141.4 (C_{quat}), 139.9 (C_{quat}), 138.1 (C_{quat}), 130.8 (C_{quat}), 128.9 (C₆), 127.8 (C₉), 127.5 (d, *J* = 14.7 Hz, CH=CH), 125.5 (d, *J* = 10.3 Hz, CH=CH), 42.8 (N-CH₂), 32.2 (d, *J* = 134.5 Hz, P-CH₂), 20.6 (CH₃), 20.1 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) :** δ 21.51. **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₆H₁₆N₄O₅P 375.0863 found 375.0862.

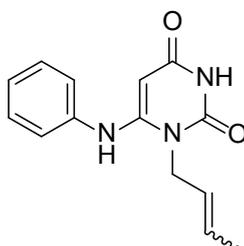
Dimethyl (5-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 185



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 87/13 from 3-benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)-7,8-dimethylbenzo[*g*]pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione following general procedure 6 & 7. Yield : 48%, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (bs, 1H, N₃H), 8.04 (s, 1H, H₇), 7.79 (s, 1H, H₉), 6.05 – 5.52 (m, 2H, CH=CH), 5.04 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.82 (s, 3H, OMe minor), 3.79 (s, 3H, OMe minor), 3.71 (s, 3H, OMe major), 3.68 (s, 3H, OMe major), 2.54 (s, 3H, CH₃), 2.50 (s, 3H, CH₃), 2.31 (ddt, *J* = 16.8, 12.2, 6.1 Hz, 2H, CH-CH₂), 1.91 – 1.70 (m, 2H, P-CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 159.7 (C=O), 149.4 (C=O), 146.2 (C_{quat}), 145.6 (C_{quat}), 142.5 (C_{quat}), 140.6 (C_{quat}), 139.3 (C_{quat}), 134.4 (d, *J* = 17.4 Hz, CH=CH), 129.6 (CH_{Ar}), 129.0 (C_{quat}), 127.1 (CH_{Ar}), 124.1 (CH=CH), 52.5 (OMe), 52.4 (OMe), 43.3 (N-CH₂), 25.2 (d, *J* = 4.5 Hz, CH-CH₂), 24.2 (d, *J* = 140.8 Hz, P-CH₂), 21.0 (CH₃), 20.5 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆)** 33.88 (P minor), 33.75 (P major). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₂₃N₄O₅P 418.1431 found 418.1433. **Rf** : 0.29 (DCM/MeOH 97/3).

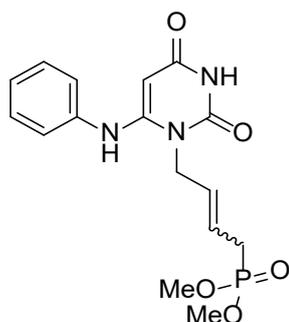
1-(but-2-en-1-yl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione - 171



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione following general procedure 3. Yield : 52%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.47 (s, 1H, N₃H), 8.26 (s, 1H, N₆H), 7.52 – 7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 7.26 – 6.91 (m, 2H, H_{Ar}), 5.75 – 5.20 (m, 2H, CH=CH), 4.81 (s, 1H, H₅), 4.28 (dd, *J* = 45.4, 6.1 Hz, 2H, N-CH₂), 1.65 (m, 3H, CH-CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 162.9 (C=O), 150.8 (C=O), 150.6 (C_{quat}), 137.9 (C_{quat}), 129.5 (CH_{Ar}), 127.6 (CH=CH), 126.8 (CH_{Ar}), 126.0 (CH=CH), 125.9 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 122.8 (CH_{Ar}), 75.8 (C₅), 40.4 (N-CH₂), 17.4 (CH-CH₃). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₆N₃O₂ 258.1237 found 258.1235. **Rf** : 0.32 (DCM/MeOH 97/3).

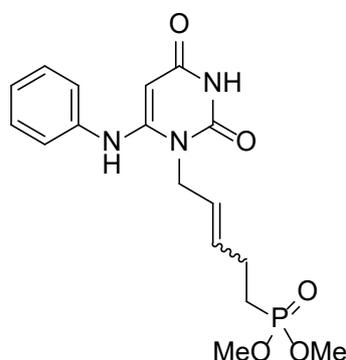
Dimethyl (4-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 186



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 80/20 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-(phenylamino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 33%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 10.01 (s, 1H, N₃H), 7.90 (s, 1H, N₆H), 7.30 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.20 – 7.13 (m, 1H, H_{Ar}), 7.13 – 7.08 (m, 2H, H_{Ar}), 5.98 – 5.51 (m, 2H, CH=CH), 5.10 (s, 1H, H₅), 4.57 – 4.49 (m, 2H, N-CH₂), 4.47 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, N-CH₂), 3.77 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H, OMe minor), 3.76 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H, OMe major), 2.99 (dd, *J* = 22.3, 7.8 Hz, 2H, P-CH₂ minor), 2.65 (dd, *J* = 21.7, 7.2 Hz, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 164.5 (C=O), 151.7 (C=O), 151.3 (C_{quat}), 137.2 (C_{quat}), 131.0 (d, *J* = 14.7 Hz, CH=CH), 129.6 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 125.6 (CH_{Ar}), 123.5 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Ar}), 121.0 (d, *J* = 11.2 Hz, CH=CH), 76.1 (C₅), 53.3 (d, *J* = 6.9 Hz, OMe major), 53.1 (d, *J* = 6.7 Hz, OMe minor), 41.3 (N-CH₂ major), 36.8 (N-CH₂ minor), 29.1 (d, *J* = 139.0 Hz, P-CH₂ major), 24.9 (d, *J* = 139.5 Hz, P-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 34.77 (P major), 34.71 (P minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₂₀N₃O₅P 366.1213 found 366.1208. **Rf :** 0.16 (DCM/MeOH 97/3).

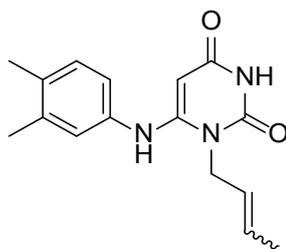
Dimethyl (5-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate -187



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 80/20 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-((3,4-dimethylphenyl)amino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 25%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.96 (s, 1H, N₃H), 7.90 (s, 1H, N₆H), 7.32 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.15 (dd, *J* = 16.1, 7.5 Hz, 3H, H_{Ar}), 5.87 – 5.42 (m, 2H, CH=CH), 5.14 (s, 1H, H₅), 4.48 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.41 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, N-CH₂ major), 3.75 – 3.69 (m, 6H, OMe minor & major), 2.61 – 2.44 (m, 2H, CH-CH₂ minor), 2.26 (td, *J* = 11.0, 6.0 Hz, 2H, CH-CH₂ major), 1.99 – 1.87 (m, 2H, P-CH₂ minor), 1.87 – 1.72 (m, 2H, P-CH₂ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 164.7 (C=O), 151.2 (C=O), 151.1 (C_{quat}), 137.0 (C_{quat}), 131.4 (d, *J* = 17.4 Hz, CH=CH major), 131.1 (d, *J* = 16.2 Hz, CH=CH minor), 129.6 (CH_{Ar}), 125.7 (d, *J* = 11.8 Hz, CH=CH), 125.7 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 123.5 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Ar}), 76.2 (C₅) 52.6 (d, *J* = 6.7 Hz, OMe minor & major), 41.1 (N-CH₂ major), 36.9 (N-CH₂ minor), 24.8 (d, *J* = 4.5 Hz, CH-CH₂ major), 24.4 (P-CH₂ major), 23.1 (P-CH₂ minor), 20.3 (d, *J* = 4.6 Hz, CH-CH₂ minor). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 34.77 (P major), 34.71 (P minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₂₃N₃O₅P 380.1369 found 380.1368. **Rf :** 0.16 (DCM/MeOH 97/3)

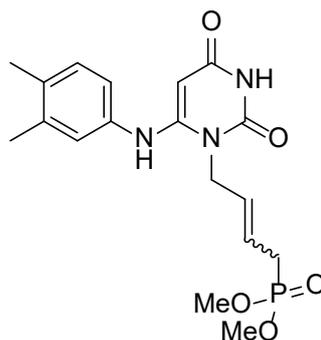
1-(but-2-en-1-yl)-6-((3,4-dimethylphenyl)amino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione - 172



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 85/15 from 6-((3,4-dimethylphenyl)amino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 3. Yield : 53%, white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10.37 (s, 1H, N₃H), 8.05 (s, 1H, N₆H), 7.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{6'}), 6.99 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{2''}), 6.92 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, H_{5''}), 5.81 – 5.18 (m, 2H, CH=CH), 4.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, N-CH₂ minor), 4.22 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, N-CH₂ major), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.68 (d, *J* = 1.6 Hz, 3H, CH-CH₃ minor), 1.64 – 1.53 (m, 3H, CH-CH₃ major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 162.7 (C=O), 151.1 (C=O), 150.6 (C_{quat}), 137.4 (C_{quat}), 135.2 (C_{quat}), 133.1 (C_{quat}), 130.3 (C_{6''}), 127.4 (CH=CH), 126.7 (CH_{Ar}), 126.0 (CH=CH), 125.9 (CH_{Ar}), 124.3 (C_{2''}), 120.6 (C_{5''}), 75.2 (C₅), 40.3 (N-CH₂ major), 36.0 (N-CH₂ minor), 19.4 (CH₃), 18.8 (CH₃), 17.4 (CH-CH₃ major), 12.9 (CH-CH₃ minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₂₀N₃O₂ 286.1550 found 286.1550. **Rf :** 0.32 (DCM/MeOH 97/3).

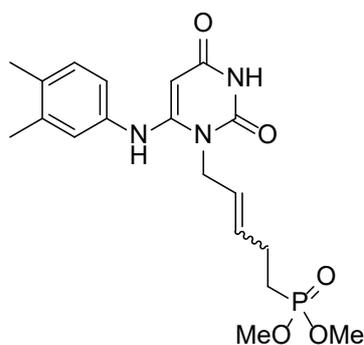
Dimethyl (4-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate - 188



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 80/20 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-((3,4-dimethylphenyl)amino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 48%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 9.96 (s, 1H, N₃H), 7.68 (s, 1H, N₆H), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.84 – 5.46 (m, 2H), 5.02 (s, 1H), 4.48 (dd, *J* = 7.6, 3.1 Hz, 1H), 4.44 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.73 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 10.9 Hz, 5H), 2.94 (dd, *J* = 22.2, 7.8 Hz, 0H), 2.60 (dd, *J* = 22.9, 8.4 Hz, 1H), 2.19 (d, *J* = 10.6 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 162.7 (C=O), 151.1 (C=O), 150.6 (C_{quat}), 137.4 (C_{quat}), 135.2 (C_{quat}), 133.1 (C_{quat}), 130.3 (C_{6''}), 127.4 (CH=CH), 126.0 (CH=CH), 124.3 (C_{2''}), 120.6 (C_{5''}), 75.2 (C₅), 40.3 (N-CH₂), 19.4 (CH₃), 18.8 (CH₃), 17.4 (CH-CH₃). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₂₅N₃O₅P 394.1526 found 394.1525. **Rf :** 0.16 (DCM/MeOH 97/3).

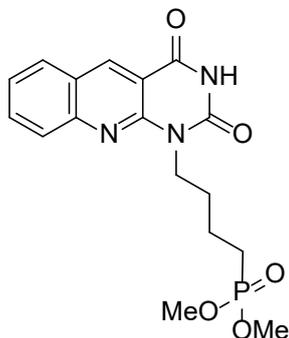
Dimethyl (5-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 189



Procedure : The title compound was obtained as an inseparable mixture of *E/Z* isomers in the proportion of 80/20 from 1-(but-2-en-1-yl)-6-((3,4-dimethylphenyl)amino)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione following general procedure 4. Yield : 25%, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.91 (s, 1H, N₃H), 7.67 (s, 1H, N₆H), 7.07 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{6'}), 6.93 (s, 1H, H_{2''}), 6.86 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H_{5''}), 5.82 – 5.40 (m, 2H, CH=CH), 5.08 (s, 1H, H₅), 4.50 – 4.45 (m, 2H, N-CH₂ minor), 4.43 – 4.40 (m, 2H, N-CH₂ major), 3.75 – 3.73 (m, 6H, OMe minor), 3.73 - 3.71 (m, 6H, OMe major), 2.42 – 2.12 (m, 8H, CH-CH₂ minor & major, Me), 1.87 – 1.79 (m, 2H, P-CH₂ minor & major). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 164.7 (C=O), 151.7 (C=O), 151.3 (C_{quat}), 138.1 (C_{quat}), 134.6 (C_{quat}), 134.5 (C_{quat}), 131.5 (d, *J* = 17.4 Hz, CH=CH), 130.7 (C_{6''}), 125.7 (CH=CH), 125.2 (C_{2''}), 121.4 (C_{5''}), 76.1 (C₅), 52.8 (OMe), 52.7 (OMe), 41.2 (N-CH₂ major), 37.0 (N-CH₂ minor), 24.9 (d, *J* = 4.3 Hz, CH-CH₂), 24.6 (P-CH₂ minor), 23.2 (P-CH₂ major), 19.9 (CH₃), 19.4 (CH₃). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 34.77 (P major), 34.71 (P minor). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₂₇N₃O₅P 408.1682 found 408.1682. **Rf :** 0.16 (DCM/MeOH 97/3).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)butyl)phosphonate - 216



Procedure A :

Step 1: Regioselective alkylation

To a suspension of pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione (0.5 g, 2.35 mmol, 1 eq) in DMF_{anh} (2.35 mL) was added BSA (1.27 mL, 5.16 mmol, 2.2 eq) and a spatula of 4 Å molecular sieves. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 5 minutes at room temperature until a clear solution was observed. To this resulting solution was added TBAI (catalytic) and 1,4-dibromobutane (0.84 mL, 7.04 mmol, 3 eq) and the resulting mixture was heated at 130°C overnight. The volatiles were then removed in vacuum, and the obtained brown oil was dissolved in 20 mL of solution of saturated NaHCO₃ and 20 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 10 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with H₂O (10 mL), Na₂S₂O₃ solution (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 100% to 97:3) to afford desired compound which was used without further purification.

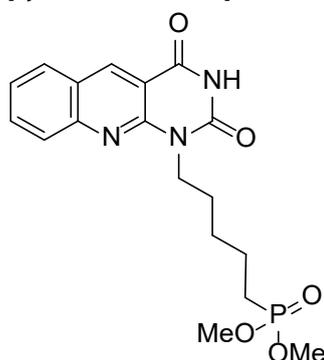
Step 2 : Arbuzov reaction

A mixture of 1-(4-bromobutyl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione (75 mg, 2.1612 mmol) and P(OMe)₃ (1.02 mL, 8.65 mmol) was stirred under an argon atmosphere for 4 h at 140°C. The reaction was concentrated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100% to 95:5) giving the desired compound as a yellow solid (47 mg, 18% over 2 steps).

Procedure B : The title compound was obtained from dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.00 (s, 1H, H_{Ar}), 7.95 (dd, *J* = 16.9, 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.57 – 4.41 (m, 2H, N-CH₂), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.70 (s, 3H, OMe), 1.90 (m, 4H, CH₂), 1.82 – 1.68 (m, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 161.5 (C=O), 151.4 (C=O), 150.0 (C_{quat}), 148.1 (C_{quat}), 140.3 (CH_{Ar}), 133.3 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{quat}), 111.0 (C_{quat}), 52.5 (OMe), 52.4 (OMe), 41.9 (N-CH₂), 28.7 (d, *J* = 16.9 Hz, CH₂), 24.6 (d, *J* = 141.1 Hz, CH₂), 19.9 (d, *J* = 5.0 Hz, CH₂). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** δ 34.50. **Rf :** 0.34 (DCM/MeOH 96/4).

Dimethyl (4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)pentyl)phosphonate - 217



Procedure A :

Step 1: Regioselective alkylation

To a suspension of pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione (0.5 g, 2.35 mmol, 1 eq) in DMF_{anh} (2.35 mL) was added BSA (1.27 mL, 5.16 mmol, 2.2 eq) and a spatula of 4 Å molecular sieves. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 5 minutes at room temperature until a clear solution was observed. To this resulting solution was added TBAI (catalytic) and 1,5-dibromopentane (0.96 mL, 7.04 mmol, 3 eq) and the resulting mixture was heated at 130°C overnight. The volatiles were then removed in vacuum, and the obtained brown oil was dissolved in 20 mL of solution of saturated NaHCO₃ and 20 mL of EtOAc. The aqueous layer was extracted 3 times with 10 mL of EtOAc, and the organic layer was washed with H₂O (10 mL), Na₂S₂O₃ solution (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (pure DCM to DCM/MeOH 97:3) to afford desired compound which was used without further purification.

Step 2: Arbuzov reaction

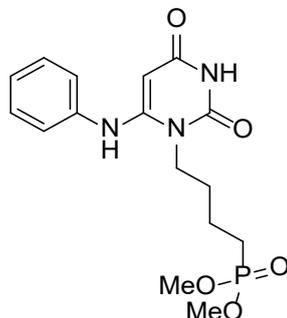
A mixture of 1-(4-bromopentyl)pyrimido[4,5-b]quinoline-2,4(1H,3H)-dione (75 mg, 2.08 mmol) and P(OMe)₃ (0.98 mL, 8.31 mmol) was stirred under an argon atmosphere for 4 h at 140°C. The reaction was concentrated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100% to 95:5) giving the desired compound as a yellow solid (52 mg, 19% over 2 steps).

Procedure B : The title compound was obtained from dimethyl (E)-(5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimido[4,5-b]quinolin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.01 (s, 1H, H_{Ar}), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.82 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.51 – 4.42 (m, 2H, N-CH₂), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.71 (s, 3H, OMe), 1.77 (m, 6H, CH₂), 1.54 (m, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 161.6 (C=O), 151.4 (C=O), 150.1 (C_{quat}), 148.1 (C_{quat}), 140.2

(CH_{Ar}), 133.2 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{quat}), 111.0 (C_{quat}), 52.4 (OMe), 52.4 (OMe), 42.4 (N-CH₂), 27.8 (d, *J* = 17.0 Hz, CH₂), 27.2 (CH₂), 24.7 (d, *J* = 140.6 Hz, CH₂), 22.2 (d, *J* = 5.2 Hz, CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 34.87. Rf : 0.37 (DCM/MeOH 96/4).

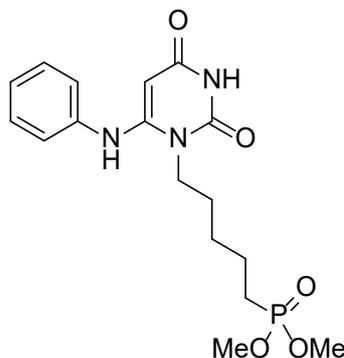
Dimethyl (4-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)butyl)phosphonate – 220



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (4-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.93 (bs, 1H, NH), 7.26 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.14 (s, 1H, H₅), 3.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.66 (s, 3H, OMe), 1.82 (dt, *J* = 17.7, 7.4 Hz, 2H, P-CH₂), 1.72 (dt, *J* = 13.1, 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.62 (dq, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) : δ 165.7 (C=O), 154.2 (C=O), 138.4 (C_{quat}), 129.4 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 123.1 (CH_{Ar}), 76.4 (C₅), 52.6 (OMe), 52.6 (OMe), 38.8 (N-CH₂), 28.4 (d, *J* = 14.2 Hz, CH₂), 23.4 (d, *J* = 140.4 Hz, P-CH₂), 19.5 (d, *J* = 5.2 Hz, CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) : δ 35.36. HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₂₃N₃O₅P 368.1369 found 368.1370. Rf : 0.30 (DCM/MeOH 97/3)

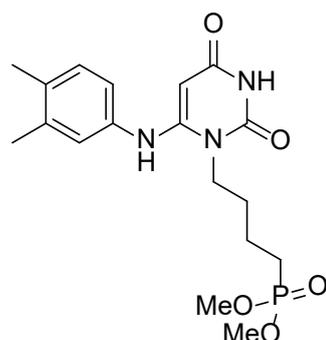
Dimethyl (5-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pentyl)phosphonate – 221



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (5-(2,4-dioxo-6-(phenylamino)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 9.98 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, NH), 7.33 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.16 (t, *J* = 9.1 Hz, 3H, H_{Ar}), 5.14 (s, 1H, H₅), 3.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, N-CH₂), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.71 (s, 3H, OMe), 1.78 (dt, *J* = 17.2, 8.2 Hz, 2H, P-CH₂), 1.63 (bs, 4H, CH₂), 1.42 (p, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) : δ 165.0 (C=O), 151.6 (C=O), 151.1 (C_{quat}), 137.3 (C_{quat}), 129.7 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Ar}), 76.5 (C₅), 52.8 (OMe), 52.7 (OMe), 39.8 (N-CH₂), 27.9 (d, *J* = 17.2 Hz, CH₂), 27.6 (CH₂), 24.3 (d, *J* = 139.4 Hz, P-CH₂), 22.0 (d, *J* = 4.9 Hz, CH₂). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) : δ 35.68. HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₂₅N₃O₅P 382.1526 found 382.1525. Rf : 0.32 (DCM/MeOH 97/3)

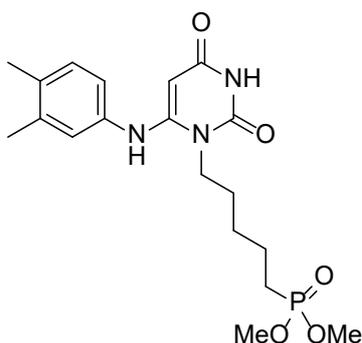
Dimethyl (4-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)butyl)phosphonate - 222



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (4-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)but-2-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.29 (bs, 1H, NH), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.87 (s, 1H, H_{Ar}), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.07 (s, 1H, H₅), 3.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, N-CH₂), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.20 (s, 3H, Me), 2.16 (s, 3H, Me), 1.82 (dt, *J* = 17.9, 7.6 Hz, 2H, P-CH₂), 1.72 (dt, *J* = 13.2, 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.62 (tt, *J* = 14.0, 7.1 Hz, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 165.0 (C=O), 153.5 (C=O), 152.9 (C_{quat}), 137.7 (C_{quat}), 135.1 (C_{quat}), 133.7 (C_{quat}), 130.3 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 76.0 (C₅), 52.5 (OMe), 52.4 (OMe), 38.8 (N-CH₂), 28.5 (d, *J* = 15.0 Hz, CH₂), 23.5 (d, *J* = 140.0 Hz, P-CH₂), 19.8 (Me), 19.4 (d, *J* = 5.0 Hz, CH₂), 19.2 (Me). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 35.31. **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₈H₂₇N₃O₅P 396.1682 found 396.1684. **Rf :** 0.33 (DCM/MeOH 97/3)

Dimethyl (5-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pentyl)phosphonate - 223



Procedure : The title compound was obtained from dimethyl (5-(6-((3,4-dimethylphenyl)amino)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 9. Yield : qtf, grey solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.36 (bs, 1H, NH), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82 (s, 2H, H_{Ar}), 5.10 (s, 1H, C₅), 3.85 (m, 2H, N-CH₂), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.65 (s, 3H, OMe), 2.18 (s, 3H, Me), 2.14 (s, 3H, Me), 1.80 – 1.55 (m, 6H, CH₂), 1.48 – 1.34 (m, 2H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 165.6 (C=O), 160.0 (C=O), 154.3 (C_{quat}), 137.7 (C_{quat}), 135.8 (C_{quat}), 133.3 (C_{quat}), 130.4 (CH_{Ar}), 124.7 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 76.4 (C₅), 52.5 (OMe), 52.5 (OMe), 39.3 (N-CH₂), 27.3 (CH₂), 27.1 (d, *J* = 14.1 Hz, CH₂), 23.0 (CH₂), 21.5 (CH₂), 19.9 (Me), 19.3 (Me). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 35.39. **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₉H₂₉N₃O₅P 410.1839 found 410.1840. **Rf :** 0.34 (DCM/MeOH 97/3)

PARTIE D :
INSERTION DU MOTIF PCF₂ SUR DIVERS ANPs

I. Introduction

Une des problématiques majeures des nucléosides en tant que chimiothérapie efficace est l'étape limitante de première phosphorylation permettant l'effet terminateur de chaîne lié à l'incorporation de ces composés dans le génome viral après l'action de kinases (NDP et NTP kinases). Ainsi, leur forme monophosphate ne sont pas administrables du fait de leur instabilité chimique et métabolique en milieu physiologique. Afin d'empêcher la dégradation enzymatique de ces dérivés, le phosphate a été remplacé par un groupement phosphonate avec les travaux pionniers initiés dès 1986 par les groupes des Pr. Antonin Holý et Pr. Erik De Clercq.¹⁴⁹ Trois ANPs sont actuellement utilisés pour le traitement clinique de certaines infections virales (Figure 102) :

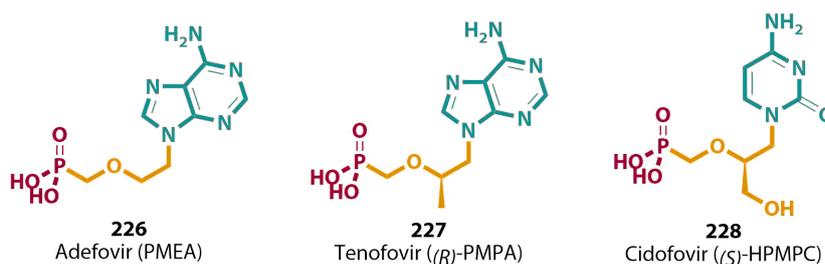


Figure 102 : Structures de 3 ANPs cliniques majeurs.

1 - L'adéfovir (**226**, PMEa) possède un pont éther liée à un noyau adénine. Cette molécule achirale sous sa forme prodrogue dipivoxyde (Hepsera[®]) est préconisée pour le traitement d'une multitude de virus à ADN (Herpes, Epstein-Barr, HBV) mais aussi de virus à ARN tel que le VIH depuis son approbation par la FDA en 2002.¹⁵⁰

2 – Le ténofovir (**227**, PMPA) diffère de son homologue PMEa par l'addition d'un groupement méthyle en position 2' qui est responsable de la chiralité de ce composé. Sous forme commercialisée (Viread[®]), l'ajout de 2 groupements biolabiles *iso*-propyle oxyméthyle carbonate (POC) est réalisé et ce traitement est utilisé pour des infections à des virus à ARN tel que le VIH, le VIS et le VIF mais aussi dans le cas de certains Herpes.¹⁵¹

3 – Le cidofovir (**228**, HPMPC), quant à lui, présente deux différences majeures par rapport à ces deux derniers homologues. Ainsi, il présente une cytosine comme nucléobase à la place de l'adénine et un groupement hydroxyméthyl. Commercialisé sous le nom de Vistide[®], il est employé pour des infections sur un grand nombre de virus à ADN (papova-, adeno-, herpes-, poxvirus, ainsi que sur les virus d'Epstein

¹⁴⁹ a) Clercq, E. D.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. A Novel Selective Broad-Spectrum Anti-DNA Virus Agent. *Nature* **1986**, *323*, 464–467. b) Holý, A. Antiviral Acyclic Nucleoside Phosphonates Structure Activity Studies. *Antivir Res* **2006**, *71*, 248–253.

¹⁵⁰ a) Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; Baba, M.; Johns, D. G.; Clercq, E. D. Marked in Vivo Antiretrovirus Activity of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine, a Selective Anti-Human Immunodeficiency Virus Agent. *PNAS* **1989**, *86*, 332–336. b) Yokota, T.; Konno, K.; Chonan, E.; Mochizuki, S.; Kojima, K.; Shigeta, S.; Clercq, E. de. Comparative Activities of Several Nucleoside Analogs against Duck Hepatitis B Virus in Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**, *34*, 1326–1330. c) Yokota, T.; Mochizuki, S.; Konno, K.; Mori, S.; Shigeta, S.; Clercq, E. D. Inhibitory Effects of Selected Antiviral Compounds on Human Hepatitis B Virus DNA Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, *35*, 394–397.

¹⁵¹ Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; Clercq, E. D. Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus Effects of the (S) and (R) Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates: Potent and Selective in Vitro and in Vivo Antiretrovirus Activities of (R)-9-(2-Phosphonomethoxypropyl)-2,6-Diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**, *37*, 332–338.

Barr).¹⁵² Etant donné l'apparition de résistance virale et de BMRs, la recherche de nouvelle chimiothérapie nucléotidique inclut l'exploration de nouvelles structures d'ANPs par différentes modulations. Pour ce faire, la littérature fait état de nombreuses modifications structurelles conduisant à de nouveaux inhibiteurs d'enzymes virales et bactériennes et de nouvelles générations d'ANPs avec l'introduction de l'atome de fluor dans ces composés.¹⁵³

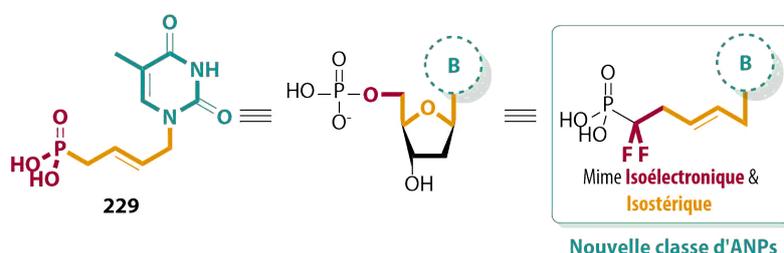


Figure 103 : Mime de NMPs par l'introduction du motif PCF₂.

Avec les travaux récents de notre équipe démontrant le potentiel biologique de l'introduction entre le groupement phosphonate et diverses nucléobases de la chaîne latérale (*E*)-but-2'-ényle avec des activités antivirales contre les virus à ADN/ARN en concentrations submicromolaires¹⁵⁴ et les propriétés physico-chimiques intéressantes du fluor tel que sa forte électronégativité, son caractère bioisostérique à l'hydrogène et son comportement d'accepteur de liaison hydrogène, notre attention se porte alors sur l'introduction d'un fragment *gem*-difluorométhylphosphonate pour sa qualité de mime isopolaire et isostérique de la fonction phosphate (Figure 103).¹⁵⁵

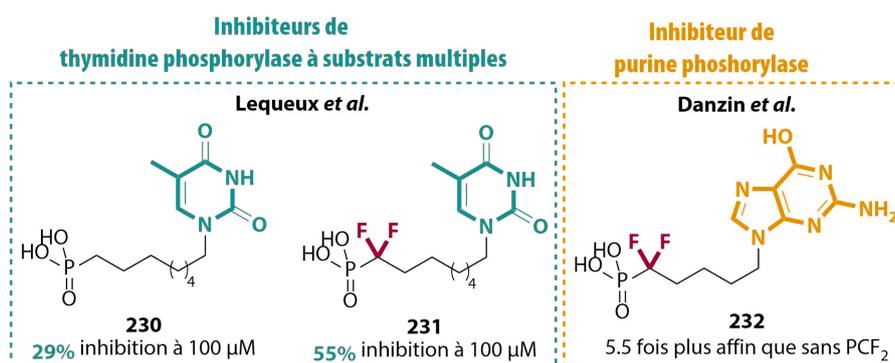


Figure 104 : Molécules bioactives liés au groupement PCF₂.

L'insertion de ce motif a mené à des analogues nucléotidiques tels que la 9-(5,5-difluoro-5-phosphonopentyl)-guanine **232** en tant qu'inhibiteur de purine phosphorylase, responsable du recyclage des purines et ainsi, une cible biochimique intéressante dans le cas de maladies parasitiques

¹⁵² a) De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral Activity of Phosphonylmethoxyalkyl Derivatives of Purine and Pyrimidines. *Antivir Res* **1987**, *8*, 261–272. b) Clercq, E. D. Therapeutic Potential of HPMPC as an Antiviral Drug. *Reviews in Medical Virology* **1993**, *3*, 85–96. c) De Clercq Erik. The Discovery of Antiviral Agents: Ten Different Compounds, Ten Different Stories. *Med Res Rev* **2008**, *28*, 929–953.

¹⁵³ a) Pertusat, F.; Serpi, M.; McGuigan, C. Medicinal Chemistry of Nucleoside Phosphonate Prodrugs for Antiviral Therapy. *Antivir Chem Chemother* **2012**, *22*, 181–203. b) Baszczyński Ondřej; Janeba Zlatko. Medicinal Chemistry of Fluorinated Cyclic and Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Med Res Rev* **2013**, *33*, 1304–1344.

¹⁵⁴ Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; et al. Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232.

¹⁵⁵ Romanenko, V. D.; Kukhar, V. P. Fluorinated Phosphonates: Synthesis and Biomedical Application. *Chem Rev* **2006**, *106*, 3868–3935.

et en tant qu'agent immunosuppresseur.¹⁵⁶ Aussi, Lequeux *et al.* ont montré le potentiel biologique de ce motif dans le cas d'inhibiteurs de thymidine phosphorylase en tant qu'agent anti-néoplasique par l'inhibition de l'angiogénèse et la promotion de l'apoptose des cellules cancéreuses. Ainsi, l'analogue difluorophosphonate **231** a montré une inhibition de 55% à 100 µM sur cette enzyme par rapport à son homologue phosphonate classique **230** (29% à 100 µM) (Figure 104).¹⁵⁷ Etant donné le potentiel inexploré de ce motif et dans le but de synthétiser une nouvelle série d'ANPs par pharmacomodulation, nous avons alors entrepris d'introduire ce motif sur notre chaîne latérale (*E*)-pent-2'-ényle avec différentes nucléobases.

¹⁵⁶ Halazy, S.; Ehrhard, A.; Danzin, C. 9-(Difluorophosphonoalkyl)Guanines as a New Class of Multisubstrate Analog Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 315–317.

¹⁵⁷ Diab, S. A.; De Schutter, C.; Muzard, M.; Plantier-Royon, R.; Pfund, E.; Lequeux, T. Fluorophosphonylated Nucleoside Derivatives as New Series of Thymidine Phosphorylase Multisubstrate Inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 2758–2768.

II. Synthèse de nouveaux ANPs visant l'inhibition de la FDTS

1 Contexte

En 2011, Herdewijn *et al.* a décrit la synthèse d'analogues nucléotidiques basés sur la charpente 2'-désoxyuridine monophosphate dont la position 5 a été fonctionnalisée par divers groupements (Figure 105) :¹⁵⁸

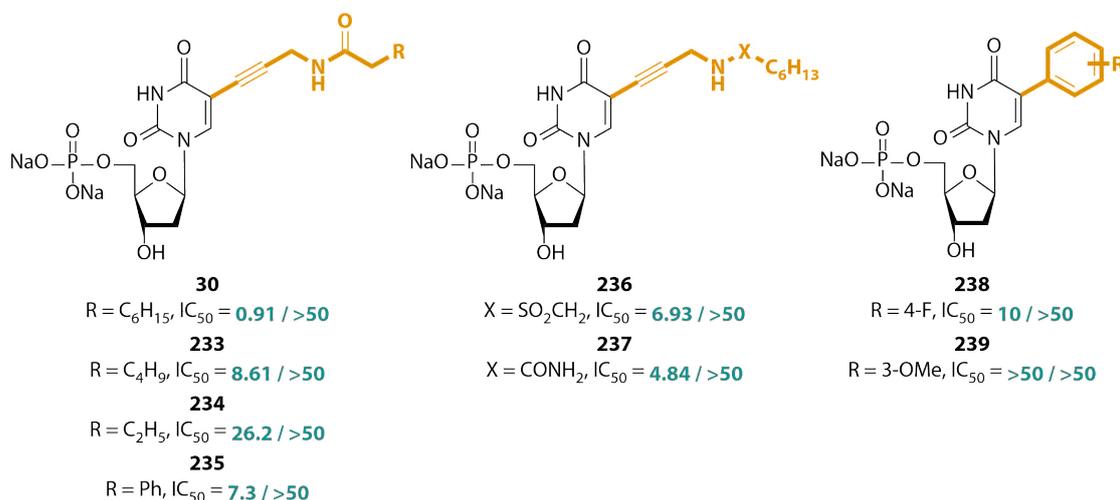


Figure 105 : Inhibiteurs majeurs de la FDTS accompagnés par leurs IC₅₀ (μM) sur la FDTS et la TSase.

Ces structures présentent la particularité de cibler sélectivement la FDTS par rapport à la TSase par l'introduction sur la position 5 du noyau uracile de chaînes longues lipophiles ou de groupement aryles. L'inhibiteur **30** est le composé présentant l'IC₅₀ la plus intéressante avec une valeur inférieure à 1 μM (IC₅₀ = 0.91 μM) et ainsi, une sélectivité se révélant la plus élevée entre les deux enzymes avec une IC₅₀ sur la TSase humaine supérieure à 50 μM. Ce dernier est fonctionnalisé par une chaîne latérale de type octynamide propargylique dont les interactions dans le site actif de la FDTS ont été étudiées par la même équipe, ce qui a permis de révéler par étude RMN et par modélisation moléculaire une interaction forte de la fonction amide avec l'acide aminé Lys165 et des interactions lipophiles avec cette longue chaîne aliphatique. Dans ce contexte, afin de pallier à la faible stabilité des analogues nucléotidiques *in-vivo*, nous transposons ces noyaux uraciles fonctionnalisés sur le C₅ sur notre linker à 5 chaînons portant le motif d'intérêt PCF₂ afin d'en évaluer le potentiel biologique.

2 Rétrosynthèse envisagée

Le greffage d'un motif *gem*-difluorométhylphosphonate sur un composé d'intérêt relève d'un challenge synthétique par la réactivité particulière de ce dernier. Cependant, cinq grandes méthodologies sont décrites dans la littérature afin de permettre l'accès à ce motif sur une grande variété de substrat (Figure 106) :

¹⁵⁸ Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrier, E.; *et al.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 2'-Deoxyuridine Monophosphate Analogues As Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in Mycobacterium Tuberculosis. *J Med Chem* **2011**, *54*, 4847–4862.

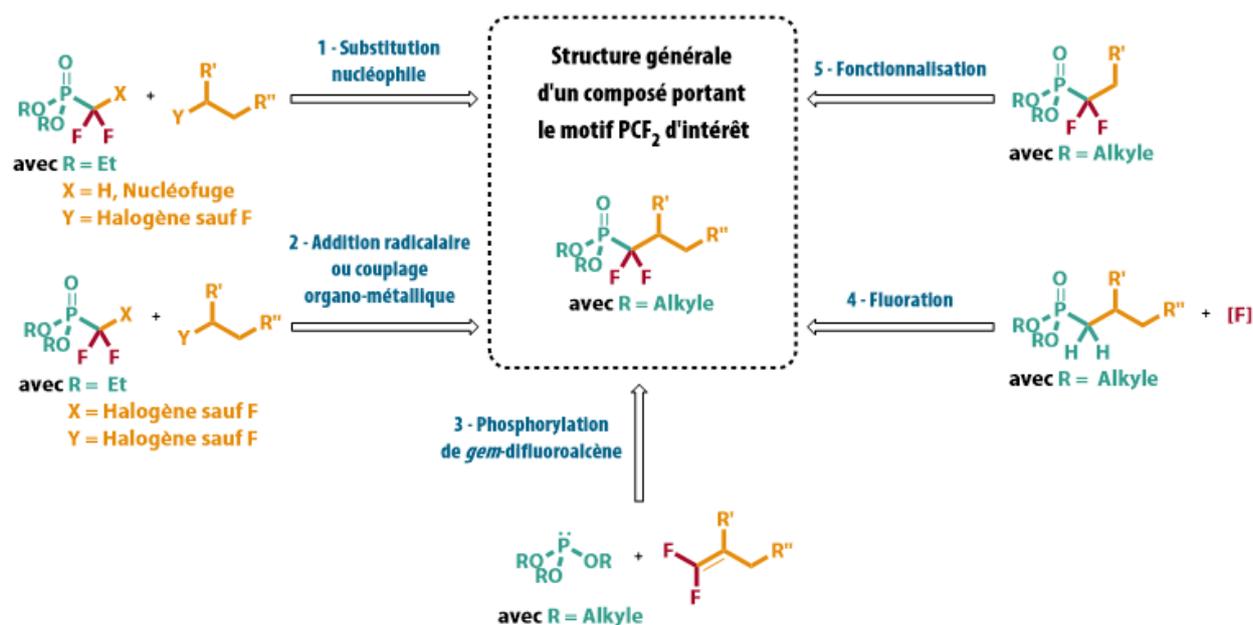


Figure 106 : Panel de méthodes décrites dans la littérature résultant en l'incorporation de ce motif.

1 – Par addition nucléophile après la formation intermédiaire de carbanion en α du phosphore.^{157,159} L'ylure de phosphore, ainsi formé, permet l'accès à une large gamme de fonctionnalisations via l'utilisation d'électrophiles de diverses natures.

2 - Par addition radicalaire¹⁶⁰ et couplage organométallique lié à la présence d'halogène plus réactif que le fluor.¹⁶¹ La formation du radical phosphonodifluorométhyle à partir d'un précurseur halogéné, sulfanyl ou sélanyl permet l'addition de divers dérivés halogénés et le couplage de cet intermédiaire avec des partenaires insaturés, résultants en la fonctionnalisation de ce motif d'intérêt.

¹⁵⁹ Burton, D. J.; Yang, Z.-Y.; Qiu, W. Fluorinated Ylides and Related Compounds. *Chem Rev* **1996**, *96*, 1641–1716.

¹⁶⁰ a) Li, A.-R.; Chen, Q.-Y. Diethyl Iododifluoromethylphosphonate: A New Synthetic Method and Its Reaction with Alkynes. *Synthesis* **1996**, *5*, 606–608. b) Lequeux, T.; Lebouc, F.; Lopin, C.; Yang, H.; Gouhier, G.; Pietre, S. R. Sulfanyl- and Selanyldifluoromethylphosphonates as a Source of Phosphonodifluoromethyl Radicals and Their Addition onto Alkenes. *Org Lett* **2001**, *3*, 185–188. c) Sha, W.; Zhang, W.; Ni, S.; Mei, H.; Han, J.; Pan, Y. Photoredox-Catalyzed Cascade Difluoroalkylation and Intramolecular Cyclization for Construction of Fluorinated γ -Butyrolactones. *J Org Chem* **2017**, *82*, 9824–9831. d) Huang, W.; Chen, J.; Hong, D.; Chen, W.; Cheng, X.; Tian, Y.; Li, G. Hydrophosphonodifluoromethylation of Alkenes via Thiyl-Radical/Photoredox Catalysis. *J Org Chem* **2018**, *83*, 578–587. e) Huang, H.; Yu, M.; Su, X.; Guo, P.; Zhao, J.; Zhou, J.; Li, Y. Sustainable Radical Cascades to Synthesize Difluoroalkylated Pyrrolo[1,2-a]Indoles. *J Org Chem* **2018**, *83*, 2425–2437. f) Yin, Z.-B.; Ye, J.-H.; Zhou, W.-J.; Zhang, Y.-H.; Ding, L.; Gui, Y.-Y.; Yan, S.-S.; Li, J.; Yu, D.-G. Oxy-Difluoroalkylation of Allylamines with CO₂ via Visible-Light Photoredox Catalysis. *Org Lett* **2018**, *20*, 190–193.

¹⁶¹ a) Yang, Z.-Y.; Burton, D. J. A Novel, General Method for the Preparation of α,α -difluoro Functionalized Phosphonates. *Tet Lett* **1991**, *32*, 1019–1022. b) Yokomatsu, T.; Suemune, K.; Murano, T.; Shibuya, S. Synthesis of (α,α -Difluoroallyl)Phosphonates from Alkenyl Halides or Acetylenes. *J Org Chem* **1996**, *61*, 7207–7211. c) Waschbüsch, R.; Samadi, M.; Savignac, P. A Useful Magnesium Reagent for the Preparation of 1,1-Difluoro-2-Hydroxyphosphonates from Diethyl Bromodifluoromethylphosphonate via a Metal–halogen Exchange Reaction. *J Organomet Chem* **1997**, *529*, 267–278. d) Feng, Z.; Xiao, Y.-L.; Zhang, X. Palladium-Catalyzed Phosphonyldifluoromethylation of Alkenes with Bromodifluoromethylphosphonate. *Org Chem Front* **2016**, *3*, 466–469. e) Budinská, A.; Václavík, J.; Matoušek, V.; Beier, P. Nucleophilic Tetrafluoroethylation Employing in Situ Formed Organomagnesium Reagents. *Org Lett* **2016**, *18*, 5844–5847.

3 – Par phosphorylation de *gem*-difluoroalcènes.¹⁶² Ces 1,1-difluoroalcènes sont obtenus par divers protocoles dont les méthodes d'oléfination classiques (Wittig, Elimination, ect) ce qui induit un accès à ces intermédiaires avec un nombre réduit d'étapes et une efficacité modérée.

4 – Par fluoration en α d'un précurseur phosphonate.¹⁶³ L'accès au précurseur est très simple par la chimie classique du phosphore, cependant l'étape de fluoration par des agents donneur de F^+ montre de manière générale de faible rendement.

5 – Par fonctionnalisation postérieure à l'introduction de ce motif.

3 Résultats et discussion

➤ Notre travail

Etant donné l'expérience de notre équipe dans la préparation d'ANPs par métathèse croisée des oléfines et l'aspect novateur que présente cette étape clé avec un substrat fluoré, car essentiellement décrite dans le cas de métathèse cyclisante,¹⁶⁴ notre retrosynthèse se concentre alors sur cette étape clé entre le *gem*-difluorophosphonate allylique **242** et la base hétérocyclique crotylée **241** (Figure 107).

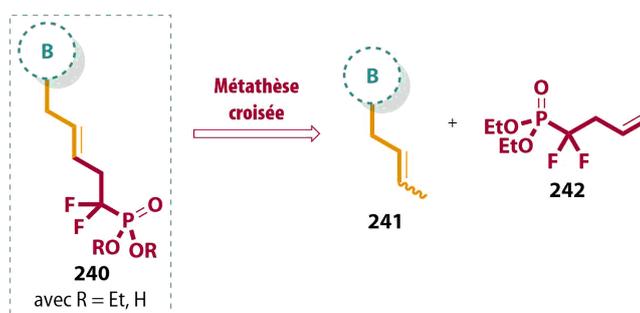


Figure 107 : Rétrosynthèse de la première approche.

➤ Première approche

¹⁶² a) Bissey, J. E.; Goldwhite, H.; Rowsell, D. G. Reactions of 2,3-Dichlorotetrafluoropropene with Nucleophiles Containing Phosphorus. *J Org Chem* **1967**, *32*, 1542–1546. b) Piettre, S. R. Simple and Efficient Synthesis of 2,2-Disubstituted-1,1-Difluorophosphonates and Phosphonothioates. *Tet Lett* **1996**, *37*, 2233–2236. c) Nair, H. K.; Burton, D. J. Facile Synthesis of Fluorinated Phosphonates via Photochemical and Thermal Reactions. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 9137–9143.

¹⁶³ a) Hum, G.; Lee, J.; Taylor, S. D. Synthesis of [Difluoro-(3-Alkenylphenyl)-Methyl]-Phosphonic Acids on Non-Crosslinked Polystyrene and Their Evaluation as Inhibitors of PTP1B. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 3471–3474. b) Marma, M. S.; Khawli, L. A.; Harutunian, V.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E. Synthesis of α -Fluorinated Phosphonoacetate Derivatives Using Electrophilic Fluorine Reagents: Perchloryl Fluoride versus 1-Chloromethyl-4-Fluoro-1,4-Diazoniabicyclo[2.2.2]Octane Bis(Tetrafluoroborate) (Selectfluor®). *J Fluorine Chem* **2005**, *126*, 1467–1475. c) Vints, I.; Gatenyo, J.; Rozen, S. Mono and Difluorination of Centers α to Sulfonates and Phosphonates Using AcOF. *J Fluorine Chem* **2013**, *146*, 66–69.

¹⁶⁴ a) Fustero, S.; Simón-Fuentes, A.; Barrio, P.; Haufe, G. Olefin Metathesis Reactions with Fluorinated Substrates, Catalysts, and Solvents. *Chem Rev* **2015**, *115*, 871–930. b) Guérin, D.; Dez, I.; Gaumont, A.-C.; Pannecoucke, X.; Couve-Bonnaire, S. Access to Constrained Fluoropseudopeptides via Ring-Closing Metathesis of Fluoroalkenes. *Org Lett* **2016**, *18*, 3606–3609. d) Li, Y.; Li, K.; Wu, Y.; Ma, Q.; Lei, X. Facile Synthesis of Fluorovinyl-Containing Lactams via Ring-Closing Metathesis of N-Substituted 2-Fluoroallylamides. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 4845–4853.

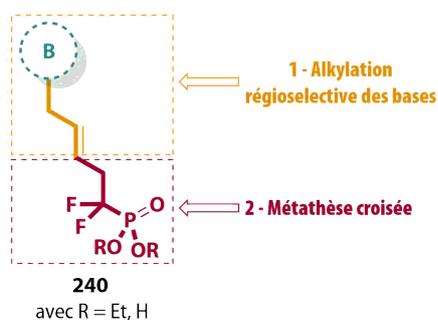


Figure 108 : Première stratégie de synthèse de **240**.

Dans cette synthèse, l'objectif est d'accéder aux produits **240** en version acide phosphonique, nous nous intéresserons ainsi, à l'alkylation régiosélective de l'uracile choisie comme preuve de concept pour une généralisation consécutive avec diverses nucléobases. Avec ces intermédiaires en main, une étape clé de métathèse croisée est alors envisagée suivie d'une étape de déprotection finale des phosphonates.

- Préparation du synthon

Concernant la synthèse des intermédiaires alkylés de l'uracile, cette dernière débute par une réaction de mono-benzoylation régiosélective de l'azote N_3 résultant de la *per*-protection de ces noyaux pyrimidiques suivi par une étape de déprotection régiosélective. Le dérivé résultant est ensuite N_1 -alkylé avec le bromure de crotyle pour donner le synthon **245** avec un bon rendement de 83% respectivement en 3 étapes (Figure 109).

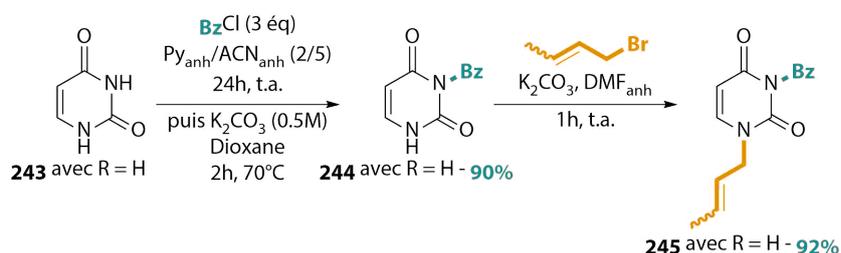


Figure 109 : Préparations du synthon pyrimidique **245**.

Afin d'éviter tout empoisonnement du catalyseur et de maximiser les rendements de l'étape de métathèse avec le partenaire phosphonate fluoré, l'intermédiaire **245** est directement utilisé sans déprotection. Le précurseur phosphonate **242** de métathèse croisée est quant à lui obtenu en 2 étapes séquentielles réalisées en one-pot (Figure 110) :

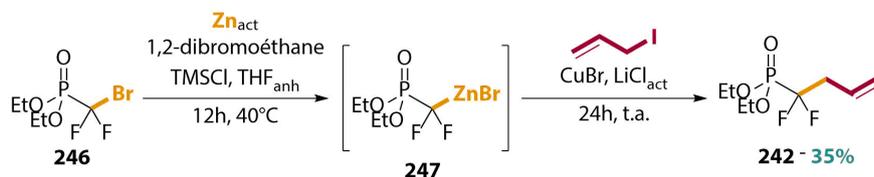


Figure 110 : Préparation du partenaire phosphonate allylique **242**.

Suivant le protocole décrit par Sprague *et al.*¹⁶⁵, le dérivé **246** portant le motif PCF_2 est transformé en l'intermédiaire organozincique **247** en présence de zinc activé. Celui-ci est ensuite activé en cuprate

¹⁶⁵ Burton, D. J.; Sprague, L. G. Allylations of [(Diethoxyphosphinyl)Difluoromethyl]Zinc Bromide as a Convenient Route to 1,1-Difluoro-3-Alkenephosphonates. *J Org Chem* **1989**, *54*, 613–617.

zincique de Knochel afin de réagir avec d'iodure d'allyle pour obtenir le précurseur **242** avec un rendement de 35%.

- Essais de métathèse

De la même manière que précédemment, le partenaire phosphonate difluoré constitue, selon le modèle de sélectivité de Grubbs, une oléfine de type 1 avec le catalyseur de Grubbs de 2nde génération et les pyrimidines crotylées en *N*₁ constituent des alcènes de type 2. Sur la base des résultats récents de notre équipe reportant des réactions de métathèse croisée entre ces mêmes bases pyrimidiques fonctionnalisées et des partenaires phosphonates classiques, les mêmes conditions sont engagées. Une première tentative est réalisée avec un large excès du phosphonate **242** par rapport à la nucléobase **245** en présence de 10 mol % du catalyseur de Nolan-Grubbs (**Gru-II'**) à reflux du DCM pendant 24h (Figure 111).

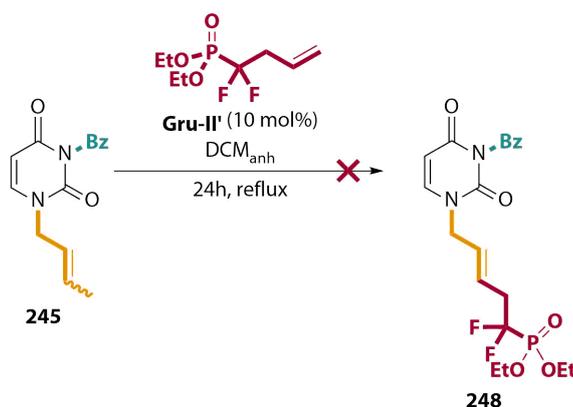


Figure 111 : Essais préliminaires de métathèse croisée.

Après plusieurs essais accompagnés de modifications du nombre d'équivalent des substrats, du catalyseur et de la méthode d'activation employée (chauffage classique, ultrason, MO...), la formation du produit attendu n'est pas observée. L'hypothèse émise expliquant ces échecs est le fort effet électroattracteur du motif 2-*gem*-difluoro appauvrissant fortement l'oléfine et réduisant considérablement la réactivité de cette dernière avec le complexe ruthénique.

➤ Seconde approche

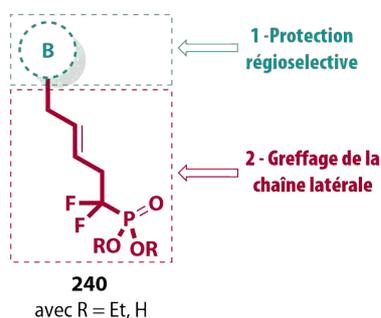


Figure 112 : Seconde stratégie de synthèse de **240**.

Avec l'échec de l'étape de métathèse croisée, nous avons alors décidé de modifier notre protocole synthétique en éliminant cette dernière étape. Ainsi, cette seconde approche débute par la préparation des nucléobases avec la protection régiosélective de la position *N*₃, seulement nécessaire dans le cas des noyaux pyrimidines. Ces hétérocycles seront engagés directement dans une étape de substitution

nucléophile avec la chaîne latérale portant un atome de brome, préparée en parallèle, pouvant conduire aux composés **240** après les étapes de déprotection finale.

- Synthèse de la chaîne latérale

Dans le but d'accéder à notre linker portant le motif d'intérêt PCF₂ et un bon nucléofuge en bout de chaîne en vue d'une réaction de type SN₂, le même protocole synthétique est alors réemployé (Figure 113) :

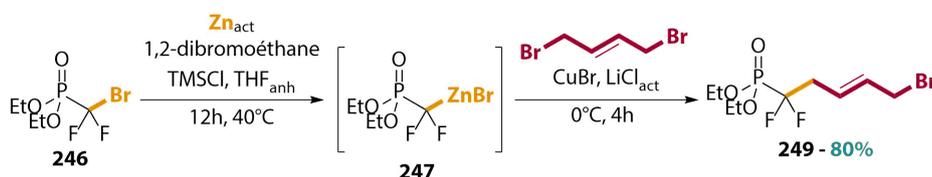


Figure 113 : Synthèse de la chaîne latérale **249**.

Une modification de méthodologie est cependant effectuée afin de réaliser l'insertion du dérivé bromé. Ainsi, lorsque la seconde étape est effectuée à température ambiante, une multitude de composés issus de dégradation sont observés sur CCM et sans la présence d'un composé majoritaire. La température du milieu est alors abaissée à 0°C et permet l'insertion complète après 4h de réaction. Après traitement et purification, le produit **249** est alors obtenu avec un bon rendement de 80% et sans isomérisation de l'oléfine. Enfin, il est important de noter que cette étape de formation de la chaîne latérale **249** est réalisable sur une échelle de 5 grammes de réactif de départ sans baisse de rendement significative.

- Cas des pyrimidines canoniques

Les produits sont préparés selon le schéma réactionnel suivant (Figure 114) :

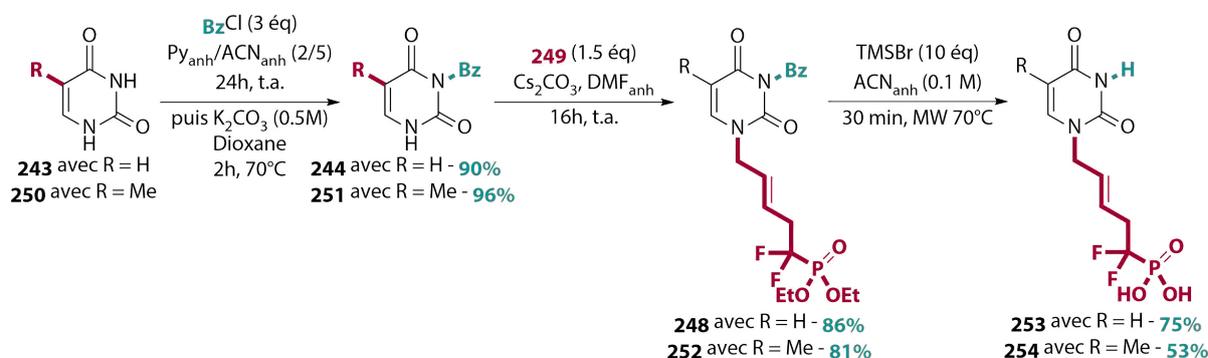


Figure 114 : Synthèse des produits **253** et **254** à base pyrimidiques.

Ainsi, la protection régiosélective l'azote N₃ par un groupement benzoyle avec de très bon rendements de l'ordre de 90% permet d'introduire la chaîne latérale bromée **249**, fournissant ainsi les dérivés substitués en N₁ **248** et **252** par substitution nucléophile en présence de Cs₂CO₃ avec des rendements de 86% et 81% respectivement.¹⁶⁶ L'étape finale concerne la déprotection simultanée du groupement benzoyle en N₃ et des éthers méthyliques de la fonction phosphonate par l'action du TMSBr dans l'ACN

¹⁶⁶ Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408.

sous activation micro-onde. Les produits désirés **253** et **254** sont alors isolés sous la forme d'une huile incolore.¹⁶⁷

- Cas des pyrimidines alkylés en C₅

Afin de permettre une convergence optimale de ce procédé synthétique, la fonctionnalisation de la base en C₅ par couplage pallado-catalysé de Sonogashira est réalisée après l'étape de couplage (Figure 115).

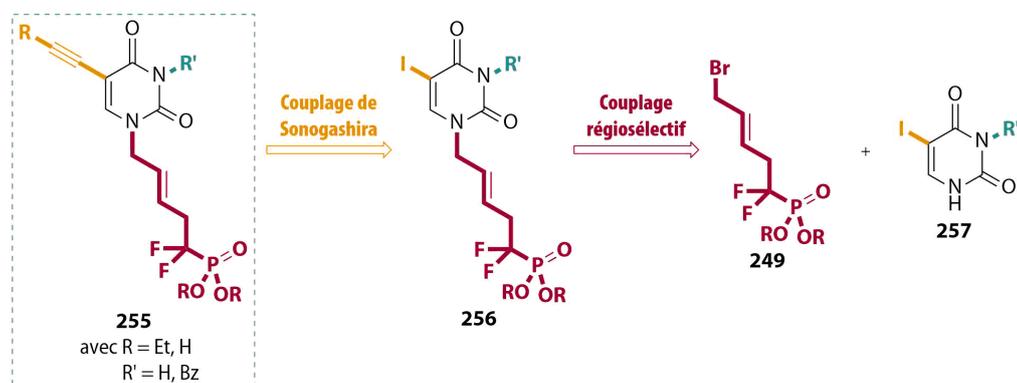


Figure 115 : Rétrosynthèse envisagée.

Les étapes clés de la rétrosynthèse abordée, conduisant aux produits d'intérêt **255**, sont au nombre de deux. Ainsi, ces derniers composés proviennent d'une étape de couplage de Sonogashira depuis le dérivé commun **256** dont lui-même provient d'une étape de fonctionnalisation en N₁ de notre linker **249** avec la 5-iodouracile N₃-protégée **257** (Figure 115).

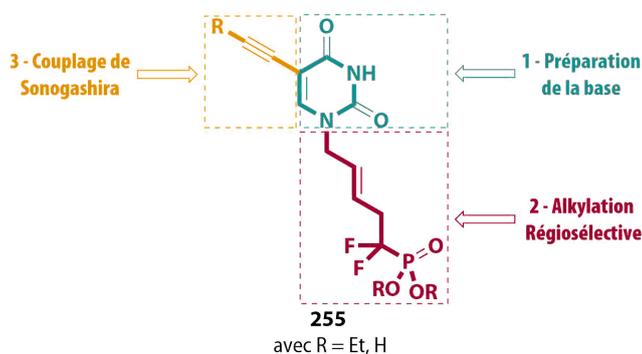


Figure 116 : Stratégie de synthèse de **255**.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la protection régiosélective de notre base et à son alkylation. Puis dans un second temps, à la fonctionnalisation en C₅ de ce noyau iodé par différents alcynes. Enfin, les problèmes liés aux déprotections des groupements phosphonates et les solutions afin de les contourner seront décrites.

- Préparation de l'intermédiaire clé **258**

¹⁶⁷ : Kumamoto, H.; Topalis, D.; Broggi, J.; Pradere, U.; Roy, V.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Deville-Bonne, D.; Andrei, G.; Snoeck, R.; et al. Preparation of Acyclo Nucleoside Phosphonate Analogues Based on Cross-Metathesis. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3517–3526.

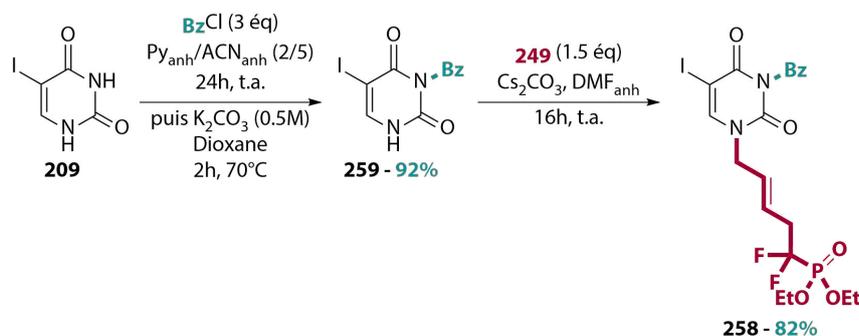


Figure 117 : Pr\u00e9paration de l'interm\u00e9diaire cl\u00e9 **258**.

La m\u00eame m\u00e9thodologie de protection r\u00e9gios\u00e9lective est employ\u00e9e sur le substrat de d\u00e9part **209** fournissant le d\u00e9riv\u00e9 monobenzoyl\u00e9 **259**, qui est directement employ\u00e9 dans l'\u00e9tape d'alkylation afin de conduire \u00e0 l'interm\u00e9diaire cl\u00e9 **258** avec un rendement de 75% en 3 \u00e9tapes (Figure 117).

- Couplage pallado-catalys\u00e9 de Sonogashira

Le compos\u00e9 **258** est directement engag\u00e9 dans le couplage pallado-catalys\u00e9 de Sonogashira sans d\u00e9protection pr\u00e9alable dans l'optique de maximiser les rendements, d'\u00e9viter la formation de produits secondaires et de simplifier les purifications. Concernant les partenaires alcynes, leur choix a \u00e9t\u00e9 guid\u00e9 par les interactions d\u00e9crites dans le site actif de la FDTs. Ainsi, avec l'objectif d'apporter de la diversit\u00e9 mol\u00e9culaire \u00e0 nos potentiels inhibiteurs, nous avons choisi des alcynes comportant des cycles aromatiques afin de tirer parti du fort π -stacking liant les substrats et les cofacteurs \u00e0 l'int\u00e9rieur de l'enzyme et de longues chaines lipophiles qui r\u00e9alise des interactions faibles \u00e0 l'int\u00e9rieur de la poche de cette derni\u00e8re. Seuls les alcynes d\u00e9crits par Herdewijn *et al.* \u00e0 squelette propargylamide n\u00e9cessitent une pr\u00e9paration pr\u00e9alable¹⁵⁸ par la mise en r\u00e9action de l'amine propargylique avec les chlorures d'acyles correspondant en pr\u00e9sence de di-*iso*-propylethylamine (DIPEA) \u00e0 temp\u00e9rature ambiante pendant 2h (Figure 118). Le couplage de ces compos\u00e9s permet l'obtention des amides **261** et **262** avec des rendements quantitatifs.

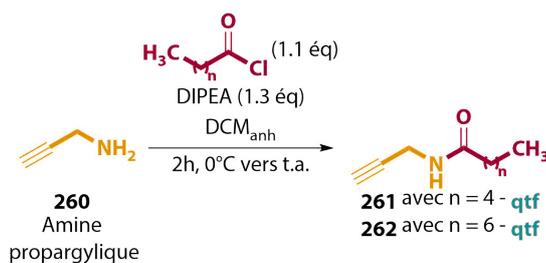


Figure 118 : Synth\u00e8se des alcynes **261** & **262**.

Ces synthons en main, ces derniers sont engag\u00e9s dans une r\u00e9action de Sonogashira en pr\u00e9sence $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et de l'esp\u00e8ce cuivr\u00e9e (CuI) dans un m\u00e9lange de DMF/ Et_3N (10/1) pendant 2h \u00e0 50°C (Figure 119) :

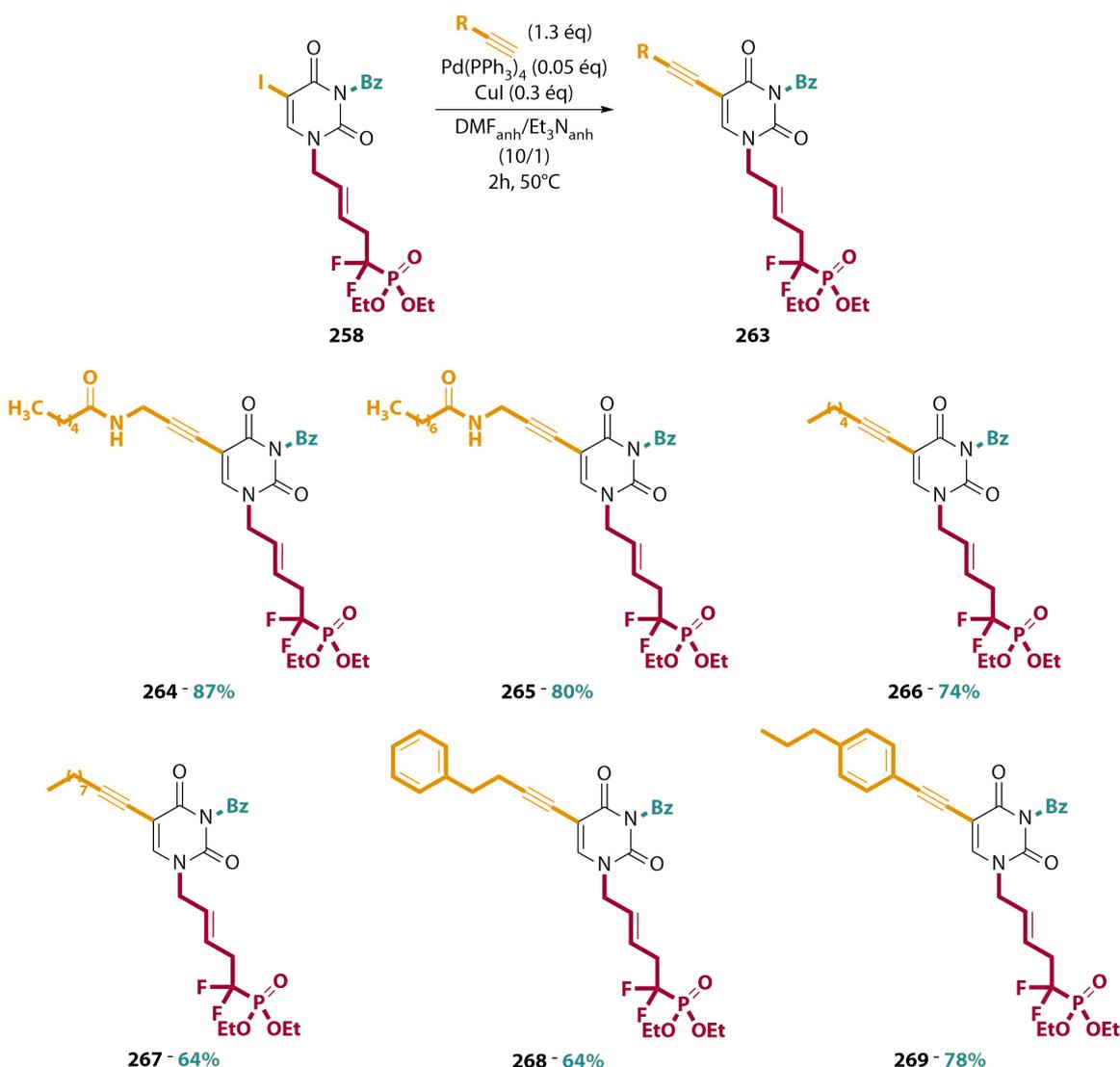


Figure 119 : Exemplification du couplage de Sonogashira.

Une conversion complète est observée après 2h de réaction pour tous les dérivés synthétisés. Concernant les dérivés portant une fonction amide, malgré la crainte d'une complexation avec l'espèce palladée, les dérivés **264** et **265** sont isolés avec de très bons rendements de 87% et 80%. De la même manière, les deux analogues à longues chaînes aliphatiques branchées directement sur l'alcyne **266** et **267** sont aussi obtenus avec des rendements du même ordre (74% pour **266** et 64% pour **267**). Enfin, dans le but de déduire une relation structure-activité et en rajoutant du π -stacking pour une meilleure affinité, le choix s'est porté vers deux alcynes portant des groupements aromatiques soit directement liés à ce dernier ou espacés par une courte chaîne aliphatique. Ces derniers sont aussi de bons partenaires pour ce couplage et permettent l'obtention des produits avec des rendement 74% pour **268** et 64% pour **269**. Il est important de noter que la séparation sur colonne chromatographique de ces différents composés est facilitée par la présence du groupement protecteur en N_3 .

- Déprotection

Par une première approche, les conditions précédentes de déprotection sous activation micro-onde qui ont permis le clivage simultané du groupement benzyle sur l'azote N_3 et des éthers méthyliques des phosphonates sont utilisées:

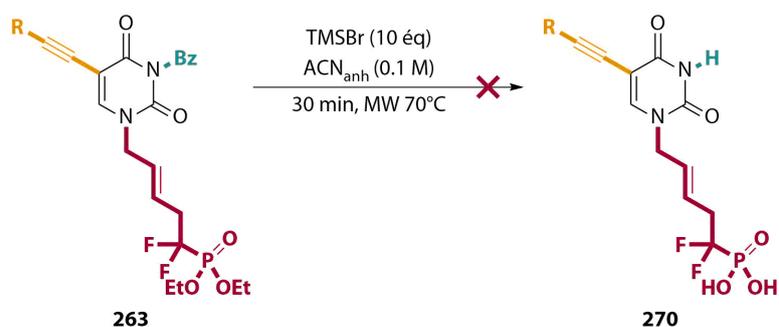


Figure 120 : Essais de déprotection simultanée.

Ces conditions provoquent ici la dégradation totale du milieu réactionnel et nous avons alors modifié la méthodologie de synthèse par la réalisation séquentielle des étapes de déprotection. Ainsi, la première étape concerne la déprotection du groupement benzoyle en N_3 qui s'effectue ici encore par l'action de l'ammoniaque méthanolique à 7N pendant la nuit à 4°C :

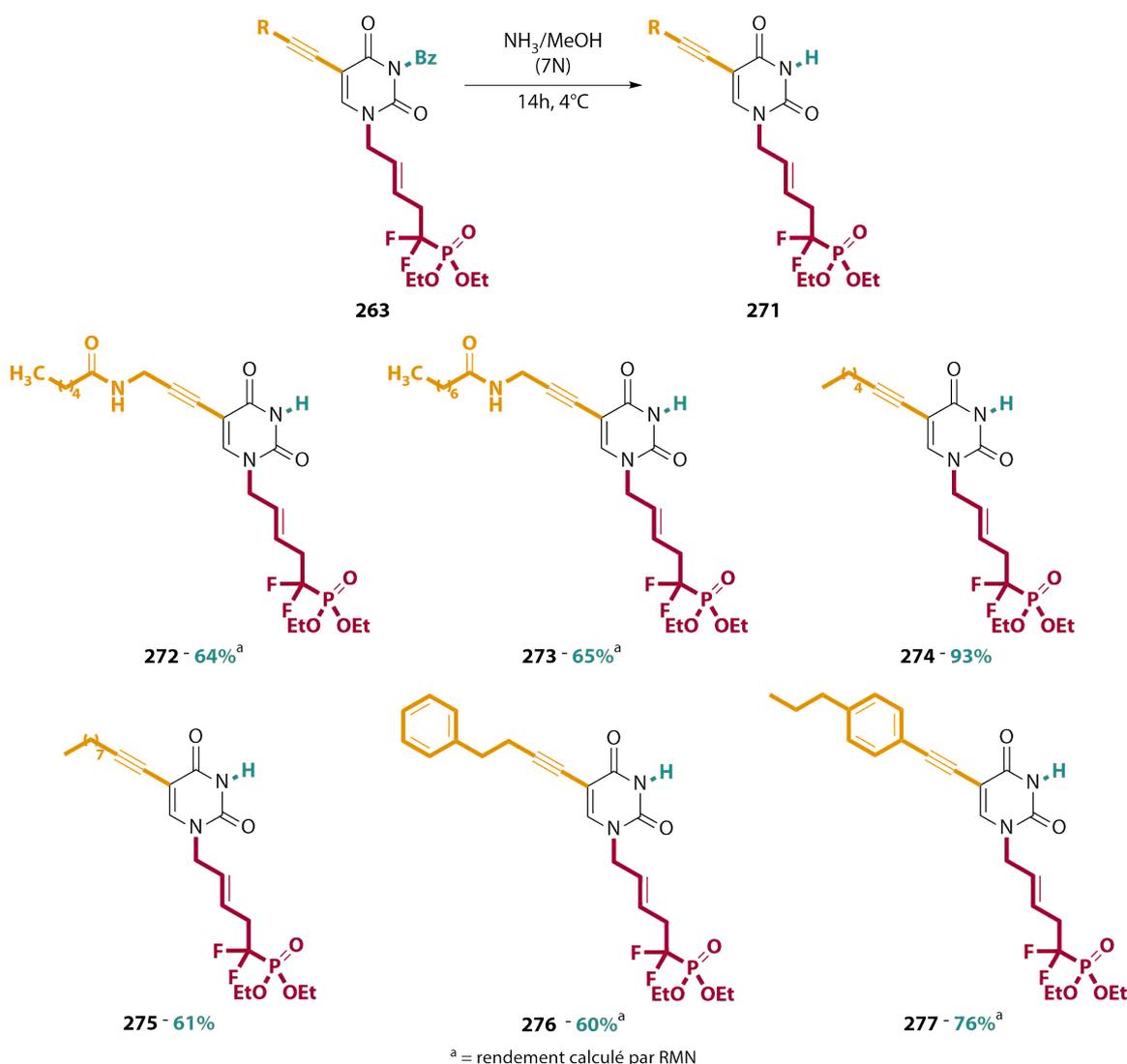


Figure 121 : Déprotection des groupements benzoyles à l'ammoniaque méthanolique.

De cette déprotection résulte la formation concomitante de benzamide dont les tâches sont très proches des produits sur CCM ce qui induit une isolation difficile de nos produits. Les dérivés souhaités sont obtenus avec des taux de conversions variant de satisfaisants à excellents (de 60% à 93%). Ainsi, les rendements de nos produits sont calculés par RMN pour tous les dérivés à l'exception de **274** et **275**.

Les conditions classiques utilisées pour la déprotection des phosphonates en acides phosphoniques des ANPs à base pyrimidique sont alors entreprises :

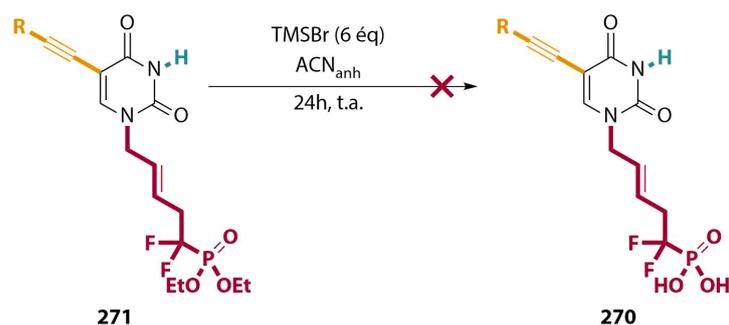


Figure 122 : Déprotection classiques des phosphonates

Après traitement, les analyses HRMS font état de la dégradation de nos substrats de départ par l'addition d'acide bromohydrique (HBr) sur nos alcynes et ainsi, la formation de formes bromées et oxydées des acides phosphoniques ciblées. L'ajout d'une base telle que la Et₃N permet d'éviter cette réaction secondaire en captant l'acide formé in-situ (Figure 123) :⁴⁰

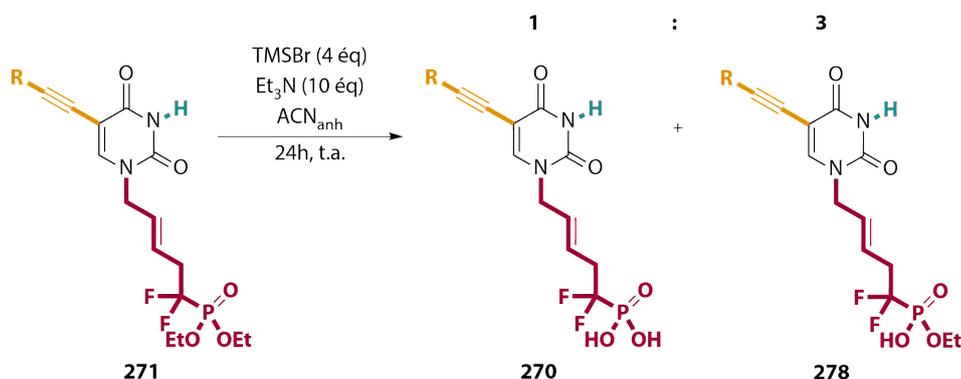


Figure 123 : Traitement au TMSBr avec ajout de Et₃N

Cette étape résulte en la formation des acides phosphoniques **270** en mélange avec les produits mono-déprotégés **278** avec une proportion respective de 1 pour 3. Ces mélanges sont en cours de purification afin d'isoler les produits d'intérêt.

- Dérivation en 6-alkylfurano[2,3-d]pyrimidine

Afin d'éviter les réactions secondaires d'addition sur nos alcynes lors de la déprotection des phosphonates et dans une optique de diversité moléculaire pour nos potentiels inhibiteurs, la présence d'un groupement alcyne lié à la position 6 du noyau uracile est alors mise à profit par la cyclisation en noyau furano[2,3-d]pyrimidine selon le protocole décrit par notre équipe.¹⁶⁸ La littérature fait état de différentes conditions conduisant à ces noyaux avec, en majorité, la mise en réaction de 6-alkynyluridine avec une espèce cuivrée, qui par sa complexation sur la triple liaison, induit la formation de ces nucléosides bicycliques par cyclisation *5-endo-dig*.¹⁶⁹ Le caractère électrophile du nitrate d'argent (AgNO₃) est alors exploité en tant que catalyseur de la réaction (Figure 124) :

¹⁶⁸ Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L. A. Highly Efficient AgNO₃-Catalyzed Preparation of Substituted Furano-pyrimidine Nucleosides. *Synlett* **2004**, 13, 2406–2408.

¹⁶⁹ Robins, M. J.; Barr, P. J. Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides. *J Org Chem* **1983**, 48, 1854–1862.

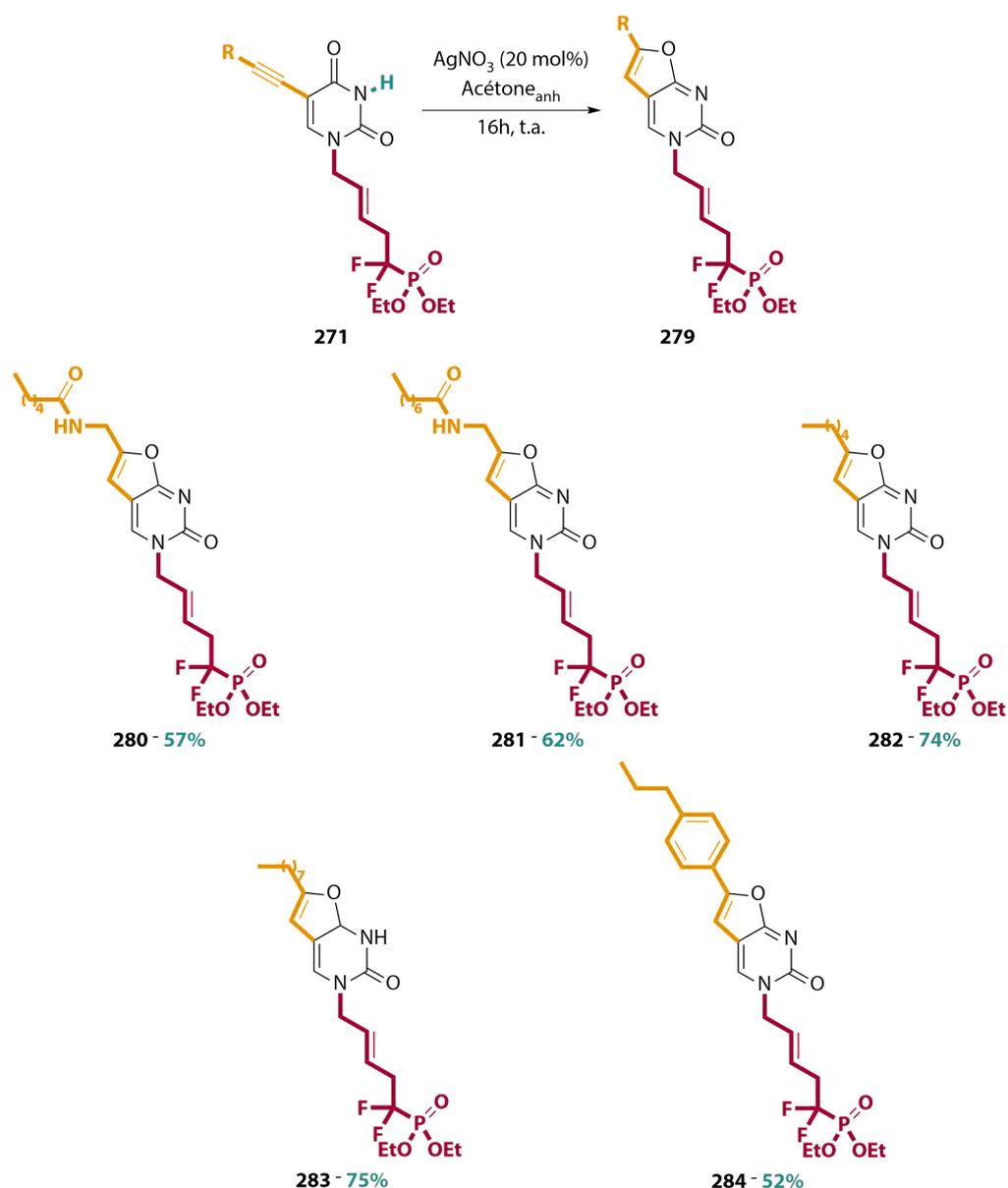


Figure 124 : Cyclisation en noyaux furano[2,3-d]pyrimidines à partir des dérivés de **271**.

La particularité expérimentale de cette étape concerne les rapports frontaux qui sont sensiblement équivalents entre les substrats de départ et les produits bicycliques, la conversion est alors estimée par RMN par la présence de l'hydrogène aromatique H_7 . Du fait de l'apparition de légère tâche de dégradation sur CCM, les produits sont isolés par filtration sur silice et sont suivis à l'aide d'une lampe UV car ces derniers présentent une légère fluorescence à 354 nm. Les différents analogues ciblés sont obtenus avec des rendements satisfaisants de 52% à 75% et ces derniers sont alors directement engagés dans la déprotection des phosphonates dans les conditions classiques (Figure 125) :

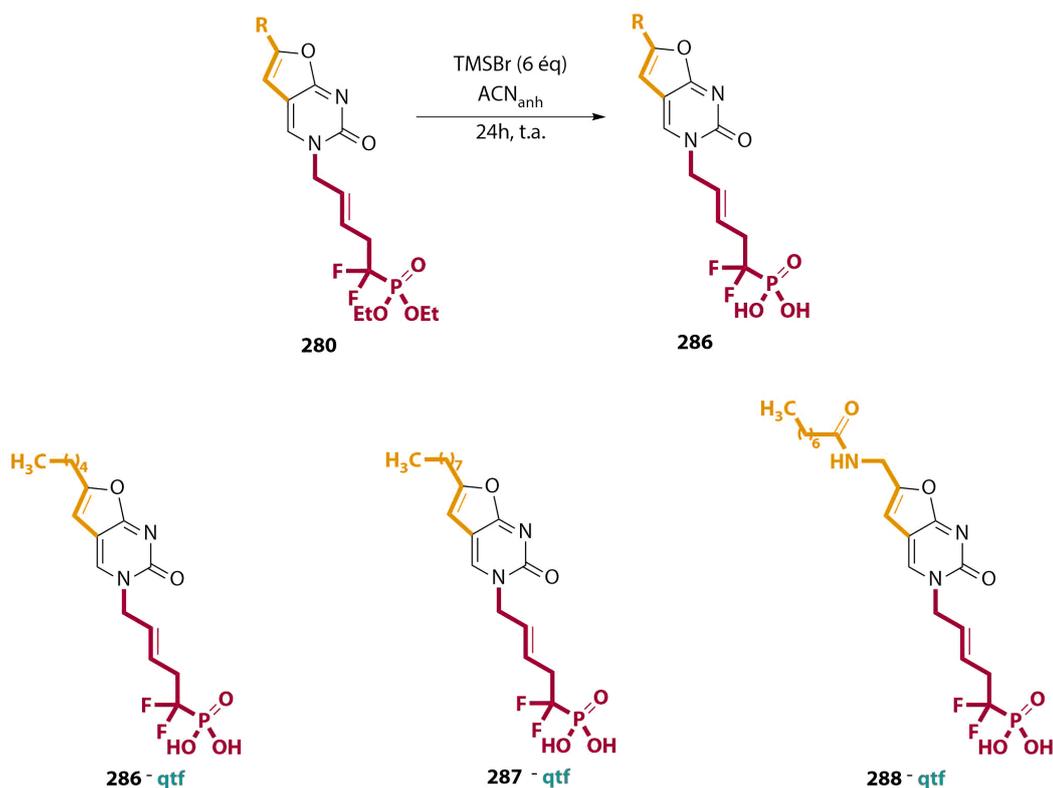


Figure 125 : Déprotection finale des dérivés bicycliques

Le traitement aux TMSBr de nos 5 ANPs bicycliques a pour résultat la dégradation de **284** et de **280** mais l'obtention de manière quantitative des autres produits ciblés.

- Cas de la cytosine et son analogue fluoré

Cette stratégie de synthèse a été appliquée à la cytosine **290** et à la 5-fluorocytosine **291** avec dans ce cas la protection de l'amine exocyclique (Figure 126) :

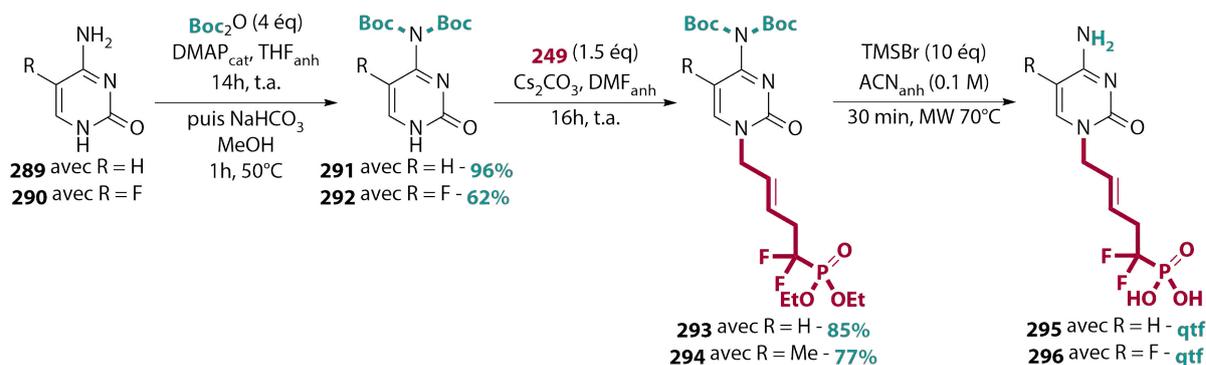


Figure 126 : Synthèse des produits **295** et **296**.

Ainsi, le groupement Boc est introduit par la formation intermédiaire d'un dérivé *N₁,N₃,N₄-tris-Boc* puis par la déprotection régiosélective de l'azote *N₁* par l'action d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) dans le méthanol. Avec le même protocole d'insertion de la chaîne latérale et de déprotection simultanée, les dérivés **296** et **297** sont obtenus avec de bons rendements de 85% et 77% en 2 étapes.

- Cas des bases puriques et analogues

Contrairement aux pyrimidines, la méthodologie de synthèse employée pour les bases puriques ne nécessite pas de groupement protecteur du fait de l'utilisation des précurseurs 6-chlorés **297** et **298** respectivement de l'hypoxanthine et de la guanine (Figure 127).

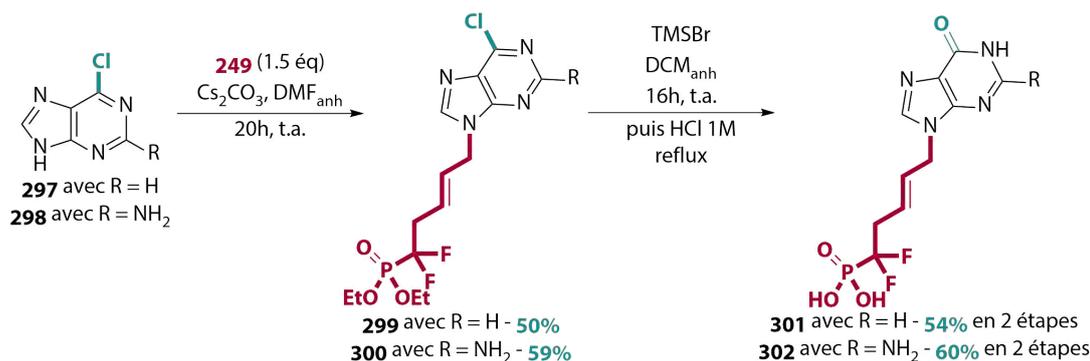


Figure 127 : Synthèse des produits **301** et **302** à bases puriques.

Le couplage des bases **297** et **298** avec la chaîne latérale **249** procède avec des rendements satisfaisant dans les mêmes conditions que précédemment avec une légère extension du temps de réaction afin de parvenir à une conversion complète. Selon le protocole décrit par Yokomatsu *et al.*¹⁷⁰ qui réalise le traitement séquentiel de leur dérivé au TMSBr afin de libérer les acides phosphoniques correspondants suivi d'un traitement avec une solution d'acide chlorhydrique 1M à reflux qui permet la conversion des analogues de 6-chloropurine en noyaux hypoxanthines, les produits **301** et **302** sont alors obtenus avec respectivement 54% et 60% de rendement en 2 étapes.

Enfin, notre chaîne acyclique **249** a aussi été couplée à la base azotée **303**, qui constitue un mime connu de la guanine :

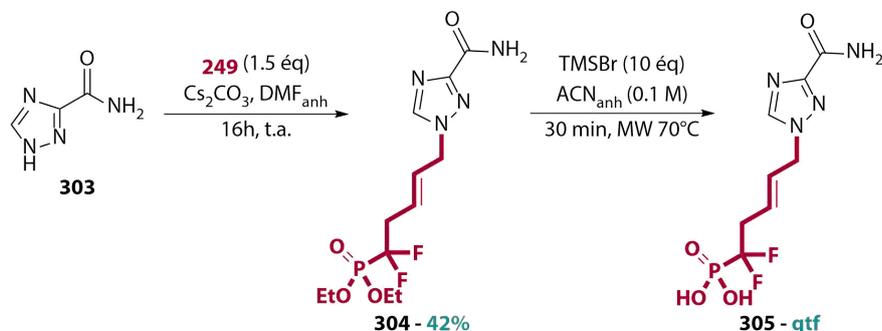


Figure 128 : Synthèse de l'analogue de la ribavirine **305**.

Par la même méthodologie, le dérivé ciblé **305** est obtenu en 2 étapes avec un rendement de 42%.

4 Tests Biologiques

Les tests biologiques de ces composés sur la FDTs ont été réalisés avec l'équipe partenaire du projet du Pr. Hannu Myllykallio et du Dr. Hubert Becker, MCU en suivant le même protocole expérimental :

¹⁷⁰ Hikishima, S.; Isobe, M.; Koyanagi, S.; Soeda, S.; Shimeno, H.; Shibuya, S.; Yokomatsu, T. Synthesis and Biological Evaluation of 9-(5',5'-Difluoro-5'-Phosphonopentyl)Guanine Derivatives for PNP-Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, 1660–1670.

Tableau 24 : Résultats de l'évaluation anti-FDTS sur Mtb-ThyX

Entrée	Composé	[I] = 200 µM + FAD		[I] = 200 µM + FAD	
		$V_i \times 10^{-2}$ ($\delta DO.s^{-1}$)	% inhibition	$V_i \times 10^{-2}$ ($\delta DO.s^{-1}$)	% inhibition
1	Sans enzyme	0.0083	X	0.0109	X
2	286	0.1117	11.2	0.0853	21.8
3	287	0.1126	10.5	0.0689	36.8
4	288	0.1243	1.2	0.0898	17.8
5	Composé Témoin	0.0041	96.7	0,0001	99.9
6	Contrôle sans composé	0.1258	/	0.1092	/

Avec une concentration de 200 µM de nos composés dans le milieu réactionnel, les 2 études cinétiques ne révèlent qu'une légère inhibition de la FDTS pour les trois composés avec une inhibition maximale de 37% pour le composé **287**. Etant donné l'activité modérée de ces derniers et afin d'estimer si notre linker constitue un mime de la charpente osidique, les tests biologiques des autres molécules synthétisées ont été effectués sur divers virus à ADN/ARN en collaboration avec les Pr. Robert Snoeck et Pr. Graciela Andrei à l'institut REGA à Leuven en Belgique. Cependant, l'activité antivirale (EC_{50}) sur les lignées cellulaires HEL, MDCK, Vero et HeLa des nucléosides 5',5'-difluoro-5'-phosphono-pent-2'-ène-1-yle synthétisés ne s'est pas révélée significative.

5 Conclusions & Perspectives

L'extrapolation à la synthèse d'ANPs originaux portant le motif d'intérêt PCF_2 a été effectuée afin d'évaluer le potentiel biologique de cette série dans l'optique de nouveaux antibactérien inhibiteurs de la FDTS et de nouveaux antiviraux.

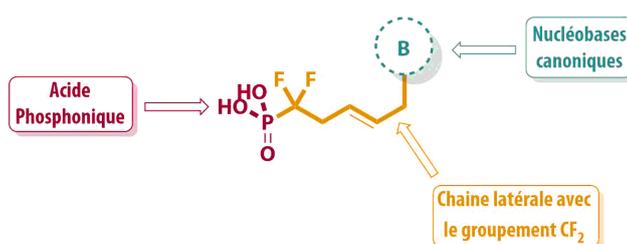


Figure 129 : Formule des ANPs synthétisés.

Dans ce but, la synthèse de ces dérivés a nécessité la mise en place d'un greffage régiosélectif de cette chaîne aliphatique sur les différentes bases hétérocycliques sélectionnées, après des essais de métathèse croisée infructueux entre un synthon uracile alkylé en N_1 par un groupement crotyle et le partenaire PCF_2 allylique. Dans le cas des dérivés de pyrimidines alkylés en C_5 , cette synthèse a entraîné la modification des conditions de déprotection finale, après la fonctionnalisation en N_1 de notre chaîne latérale et un couplage de Sonogashira en position 5, par l'ajout d'une base qui a pour effet d'éviter la formation secondaire de forme d'hydrobromation des produits. Enfin, comme le π -stacking semble être une interaction essentielle dans le site actif de l'enzyme, la formation des analogues bicycliques de nos dérivés a été effectuée par une cyclisation électrophile catalysée par l'argent de nos 5-alkynyluraciles en furano[2,3-d]pyrimidines.

Avec une légère activité inhibitrice observée, il serait intéressant d'étudier le binding de ces composés par l'utilisation de méthodes *in-silico* afin de déduire une relation structure-activité et de pharmacomoduler les chaînes latérales en position 5.

Les tests *in-vivo* n'ont pas montré d'activités antivirales significatives sous la forme acide phosphonique de nos composés. Cette évaluation biologique repose sur la biodisponibilité de nos molécules, il convient alors de modifier la méthodologie de synthèse afin de conduire à ces mêmes molécules sous forme prodrogue. Pour ce faire, une synthèse alternative, convergente et envisageable inclurait les étapes suivantes :

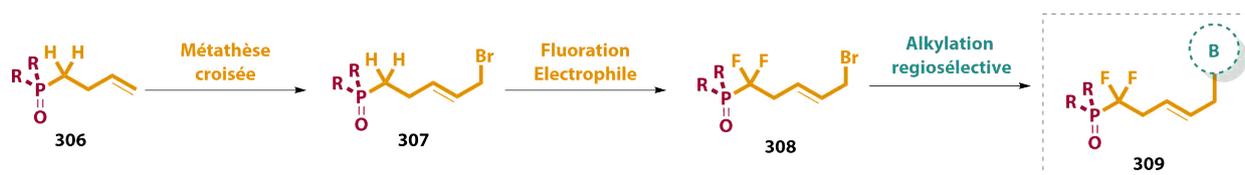


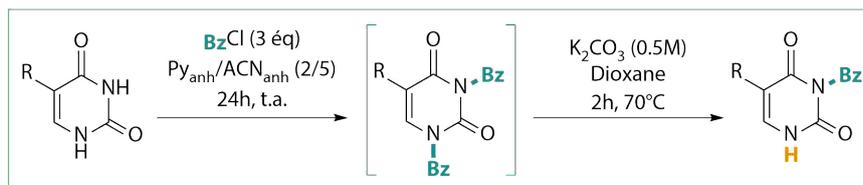
Figure 130 : Synthèse envisagée pour la synthèse des produits sous forme prodrogue.

Ainsi, le dérivé phosphonate portant des groupement biolabiles (POM ou POC) **306** serait directement engagé dans une réaction de métathèse croisée avec le *trans*-1,4-dibromobut-2-ène tel que décrit par notre équipe récemment.¹⁷¹ La présence du phosphonate serait mise à profit par la forte acidité des protons en α de cette fonction chimique afin d'insérer deux atomes de fluor sur le dérivé **308** par l'action d'un agent de type SelectFluor®. Avec cette chaîne latérale en main, le greffage des bases serait alors réalisé dans les mêmes conditions que celle résultant en la synthèse des acides phosphoniques et fournissant ainsi les dérivés souhaités **309**.

¹⁷¹ Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, 67, 398–408.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

GENERAL PROCEDURE 1 : Mono-protection of uracil analogs



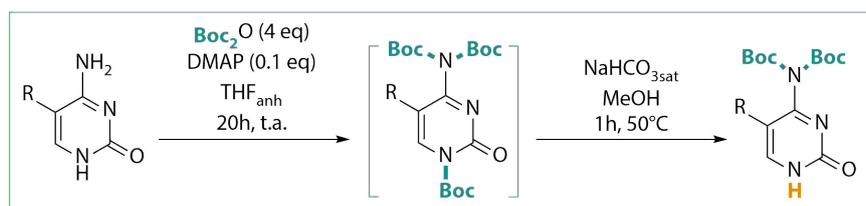
Step 1: Formation of bis-dibenzoylated uracil analogs

To a solution of uracil analog (1 g) in a 2/5 mixture of pyridine_{anh} & ACN_{anh} (20 mL) was added BzCl (3 eq). The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between DCM (50 mL) and H₂O (50 mL). The organic layer was separated and then evaporated under reduced pressure.

Step 2: Regioselective deprotection

N_1,N_3 -dibenzoylated uracil analog was dissolved in a mixture of aqueous K_2CO_3 0.5 M (20 mL) and 1,4-dioxane (40 mL) and stirred at 70°C until complete conversion (typically 2h). The solution was cooled down to room temperature and the pH was lowered to 5 by cautious addition of glacial AcOH. The volatiles were evaporated under reduced pressure in order to initiate crystallization. The aqueous mixture was filtered and the residue was washed with H₂O and Et₂O yielding desired N_3 -benzoylated derivatives as white solids.

GENERAL PROCEDURE 2 : Regioselective protection of cytosine analogs



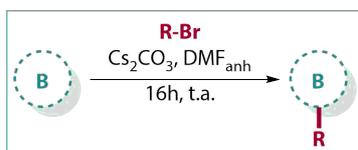
Step 1: Formation of tris-Boc-cytosine analogs

To a solution of cytosine derivative (1 g) in THF_{anh} (30 mL) were added DMAP (0.1 eq) and Boc₂O (4 eq) under argon atmosphere. The solution was stirred 20 h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with HCl_{aq} (1N), brine, dried over MgSO₄ and concentrated in *vacuo*.

Step 2: Regioselective deprotection

The crude *tris*-Boc cytosine was dissolved in MeOH (100 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (40 mL) was added. The mixture was stirred 1 h at 50°C and filtered. MeOH was removed from the mixture under reduced pressure and the solution was extracted with DCM, dried over MgSO₄ and concentrated in *vacuo* to afford *bis*-Boc-cytosine derivative as a white solid.

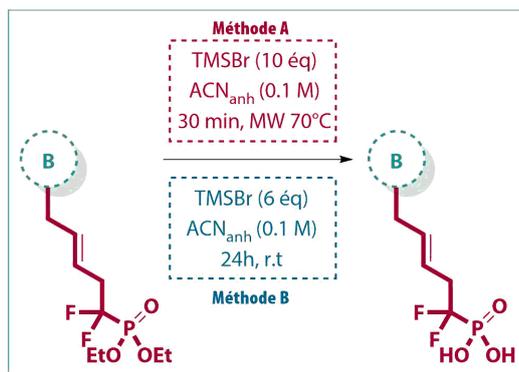
GENERAL PROCEDURE 3 : Alkylation of nucleobases



To a solution of nucleobase (1 eq) in DMF_{anh} (0.3 M) was added Cs₂CO₃ (1.1 eq) and alkylbromide derivative (1.5 eq) and the resulting slurry was stirred at room temperature under inert atmosphere for 16 h. The volatiles were

then removed in vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 96/4) to afford desired product.

GENERAL PROCEDURE 4 : Deprotection of diethylphosphonate nucleosides



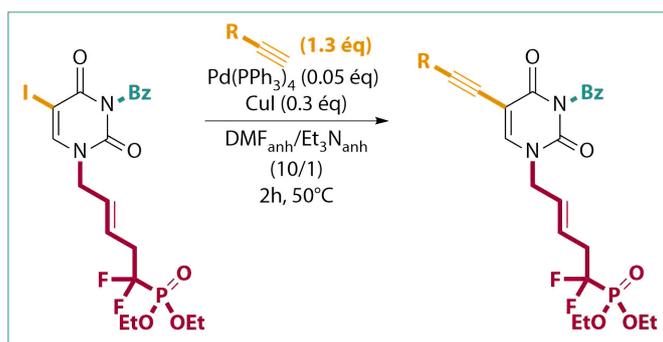
Method A (Via Microwave Activation):

A 2-5 mL vial was charged with diethyl phosphonate derivative (1 eq) in ACN_{anh} (0.1 M). To this solution was added TMSBr (10 eq) and the vial was sealed. The resulting red solution was stirred under microwave irradiation for 30 min at 70°C. The reaction mixture was quenched with MeOH (2 mL) and concentrated under vacuum, then deionized H₂O (ELGA® water, 10 mL) was added and the aqueous layer was washed with DCM (3 × 5 mL) and lyophilised to yield the expected phosphonic acid derivative.

Method B (At Room Temperature):

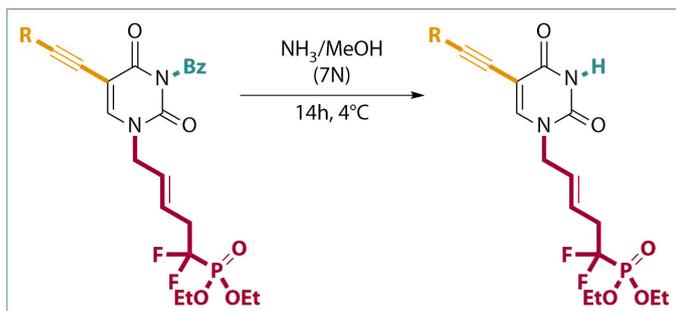
A 2-5 mL vial was charged with diethyl phosphonate derivative (1 eq) in ACN_{anh} (0.1 M). To this solution was added TMSBr (6 eq) and the vial was sealed. The resulting red solution was stirred at room temperature for 24h. The reaction mixture was quenched with MeOH (2 mL) and concentrated under vacuum, then deionized H₂O (ELGA® water, 10 mL) was added and the aqueous layer was washed with DCM (3 × 5 mL) and lyophilised to yield the expected phosphonic acid derivative.

GENERAL PROCEDURE 5 : Sonogashira coupling of 5-iodouracil derivative



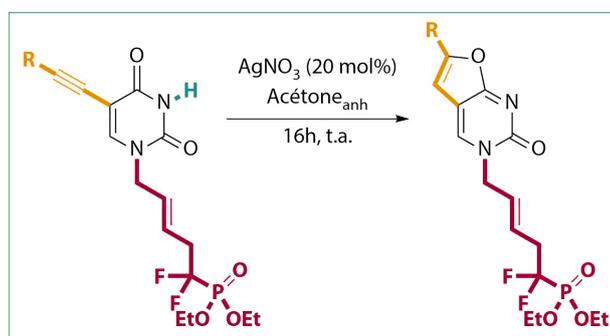
A 2-5 mL oven-dried vial was purged under argon atmosphere for 15 min and then was charged with 5-iodouracil derivative (1 eq) in a mixture of DMF_{anh}/Et₃N_{anh} (10:1, 0.2 M). To this solution was added successively alkyne partner (1.3 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.05 eq) and CuI (0.3 eq) and the vial was sealed. The resulting orange solution was stirred for 2h at 50°C (checked by TLC) and the volatiles were then removed in vacuum. The obtained residue was purified by silica gel column chromatography (DCM 100% to DCM/MeOH 99/1) to afford desired product.

GENERAL PROCEDURE 6 : Deprotection of *N*₃-benzoylated uracil derivatives



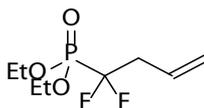
The debenzoylation of C₅-substituted uracil derivatives (100 mg) was carried out at 4 °C overnight in a 7N methanolic solution of ammonia (5 mL). After evaporation of all the volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM 99/1 to DCM/MeOH 97/3) to yield the desired debenzoylated derivative.

GENERAL PROCEDURE 7 : Formation of furano[2,3-d]pyrimidine core



Under argon atmosphere, an oven dried round bottomed flask was charged with C₅-substituted uracil derivative (1 eq) in acetone (0.05 M). To this solution was added AgNO₃ (0.2 éq) and the reaction was stirred at rt until complete conversion was reached (typically 16h, checked by NMR). After evaporation of volatiles, the crude residue was dissolved in EtOAc (10 mL), was washed with H₂O (3 x 15 mL) before being dried over MgSO₄, filtered, evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM 96/4) to yield the desired bicyclic derivative.

Diethyl-(1,1-difluorobut-3-en-1-yl)phosphonate - 242

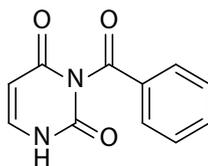


Procedure : The title compound was obtained in 1 steps starting from diethyl(bromodifluoro)methylphosphonate. Yield : 35%, yellow oil.

A suspension of Zn powder (441.3 mg, 6.75 mmol, 99.99% purity) in THF_{anh} (0.4 mL) was added to a solution of 1,2-dibromoethane (0.96 mL, 1.13 mmol) in THF_{anh} (5 mL) at room temperature, and was then warmed up to 65 °C. After 1 min, TMSCl (0.12 mL, 0.8 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at 25 °C. After 15 min, the suspension was added dropwise to a solution of diethyl(bromodifluoro)methylphosphonate (0.8 mL, 4.5 mmol) in THF (2 mL), then the reaction mixture was stirred 12 h at 45 °C. CuBr (1.16 g, 8.1 mmol), activated LiCl (344.0 mg 8.1 mmol) and THF_{anh} (4 mL) was added to the yellow solution at 0 °C under nitrogen, and then the resulting blue solution was stirred at 0 °C. After 10 min, allyliodide (0.617 mL, 6.75 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 h at 0 °C. The mixture was filtered through a celite plug and the filtrate was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography with PE/EtOAc (8/2) to yield the desired product (0.36 g).

CAS : 80077-71-0.

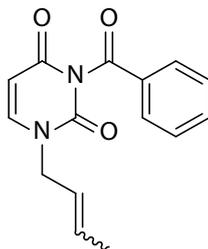
3-Benzoyluracil - 244



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from uracil following general procedure 1. Yield : 90%, white solid.

CAS : 2775-87-3.

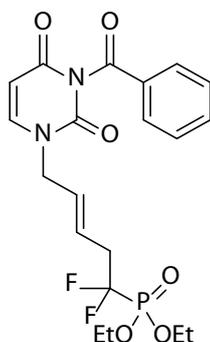
3-Benzoyl-1-(but-2-en-1-yl)uracil - 245



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from uracil following general procedure 2. Yield : 92%, white solid.

CAS : 1067228-36-7.

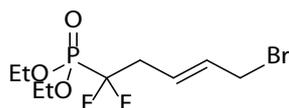
N₃-Benzoyl-1-[(E)-5-diethoxyphosphoryl]-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-uracil - 248



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from 3-benzoyluracil following general procedure 3. Yield : 86%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 2H), 7.62 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.78 (m, 2H), 5.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.84 (m, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 168.9, 162.5, 149.8, 143.7, 135.2, 131.5, 130.5, 129.6, 129.3, 125.7, 102.4, 64.8, 49.5, 37.7, 37.5, 37.4, 37.1, 16.5. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃):** δ -111.26 (d, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃):** δ 6.3 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₄F₂N₂O₆P 457.1340, found 457.1334.

(E)-1-Bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene - 249

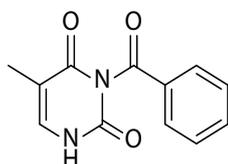


Procedure : The title compound was obtained in 1 steps starting from diethyl(bromodifluoro)methylphosphonate. Yield : 80%, yellow oil.

A suspension of Zn powder (441.3 mg, 6.75 mmol, 99.99% purity) in THF_{anh} (0.4 mL) was added to a solution of 1,2-dibromoethane (0.96 mL, 1.13 mmol) in THF_{anh} (5 mL) at room temperature, and was then warmed up to 65 °C. After 1 min, TMSCl (0.12 mL, 0.8 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at 25 °C. After 15 min, the suspension was added dropwise to a solution of diethyl(bromodifluoro)methylphosphonate (0.8 mL, 4.5 mmol) in THF (2 mL), then the reaction mixture was stirred 12 h at 45 °C. CuBr (1.16 g, 8.1 mmol), activated LiCl (344.0 mg 8.1 mmol) and THF_{anh} (4 mL) was added to the yellow solution at 0 °C under nitrogen, and then the resulting blue solution was stirred at 0 °C. After 10 min, *trans*-1,4-dibromo-2-butene (1.44 g, 6.75 mmol) was added and the reaction was stirred for 4 h at 0 °C. The mixture was filtered through a celite plug and the filtrate was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography with PE/EtOAc (8/2) to yield the desired product (1.15 g).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.88–5.76 (m, 1H), 5.29–5.22 (m, 1H), 4.27 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.81 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 125.2, 127.1, 127.0, 126.9, 121.4, 64.6, 64.5, 39.1, 38.9, 38.7, 38.5, 16.5, 16.4. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃):** δ -111.3 (d, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃):** δ 6.9 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₇BrF₂O₃P 321.0064 found 321.0061. **Rf:** 0.33 (PE/EtOAc 8/2).

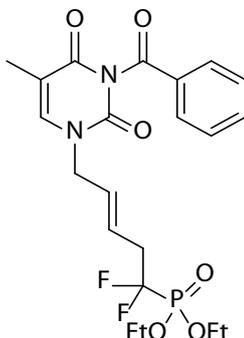
3-Benzoylthymine - 251



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from thymine following general procedure 1.
Yield : 96%, white solid.

CAS : 4330-20-5.

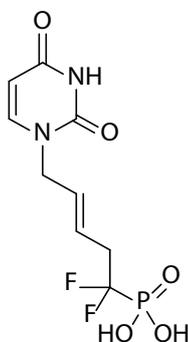
***N*₃-Benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-thymine - 252**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from 3-benzoylthymine following general procedure 3. Yield : 81%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.91 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 2H), 7.63 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 169.2, 163.2, 149.9, 139.5, 135.1, 131.7, 130.5, 130.0, 129.2, 125.7, 125.6, 125.5, 125.5, 111.2, 64.7, 49.2, 37.8, 37.6, 37.4, 37.2, 29.8, 16.5, 12.4. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.9 (dt, ¹*J*_{F-F} = 18.8 Hz, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.4 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₁H₂₆F₂N₂O₆P 471.1489, found 471.1491.

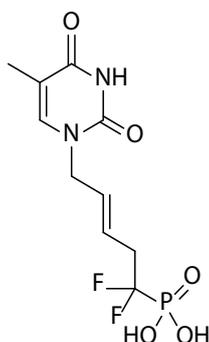
***N*₁-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-uracil - 253**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-Benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-uracil following general procedure 4, Method A. Yield : 75%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.79 (m, 2H), 5.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) :** δ 166.9, 152.7, 147.0, 131.1, 126.2, 126.1, 102.55, 38.6, 38.34, 38.2, 38.0, 20.4. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -113.9 (d, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 5.3 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₂F₂N₂O₅P 297.0447, found 297.0446.

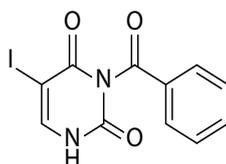
***N*₁-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-thymine - 254**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-thymine following general procedure 4, Method A. Yield : 53%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 7.40 (s, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.34 (d, *J* = 3.9 Hz, 4H), 2.85 (m, 2H), 1.87 (s, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) :** δ 167.0, 152.9, 142.7, 131.3, 126.0, 111.6, 38.5, 38.4, 38.3, 38.2, 21.1, 12.3. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -113.9 (d, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 5.3 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₄F₂N₂O₅P 311.0602, found 311.0602.

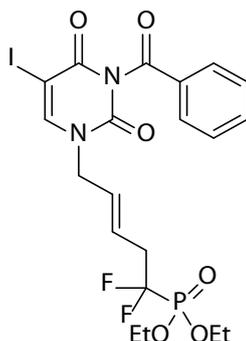
3-Benzoyl-5-iodouracil - 259



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from 5-iodouracil following general procedure 1. Yield : 92%, white solid.

CAS : 161263-60-1

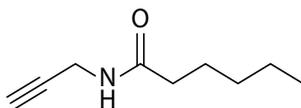
*N*₃-Benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil - 258



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from 3-benzoyl-5-iodouracil following general procedure 3. Yield : 82%, yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.96 – 7.85 (m, 2H, H_{Ar}), 7.79 (s, 1H, H₆), 7.71 – 7.60 (m, 1H, H_{Ar}), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.98 – 5.65 (m, 2H, CH=CH), 4.40 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂), 4.28 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.94 – 2.79 (m, 2H, CH₂-CF₂), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 167.9 (C₄), 159.3 (C₂), 149.6 (C=O), 148.0 (C₆), 135.4 (CH_{Ar}), 131.1 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH=CH), 129.2 (CH_{Ar}), 126.8 (d, *J* = 5.4 Hz, CH=CH), 67.9 (C_{quat}), 64.9 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 49.8 (N-CH₂), 38.9 – 35.8 (m, CH₂-CF₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.9 (dt, ¹*J*_{F-F} = 18.9 Hz, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.3 (t, ²*J*_{P-F} = 112.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₂₃F₂IN₂O₆P 583.0301 found 583.0300.

***N*-(prop-2-yn-1-yl)hexanamide - 261**

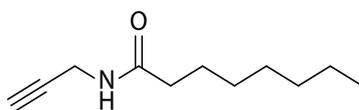


Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from propargylamine. Yield : qtf, white solid.

Propargylamine (512 μ l, 8 mmol) was dissolved in DCM_{anh} (20 ml), DIPEA (1.3 eq) was added and the solution was cooled to 0 °C. Hexanoyl chloride (1.1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched through dropwise addition of H₂O (1 ml), then diluted with DCM (20 ml) and washed with saturated NaHCO₃ solution (40 mL) and brine (40 ml), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The obtained white solid was used without further purification.

CAS : 363624-46-8

***N*-(prop-2-yn-1-yl)octanamide - 262**

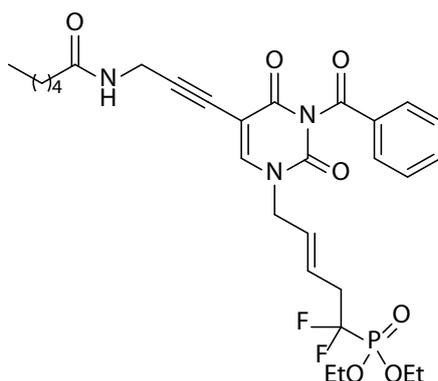


Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from propargylamine. Yield : qtf, white solid.

Propargylamine (512 μ l, 8 mmol) was dissolved in DCM_{anh} (20 ml), DIPEA (1.3 eq) was added and the solution was cooled to 0 °C. Octanoyl chloride (1.1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched through dropwise addition of H₂O (1 ml), then diluted with DCM (20 ml) and washed with saturated NaHCO₃ solution (40 mL) and brine (40 ml), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The obtained white solid was used without further purification.

CAS : 422284-34-2

Diethyl (*E*)-(5-(3-benzoyl-5-(3-hexanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate - 264

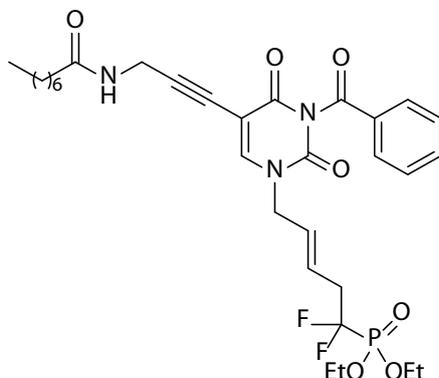


Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 87%, orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.93 – 7.87 (m, 2H, H_{Ar}), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.60 (s, 1H, H₆), 7.54 – 7.45 (m, 2H, H_{Ar}), 5.97 – 5.69 (m, 4H, CH₂ & CH=CH), 4.39 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, N-CH₂), 4.34 – 4.17 (m, 6H, CH₂-CH₃ & CH₂), 2.87 (m, 2H, CH₂-CF₂), 2.17 (td, *J* = 7.8, 2.8 Hz, 2H, CH₂), 1.62 (dt, *J* = 13.7, 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 1.31 – 1.26 (m, 4H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 173.0 (C=O), 167.9 (C₄), 161.1 (C₂), 148.8 (C_{quat}), 146.3 (H₆), 135.4 (CH_{Ar}), 132.3 (C_{quat}), 131.2 (CH_{Ar}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.1 (C_{quat}), 128.7 (d, *J* = 13.8 Hz, CH=CH), 126.8 (d, *J* =

13.8 Hz, CH=CH), 99.9 (C_{quat}), 90.8 (C_{quat}), 73.5 (C_{quat}), 64.9 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.1 (N-CH₂), 38.0 – 37.1 (m, CH₂-CF₂), 36.6 (CH₂), 31.6 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 25.4 (CH₂), 22.5 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -110.85 (dt, ¹J_{F-F} = 19.1 Hz, ²J_{P-F} = 106.1 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 6.3 (t, ²J_{P-F} = 106.1 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₉H₃₇F₂N₃O₇P 608.2331 found 608.2335.

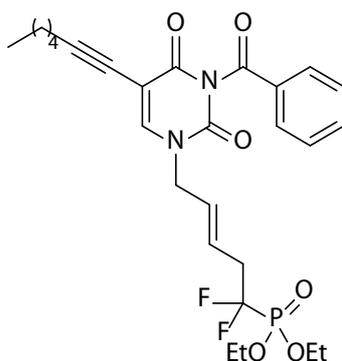
Diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-5-(3-octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate - 265



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 80%, orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.93 – 7.86 (m, 2H, H_{Ar}), 7.71 – 7.62 (m, 1H, H_{Ar}), 7.61 (s, 1H, H₆), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.12 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, NH), 5.94 – 5.67 (m, 2H, CH=CH), 4.39 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, N-CH₂), 4.27 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 4.20 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 2.88 (tt, *J* = 19.0, 6.6 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.22 – 2.08 (m, 2H, CH₂), 1.64 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 1.26 (s, 10H, CH₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 173.1 (C=O), 167.9 (C₄), 161.2 (C₂), 148.8 (C_{quat}), 146.4 (H₆), 135.5 (CH_{Ar}), 132.3 (C_{quat}), 132.2 (C_{quat}), 131.2 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.1 (C_{quat}), 128.7 (d, *J* = 12.36 Hz, CH=CH), 126.7 (d, *J* = 5.2 Hz, CH=CH), 99.8 (C_{quat}), 90.9 (C_{quat}), 73.5 (C_{quat}), 64.9 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.1 (N-CH₂), 38.0 – 37.0 (m, CH₂-CF₂), 36.5 (CH₂), 31.8 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 25.7 (CH₂), 22.7 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -110.83 (d, ²J_{P-F} = 109.0 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 5.3 (t, ²J_{P-F} = 109.0 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₃₁H₄₁F₂N₃O₇P 636.2644 found 636.2647.

Diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-5-(hept-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate - 266

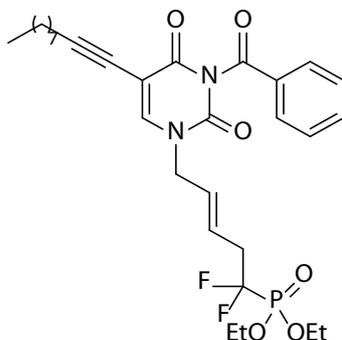


Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 74%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.91 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (s, 1H, H₆), 7.48 (t, *J* = 3.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.93 – 5.69 (m, 2H, CH=CH), 4.39 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, N-CH₂), 4.28 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.89 (tt, *J* = 18.9, 6.5 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.63 – 1.51 (m, 2H, CH₂), 1.44 – 1.24 (m, 10H, CH₃ & CH₂).

0.89 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 168.2 (C₄), 161.2 (C₂), 149.0 (C_{quat}), 144.8 (C₆), 135.2 (CH_{Ar}), 131.4 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH=CH), 129.3 (CH_{Ar}), 126.2 (d, $J = 5.2$ Hz, CH=CH), 101.4 (C_{quat}), 96.5 (C_{quat}), 70.5 (C_{quat}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.0 (N-CH₂), 37.9 – 37.0 (m, CH₂-CF₂), 31.2 (CH₂), 28.3 (CH₂), 22.3 (CH₂), 19.7 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.1 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -110.97 (d, $^2J_{P-F} = 106.5$ Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 6.44 (t, $^2J_{P-F} = 106.5$ Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₇H₃₄F₂N₂O₆P 551.2117 found 551.2119.

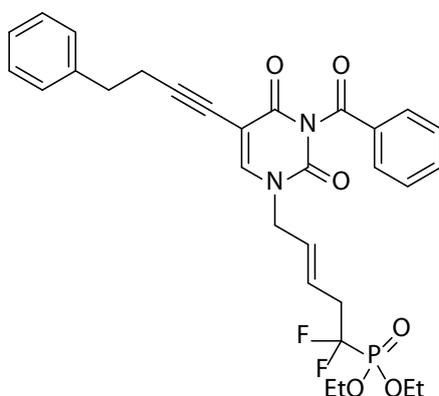
Diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-5-(dec-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate -267



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 64%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.94 – 7.88 (m, 2H, H_{Ar}), 7.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (s, 1H, H₆), 7.50 – 7.46 (m, 2H, H_{Ar}), 5.93 – 5.70 (m, 2H, CH=CH), 4.39 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, N-CH₂), 4.28 (p, $J = 7.3$ Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.90 (m, 2H, CH₂-CF₂), 2.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.59 – 1.51 (m, 2H, CH₂), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃), 1.26 (bs, 10H, CH₂), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 168.2 (C₄), 161.2 (C₂), 149.0 (C_{quat}), 144.8 (C₆), 135.3 (CH_{Ar}), 131.4 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH=CH), 129.3 (CH_{Ar}), 126.2 (d, $J = 5.5$ Hz, CH=CH), 101.4 (C_{quat}), 96.5 (C_{quat}), 70.5 (C_{quat}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.0 (N-CH₂), 38.0 – 37.2 (m, CH₂-CF₂), 32.0 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.6 (CH₂), 22.8 (CH₂), 19.8 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.2 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -110.96 (d, $^2J_{P-F} = 106.5$ Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 6.44 (t, $^2J_{P-F} = 106.5$ Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₃₀H₄₀F₂N₂O₆P 593.2586 found 593.2586.

Diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-2,4-dioxo-5-(4-phenylbut-1-yn-1-yl)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate -268

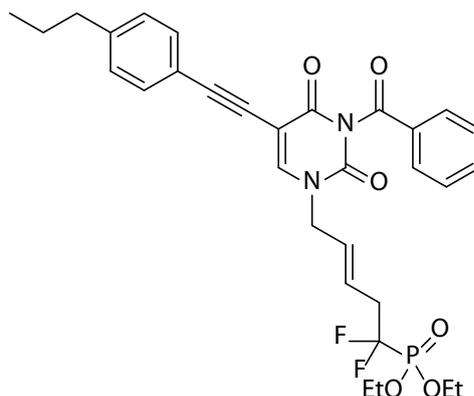


Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₃-benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 64%, orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.94 – 7.88 (m, 2H, H_{Ar}), 7.69 – 7.62 (m, 1H, H_{Ar}), 7.52 – 7.46 (m, 2H, H_{Ar}), 7.44 (s, 1H, H₆), 7.33 – 7.18 (m, 5H, H_{Ar}), 5.93 – 5.69 (m, 2H, CH=CH), 4.38 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, N-CH₂), 4.27 (p, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH₂-

CH₃), 2.99 – 2.80 (m, 4H, CH₂ & CH₂-CF₂), 2.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 168.1 (C₄), 161.2 (C₂), 148.9 (C_{quat}), 145.1 (CH_{Ar}), 142.0 (CH_{Ar}), 140.5 (C_{quat}), 135.3 (CH_{Ar}), 131.4 (C_{quat}), 130.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH=CH), 129.3 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.3 – 126.1 (m, CH=CH), 101.1 (C_{quat}), 95.4 (C_{quat}), 71.3 (C_{quat}), 64.9 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.0 (N-CH₂), 37.7 – 37.0 (m, CH₂-CF₂), 34.9 (CH₂-CH₂), 22.0 (CH₂-CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)**: δ -110.98 (d, ²*J*_{P-F} = 106.3 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)**: δ 6.42 (t, ²*J*_{P-F} = 106.3 Hz). **HRMS-ESI (m/z)**: [M+H]⁺ calculated for C₃₀H₃₂F₂N₂O₆P 585.1960 found 585.1960.

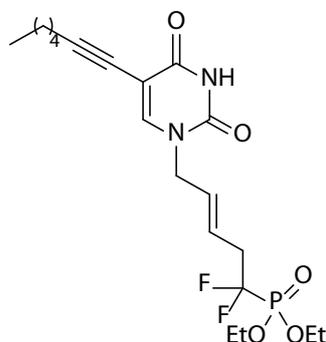
Diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-2,4-dioxo-5-((4-propylphenyl)ethynyl)-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate -269



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from N₃-benzoyl-1-[(E)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-iodouracil following general procedure 5. Yield : 78%, orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.66 (q, *J* = 8.5, 7.5 Hz, 2H, H_{Ar} & H₆), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.98 – 5.70 (m, 2H, CH=CH), 4.42 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, N-CH₂), 4.27 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.89 (tt, *J* = 18.8, 6.9 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.63 – 2.51 (m, 2H, CH₂), 1.62 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)**: δ 168.1 (C₄), 160.8 (C₂), 148.9 (C=O), 145.2 (C₆), 143.8 (C_{quat}), 135.3 (CH_{Ar}), 132.2 (CH_{Ar}), 132.1 (CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 131.3 (C_{quat}), 130.6 (CH_{Ar}), 129.3 (CH=CH), 129.3 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 126.5 (d, *J* = 5.6 Hz, CH=CH), 119.7 (C_{quat}), 101.0 (C_{quat}), 95.0 (C_{quat}), 78.9 (C_{quat}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.8 (CH₂-CH₃), 50.0 (N-CH₂), 38.1 (CH₂), 37.9 – 37.2 (m, CH₂-CF₂), 24.4 (CH₂-CH₃), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 13.8 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)**: δ -110.73 (d, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)**: δ 6.40 (t, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz). **HRMS-ESI (m/z)**: [M+H]⁺ calculated for C₃₁H₃₄F₂N₂O₆P 599.2117 found 599.2117.

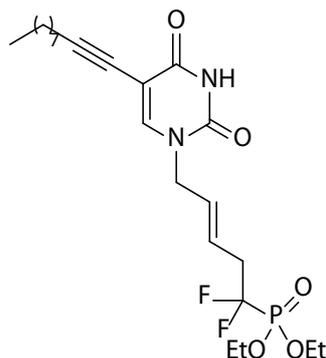
Diethyl (E)-(1,1-difluoro-5-(5-(hept-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 274



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-5-(hept-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 6. Yield : 93%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.89 (bs, 1H, N₃H), 7.38 (s, 1H, H₆), 5.78 (ddt, *J* = 30.5, 15.4, 8.1 Hz, 2H, CH=CH), 4.34 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂), 4.27 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.86 (tt, *J* = 19.0, 6.5 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.57 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.36 (dt, *J* = 12.8, 6.9 Hz, 10H, CH₃ & CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 162.1 (C₄), 149.8 (C₂), 145.4 (C₆), 129.7 (CH=CH), 125.6 (d, *J* = 5.7 Hz, CH=CH), 101.2 (C_{quat}), 95.8 (C_{quat}), 70.8 (C_{quat}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.7 (CH₂-CH₃), 49.6 (N-CH₂), 37.4 (td, *J* = 21.8, 15.8 Hz, CH₂-CF₂), 31.3 (CH₂), 28.4 (CH₂), 22.3 (CH₂), 19.7 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.1 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -111.03 (d, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 6.40 (t, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₃₀F₂N₂O₅P 447.1854 found 447.1856.

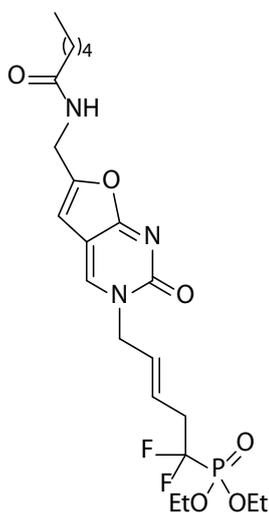
Diethyl (E)-(5-(5-(dec-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate - 275



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from diethyl (E)-(5-(3-benzoyl-5-(dec-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 6. Yield : 61%, brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.89 (bs, 1H, N₃H), 7.37 (s, 1H, H₆), 5.85 – 5.68 (m, 2H, CH=CH), 4.34 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, N-CH₂), 4.27 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.86 (tt, *J* = 18.9, 6.5 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.56 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 1.26 (bs, 10H, CH₂), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 162.1 (C₄), 149.8 (C₂), 145.4 (C₆), 129.7 (CH=CH), 125.6 (d, *J* = 5.4 Hz, CH=CH), 101.2 (C_{quat}), 95.8 (C_{quat}), 70.8 (C_{quat}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.7 (CH₂-CH₃), 49.6 (N-CH₂), 38.0 – 36.9 (m, CH₂-CF₂), 32.0 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.7 (CH₂), 22.8 (CH₂), 19.8 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.2 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ -111.03 (d, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 6.48 (t, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₂₃H₃₆F₂N₂O₅P 489.2324 found 489.2325.

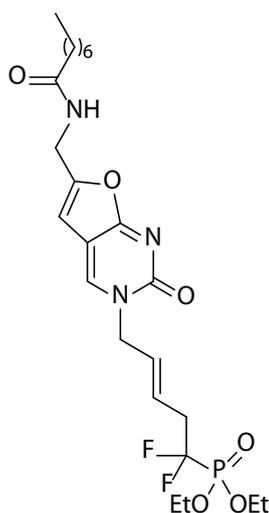
Diethyl (E)-(1,1-difluoro-5-(6-(hexanamidomethyl)-2-oxofuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 280



Procedure : The title compound was obtained in 2 steps starting from diethyl (*E*)-(5-(3-benzoyl-5-(3-hexanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 6 then 7. Yield : 57%, yellow amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.96 (s, 1H, H₉), 6.36 (s, 1H, H₇), 6.22 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 5.95 – 5.74 (m, 2H, CH=CH), 4.65 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, N-CH₂), 4.42 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, N-CH₂), 4.26 (p, *J* = 7.3 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.86 (tt, *J* = 18.7, 6.0 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.30 – 2.15 (m, 2H, CH₂), 1.63 (p, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 1.30 (m, 4H, CH₂), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 173.5 (C_{quat}), 171.9 (C_{quat}), 161.7 (C_{quat}), 155.4 (C_{quat}), 154.7 (C_{quat}), 140.1 (C₉), 130.2 (CH=CH), 125.9 (d, *J* = 4.9 Hz, CH=CH), 107.6 (C_{quat}), 101.2 (C₇), 64.9 (CH₂), 64.8 (CH₂), 52.4 (N-CH₂), 37.7 (m, CH₂-CF₂), 36.6 (N-CH₂), 36.6 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.8 (CH₂), 25.3 (CH₂), 22.5 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.1 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.68 (d, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.28 (t, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₂H₃₃F₂N₃O₆P 504.2069 found 504.2065.

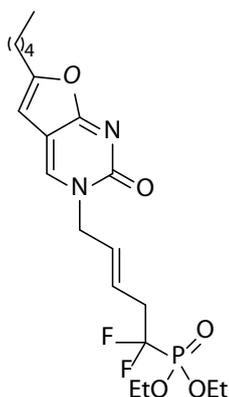
Diethyl (*E*)-(1,1-difluoro-5-(6-(octanamidomethyl)-2-oxofuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 281



Procedure : The title compound was obtained in 2 steps starting from diethyl (*E*)-(5-(3-benzoyl-5-(3-octanamidoprop-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 6 & 7. Yield : 62%, yellow amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.99 (s, 1H, H₉), 6.64 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 6.37 (s, 1H, H₇), 5.96 – 5.73 (m, 2H, CH=CH), 4.64 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, N-CH₂), 4.41 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, N-CH₂), 4.25 (p, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂-CH₃), 2.85 (tt, *J* = 18.8, 5.9 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.29 – 2.15 (m, 2H, CH₂), 1.70 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 1.27 (bs, 10H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 173.6 (C_{quat}), 171.8 (C_{quat}), 155.4 (C_{quat}), 154.8 (C_{quat}), 140.0 (C₉), 130.1 (CH=CH), 125.7 (d, *J* = 5.4 Hz, CH=CH), 107.6 (C_{quat}), 101.1 (C₇), 64.7 (CH₂-CH₃), 64.6 (CH₂-CH₃), 52.3 (N-CH₂), 37.8 – 37.1 (m, CH₂-CF₂), 36.4 (N-CH₂), 36.4 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 25.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 16.4 (CH₃), 16.4 (CH₃), 14.0 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.72 (d, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.27 (t, ²*J*_{P-F} = 106.5 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₄H₃₇F₂N₃O₆P 532.2382 found 532.2377.

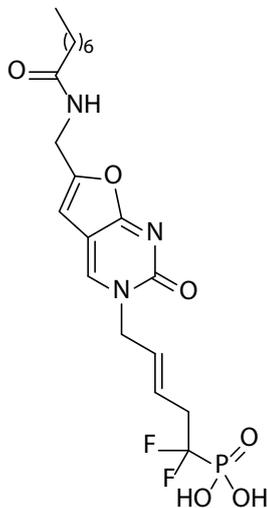
Diethyl (*E*)-(1,1-difluoro-5-(2-oxo-6-pentylfuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate - 282



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from diethyl (*E*)-(1,1-difluoro-5-(5-(hept-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 7. Yield : 74%, yellow amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.82 (s, 1H, H_{Ar}), 6.07 (s, 1H, H_{Ar}), 5.92 – 5.79 (m, 2H, CH=CH), 4.63 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, N-CH₂), 4.31 – 4.19 (m, 6H, CH₂-CH₃ & CH₂), 2.94 – 2.75 (m, 2H, CH₂-CF₂), 2.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.67 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (m, 10H, CH₃ & CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 172.1 (C_{quat}), 169.4 (C_{quat}), 160.4 (C_{quat}), 155.5 (C_{quat}), 130.6 (CH=CH), 127.5 (CH_{Ar}), 125.3 (d, *J* = 5.3 Hz, CH=CH), 108.3 (C_{quat}), 98.6 (CH_{Ar}), 64.8 (CH₂-CH₃), 64.7 (CH₂-CH₃), 52.3 (N-CH₂), 38.0 – 36.9 (m, CH₂-CF₂), 31.3 (CH₂), 28.4 (CH₂), 26.6 (CH₂), 22.4 (CH₂), 16.6 (CH₃), 16.5 (CH₃), 14.0 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.74 (d, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.40 (t, ²*J*_{P-F} = 106.6 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₀H₃₀F₂N₂O₅P 447.1854 found 447.1854.

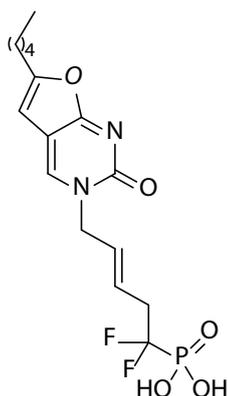
(*E*)-(1,1-difluoro-5-(6-(octanamidomethyl)-2-oxofuro[2,3-*d*]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 286



Procedure : The title compound was obtained in 2 steps starting from diethyl (*E*)-(1,1-difluoro-5-(6-(octanamidomethyl)-2-oxofuro[2,3-*d*]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 4, Method B. Yield : qtf, amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) : δ 8.56 (s, 1H, H₉), 6.62 (s, 1H, H₆), 6.00 – 5.85 (m, 2H, CH=CH), 4.72 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H, N-CH₂), 4.43 (s, 2H, N-CH₂), 2.87 (tt, *J* = 18.5, 4.7 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.62 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (m, 10H, CH₂), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) :** δ 176.5 (C_{quat}), 172.5 (C_{quat}), 157.2 (C_{quat}), 144.5 (C₉), 130.3 (CH=CH), 127.6 (d, *J* = 5.3 Hz, CH=CH), 110.2 (C_{quat}), 102.5 (C₆), 54.2 (N-CH₂), 38.6 – 38.1 (m, CH₂-CF₂), 37.2 (N-CH₂), 36.9 (CH₂), 32.8 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.1 (CH₂), 26.9 (CH₂), 23.6 (CH₂), 14.4 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -113.59 (d, ²*J*_{P-F} = 103.4 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 5.14 (t, ²*J*_{P-F} = 103.4 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₂₀H₂₇F₂N₃O₆P 474.1611 found 474.1599.

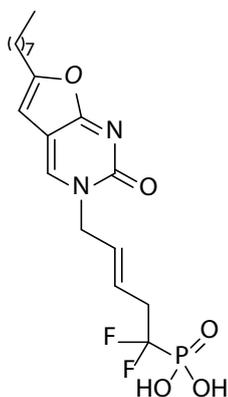
(E)-(1,1-difluoro-5-(2-oxo-6-pentylfuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 287



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from diethyl (E)-(1,1-difluoro-5-(2-oxo-6-pentylfuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 4, Method B. Yield : qtf, amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) : δ 8.45 (s, 1H, H₉), 6.45 (s, 1H, H₆), 5.89 (m, 2H, CH=CH), 4.71 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H, N-CH₂), 2.86 (td, *J* = 16.3, 13.5, 6.3 Hz, 2H, CH₂-CF₂), 2.72 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.72 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.39 (m, 4H, CH₂), 0.96 – 0.89 (m, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) :** δ 177.4 (C_{quat}), 172.7 (C_{quat}), 162.0 (C_{quat}), 157.3 (C_{quat}), 143.0 (C₉), 129.5 (CH=CH), 127.4 (CH=CH), 110.7 (C_{quat}), 100.6 (C₆), 54.2 (N-CH₂), 38.7 – 37.9 (m, CH₂-CF₂), 32.3 (CH₂), 28.9 (CH₂), 27.7 (CH₂), 23.3 (CH₂), 14.2 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -114.37 (d, ²*J*_{P-F} = 105.3 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 5.14 (t, ²*J*_{P-F} = 105.3 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₆H₂₀F₂N₂O₅P 389.1083 found 389.1080.

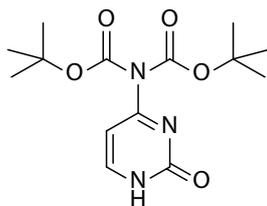
(E)-(1,1-difluoro-5-(6-octyl-2-oxofuro[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl)pent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 288



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from diethyl (E)-(5-(5-(dec-1-yn-1-yl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonate following general procedure 7 & 4, Method B. Yield : 75%, amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) : δ 8.49 (s, 1H, H₉), 6.48 (s, 1H, H₆), 5.91 (m, 2H, CH=CH), 4.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H, N-CH₂), 4.09 – 3.98 (m, 2H, CH₂), 2.87 (m, 2H, CH₂-CF₂), 2.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.72 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.29 (bs, 10H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) :** δ 178.2 (C_{quat}), 172.3 (C_{quat}), 162.5 (C_{quat}), 143.4 (C₉), 130.3 (CH=CH), 126.3 (CH=CH), 111.2 (C_{quat}), 100.7 (C₆), 54.2 (N-CH₂), 38.2 (m, CH₂-CF₂), 33.0 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.0 (CH₂), 23.7 (CH₂), 14.4 (CH₃). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -113.57 (d, ²*J*_{P-F} = 105.3 Hz, 2F). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 5.20 (t, ²*J*_{P-F} = 105.3 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H]⁻ calculated for C₁₉H₂₆F₂N₂O₅P 431.1552 found 431.1548.

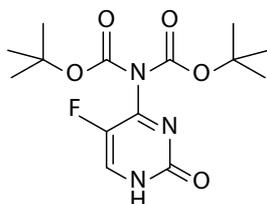
***N*₄,*N*₄-bis(Boc)-cytosine - 291**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from cytosine following general procedure 2. Yield : 59%, white solid.

CAS : 4330-20-5.

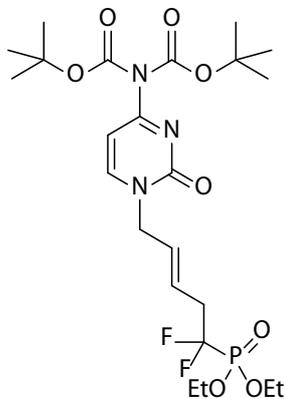
***N*₄,*N*₄-bis(Boc)-5-fluorocytosine - 292**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from 5-fluorocytosine following general procedure 2. Yield : 57%, white solid.

CAS : 1108637-28-0.

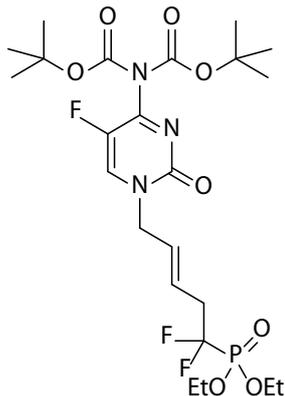
***N*₄,*N*₄-bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-cytosine - 293**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₄,*N*₄-bis(Boc)-cytosine following general procedure 3. Yield : 85%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.83 (m, 2H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 162.3, 154.9, 149.6, 147.1, 130.2, 124.9, 96.5, 84.8, 64.5, 51.1, 37.4 (td, *J* = 21.5, 15.4 Hz), 27.7, 16.4. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ -110.8 (t, *J* = 19.0 Hz), -111.1 (t, *J* = 19.0 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 7.09 (s), 6.44 (s), 5.78 (s). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₃H₃₇F₂N₃O₈P 552.2281, found 552.2284.

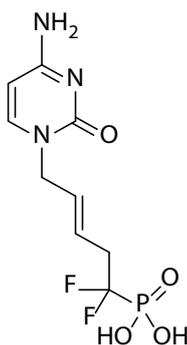
***N,N*-bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-fluorocytosine - 294**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N,N*-bis(Boc)-5-fluorocytosine following general procedure 3. Yield : 77%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.74 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.90–5.76 (m, 2H), 4.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H), 1.47 (s, 18H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) :** δ 156.0 (d, *J* = 14.3 Hz), 153.8, 149.0, 142.0, 139.6, 133.07 (d, *J* = 34.73 Hz), 129.2, 126.9 (m), 84.9, 64.8 (d, *J* = 8.5 Hz), 51.6, 37.6 (m), 29.8, 27.9, 16.5 (d, *J* = 5.5 Hz). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) :** δ –110.8, –111.1, –156.23. **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) :** δ 6.23 (t, ²*J*_{P-F} = 105.8 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₂₃H₃₅F₃N₃O₈P 570.2189 found 570.2187.

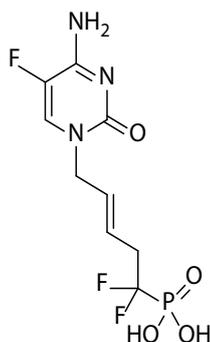
(*E*)-(5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 295



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N,N*-bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-cytosine following general procedure 4, Method A. Yield : qtf, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 7.95 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.87 (m, 2H), 4.44 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) :** δ 153.7, 153.4, 146.6, 136.0, 134.0, 133.7, 120.6, 36.9 (td, *J* = 22.1, 15.6 Hz). **¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) :** δ –113.19, –113.46, –170.84. **³¹P NMR (162 MHz, MeOD) :** δ 4.79 (t, ²*J*_{P-F} = 106.19 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₄F₂N₂O₅P 311.0602, found 311.0602.

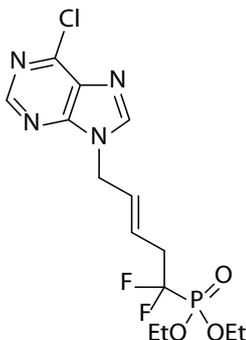
(*E*)-(5-(4-amino-5-fluoro-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 296



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₄,*N*₄-bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-fluorocytosine following general procedure 4, Method A. Yield : qtf, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.17–6.08 (m, 1H), 5.88 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.02–2.77 (m, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD):** δ 153.7, 153.4, 146.6, 136.0, 134.0, 133.7, 120.6, 36.9 (td, *J* = 22.1, 15.6 Hz). **¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD):** δ –113.3 (t, *J* = 19.0 Hz), –113.6 (t, *J* = 18.9 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, MeOD):** δ 5.68 (s), 5.04 (s), 4.40 (s). **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₃F₂N₃O₄P 295.0606 found 295.0607.

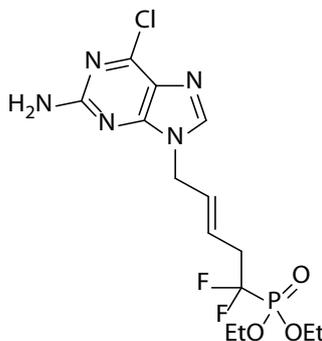
*N*₉-[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(6-chloro)purine - 299



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from 6-chloropurine following general procedure 3. Yield : 50%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 5.80 (m, 2H), 5.80 (dt, *J* = 15.6, 6.8 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.86 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 152.2, 152.1, 151.7, 151.1, 145.1, 131.6, 130.1, 129.2, 125.8, 64.7, 45.5, 37.6, 37.4, 37.2, 37.0, 16.5. **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃):** δ –114.1, –113.7. **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃):** δ 6.3. **HRMS-ESI (m/z):** [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₉ClF₂N₄O₃P 395.0848, found: 395.0845.

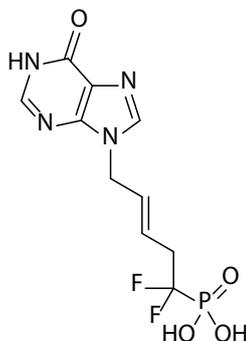
*N*₉-[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(2-amino-6-chloro)purine - 300



Procedure: The title compound was obtained in 1 step starting from 6-chloro-2-aminopurine following general procedure 3. Yield : 59%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.80 (s, 1H), 5.90–5.75 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.68 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.85 (m, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** : δ 159.1, 153.6, 151.3, 142.0, 129.7, 125.2, 124.8 (dd, *J* = 11.0, 5.6 Hz), 64.6 (d, *J* = 6.9 Hz), 44.9, 37.2 (td, *J* = 21.6, 15.6 Hz), 16.4 (d, *J* = 5.4 Hz). **¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃)** : δ –110.9 (t, *J* = 18.9 Hz), –111.2 (t, *J* = 18.9 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃)** : δ 7.10 (dt, *J* = 14.8, 7.3 Hz), 6.44 (dt, *J* = 14.6, 7.1 Hz), 5.78 (dt, *J* = 15.0, 7.3 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₂₀ClF₂N₅O₃P 410.0955 found 410.0958.

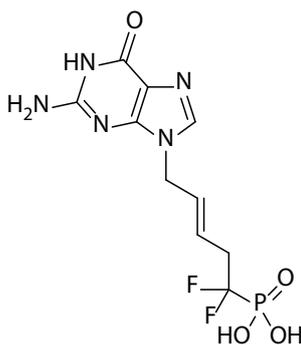
***N*₉-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-hypoxanthine - 301**



Procedure : To a stirred solution of *N*₉-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(6-chloro)purine (100 mg, 0.254 mmol) in DCM_{anh} (0.15 M) was added TMSBr (5 eq). The mixture was stirred for 16h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The residue was treated with 1 M HCl (4 mL) under reflux and then volatiles were removed in vacuo. Crystalline material was collected and washed with EtOAc to yield the desired product (44 mg, 54%) as an amorphous solid. Yield : 54%, amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 12.31 (s, 1H), 8.08 (t, *J* = 10.6 Hz, 2H), 7.29–6.90 (m, 1H), 5.95–5.88 (m, 1H), 5.73–5.65 (m, 1H), 4.78 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 19.7 Hz, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 157.0, 148.6, 146.1, 140.4, 130.5, 124.7 (d, *J* = 5.0 Hz), 124.1, 45.1, 37.2, 37.0–36.5 (m). **¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ –111.8 (t, *J* = 19.8 Hz), –112.1 (t, *J* = 19.8 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 4.12 (t, *J* = 4.0 Hz), 3.51 (t, *J* = 4.6 Hz), 2.91 (t, *J* = 4.5 Hz). **HRMS-ESI (m/z)** : [M-H][–] calculated for C₁₀H₁₀F₂N₄O₄P 319.0413 found 319.0417.

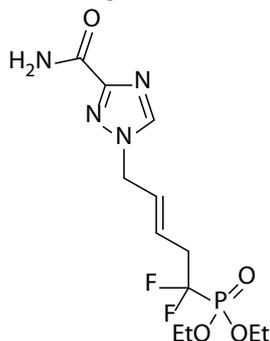
***N*₉-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-guanine - 302**



Procedure : To a stirred solution of *N*₉-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(2-amino-6-chloro)purine (100 mg, 0.244 mmol) in DCM_{anh} (0.15 M) was added TMSBr (5 eq). The mixture was stirred for 16h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The residue was treated with 1 M HCl (4 mL) under reflux and then volatiles were removed in vacuo. Crystalline material was collected and washed with EtOAc to yield the desired product (15 mg, 60%) as an amorphous solid. Yield : 60%, amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 9.08 (s, 2H), 8.11 (s, 1H), 6.02 (s, 4H), 4.88 (d, *J* = 3.9 Hz, 4H), 2.92 (t, *J* = 18.7 Hz, 4H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)** : δ 162.0, 155.9, 153.7, 150.1, 136.6, 127.9–127.4 (m), 107.4, 46.1, 36.9 (d, *J* = 15.5 Hz). **¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD)** : δ –113.1 (t, *J* = 18.8 Hz), –113.4 (t, *J* = 18.8 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, MeOD)** : δ 5.68 (s), 5.30 (d, *J* = 103.5 Hz), 4.35 (s). **HRMS-ESI (m/z)** : [M-H][–] calculated for C₁₀H₁₁F₂N₅O₄P 334.0522 found 334.0529.

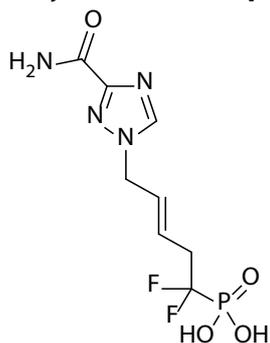
***N*₁-[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(3-carbamoyl)-1,2,4-triazol - 304**



Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from 1*H*-1,2,4-triazole-3-carboxamide following general procedure 3. Yield : 42%, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 8.49 (s, 1H), 6.04–5.96 (m, 1H), 5.85–5.71 (m, 1H), 4.93 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.34–4.22 (m, 4H), 2.99–2.80 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) :** δ 159.4, 149.6, 149.5–149.1 (m), 145.9, 130.7, 123.2 (dd, *J* = 10.9, 6.0 Hz), 120.4, 118.2, 64.8 (d, *J* = 7.0 Hz), 51.6, 45.7, 36.9 (dd, *J* = 21.6, 6.3 Hz), 15.4. **¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) :** δ –111.8 (t, *J* = 19.2 Hz), –112.1 (t, *J* = 19.2 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, MeOD) :** δ 7.21 (dt, *J* = 15.7, 7.9 Hz), 6.54 (dt, *J* = 15.8, 7.9 Hz), 5.87 (dt, *J* = 15.9, 7.9 Hz). **HRMS-ESI (m/z) :** [M+H]⁺ calculated for C₁₂H₂₀F₂N₄O₄P 354.1185 found 354.1187.

(*E*)-(5-(3-carbamoyl-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-1,1-difluoropent-3-en-1-yl)phosphonic acid - 305



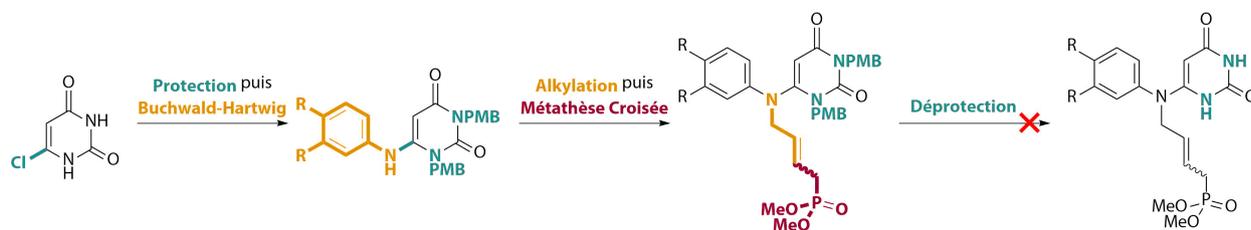
Procedure : The title compound was obtained in 1 step starting from *N*₁-[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-(3-carbamoyl)-1,2,4-triazol following general procedure 4 Method A. Yield : qtf, colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) : δ 8.07 (s, 1H), 6.02–5.73 (m, 2H), 5.29 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.97–2.72 (m, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) :** δ 159.5, 149.5, 145.9, 129.8, 127.3, 124.4 (d, *J* = 5.8 Hz), 51.8, 36.9–36.4 (m). **¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) :** δ –114.3 (t, *J* = 19.3 Hz), –114.6 (t, *J* = 19.3 Hz). **³¹P NMR (162 MHz, MeOD) :** δ 5.68 (s), 5.30 (d, *J* = 103.5 Hz), 4.75 (s). **HRMS-ESI (m/z) :** [M-H][–] calculated for C₈H₁₀F₂N₄O₄P 295.0413 found 295.0414.

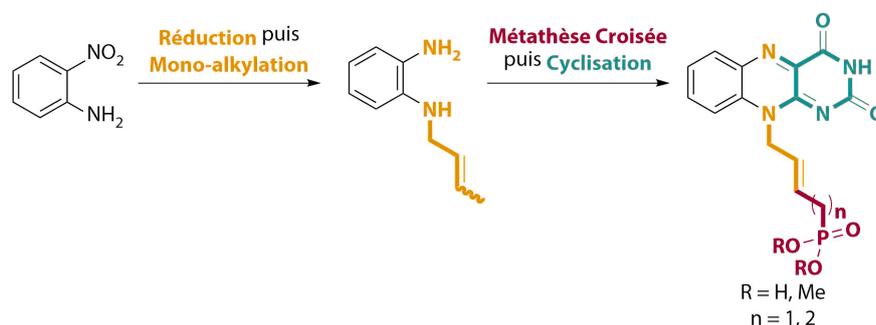
CONCLUSION GENERALE

Dans ce contexte d'apparition de bactéries multi-résistantes (BMRs) induite par l'utilisation massive de chimiothérapies antibactériennes, la recherche de nouvelles cibles biochimiques et la conception de structures inédites constitue alors d'autant plus un challenge d'actualité. Depuis la découverte de la FDTs par l'équipe de Myllykallio en 2002 qui a permis de mettre en évidence un nouveau chemin biochimique responsable de la biosynthèse de novo de la thymine chez une multitude de pathogènes bactériens, les études postérieures ont révélé des différences majeures avec l'enzyme humaine au niveau du mécanisme, des substrats et de la structure de cette dernière. Ainsi, une grande tolérance conformationnelle du site actif de cette enzyme a été observée ce qui a induit notre équipe à considérer cette cible biochimique comme une cible d'intérêt pour le développement de nouveaux ANPs à visée antibactérienne.

- Dans la première partie, nous avons ainsi porté notre intérêt sur la synthèse de nouveaux ANPs à noyaux tricycliques aromatiques substitués par nos chaînes d'intérêt sur l'azote centrale N_{10} de ces derniers. Pour ce faire, le développement d'une nouvelle méthode de synthèse convergente par deux étapes clés de réaction de Buchwald-Hartwig entre un synthon 6-chlorouracile bis-protégé et une aniline puis par une étape de métathèse croisée entre les synthons 6-anilinoouraciles monocrotylés avec nos partenaires phosphonates, s'est révélé infructueuse à l'étape finale de déprotection.

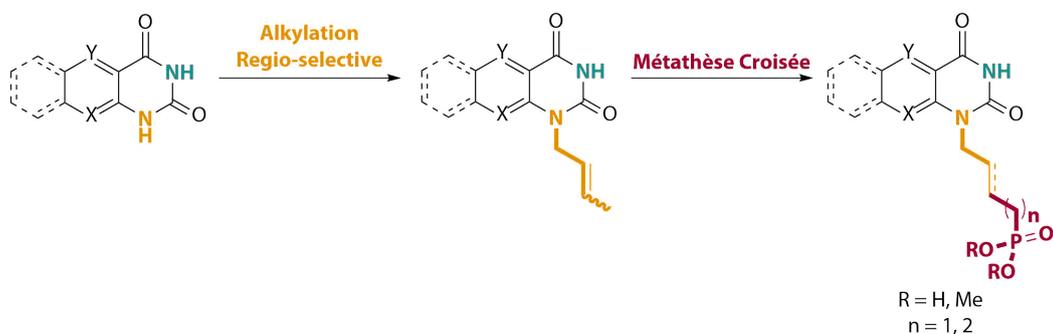


Ainsi, après une recherche bibliographique étendue, nous nous sommes alors reportés aux méthodes classiques permettant l'accès aux dérivés tricycliques flavine et 5-déazaflavine respectivement. Deux approches ont été explorées, la première, consistant à placer l'étape de métathèse croisée avant l'étape de cyclisation responsable de la formation finale du noyau isoalloxazine, n'a pas permis l'obtention du produit de cyclisation. A l'inverse, la seconde approche dont l'attrait provient de la convergence supérieure qu'elle présente par le fait que la métathèse croisée a été réalisée de manière postérieure à la formation du noyau isoalloxazine.



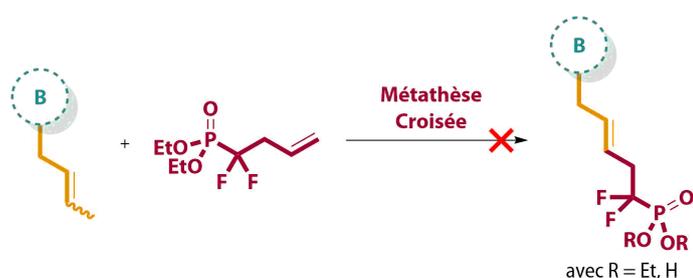
Cette dernière a permis la synthèse de nos composés d'intérêt et avec une évaluation biologique qui s'est révélée décevante, la synthèse d'analogues par l'emploi de différentes 2-nitroanilines sera entreprise.

- Dans le second chapitre, l'intérêt a été porté sur la synthèse de nouveaux ANPs basés sur une multitude de bases non canoniques substituées en N_7 par notre chaîne butényle ou pentényle phosphonate sous forme insaturée ou saturée. Pour ce faire, nous avons exploré plusieurs voies de synthèse dont la construction du noyau pyrimidine, la protection régiosélective et enfin par une nouvelle méthodologie d'alkylation régiosélective qui a permis l'obtention d'intermédiaire N_7 -crotylée. La réactivité de ces précurseurs de métathèse croisée a ensuite été étudié par l'emploi de plusieurs complexes ruthéniques ce qui a permis la synthèse des produits d'intérêts.

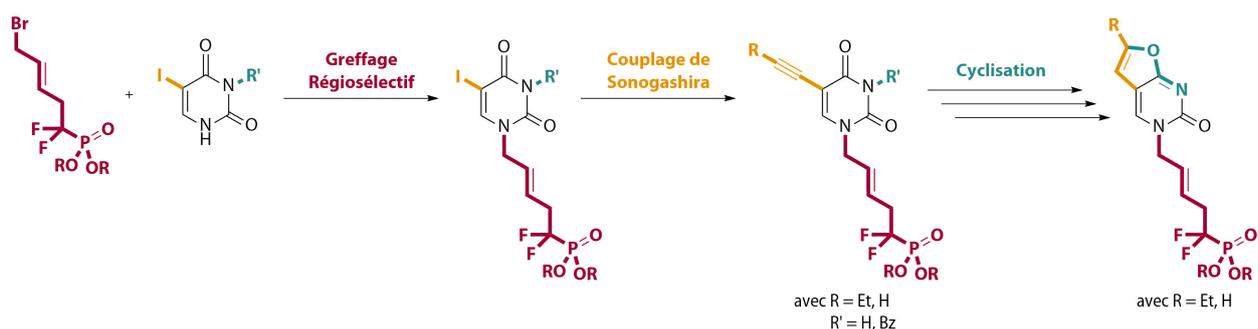


L'activité anti-FDTS de ces derniers a ensuite été évaluée et ces essais n'ont pas résultés en une inhibition significative de cette enzyme *in-vitro*. Le passage de ces molécules sous forme prodrogue serait une alternative intéressante afin d'envisager de nouvelles évaluations biologiques *in-vivo* en tant qu'antibactériens et antiviraux.

- Dans la dernière partie, nous avons cherché à développer nos ANPs avec le motif d'intérêt difluorométhylphosphonate (PCF₂) qui est considéré dans la littérature comme le meilleur mime du phosphate nucléotidique. Dans un premier temps, afin d'insérer ce dernier sur des charpentes connues d'ANPs, nous avons décidé de développer une étape de métathèse croisée entre un intermédiaire fluoroalcène et les bases hétérocycliques canoniques crotylées ce qui n'a pas résulté en l'obtention des composés souhaités par la faible réactivité des partenaires fluorés vis-à-vis du catalyseur de métathèse.



De ce fait, l'approche menant à ces composés a ainsi été modifié par la mise en place d'une étape d'alkylation régiosélective sur des bases canoniques protégées ou des précurseurs de ces dernières dans le cas des bases puriques.



La petite librairie de composés synthétisés a été évalué *in vivo* sur différentes lignées cellulaires infectées par une multitude de virus à ADN et ARN mais ne s'est pas révélé significative. Enfin, basé sur les travaux de l'équipe de Herdewijn, nous avons exploré de nouvelles structures originales en tant que potentiels inhibiteurs de la FDTs de la série 1 et avec l'incorporation de ce même motif d'intérêt PCF₂, les tests biologiques préliminaires ont été effectués sur les composés synthétisés et l'exemplification est nécessaire afin d'accéder à un potentiel lead.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ *Medical Microbiology*. 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX), 1996.
- ² Kamada, N.; Chen, G. Y.; Inohara, N.; Nunez, G., Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **2013**, *14*, 685-90.
- ³ Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D., Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21*, 8787-803.
- ⁴ Collins, S. M., A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2014**, *11*, 497-505.
- ⁵ a) Pham, T. A. N.; Lawley, T. D. Emerging Insights on Intestinal Dysbiosis during Bacterial Infections. *Curr Opin Microbiol* **2014**, *17*, 67-74. b) Levy, M.; Kolodziejczyk, A. A.; Thaïss, C. A.; Elinav, E. Dysbiosis and the Immune System. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 219-232. c) Lupp, C.; Robertson, M. L.; Wickham, M. E.; Sekirov, I.; Champion, O. L.; Gaynor, E. C.; Finlay, B. B., Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 119-29 .
- ⁶ Wilson, J. W., Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* **2002**, *78*, 216-224.
- ⁷ Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Royal Soc Exper Biol Med* **1942**, *51*, 386-389.
- ⁸ WHO, Antimicrobial resistance, Fact Sheet n°194, Updated November 2017.
- ⁹ Teillant, A.; Gandra, S.; Barter, D. J.; Laxminarayan, R. Potential Burden of Antibiotic Resistance on Surgery and Cancer Chemotherapy Antibiotic Prophylaxis in the USA: A Literature Review and Modelling Study. *Lancet Infectious Diseases* **2015**, *15*, 1429-1437.
- ¹⁰ Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T* **2015**, *40*, 277-283.
- ¹¹ von Wintersdorff, C. J. H.; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H.
- ¹² M.; Wolffs, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* **2016**, *7*.
- ¹³ Allen, H. K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen, K. A.; Davies, J.; Handelsman, J. Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 251-259.
- ¹⁴ Bentley, R., Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. *Chem Rev* **2000**, *100*, 3801-3826.
- ¹⁵ Ehrlich, P.; Bertheim, A. Über Das Salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-Dioxy-Arsenobenzol Und Seine Nächsten Verwandten. *Ber Dtsch Chem Ges* **1912**, *45*, 756-766.
- ¹⁶ Lloyd, N. C.; Morgan, H. W.; Nicholson, B. K.; Ronimus, R. S. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 941-944.
- ¹⁷ Ligon, B. L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. *Semin Pediatr Infect Dis* **2004**, *15*, 52-57.
- ¹⁸ Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529*, 336-343.
- ¹⁹ Lewis, K. Platforms for Antibiotic Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 371-387.
- ²⁰ a) Wilson, P. M.; Danenberg, P. V.; Johnston, P. G.; Lenz, H.-J.; Ladner, R. D. Standing the Test of Time: Targeting Thymidylate Biosynthesis in Cancer Therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**, *11*, 282-298. b) Gonen, N.; Assaraf, Y. G. Antifolates in Cancer Therapy: Structure, Activity and Mechanisms of Drug Resistance. *Drug Resist Updat* **2012**, *15*, 183-210.
- ²¹ Yuthavong, Y. Basis for Antifolate Action and Resistance in Malaria. *Microbes Infect* **2002**, *4*, 175-182.
- ²² Bourne, C. R. Utility of the Biosynthetic Folate Pathway for Targets in Antimicrobial Discovery. *Antibiotics (Basel)* **2014**, *3*, 1-28. b) Hawser, S.; Lociuoro, S.; Islam, K. Dihydrofolate Reductase Inhibitors as Antibacterial Agents. *Biochem Pharmacol* **2006**, *71*, 941-948. c) Then, R. L. Antimicrobial Dihydrofolate Reductase Inhibitors - Achievements and Future Options: Review. *J Chemother* **2004**, *16*, 3-12.
- ²³ Garg, D.; Henrich, S.; Salo-Ahen, O. M. H.; Myllykallio, H.; Costi, M. P.; Wade, R. C. Novel Approaches for Targeting Thymidylate Synthase to Overcome the Resistance and Toxicity of Anticancer Drugs. *J Med Chem* **2010**, *53*, 6539-6549.
- ²⁴ Myllykallio, H.; Lipowski, G.; Leduc, D.; Filee, J.; Forterre, P.; Liebl, U. An Alternative Flavin-Dependent Mechanism for Thymidylate Synthesis. *Science* **2002**, *297*, 105-107.
- ²⁵ Mathews, I. I. Flavin-Dependent Thymidylate Synthase as a Drug Target for Deadly Microbes: Mutational Study and a Strategy for Inhibitor Design. *J Bioterr & Biodef* **2013**, *Suppl 12* (650), 004.
- ²⁶ Carreras, C. W.; Santi, D. V. The Catalytic Mechanism and Structure of Thymidylate Synthase. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 721-762.
- ²⁷ a) Heidelberger, C.; Mooren, D.; Plevin, E.; Scheiner, J.; Griesbach, L.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Schnitzer, R. J.; Duschinsky, R. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179*, 663. b) Danenberg, P. V.; Langenbach, R. J.; Heidelberger, C. Fluorinated Pyrimidines. Structures of Reversible and Irreversible Complexes of Thymidylate Synthetase and Fluorinated

- Pyrimidine Nucleotides. *Biochemistry* **1974**, *13*, 926–933. c) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 330–338.
- 28 Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Kohen, A. Mechanisms and Inhibition of Uracil Methylating Enzymes. *Bioorg Chem* **2012**, *43*, 37–43.
- 29 a) Koehn, E. M.; Fleischmann, T.; Conrad, J. a; Palfey, B. a; Lesley, S. a; Mathews, I. I.; Kohen, A. An Unusual Mechanism of Thymidylate Biosynthesis in Organisms Containing the ThyX Gene. *Nature* **2009**, *458*, 919–923. b) Koehn, E. M.; Kohen, A. Flavin-Dependent Thymidylate Synthase: A Novel Pathway towards Thymine. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *493*, 96–102.
- 30 Hong, B.; Maley, F.; Kohen, A. Role of Y94 in Proton and Hydride Transfers Catalyzed by Thymidylate Synthase. *Biochem* **2007**, *46*, 14188–14197.
- 31 Conrad, J. A.; Ortiz-Maldonado, M.; Hoppe, S. W.; Palfey, B. A. Detection of Intermediates in the Oxidative Half-Reaction of the FAD-Dependent Thymidylate Synthase from *Thermotoga Maritima*: Carbon Transfer without Covalent Pyrimidine Activation. *Biochemistry* **2014**, *53*, 5199–5207.
- 32 Mishanina, T. V.; Koehn, E. M.; Conrad, J. A.; Palfey, B. A.; Lesley, S. A.; Kohen, A. Trapping of an Intermediate in the Reaction Catalyzed by Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 4442–4448.
- 33 Mishanina, T. V.; Corcoran, J. M.; Kohen, A. Substrate Activation in Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 10597–10600.
- 34 Mishanina, T. V.; Yu, L.; Karunaratne, K.; Mondal, D.; Corcoran, J. M.; Choi, M. A.; Kohen, A. An Unprecedented Mechanism of Nucleotide Methylation in Organisms Containing ThyX. *Science* **2016**, *351*, 507–510.
- 35 Stull, F. W.; Bernard, S. M.; Sapra, A.; Smith, J. L.; Zuiderweg, E. R. P.; Palfey, B. A. Deprotonations in the Reaction of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3261–3269.
- 36 Giladi, M.; Bitan-Banin, G.; Mevarech, M.; Ortenberg, R. Genetic Evidence for a Novel Thymidylate Synthase in the Halophilic Archaeon *Halobacterium Salinarum* and in *Campylobacter Jejuni*. *FEMS Microbiol Lett* **2002**, *216*, 105–109.
- 37 a) Hardy, L. W.; Finer-Moore, J. S.; Montfort, W. R.; Jones, M. O.; Santi, D. V.; Stroud, R. M. Atomic Structure of Thymidylate Synthase: Target for Rational Drug Design. *Science* **1987**, *235*, 448–455. b) Kuhn, P.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Canaves, J. M.; Brinen, L. S.; Dai, X.; Deacon, A. M.; Elsliger, M. A.; Eshaghi, S.; Floyd, R.; *et al.* Crystal Structure of Thy1, a Thymidylate Synthase Complementing Protein from *Thermotoga Maritima* at 2.25 Å Resolution. *Proteins* **2002**, *49*, 142–145. c) Graziani, S.; Bernauer, J.; Skouloubris, S.; Graille, M.; Zhou, C.-Z.; Marchand, C.; Decottignies, P.; Tilbeurgh, H. van; Myllykallio, H.; Liebl, U. Catalytic Mechanism and Structure of Viral Flavin-Dependent Thymidylate Synthase ThyX. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 24048–24057.
- 38 Leduc, D.; Graziani, S.; Lipowski, G.; Marchand, C.; Maréchal, P. L.; Liebl, U.; Myllykallio, H. Functional Evidence for Active Site Location of Tetrameric Thymidylate Synthase X at the Interphase of Three Monomers. *PNAS* **2004**, *101*, 7252–7257. b) Koehn, E. M.; Perissinotti, L. L.; Moghram, S.; Prabhakar, A.; Lesley, S. A.; Mathews, I. I.; Kohen, A. Folate Binding Site of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *PNAS* **2012**, *109*, 15722–15727.
- 39 Esra Önen, F.; Boum, Y.; Jacquement, C.; Spanedda, M. V.; Jaber, N.; Scherman, D.; Myllykallio, H.; Herscovici, J. Design, Synthesis and Evaluation of Potent Thymidylate Synthase X Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 3628–3631.
- 40 Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; *et al.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 2'-Deoxyuridine Monophosphate Analogues As Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Med Chem* **2011**, *54*, 4847–4862.
- 41 Parchina, A.; Froeyen, M.; Margamuljana, L.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Briers, Y.; Lavigne, R.; Herdewijn, P.; Lescrinier, E. Discovery of an Acyclic Nucleoside Phosphonate That Inhibits *Mycobacterium Tuberculosis* ThyX Based on the Binding Mode of a 5-Alkynyl Substrate Analogue. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1373–1383.
- 42 Basta, T.; Boum, Y.; Briffotiaux, J.; Becker, H. F.; Lamarre-Jouenne, I.; Lambry, J.-C.; Skouloubris, S.; Liebl, U.; Graille, M.; Tilbeurgh, H. van; *et al.* Mechanistic and Structural Basis for Inhibition of Thymidylate Synthase ThyX. *Open Biol* **2012**, *2*, 120.
- 43 Skouloubris, S.; Djaout, K.; Lamarre, I.; Lambry, J.-C.; Anger, K.; Briffotiaux, J.; Liebl, U.; de Reuse, H.; Myllykallio, H. Targeting of *Helicobacter Pylori* Thymidylate Synthase ThyX by Non-Mitotoxic Hydroxy-Naphthoquinones. *Open Biol* **2015**, *5*.

- 44 Luciani, R.; Saxena, P.; Surade, S.; Santucci, M.; Venturelli, A.; Borsari, C.; Marverti, G.; Ponterini, G.; Ferrari, S.; Blundell, T. L.; *et al.* Virtual Screening and X-Ray Crystallography Identify Non-Substrate Analog Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Med Chem* **2016**, *59*, 9269–9275.
- 45 Abu El Asrar, R.; Margamuljana, L.; Klaassen, H.; Nijs, M.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Myllykallio, H.; Becker, H. F.; De Jonghe, S.; Herdewijn, P.; *et al.* Discovery of a New Mycobacterium Tuberculosis Thymidylate Synthase X Inhibitor with a Unique Inhibition Profile. *Biochem Pharmacol* **2017**, *135*, 69–78.
- 46 Gudipati, V.; Koch, K.; Lienhart, W.-D.; Macheroux, P. The Flavoproteome of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 535–544.
- 47 Lienhart, W.-D.; Gudipati, V.; Macheroux, P. The Human Flavoproteome. *Arch Biochem Biophys* **2013**, *535*, 150–162.
- 48 Sun, M.; Moore, T. A.; Song, P.-S. Molecular Luminescence Studies of Flavines. I. Excited States of Flavines. *J Am Chem Soc* **1972**, *94*, 1730–1740.
- 49 a) Land, E. J.; Swallow, A. J. One-Electron Reactions in Biochemical Systems as Studied by Pulse Radiolysis. II. Riboflavine. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2117–2125. b) Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH Dependence of the Absorption and Emission Behaviour of Riboflavin in Aqueous Solution. *Chem Phys* **2002**, *282*, 429–439. c) Brazard, J.; Usman, A.; Lacombe, F.; Ley, C.; Martin, M. M.; Plaza, P. New Insights into the Ultrafast Photophysics of Oxidized and Reduced FAD in Solution. *J Phys Chem A* **2011**, *115*, 3251–3262.
- 50 Ghisla, S.; Edmondson, D. E. Flavin Coenzymes. In *eLS*; John Wiley & Sons Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014.
- 51 Barrio, J. R.; Tolman, G. L.; Leonard, N. J.; Spencer, R. D.; Weber, G. Flavin 1, N6-Ethenoadenine Dinucleotide: Dynamic and Static Quenching of Fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 941–943.
- 52 Kao, Y.-T.; Saxena, C.; He, T.-F.; Guo, L.; Wang, L.; Sancar, A.; Zhong, D. Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13132–13139. b) Zhao, R.-K.; Lukacs, A.; Haigney, A.; Brust, R.; Greetham, G. M.; Towrie, M.; Tonge, P. J.; Meech, S. R. Ultrafast Transient Mid IR to Visible Spectroscopy of Fully Reduced Flavins. *Chem Phys* **2011**, *13*, 17642–17648.
- 53 Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. pH Dependence of the Absorption and Emission Behaviour of Riboflavin in Aqueous Solution. *Chem Phys* **2002**, *282*, 429–439.
- 54 Cerletti, P.; Siliprandi, N. Pure Crystalline Flavin Adenine Dinucleotide. *Arch Biochem Biophys* **1958**, *76*, 214–224.
- 55 Van Den Berg, P. A. W.; Widengren, J.; Hink, M. A.; Rigler, R.; Visser, A. J. W. G. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Flavins and Flavoenzymes: Photochemical and Photophysical Aspects. *Spectrochim Acta A* **2001**, *57*, 2135–2144.
- 56 a) Weber, G. Fluorescence of Riboflavin and Flavin-Adenine Dinucleotide. *Biochem J* **1950**, *47*, 114–121. b) Bowd, A., Byrom, P., Hudson, J. B. and Turnbull, J. H. Excited States of Flavin Coenzymes - III. Fluorescence and Phosphorescence Emissions. *Photochem Photobiol* **1968**, *8*, 1–10.
- 57 a) Visser, A. J. W. G. Kinetics of Stacking Interactions in Flavin Adenine Dinucleotide from Time-Resolved Flavin Fluorescence. *Photochem Photobiol* **1984**, *40*, 703–706. b) Van Den Berg, P. A. W.; Feenstra, K. A.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C.; Visser, A. J. W. G. Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics. *J Phys Chem B* **2002**, *106*, 8858–8869. c) Nakabayashi, T.; Islam, M. S.; Ohta, N. Fluorescence Decay Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide in a Mixture of Alcohol and Water in the Femtosecond and Nanosecond Time Range. *J Phys Chem B* **2010**, *114*, 15254–15260.
- 58 a) Karen, A.; Ikeda, N.; Mataga, N.; Tanaka, F. Picosecond Laser Photolysis Studies of Fluorescence Quenching Mechanisms of Flavin: A Direct Observation of Indole-Flavin Singlet Charge Transfer State Formation in Solutions and Flavoenzymes. *Photochem Photobiol* **1983**, *37*, 495–502. b) Mataga, N.; Chosrowjan, H.; Shibata, Y.; Tanaka, F. Ultrafast Fluorescence Quenching Dynamics of Flavin Chromophores in Protein Nanospace. *J Phys Chem B* **1998**, *102*, 7081–7084.
- 59 Baugh, L.; Phan, I.; Begley, D. W.; Clifton, M. C.; Armour, B.; Dranow, D. M.; Taylor, B. M.; Muruthi, M. M.; Abendroth, J.; Fairman, J. W.; *et al.* Increasing the Structural Coverage of Tuberculosis Drug Targets. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 142–148.
- 60 Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem Rev* **1996**, *96*, 3147–3176.
- 61 Thèse du Dr. Romain Laporte, soutenue en Octobre 2016
- 62 Otani, S.; Takatsu, M.; Nakano, M.; Kasai, S.; Miura, R.; Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **1974**, *27*, 88–89.
- 63 a) Kasai, S.; Kubo, Y.; Yamanaka, S.; Anti-riboflavin activity of 8N-alkyl analogues of roseoflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1978**, *24*, 339–350. b) Kasai, S.; Yamanaka, S.; Wang,

- S.C.; Matsui, K.; Anti-riboflavin activity of 8-O-alkyl derivatives of riboflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1979**, *25*, 289–298.
- ⁶⁴ Pedrolli, D. B.; Jankowitsch, F.; Schwarz, J.; Langer, S.; Nakanishi, S.; Mack, E. F. and M. Riboflavin Analogs as Antiinfectives: Occurrence, Mode of Action, Metabolism and Resistance. *Curr Pharm Des* **2013**, *19*, 2552–2560.
- ⁶⁵ a) Schrier, A.; Greebel, G.; Attia, H.; Trokel, S.; Smith, E. F. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Riboflavin and Ultraviolet Light on Staphylococcus Aureus, Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus, and Pseudomonas Aeruginosa. *J Refract Surg* **2009**, *25*, S799-802. b) Makdoumi, K.; Bäckman, A.; Mortensen, J.; Crafoord, S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Photo-Activated Riboflavin Using Ultraviolet Light (UVA). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2010**, *248*, 207–212. c) Ahgilan, A.; Sabaratnam, V.; Periasamy, V. Antimicrobial Properties of Vitamin B2. *Int J Food Prop* **2016**, *19*, 1173–1181.
- ⁶⁶ a) Light, D. R.; Walsh, C. Flavin Analogs as Mechanistic Probes of Adrenodoxin Reductase-Dependent Electron Transfer to the Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P-450 of the Adrenal Cortex. *J Biol Chem* **1980**, *255*, 4264–4277. b) Zanetti, G.; Massey, V.; Curti, B. FAD Analogues as Mechanistic and “binding-Domain” Probes of Spinach Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. *Eur J Biochem* **1983**, *132*, 201–205. c) Ghisla, S.; Massey, V. New Flavins for Old: Artificial Flavins as Active Site Probes of Flavoproteins. *Biochem J* **1986**, *239*, 1–12. d) Murthy, Y. V. S. N.; Massey, V. [41] Syntheses and Applications of Flavin Analogs as Active Site Probes for Flavoproteins. In *Methods Enzymol; Vitamins and Coenzymes Part J*; Academic Press, **1997**, *280*, 436–460.
- ⁶⁷ a) Hasford, J. J.; Rizzo, C. J. Linear Free Energy Substituent Effect on Flavin Redox Chemistry. *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 2251–2255. b) Cibulka, R. Artificial Flavin Systems for Chemoselective and Stereoselective Oxidations. *Eur J Org Chem* **2015**, 915–932. c) Kormányos, A.; Hossain, M. S.; Ghadimkhani, G.; Johnson, J. J.; Janáky, C.; de Tacconi, N. R.; Foss, F. W.; Paz, Y.; Rajeshwar, K. Flavin Derivatives with Tailored Redox Properties: Synthesis, Characterization, and Electrochemical Behavior. *Chem Eur J* **2016**, *22*, 9209–9217.
- ⁶⁸ Kasai, S.; Kubo, Y.; Yamanaka, S.; Hirota, T.; Sato, H.; Tsuzukida, Y.; Matusi, K., S. Anti-riboflavin activity of 8N-alkyl analogues of roseoflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1978**, *24*, 339-350.
- ⁶⁹ Kasai, S.; Yamanaka, S.; Wang, S.C.; Matsui, K. Anti-riboflavin activity of 8-O-alkyl derivatives of riboflavin in some Gram-positive bacteria. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1979**, *25*, 289-298.
- ⁷⁰ Coish, P.; Dixon, B.; Osterman, D.; Aristoff, P.; Navia, M.; Scivolino, F.; Avola, S.; Baboulas, N.; Belliotti, T.; Bello, A.; *et al.* Flavin Derivatives. WO2011126567 (A1), October 13, 2011. b) Coish, P. D. g; Aristoff, P. A.; Dixon, B. R. Flavin Derivatives. WO2012109458 (A1), August 16, 2012.
- ⁷¹ a) Yoneda, F.; Sakuma, Y.; Ichiba, M.; Shinomura, K. Syntheses of Isoalloxazines and Isoalloxazine 5-Oxides. A New Synthesis of Riboflavin. *J Am Chem Soc* **1976**, *98*, 830–835. b) Carlson, E. E.; Kiessling, L. L. Improved Chemical Syntheses of 1- and 5-Deazariboflavin. *J Org Chem* **2004**, *69*, 2614–2617.
- ⁷² a) Roy, V.; Kumamoto, H.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Topalis, D.; Deville-Bonne, D.; Balzarini, J.; Neyts, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; *et al.* Cross-Metathesis Mediated Synthesis of New Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1399–1402. b) Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232. c) Pradère, U., Clavier, H., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The Shortest Strategy for Generating Phosphonate Prodrugs by Olefin Cross-Metathesis - Application to Acyclonucleoside Phosphonates. *Eur J Org Chem* **2011**, 7324–7330. d) Montagu, A., Pradère, U., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. Expedient convergent procedure for the preparation of bis(POC) prodrugs of new (E)-4-phosphono-but-2-en-1-yl nucleosides. *Tetrahedron*. **2011**, *67*, 5319–5328. e) Agrofoglio, L.A., Roy, V. Novel antiviral acyclic nucleoside phosphonates, WO2012034719 (A1) 2012-03-22. f) Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408. g) Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Olefin Cross-Metathesis for the Synthesis of Alkenyl Acyclonucleoside Phosphonates. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- ⁷³ Furstner, A. Olefin metathesis and beyond. *Angew Chem Int Ed* **2000**, *39*, 3013–3043. (b) Hoveyda, A. H. & Zhugralin, A. R. The remarkable metal-catalyzed olefin metathesis reaction. *Nature*. **2007**, *450*, 243–251.
- ⁷⁴ a) Connon S. J., Blechert S. Recent developments in olefin cross-metathesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 1900–1923. b) Diver, S. T.; Giessert, A. J. Enyne metathesis (enyne bond reorganization). *Chem Rev* **2004**, *104*, 1317–1382. c) Deiters, A.; Martin, S. F. Synthesis of oxygen- and nitrogen-containing heterocycles by ring-closing metathesis. *Chem Rev* **2004**, *104*, 2199–2238. d) Van Otterlo, W. A. L.; De Koning, C. B. Metathesis in the synthesis of aromatic compounds. *Chem Rev* **2009**, *109*, 3743–3782.

- 75 Yu, X.; Sun, D. Macrocyclic Drugs and Synthetic Methodologies toward Macrocycles. *Molecules* **2013**, *18*, 6230–6268.
- 76 Hérisson, J.-L.; Chauvin, Y., Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfinacycliques. *Makromol Chem* **1971**, *141*, 161–176.
- 77 a) Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Bazan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M.; O'Regan, M. Synthesis of Molybdenum Imido Alkylidene Complexes and Some Reactions Involving Acyclic Olefins. *J Am Chem Soc* **1990**, *112*, 3875–3886. b) Bazan, G. C.; Oskam, J. H.; Cho, H. N.; Park, L. Y.; Schrock, R. R. Living Ring-Opening Metathesis Polymerization of 2,3-Difunctionalized 7-Oxanorbornenes and 7-Oxanorbornadienes by Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-Iso-Pr₂-2,6)(O-Tert-Bu)₂ and Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-Iso-Pr₂-2,6)(OCMe₂CF₃)₂. *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 6899–6907.
- 78 a) Fu, G. C.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. Catalytic ring-closing metathesis of functionalized dienes by a ruthenium carbene complex. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 9856–9857. b) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R.H. A series of well-defined metathesis catalysts-synthesis of [RuCl₂(=CHR')(PR₃)₂] and its reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **1995**, *34*, 2039–2041.
- 79 Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C.W.; Grubbs, R.H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Org Lett* **1999**, *1*, 953–956.
- 80 Scholl, M.; Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Grubbs, R.H. Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazolin-2-ylidene ligands. *Tet Lett* **1999**, *40*, 2247–2250.
- 81 Tomasek, J.; Schatz, J. Olefin Metathesis in Aqueous Media. *Green Chem* **2013**, *15*, 2317–2338.
- 82 Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L. Olefin metathesis-active ruthenium complexes bearing a nucleophilic carbene ligand. *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 2674–2678.
- 83 Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B.L.; Hoveyda, A. H. Efficient and recyclable monomeric and dendritic Ru-based metathesis catalysts. *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 8168–8179.
- 84 Love, J. A.; Morgan, J. P.; Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. A Practical and Highly Active Ruthenium-Based Catalyst That Effects the Cross Metathesis of Acrylonitrile. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 4035–4037.
- 85 Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P. & Grubbs, R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 11360–11370.
- 86 a) Yoneda, F.; Koga, M. 1,3,9,11,12,14-Hexa-Azapentacene-2,4,8,10(3H,9H,12H,14H)-Tetraones (Doubled 5-Deazaflavins) with Potential for Oxido Reduction. *J Chem Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, *7*, 1809–1812. b) Kajiki, T.; Moriya, H.; Hoshino, K.; Kuroi, T.; Kondo, S.; Nabeshima, T.; Yano, Y. Functionalized Flavin Receptors. Regulation of Redox Properties of 6-Azaflavin via Hydrogen Bondings with Melamine Derivatives Bearing Guanidinium Ion(s) in Organic Solvents. *J Org Chem* **1999**, *64*, 9679–9689. c) Dudkin, S.; Iaroshenko, V. O.; Sosnovskikh, V. Y.; Tolmachev, A. A.; Villinger, A.; Langer, P. Synthesis and Reactivity of 5-Polyfluoroalkyl-5-Deazaalloxazines. *Org Biomol Chem* **2013**, *11*, 5351–5361.
- 87 Mizar, P.; Niebuhr, R.; Hutchings, M.; Farooq, U.; Wirth, T. Thioamination of Alkenes with Hypervalent Iodine Reagents. *Chem Eur J* **2016**, *22*, 1614–1617.
- 88 Choi, S.; Breugst, M.; Houk, K. N.; Poulter, C. D. δ-Deuterium Isotope Effects as Probes for Transition-State Structures of Isoprenoid Substrates. *J Org Chem* **2014**, *79*, 3572–3580.
- 89 Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protection for the Amino Group. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 2006; pp 696–926.
- 90 Yang, Y.; Chen, Z.; Rao, Y. The Synthesis of Diarylsulfones with Simple Arenes and K₂S₂O₈ through Double C–S Bond Formation. *Chem Commun* **2014**, *50*, 15037–15040
- 91 Charrier, N.; Demont, E.; Dunsdon, R.; Maile, G.; Naylor, A.; O'Brien, A.; Redshaw, S.; Theobald, P.; Vesey, D.; Walter, D. Synthesis of Indoles: Efficient Functionalisation of the 7-Position. *Synthesis* **2006**, *20*, 3467–3477.
- 92 a) Farrán, Á.; Claramunt, R.; López, C.; Pinilla, E.; Torres, R.; Elguero, J. Structural Characterization of Alloxazine and Substituted Isoalloxazines: NMR and X-Ray Crystallography. *Arkivoc* **2006**, *2007*, 20. b) Kaur, A.; Haghghatbin, M. A.; Hogan, C. F.; New, E. J. A FRET-Based Ratiometric Redox Probe for Detecting Oxidative Stress by Confocal Microscopy, FLIM and Flow Cytometry. *Chem Commun* **2015**, *51*, 10510–10513.
- 93 a) Coish, P. D. g; Aristoff, P. A.; Dixon, B. R. Flavin Derivatives. WO2012109458 (A1), August 16, 2012. b) Legrand, Y.-M.; Gray, M.; Cooke, G.; Rotello, V. M. Model Systems for Flavoenzyme Activity: Relationships between Cofactor Structure, Binding and Redox Properties. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 15789–15795.
- 94 Adak, S.; Begley, T. P. Dibenzothiophene Catabolism Proceeds via a Flavin-N5-Oxide Intermediate. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 6424–6426.

- ⁹⁵ Shen, G.-B.; Xia, K.; Li, X.-T.; Li, J.-L.; Fu, Y.-H.; Yuan, L.; Zhu, X.-Q. Prediction of Kinetic Isotope Effects for Various Hydride Transfer Reactions Using a New Kinetic Model. *J Phys Chem A* **2016**, *120*, 1779–1799.
- ⁹⁶ Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L. Applications of Palladium-Catalyzed C–N Cross-Coupling Reactions. *Chem Rev* **2016**, *116*, 12564–12649.
- ⁹⁷ Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 5969–5970.
- ⁹⁸ Louie, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Synthesis of Arylamines from Aryl Halides. Mechanistic Studies Lead to Coupling in the Absence of Tin Reagents. *Tet Lett* **1995**, *36*, 3609–3612.
- ⁹⁹ Sunesson, Y.; Limé, E.; Nilsson Lill, S. O.; Meadows, R. E.; Norrby, P.-O. Role of the Base in Buchwald–Hartwig Amination. *J Org Chem* **2014**, *79*, 11961–11969.
- ¹⁰⁰ a) Bergeron, P.; Cohen, F.; Estrada, A.; Koehler, M.; Lau, K.; Ly, C.; Lyssikatos, J.; Ortwine, D.; Pei, Z.; Zhao, X. Pyrimidine Compounds, Compositions and Methods of Use. WO2010014939 (A1), February 4, 2010. b) Kai, H.; Tanaka, S.; Hiramatsu, Y.; Nozu, A.; Nakamura, K. Heterocyclic Ring and Carbocyclic Derivative. US2016024072 (A1), January 28, 2016. c) Tanaka, S.; Tomoyuki, O.; Kai H.; Ogata, Y.; Hirai, K.; Kurosuse, N.; Fujii, Y. 6-Membered Heterocyclic Derivative and Pharmaceutical Composition Comprising Same. WO2016171249 (A1), October 27, 2016.
- ¹⁰¹ Occhipinti, G.; Bjørsvik, H.-R.; Törnroos, K. W.; Jensen, V. R. Ruthenium Alkylidene Complexes of Chelating Amine Ligands. *Organometallics* **2007**, *26*, 5803–5814.
- ¹⁰² a) Lummiss, J. A. M.; Ireland, B. J.; Sommers, J. M.; Fogg, D. E. Amine-Mediated Degradation in Olefin Metathesis Reactions That Employ the Second-Generation Grubbs Catalyst. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 459–463. b) Ireland, B. J.; Dobigny, B. T.; Fogg, D. E. Decomposition of a Phosphine-Free Metathesis Catalyst by Amines and Other Bronsted Bases: Metallacyclobutane Deprotonation as a Major Deactivation Pathway. *ACS Catal* **2015**, *5*, 4690–4698.
- ¹⁰³ Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Piredda, I.; Carta, M.; Nieddu, G. A Practical and Efficient Approach to PNA Monomers Compatible with Fmoc-Mediated Solid-Phase Synthesis Protocols. *Eur J Org Chem* **2008**, *2008*, 5786–5797.
- ¹⁰⁴ Flores, C. M.; Wade, P. R. Prokineticin 1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain. US2011319418 (A1), December 29, 2011.
- ¹⁰⁵ Jakubiec, D.; Walczak, K. Z. Aldimines of 5-Aminouracil as Reagents in 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Monatsh Chem* **2011**, *142*, 1155.
- ¹⁰⁶ André, V.; Lahrache, H.; Robin, S.; Rousseau, G. Reaction of Unsaturated Phosphonate Monoesters with Bromo- and Iodo(Bis-Collidine) Hexafluorophosphates. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10059–10066.
- ¹⁰⁷ LaFrate, A. L.; Katzenellenbogen, J. A. Improved Chemical Syntheses of 5,6-Dihydro-5-Fluorouracil. *J Org Chem* **2007**, *72*, 8573–8576.
- ¹⁰⁸ Doherty, J.; Stelmach, J.; Chen, M.-H.; Liu, L.; Hunt, J.; Ruzek, R.; Goulet, J.; Wisnoski, D.; Natarajan, S. R.; Rupprecht, K.; *et al.* (Halo-Benzo Carbonyl)Heterocyclo Fused Phenyl P38 Kinase Inhibiting Agents. WO02058695 (A1), August 1, 2002.
- ¹⁰⁹ Belaroussi, R.; Bouakher, A. E.; Marchivie, M.; Massip, S.; Jarry, C.; Hakmaoui, A. E.; Guillaumet, G.; Routier, S.; Akssira, M. Convenient Synthesis of New N-3-Substituted Pyrido[1',2':1,5]Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives. *Synthesis* **2013**, *45*, 2557–2566.
- ¹¹⁰ Hippchen, H. Synthesen von 6-Nitro-Flavinen. *Chem Ber* **1947**, *80*, 263–273.
- ¹¹¹ Sole, F.; Carranco, M.; Aiguade, B.; Puig, D.; Fonquerna, P. New Cyclohexyl and Quinuclidinyl Carbamate Derivatives Having Beta2 Adrenergic Agonist and M3 Muscarinic Antagonist Activity. WO2014095920 (A1), June 26, 2014.
- ¹¹² Piermattei, A.; Karthikeyan, S.; Sijbesma, R. P. Activating Catalysts with Mechanical Force. *Nat Chem* **2009**, *1*, 133–137.
- ¹¹³ Gułajski, Ł.; Ślędź, P.; Lupa, A.; Grela, K. Olefin Metathesis in Water Using Acoustic Emulsification. *Green Chem* **2008**, *10*, 271–274.
- ¹¹⁴ Woodward, C. P.; Spiccia, N. D.; Jackson, W. R.; Robinson, A. J. A Simple Amine Protection Strategy for Olefin Metathesis Reactions. *Chem Commun* **2010**, *47*, 779–781.
- ¹¹⁵ Spinks, D.; Ong, H. B.; Mpamhanga, C. P.; Shanks, E. J.; Robinson, D. A.; Collie, I. T.; Read, K. D.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Brenk, R.; *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Inhibitors of Trypanosoma Brucei Pteridine Reductase 1. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 302–308.
- ¹¹⁶ Jansa, P.; Hradil, O.; Baszczyński, O.; Dračinský, M.; Klepetářová, B.; Holý, A.; Balzarini, J.; Janeba, Z. An Efficient Microwave-Assisted Synthesis and Biological Properties of Polysubstituted Pyrimidinyl- and 1,3,5-Triazinylphosphonic Acids. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 865–871.
- ¹¹⁷ Shen, Q.; Wang, L.; Yu, J.; Liu, M.; Qiu, J.; Fang, L.; Guo, F.; Tang, J. Synthesis of Quinolines via Friedländer Reaction in Water and under Catalyst-Free Conditions. *Synthesis* **2012**, *44*, 389–392.

- ¹¹⁸ el-Sayed, O. A.; el-Bieh, F. M.; el-Aqeel, S. I.; al-Bassam, B. A.; Hussein, M. E. Novel 4-Aminopyrimido[4,5-b]Quinoline Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Boll Chim Farm* **2002**, *141*, 461–465.
- ¹¹⁹ Martínez, W. R.; Militão, G. C. G.; Silva, T. G. da; Silva, R. O.; Menezes, P. H. Synthesis of Novel [3,1]-Benzothiazepine and [3,1]-Benzoxazepine Derivatives with Antitumoral Activity. *RSC Adv* **2014**, *4*, 14715–14718.
- ¹²⁰ Liu, M.; Wang, X.; Sun, X.; He, W. Highly Selective N-Allylation of Anilines under Microwave Irradiation. *Tet Lett* **2014**, *55*, 2711–2714.
- ¹²¹ Chiarucci, M.; Mocci, R.; Syntrivanis, L.-D.; Cera, G.; Mazzanti, A.; Bandini, M. Merging Synthesis and Enantioselective Functionalization of Indoles by a Gold-Catalyzed Asymmetric Cascade Reaction. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 10850–10853.
- ¹²² Bala, K.; Hailes, H. C. Nitrile Oxide 1,3-Dipolar Cycloadditions in Water: Novel Isoxazoline and Cyclophane Synthesis. *Synthesis* **2005**, *19*, 3423–3427.
- ¹²³ Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232.
- ¹²⁴ a) Peet, N. P.; Sunder, S.; Barbuch, R. J. A Novel Oxamide Rearrangement. *J Het Chem* **1980**, *17*, 1513–1518. b) Schwinn, D.; Glatz, H.; Bannwarth, W. Multistep Parallel Synthesis of Quinazoline-2,4-Diones by a Fluorous Biphasic Concept without Perfluorinated Solvents. *HCA* **2003**, *86*, 188–195. c) Hartopp, P.; Johnson, T.; Sanganee, H. Combination Comprising 6-Fluoro-N-((1*s*,4*s*)-4-(6-Fluoro-2,4-Dioxo-1-(4'-(Piperazin-1-ylmethyl)Biphenyl-3-yl)-1,2-Dihydropyrido-[2,3-*d*]-pyrimidin-3(4H)-yl)Cyclohexyl)Imidazo-[1,2-*a*]-Pyridine-2-Carboxamide or a Salt. WO2010004319 (A1), January 14, 2010. d) Kamal, Ä.; Ashraf, M.; Vishnu Vardhan, M. V. P. S.; Faazil, S.; Nayak, V. L. Synthesis and Anticancer Potential of Benzothiazole Linked Phenylpyridopyrimidinones and Their Diones as Mitochondrial Apoptotic Inducers. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 147–151. e) Cheng, V. W. T.; Piragasam, R. S.; Rothery, R. A.; Maklashina, E.; Cecchini, G.; Weiner, J. H. Redox State of Flavin Adenine Dinucleotide Drives Substrate Binding and Product Release in Escherichia Coli Succinate Dehydrogenase. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1043–1052. f) Piotrowska, D. G.; Andrei, G.; Schols, D.; Snoeck, R.; ȳsakowska, M. Synthesis, Anti-Varicella-Zoster Virus and Anti-Cytomegalovirus Activity of Quinazoline-2,4-Diones Containing Isoxazolidine and Phosphonate Substructures. *Eur J Med Chem* **2017**, *126*, 84–100.
- ¹²⁵ Lai, Y.-F.; Zheng, H.; Chai, S.-J.; Zhang, P.-F.; Chen, X.-Z. Lipase-Catalysed Tandem Knoevenagel Condensation and Esterification with Alcohol Cosolvents. *Green Chem* **2010**, *12*, 1917–1918.
- ¹²⁶ Gomes, M. N.; Oliveira, C. M. A. de; Garrote, C. F. D.; Oliveira, V. de; Menegatti, R. Condensation of Ethyl Cyanoacetate with Aromatic Aldehydes in Water, Catalyzed by Morpholine. *Synth Commun* **2010**, *41*, 52–57.
- ¹²⁷ Zhou, L.; Tu, S.; Shi, D.; Dai, G.; Chen, W. Low-Valent Titanium Induced Novel Reductive Cyclization of α,β -Unsaturated Nitrile Compounds. *Synthesis* **1998**, *6*, 851–854.
- ¹²⁸ Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem Rev* **2009**, *109*, 2551–2651.
- ¹²⁹ a) Burgess, J.; Callahan, J.; Hamajima, T.; Ida, S.; Tang, J.; Mori, I. Chemical Compounds. WO2004034985 (A2), April 29, 2004. b) Liu, S.; Pestano, J. P. C.; Wolf, C. Regioselective Copper-Catalyzed C-N and C-S Bond Formation Using Amines, Thiols and Halobenzoic Acids. *Synthesis* **2007**, *22*, 3519–3527.
- ¹³⁰ Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408.
- ¹³¹ a) Roy, V.; Kumamoto, H.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Topalis, D.; Deville-Bonne, D.; Balzarini, J.; Neyts, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; *et al.* Cross-Metathesis Mediated Synthesis of New Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1399–1402. b) Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232. c) Pradère, U., Clavier, H., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The Shortest Strategy for Generating Phosphonate Prodrugs by Olefin Cross-Metathesis - Application to Acyclonucleoside Phosphonates. *Eur J Org Chem* **2011**, 7324–7330. d) Montagu, A., Pradère, U., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. Expedient convergent procedure for the preparation of bis(POC) prodrugs of new (E)-4-phosphono-but-2-en-1-yl nucleosides. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5319–5328. e) Agrofoglio, L.A., Roy, V. Novel antiviral acyclic nucleoside phosphonates, WO2012034719 (A1) 2012-03-22. f) Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408. g) Bessières, M.; De Schutter, C.; Roy, V.; Agrofoglio,

- L. A. Olefin Cross-Metathesis for the Synthesis of Alkenyl Acyclonucleoside Phosphonates. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- ¹³² Spinks, D.; Ong, H. B.; Mpamhanga, C. P.; Shanks, E. J.; Robinson, D. A.; Collie, I. T.; Read, K. D.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Brenk, R.; *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Inhibitors of Trypanosoma Brucei Pteridine Reductase 1. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 302–308.
- ¹³³ Chauhan, S. M. S.; Singh, R.; Geetanjali. Microwave-Assisted Synthesis of 10-Substituted Isoalloxazines in the Presence of Solid Acids. *Synth Commun* **2003**, *33*, 1179–1184.
- ¹³⁴ Ida, Y.; Matsubara, A.; Nemoto, T.; Saito, M.; Hirayama, S.; Fujii, H.; Nagase, H. Synthesis of Quinolinomorphinan Derivatives as Highly Selective δ Opioid Receptor Ligands. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 5810–5831.
- ¹³⁵ Shen, Q.; Wang, L.; Yu, J.; Liu, M.; Qiu, J.; Fang, L.; Guo, F.; Tang, J. Synthesis of Quinolines via Friedländer Reaction in Water and under Catalyst-Free Conditions. *Synthesis* **2012**, *44*, 389–392.
- ¹³⁶ Li, P.; Zhan, C.; Zhang, S.; Ding, X.; Guo, F.; He, S.; Yao, J. Alkali Metal Cations Control over Nucleophilic Substitutions on Aromatic Fused Pyrimidine-2,4-[1H,3H]-Diones: Towards New PNA Monomers. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8908–8915.
- ¹³⁷ Wilson, J. M.; Henderson, G.; Black, F.; Sutherland, A.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H.; Robins, D. J. Synthesis of 5-Deazaflavin Derivatives and Their Activation of P53 in Cells. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 77–86.
- ¹³⁸ Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. A Convenient, Highly Selective and Eco-Friendly N-Boc Protection of Pyrimidines under Microwave Irradiation. *RSC Adv* **2014**, *4*, 59747–59749.
- ¹³⁹ Weaver, D.; Guillain, B. Pyrimidine Compounds as Anti-Ictogenic and/or Anti-Epileptogenic Agents. WO2006070292 (A2), July 6, 2006.
- ¹⁴⁰ Ludek, O. R.; Meier, C. Influence of the N3-Protection Group on N1- vs. O2-Alkylation in the Mitsunobu Reaction. *Eur J Org Chem* **2006**, *4*, 941–946.
- ¹⁴¹ Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. A General Synthesis of Pyrimidine Nucleosides. *Ang Chem Int Ed Eng* **1970**, *9*, 461–462.
- ¹⁴² a) Godde, F.; Toulmé, J.-J.; Moreau, S. Benzoquinazoline Derivatives as Substitutes for Thymine in Nucleic Acid Complexes. Use of Fluorescence Emission of Benzo[g]Quinazoline-2,4-(1H,3H)-Dione in Probing Duplex and Triplex Formation. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13765–13775. b) Goto, S.; Tsuboi, H.; Kanoda, M.; Mukai, K.; Kagara, K. The Process Development of a Novel Aldose Reductase Inhibitor, FK366. Part 1. Improvement of Discovery Process and New Syntheses of 1-Substituted Quinazolinodiones. *Org Process Res Dev* **2003**, *7*, 700–706. c) Bookser, B. C.; Raffaele, N. B. High-Throughput Five Minute Microwave Accelerated Glycosylation Approach to the Synthesis of Nucleoside Libraries. *J Org Chem* **2007**, *72*, 173–179. d) Mata, G.; Luedtke, N. W. Stereoselective N-Glycosylation of 2-Deoxythioribosides for Fluorescent Nucleoside Synthesis. *J Org Chem* **2012**, *77*, 9006–9017. e) Song, L.; Risseuw, M.; Karalic, I.; Barrett, M.; Brown, K.; Harden, T.; Van Calenbergh, S. Synthesis of Extended Uridine Phosphonates Derived from an Allosteric P2Y2 Receptor Ligand. *Molecules* **2014**, *19*, 4313–4325. f) Yao, H.; Ji, M.; Zhu, Z.; Zhou, J.; Cao, R.; Chen, X.; Xu, B. Discovery of 1-Substituted Benzyl-Quinazoline-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives as Novel Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 681–693. g) Zhao, H.; Ji, M.; Cui, G.; Zhou, J.; Lai, F.; Chen, X.; Xu, B. Discovery of Novel Quinazoline-2,4(1H,3H)-Dione Derivatives as Potent PARP-2 Selective Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 4045–4054.
- ¹⁴³ Benhida, R.; Aubertin, A.-M.; Grierson, D. S.; Monneret, C. A Convenient Synthesis of 1-Ethoxymethyl-5-Nitro-6-Substituted Uracils. *Tet Lett* **1996**, *37*, 1031–1034.
- ¹⁴⁴ a) Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K. A Convenient One-Pot Synthesis of Acyclonucleosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43* (1), 142–143. b) Hernández-Reyes, C. X.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; González-Zamora, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Morales-Serna, J. A.; Negrón-Silva, G. E. Synthesis of Azanucleosides through Regioselective Ring-Opening of Epoxides Catalyzed by Sulphated Zirconia under Microwave and Solvent-Free Conditions. *Molecules* **2012**, *17*, 3359–3369.
- ¹⁴⁵ Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Nolan, S. P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L. A. Sonication-Assisted Synthesis of (E)-2-Methyl-but-2-Enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3108–3113.
- ¹⁴⁶ Parchina, A.; Froeyen, M.; Margamuljana, L.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Briers, Y.; Lavigne, R.; Herdewijn, P.; Lescrinier, E. Discovery of an Acyclic Nucleoside Phosphonate That Inhibits Mycobacterium Tuberculosis ThyX Based on the Binding Mode of a 5-Alkynyl Substrate Analogue. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1373–1383.
- ¹⁴⁷ Chevrier, F.; Biteau, N.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Regioselective N₁ Alkylation of Quinazolinodione derivatives under microwave irradiation. Manuscript under construction.
- ¹⁴⁸ a) Occhipinti, G.; Bjørsvik, H.-R.; Törnroos, K. W.; Jensen, V. R. Ruthenium Alkylidene Complexes of Chelating Amine Ligands. *Organometallics* **2007**, *26*, 5803–5814. b) Lummiss, J. A. M.; Ireland, B. J.; Sommers, J. M.; Fogg, D. E. Amine-Mediated Degradation in Olefin Metathesis Reactions That Employ the

- Second-Generation Grubbs Catalyst. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 459–463. c) Ireland, B. J.; Dobigny, B. T.; Fogg, D. E. Decomposition of a Phosphine-Free Metathesis Catalyst by Amines and Other Bronsted Bases: Metallacyclobutane Deprotonation as a Major Deactivation Pathway. *ACS Catal* **2015**, *5*, 4690–4698.
- 149 Bessières, M.; Hervin, V.; Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohier, J.-F.; Agrofoglio, L. A. Highly Convergent Synthesis and Antiviral Activity of (E)-but-2-Enyl Nucleoside Phosphonoamidates. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 678–686.
- 150 a) Clercq, E. D.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. A Novel Selective Broad-Spectrum Anti-DNA Virus Agent. *Nature* **1986**, *323*, 464–467. b) Holý, A. Antiviral Acyclic Nucleoside Phosphonates Structure Activity Studies. *Antivir Res* **2006**, *71*, 248–253.
- 151 a) Balzarini, J.; Naesens, L.; Herdewijn, P.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Pauwels, R.; Baba, M.; Johns, D. G.; Clercq, E. D. Marked in Vivo Antiretrovirus Activity of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine, a Selective Anti-Human Immunodeficiency Virus Agent. *PNAS* **1989**, *86*, 332–336. b) Yokota, T.; Konno, K.; Chonan, E.; Mochizuki, S.; Kojima, K.; Shigeta, S.; Clercq, E. de. Comparative Activities of Several Nucleoside Analogs against Duck Hepatitis B Virus in Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**, *34*, 1326–1330. c) Yokota, T.; Mochizuki, S.; Konno, K.; Mori, S.; Shigeta, S.; Clercq, E. D. Inhibitory Effects of Selected Antiviral Compounds on Human Hepatitis B Virus DNA Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, *35*, 394–397.
- 152 Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; Clercq, E. D. Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus Effects of the (S) and (R) Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates: Potent and Selective in Vitro and in Vivo Antiretrovirus Activities of (R)-9-(2-Phosphonomethoxypropyl)-2,6-Diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**, *37*, 332–338.
- 153 a) De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral Activity of Phosphonylmethoxyalkyl Derivatives of Purine and Pyrimidines. *Antivir Res* **1987**, *8*, 261–272. b) Clercq, E. D. Therapeutic Potential of HPMPIC as an Antiviral Drug. *Reviews in Medical Virology* **1993**, *3*, 85–96. c) De Clercq Erik. The Discovery of Antiviral Agents: Ten Different Compounds, Ten Different Stories. *Med Res Rev* **2008**, *28*, 929–953.
- 154 a) Pertusat, F.; Serpi, M.; McGuigan, C. Medicinal Chemistry of Nucleoside Phosphonate Prodrugs for Antiviral Therapy. *Antivir Chem Chemother* **2012**, *22*, 181–203. b) Baszczyński Ondřej; Janeba Zlatko. Medicinal Chemistry of Fluorinated Cyclic and Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Med Res Rev* **2013**, *33*, 1304–1344.
- 155 Topalis, D.; Pradère, U.; Roy, V.; Caillat, C.; Azzouzi, A.; Broggi, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lin, J.; Eriksson, S.; *et al.* Novel Antiviral C5-Substituted Pyrimidine Acyclic Nucleoside Phosphonates Selected as Human Thymidylate Kinase Substrates. *J Med Chem* **2011**, *54*, 222–232.
- 156 Romanenko, V. D.; Kukhar, V. P. Fluorinated Phosphonates: Synthesis and Biomedical Application. *Chem Rev* **2006**, *106*, 3868–3935.
- 157 Halazy, S.; Ehrhard, A.; Danzin, C. 9-(Difluorophosphonoalkyl)Guanines as a New Class of Multisubstrate Analog Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 315–317.
- 158 Diab, S. A.; De Schutter, C.; Muzard, M.; Plantier-Royon, R.; Pfund, E.; Lequeux, T. Fluorophosphonylated Nucleoside Derivatives as New Series of Thymidine Phosphorylase Multisubstrate Inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 2758–2768.
- 159 Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; *et al.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 2'-Deoxyuridine Monophosphate Analogues As Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase in Mycobacterium Tuberculosis. *J Med Chem* **2011**, *54*, 4847–4862.
- 160 Burton, D. J.; Yang, Z.-Y.; Qiu, W. Fluorinated Ylides and Related Compounds. *Chem Rev* **1996**, *96*, 1641–1716.
- 161 a) Li, A.-R.; Chen, Q.-Y. Diethyl Iododifluoromethylphosphonate: A New Synthetic Method and Its Reaction with Alkynes. *Synthesis* **1996**, *5*, 606–608. b) Lequeux, T.; Lebouc, F.; Lopin, C.; Yang, H.; Gouhier, G.; Piettre, S. R. Sulfanyl- and Selanyldifluoromethylphosphonates as a Source of Phosphonodifluoromethyl Radicals and Their Addition onto Alkenes. *Org Lett* **2001**, *3*, 185–188. c) Sha, W.; Zhang, W.; Ni, S.; Mei, H.; Han, J.; Pan, Y. Photoredox-Catalyzed Cascade Difluoroalkylation and Intramolecular Cyclization for Construction of Fluorinated γ -Butyrolactones. *J Org Chem* **2017**, *82*, 9824–9831. d) Huang, W.; Chen, J.; Hong, D.; Chen, W.; Cheng, X.; Tian, Y.; Li, G. Hydrophosphonodifluoromethylation of Alkenes via Thiyl-Radical/Photoredox Catalysis. *J Org Chem* **2018**, *83*, 578–587. e) Huang, H.; Yu, M.; Su, X.; Guo, P.; Zhao, J.; Zhou, J.; Li, Y. Sustainable Radical Cascades to Synthesize Difluoroalkylated Pyrrolo[1,2-a]Indoles. *J Org Chem* **2018**, *83*, 2425–2437. f) Yin, Z.-B.; Ye, J.-H.; Zhou, W.-J.; Zhang, Y.-H.; Ding, L.; Gui, Y.-Y.; Yan, S.-S.; Li, J.; Yu, D.-G. Oxy-Difluoroalkylation of Allylamines with CO₂ via Visible-Light Photoredox Catalysis. *Org Lett* **2018**, *20*, 190–193.
- 162 a) Yang, Z.-Y.; Burton, D. J. A Novel, General Method for the Preparation of α,α -difluoro Functionalized Phosphonates. *Tet Lett* **1991**, *32*, 1019–1022. b) Yokomatsu, T.; Suemune, K.; Murano, T.; Shibuya, S.

- Synthesis of (α,α -Difluoroallyl)Phosphonates from Alkenyl Halides or Acetylenes. *J Org Chem* **1996**, *61*, 7207–7211. c) Waschbüsch, R.; Samadi, M.; Savignac, P. A Useful Magnesium Reagent for the Preparation of 1,1-Difluoro-2-Hydroxyphosphonates from Diethyl Bromodifluoromethylphosphonate via a Metal—halogen Exchange Reaction. *J Organomet Chem* **1997**, *529*, 267–278. d) Feng, Z.; Xiao, Y.-L.; Zhang, X. Palladium-Catalyzed Phosphonyldifluoromethylation of Alkenes with Bromodifluoromethylphosphonate. *Org Chem Front* **2016**, *3*, 466–469. e) Budinská, A.; Václavík, J.; Matoušek, V.; Beier, P. Nucleophilic Tetrafluoroethylation Employing in Situ Formed Organomagnesium Reagents. *Org Lett* **2016**, *18*, 5844–5847.
- ¹⁶³ a) Bissey, J. E.; Goldwhite, H.; Rowsell, D. G. Reactions of 2,3-Dichlorotetrafluoropropene with Nucleophiles Containing Phosphorus. *J Org Chem* **1967**, *32*, 1542–1546. b) Piettre, S. R. Simple and Efficient Synthesis of 2,2-Disubstituted-1,1-Difluorophosphonates and Phosphonothioates. *Tet Lett* **1996**, *37*, 2233–2236. c) Nair, H. K.; Burton, D. J. Facile Synthesis of Fluorinated Phosphonates via Photochemical and Thermal Reactions. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 9137–9143.
- ¹⁶⁴ a) Hum, G.; Lee, J.; Taylor, S. D. Synthesis of [Difluoro-(3-Alkenylphenyl)-Methyl]-Phosphonic Acids on Non-Crosslinked Polystyrene and Their Evaluation as Inhibitors of PTP1B. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 3471–3474. b) Marma, M. S.; Khawli, L. A.; Harutunian, V.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E. Synthesis of α -Fluorinated Phosphonoacetate Derivatives Using Electrophilic Fluorine Reagents: Perchloryl Fluoride versus 1-Chloromethyl-4-Fluoro-1,4-Diazoniabicyclo[2.2.2]Octane Bis(Tetrafluoroborate) (Selectfluor®). *J Fluorine Chem* **2005**, *126*, 1467–1475. c) Vints, I.; Gatenyo, J.; Rozen, S. Mono and Difluorination of Centers α to Sulfonates and Phosphonates Using AcOF. *J Fluorine Chem* **2013**, *146*, 66–69.
- ¹⁶⁵ a) Fustero, S.; Simón-Fuentes, A.; Barrio, P.; Haufe, G. Olefin Metathesis Reactions with Fluorinated Substrates, Catalysts, and Solvents. *Chem Rev* **2015**, *115*, 871–930. b) Guérin, D.; Dez, I.; Gaumont, A.-C.; Pannecoucke, X.; Couve-Bonnaire, S. Access to Constrained Fluoropseudopeptides via Ring-Closing Metathesis of Fluoroalkenes. *Org Lett* **2016**, *18*, 3606–3609. d) Li, Y.; Li, K.; Wu, Y.; Ma, Q.; Lei, X. Facile Synthesis of Fluorovinyl-Containing Lactams via Ring-Closing Metathesis of N-Substituted 2-Fluoroallylamides. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 4845–4853.
- ¹⁶⁶ Burton, D. J.; Sprague, L. G. Allylations of [(Diethoxyphosphinyl)Difluoromethyl]Zinc Bromide as a Convenient Route to 1,1-Difluoro-3-Alkenephosphonates. *J Org Chem* **1989**, *54*, 613–617.
- ¹⁶⁷ Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408.
- ¹⁶⁸ : Kumamoto, H.; Topalis, D.; Broggi, J.; Pradere, U.; Roy, V.; Berteina-Raboin, S.; Nolan, S. P.; Deville-Bonne, D.; Andrei, G.; Snoeck, R.; *et al.* Preparation of Acyclo Nucleoside Phosphonate Analogues Based on Cross-Metathesis. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3517–3526.
- ¹⁶⁹ Aucagne, V.; Amblard, F.; Agrofoglio, L. A. Highly Efficient AgNO₃-Catalyzed Preparation of Substituted Furano-pyrimidine Nucleosides. *Synlett* **2004**, *13*, 2406–2408.
- ¹⁷⁰ Robins, M. J.; Barr, P. J. Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides. *J Org Chem* **1983**, *48*, 1854–1862.
- ¹⁷¹ Hikishima, S.; Isobe, M.; Koyanagi, S.; Soeda, S.; Shimeno, H.; Shibuya, S.; Yokomatsu, T. Synthesis and Biological Evaluation of 9-(5',5'-Difluoro-5'-Phosphonopentyl)Guanine Derivatives for PNP-Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, 1660–1670.
- ¹⁷² Hamada, M.; Roy, V.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Urbina-Blanco, C.; Nolan, S. P.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R. F.; *et al.* Synthesis and Broad Spectrum Antiviral Evaluation of Bis(POM) Prodrugs of Novel Acyclic Nucleosides. *Eur J Med Chem* **2013**, *67*, 398–408.

ARTICLES ET COMMUNICATIONS DE L'AUTEUR

Publications

Bessières M., **Chevrier F.**, Roy V., Agrofoglio L.A. Recent progress for the synthesis of selected carbocyclic nucleosides. *Future Med Chem*, **2015**, 7, 13, 1809-1828

Plebanek, E.; **Chevrier, F.**; Roy, V.; Garenne, T.; Lecaille, F.; Warszycki, D.; Bojarski, A. J.; Lalmanach, G.; Agrofoglio, L. A. Straightforward Synthesis of 2,4,6-Trisubstituted 1,3,5-Triazine Compounds Targeting Cysteine Cathepsins K and S. *Eur J Med Chem*, **2016**, 121, 12–20.

Chevrier, F.; Chamas, Z.; Lequeux, T.; Pfund, E.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Synthesis of 5,5-Difluoro-5-Phosphono-Pent-2-En-1-Yl Nucleosides as Potential Antiviral Agents. *RSC Adv* **2017**, 7, 51, 32282–32287.

Chevrier, F.; Biteau, N.; Roy, V.; Agrofoglio, L. A. Regioselective N_1 Alkylation of quinazolinone derivatives under microwave irradiation. Manuscript under construction.

Communications

- Poster

Plebanek E.; **Chevrier F.**; Roy V.; Garenne T.; Lecaille F.; Warszycki D.; Bojarski A.J.; Lalmanach G.; Agrofoglio L.A. Straightforward synthesis of 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazine compounds targeting cysteine cathepsins K and S, Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Amboise, 25-27 Mai 2016.

Chevrier, F.; Pfund, E.; Roy, V.; Lequeux, T.; Agrofoglio, L.A. Targeting the Unique Antimicrobial Flavin Dependent Thymidylate Synthase (FDTS) : Inhibitors Design and Synthesis, JAS FéRI, Tours , 4-5 Juillet 2016.

De Schütter, C.; **Chevrier, F.**; Favetta, P.; Roy, V.; Agrofoglio, L.A. Synthesis of New Coloured Nucleosides : Tagged Uridine and Adenosine Absorbing Visible Light & Possessing Fluorescent Properties, IRT XXII, Paris , 18-22 juillet 2016

Plebanek E.; **Chevrier F.**; Roy V.; Garenne T.; Lecaille F.; Warszycki D.; Bojarski A.J.; Lalmanach G.; Agrofoglio L.A. Straightforward synthesis of 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazine compounds targeting cysteine cathepsins K and S, Biotechnocentre, Amboise, 13 & 14 Octobre 2016.



Synthesis of 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides as potential antiviral agents†

F. Chevrier,^a Z. Chamas,^a T. Lequeux,^b E. Pfund,^b G. Andrei,^c R. Snoeck,^c V. Roy^a and L. A. Agrofoglio^{*,a}

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 32282

Received 7th May 2017
Accepted 15th June 2017

DOI: 10.1039/c7ra05153k

rsc.li/rsc-advances

A series of hitherto unknown acyclic 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl-pyrimidines (**9a**, **b**, **13a**, **b**), -purines (**16a**, **b**) and -(1,2,4)-triazolo-3-carboxamide (**19**) were successfully synthesized from (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene in a stereoselective manner. All the synthesized compounds were assayed for antiviral activity against various viruses, but were found to be neither active nor toxic.

Introduction

Viruses are infectious agents that can replicate their genome within host cells. Many antiviral drugs are nucleoside or nucleotide analogs. Acyclic nucleoside phosphonates (ANPs)¹ are a class of nucleotide analogs, originally developed by A. Holy's group,² which exhibit a broad spectrum of antiviral activities. ANPs possess a common structure, a nucleobase attached to an aliphatic side chain containing a phosphonate moiety (C–P), and have an increased metabolic stability and resistance to chemical and biological degradation.³ Their activities are reliant on their diphosphorylation by NDP and NTP kinases, and further incorporation into the viral DNA where they can act as chain terminators. Three ANPs are in current clinical use for the treatment of serious viral infections, adefovir (PMEA), tenofovir [(*R*)-PMPA] and cidofovir [(*S*)-CDV]

against hepatitis B virus (HBV), human immunodeficiency virus (HIV) and cytomegalovirus (CMV), respectively, (Fig. 1).

Due to drug-resistant viruses and emerging viruses, in an effort to identify new nucleoside inhibitors of viral enzymes, new generations of ANPs, including fluorinated ANPs, were prepared and evaluated for their antiviral activity.^{4,5} Over the last decade, our laboratory has developed a new family of ANPs based on the (*E*)-but-2-enyl linker between the phosphonate moiety and the nucleobase. Several of them exhibited antiviral activity against DNA and RNA viruses in submicromolar concentrations.⁶ During our investigations, we have demonstrated that the *N*¹-[(*E*)-4-phosphono-but-2-en-1-yl]-thymine is a substrate of human TMPK and that the (*E*)-but-2-enyl moiety mimics the conformation of the C1'–O4'–C4'–C5' atoms from the natural substrate, the thymidine 5'-monophosphate, (Fig. 2).⁶ However, unlike natural nucleotide, our molecule missed the oxygen of the phosphate group (*e.g.*, –O–P). Thus, we turn our attention to the introduction of a *gem*-difluoromethylphosphonate moiety (*e.g.*, –CF₂–P), which is isopolar and isosteric to the phosphate group.⁷

In fact, due to specific properties of fluorine (high electronegativity, small steric size, hydrogen bond acceptor, ...), its introduction into biologically active molecules could lead to major changes in their biological properties, such as reported by Halazy *et al.*⁸ for the 9-(5,5-difluoro-5-phosphonopentyl)-

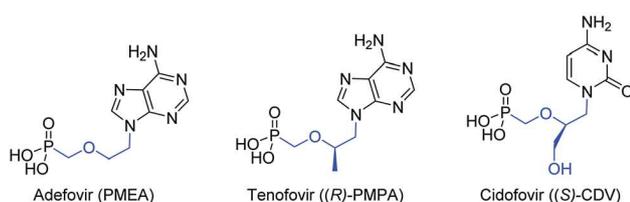


Fig. 1 Structure of approved antiviral acyclic nucleoside phosphonates.

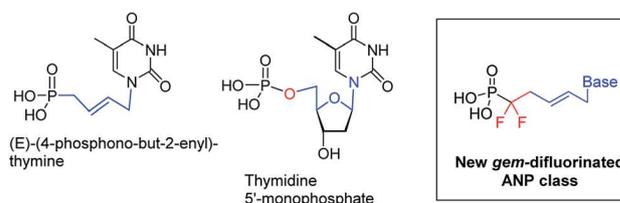


Fig. 2 Structure of newly synthesized 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides as potent mimics of dNMP.

^aUniversité d'Orléans et CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067, Orléans, France. E-mail: luigi.agrofoglio@univ-orleans.fr

^bLaboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-organique, ENSICAEN, UNICAEN, UMR, CNRS 6507, FR 3038, Caen, France

^cREGA Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium

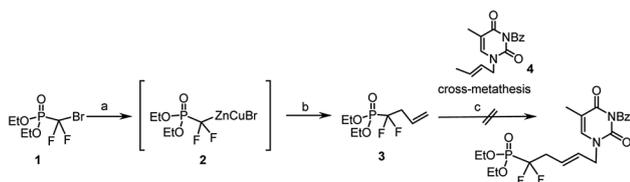
† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H, ¹³C, ³¹P and ¹⁹F NMR data of selected compounds. See DOI: 10.1039/c7ra05153k

guanine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase (PNP), a key enzyme in the purine metabolism.⁹ Therefore, based on these findings, it was interesting to design and synthesize a new type of acyclic nucleoside phosphonate, the 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl-pyrimidines, purines and -triazole, and to evaluate their inhibitory activity against several viruses.

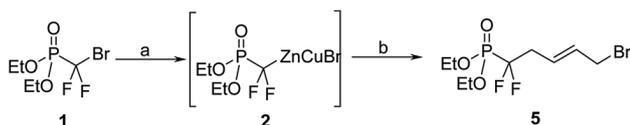
Results and discussion

Based on our previous work on the preparation of unsaturated acyclic nucleoside phosphonate using olefin cross-metathesis as key step,^{10–12} we decided to utilize this reaction between the unsaturated *gem*-difluorophosphonate **3** and *N*³-crotylated *N*³-protected thymine.¹⁰ The key intermediate **3** was synthesized from (diethoxyphosphinyl)difluoromethyl zinc bromide (**2**), allylic iodide, under CuBr catalysis, following the procedure introduced by Burton *et al.*^{13,14} Compound **3** was then engaged in the reaction of cross metathesis in presence of *N*³-benzoyl-*N*¹-crotylthymine **4** with Grubbs–Nolan catalyst¹⁵ in dichloromethane. If cross-metathesis reactions were reported with fluorinated substrates,¹⁶ despite all our attempts and contrary to our results with non-fluorinated phosphonate derivatives, we never obtained the desired product (Scheme 1); this could be due to the strong electron-withdrawing effect of the 2-*gem*-difluoro group and to the low reactivity of both cross partners with the metal alkylidene complex.

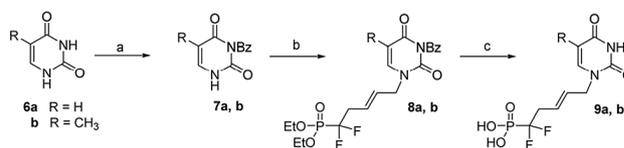
Alternatively we decided to introduce the nucleobase moiety through direct *N*-alkylation of protected and unprotected nucleobases with the corresponding (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**). Starting from bromodifluoromethylphosphonate (**1**), the previously described organo-zinc intermediate **2** was reacted with (*E*)-1,4-dibromobut-2-ene¹⁴ at 0 °C, to yield the desired compound **5** in 80% with no observed isomerization of the double bond (Scheme 2).



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) Zn_{act}, 1,2-dibromoethane, TMSCl, THF_{anh}, 40 °C, 12 h; (b) CuBr, LiCl_{act}, allyl iodide, rt, 24 h, 35%; (c) **4** (1.5 eq.), Nolan–Grubbs's II catalyst (10 mol%), CH₂Cl₂_{anh}, reflux, 24 h.



Scheme 2 Reagents and conditions: (a) Zn_{act}, 1,2-dibromoethane, TMSCl, THF_{anh}, 40 °C, 12 h; (b) CuBr, LiCl_{act}, *trans*-1,4-dibromobutene, 0 °C, 4 h, 80%.

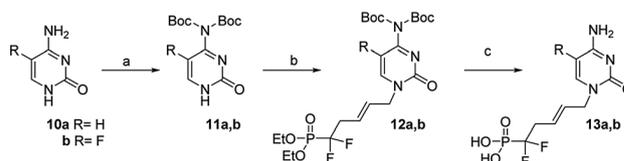


Scheme 3 Reagents and conditions: (a) (i) BzCl, CH₃CN/pyridine, rt (ii) K₂CO₃ (0.5 M), dioxane, 70 °C, 90% (for R = H) and 96% (for R = CH₃); (b) (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**), Cs₂CO₃, dry DMF, 85% (for R = H) and 81% (for R = CH₃); (c) TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 72 h, 90% (for R = H) and 96% (for R = CH₃).

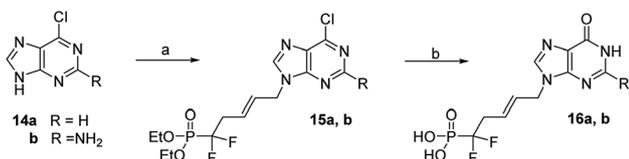
Then uracil **6a** was converted to its *N*³-benzoyl derivative **7a** through a two steps procedure involving first the formation of *N*¹,*N*³-dibenzoyl derivative in presence of an excess of benzoyl chloride in CH₃CN/pyridine mixture, then its selective *N*¹-deprotection by treatment with potassium carbonate in 1,4-dioxane, (Scheme 3).¹⁷

Similarly, thymine **6b** was converted to its *N*³-protected derivative bromide their **7b**. Finally, the successful *N*¹-alkylation of **7a** and **7b** on **5** in the presence of cesium carbonate in DMF proceeded in good yields and excellent regioselectivities and afforded **8a** and **8b**, in 86% and 75% yields, respectively. Simultaneous deprotection of the *N*³-benzoyl group and phosphonic esters with TMSBr/CH₂Cl₂ afforded analogues **9a** and **9b**, in good yields, respectively. These coupling conditions were extended to other nucleic bases. Cytosine **10a** and its fluorinated analogue **10b** were converted to *N*⁴-bis(Boc)-cytosine derivatives **11a** and **11b**, respectively, in good yields, through *N*¹,*N*³,*N*⁴-tris-Boc forms followed by regioselective *N*¹ deprotection with saturated solution of NaHCO₃ in methanol.¹⁸ Alkylation at *N*¹ position of **11a** and **11b** in presence of derivative **5**, according to the same previous conditions using Cs₂CO₃, afford **12a** and **12b**, in 85% and 77% yield, respectively.¹⁹ Deprotection with TMSBr afforded the expected free phosphonates **13a** and **13b**, respectively, in quantitative yield (Scheme 4).

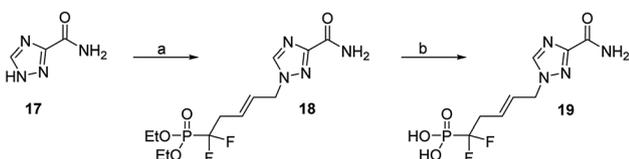
Direct coupling of the purines **14a** and **14b** with difluorophosphonate derivative **5** in DMF with Cs₂CO₃ during 20 h at rt provided the desired *N*⁹-alkylated purine nucleotides **15a** and **15b** in 50 and 59% yields, respectively.²⁰ Then, 6-chloropurine derivative **15a** was converted to its hypoxanthine analogue **16a** by treatment with TMSBr to release phosphonic acid followed by refluxing an aqueous solution of hydrochloric acid in 54% overall yield, (Scheme 5).²¹ Similarly, the 2-amino-6-chloropurine derivatives **15b** gave the guanine **16b** in 60% overall yields.



Scheme 4 Reagents and conditions: (a) (i) Boc₂O, DMAP, dry THF (ii) saturated NaHCO₃, MeOH 50 °C, 62%; (b) (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**), Cs₂CO₃, dry DMF, 85% (for R = H) and 77% (for R = F); (c) TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 72 h, quantitative for R = H and for R = F.



Scheme 5 Reagents and conditions: (a) (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**), Cs₂CO₃, dry DMF, rt, 24 h, 50% (for R = H) and 59% (for R = NH₂); (b) (i) TMSBr, CH₂Cl₂, rt then (ii) HCl (1 M), reflux, 54% (for R = H) and 60% (for R = NH₂).



Scheme 6 Reagents and conditions: (a) (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**), Cs₂CO₃, dry DMF, 42%; (b) TMSBr, CH₂Cl₂, rt, 72 h, 96%.

Finally, with respect to the broad-spectrum antiviral drug ribavirin, which possess a 1,2,4-triazole-3-carboxamide nucleobase, its acyclic difluorinated phosphonate **19** was synthesized from **17**, in a similar pathway, (Scheme 6).

All the synthesized 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides, **9a, b**, **13a, b**, **16a, b** and **19**, were evaluated against a wide variety of viruses, to determine their antiviral activity (EC₅₀) in HEL, MDCK, Vero and HeLa cell lines, as the effective concentration required to reduce virus-induced cytopathicity or plaque formation by 50%. Compounds were evaluated against vaccinia virus (VV), herpes simplex virus 1 (HSV-1) (KOS strain), herpes simplex virus 2 (HSV-2) (G strain), thymidine kinase deficient (TK-) HSV-1, vesicular stomatitis virus (VSV), varicella-zoster virus (VZV) (TK⁺ and TK⁻ strains), human cytomegalovirus (HCMV) (AD-169 and Davis strains) in HEL, vesicular stomatitis virus (VSV), Coxsackie B4, respiratory syncytial virus in HeLa cell cultures, parainfluenza-3, reovirus-1, Sindbis virus and Coxsackie B4 in Vero cells and influenza virus in MDCK cells. All of the synthesized compounds did not exhibit promising antiviral activity.

Conclusions

In summary, a series of hitherto unknown acyclic 5,5-difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl-pyrimidines (**9a, b**, **13a, b**), -purines (**16a, b**) and -(1,2,4)-triazolo-3-carboxamide (**19**) were successfully synthesized from (*E*)-1-bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**) in a convergent stereoselective manner. Surprisingly, it was discovered that cross-metathesis, in our hand, cannot afford the desired difluorinated phosphonate compounds. However, the final nucleosides were obtained, in good yields, by *N*-alkylation of various nucleobases with (*E*)-diethyl-5-bromo-1,1-difluoropent-3-enylphosphonate.

However, none of the synthesized compounds showed significant antiviral activities. One plausible explanation could

be due to a poor penetration to the cell and to the lack of next phosphorylation steps which could be dependent to the length of the acyclic chain.

Experimental section

General methods

Commercially available chemicals were of reagent grade and used as received. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040–0.063 mm, E. Merck). The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian InovaUnity 400 spectrometer (400 MHz) in (d₄) methanol, CDCl₃, shift values in parts per million relative to SiMe₄ as internal reference. High resolution mass spectra were performed on a Bruker maXis mass spectrometer by the “Federation de Recherche” ICOA/CBM (FR2708) platform. The following products are known products or previously reported by our group: *N*³-benzoyluracil (**7a**), CAS registration 2775-87-3; *N*³-benzoylthymine (**7b**), CAS registration 4330-20-5; *N*⁴,*N*⁴-bis(Boc)-cytosine (**11a**) CAS registration 1108637-28-0; 5-fluoro-*N*⁴,*N*⁴-bis(Boc)-cytosine (**11b**) CAS registration: 1450880-36-0.

(*E*)-1-Bromo-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-ene (**5**)

A suspension of zinc powder (441.3 mg, 6.75 mmol, 99.99% purity) in THF (0.4 mL) was added to a solution of 1,2-dibromoethane (0.96 mL, 1.13 mmol) in THF (5 mL) at room temperature, and was then warmed up to 65 °C. After 1 min, chlorotrimethylsilane (0.12 mL, 0.8 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at 25 °C. After 15 min, the suspension was added dropwise to a solution of diethyl (bromodifluoro)methylphosphonate (0.8 mL, 4.5 mmol) in THF (2 mL), then the reaction mixture was stirred 12 h at 45 °C. CuBr (1.16 g, 8.1 mmol), activated LiCl (344.0 mg 8.1 mmol) and THF (4 mL) was added to the yellow solution at 0 °C under nitrogen, and then the resulting blue solution was stirred at 0 °C. After 10 min, *trans*-1,4-dibromo-2-butene (1.44 g, 6.75 mmol) was added and the reaction was stirred during 4 h at 0 °C. The mixture was filtered through celite and the filtrate was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography with petroleum ether–EtOAc (4 : 1) to give **2** (1.15 g, 80%) as a colourless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.88–5.76 (m, 1H), 5.29–5.22 (m, 1H), 4.27 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.81 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 125.2, 127.1, 127.0, 126.9, 121.4, 64.6, 64.5, 39.1, 38.9, 38.7, 38.5, 16.5, 16.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ –111.1, –111.4. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 6.9; HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₇BrF₂O₃P: 321.006487, found: 321.006126.

General procedure A: alkylation with nucleobases

A solution of nucleobase (1.3 equiv.) in dry DMF (3 mL), Cs₂CO₃ (1.3 equiv.) and (*E*)-diethyl-(5-bromo-1,1-difluoro)pent-3-enylphosphonate (1 equiv.) was stirred at room temperature

under argon for 16 h. After removal of DMF under vacuum, the residue was purified by silica gel column chromatography with CH_2Cl_2 -MeOH (99 : 1 to 96 : 4) to the desired product.

***N*³-Benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-uracil (8a).** The title compound was prepared from *N*³-benzoyluracil **7a** following procedure A to give **8a** (86%) as a colourless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 2H), 7.62 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.78 (m, 2H), 5.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.84 (m, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 162.5, 149.8, 143.7, 135.2, 131.5, 130.5, 129.6, 129.3, 125.7, 102.4, 64.8, 49.5, 37.7, 37.5, 37.4, 37.1, 16.5; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -111.1, -111.4; ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 6.3; HRMS (ESI): *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$: 457.134078, found: 457.133456.

***N*³-Benzoyl-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-thymine (8b).** The title compound was prepared from *N*³-benzoylthymine with typical procedure A to give **8b** (81%) as a colourless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 2H), 7.63 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.2, 163.2, 149.9, 139.5, 135.1, 131.7, 130.5, 130.0, 129.2, 125.7, 125.6, 125.5, 125.5, 111.2, 64.7, 49.2, 37.8, 37.6, 37.4, 37.2, 29.8, 16.5, 12.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -110.7 (t, *J* = 18.8 Hz), -111.0 (t, *J* = 18.8 Hz); ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 6.4; HRMS (ESI): *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$: 471.148990, found: 471.149106.

General procedure B: deprotection of diethylphosphonate nucleosides

A septum-sealed microwave tube charged with diethyl phosphonate derivative and trimethylsilylbromide (10.0 equiv.) in CH_3CN (0.1 M) was irradiated at 70 °C under microwave irradiation during 30 min. The progress of the reaction was monitored by TLC analysis. The reaction mixture was quenched with CH_3OH and concentrated under vacuum, then deionized H_2O (ELGA® water, 10 mL) was added and the aqueous layer was washed with CH_2Cl_2 (3 × 5 mL) and lyophilised to yield the expected phosphonic acid derivative.

***N*¹-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-uracil (9a).** The title compound was prepared from phosphonate **8a** following procedure B to give **9a** (75%) as a colourless oil. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.79 (m, 2H), 5.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 166.9, 152.7, 147.0, 131.1, 126.2, 126.1, 102.55, 38.6, 38.34, 38.2, 38.0, 20.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -113.7, -114.0. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 5.3; HRMS (ESI): *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$: 297.044718, found: 297.044641.

***N*¹-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-thymine (9b).** The title compound was prepared from phosphonate **8b** following procedure B to give **9b** (53%) as a colourless oil. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.40 (s, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.34 (d, *J* = 3.9 Hz, 4H), 2.85 (m, 2H), 1.87 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 167.0,

152.9, 142.7, 131.3, 126.0, 111.6, 38.5, 38.4, 38.3, 38.2, 21.1, 12.3; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -113.7, -114.0; ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 5.3; HRMS (ESI): *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$: 311.060279, found: 311.060291.

***N*⁴,*N*⁴-Bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-cytosine (12a).** To a solution of *N*⁴,*N*⁴-bis(Boc)cytosine **11a** (186 mg, 0.59 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (2 mL) was added Cs_2CO_3 (195 mg, 0.65 mmol, 1.1 equiv.) and the *gem* difluorinated phosphonate **5** (211 mg, 0.65 mmol, 1.1 equiv.) at room temperature and stirred under an argon atmosphere for 3 h. The resulting mixture was then diluted with EtOAc (2 × 20 mL), quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography with petroleum ether/EtOAc (98 : 2 to 1 : 2) to give product **12a** (279 mg, 85%) as a colourless oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.79 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.83 (m, 2H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.3, 154.9, 149.6, 147.1, 130.2, 124.9, 96.5, 84.8, 64.5, 51.1, 37.4 (td, *J* = 21.5, 15.4 Hz), 27.7, 16.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -110.8 (t, *J* = 19.0 Hz), -111.1 (t, *J* = 19.0 Hz); ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 7.09 (s), 6.44 (s), 5.78 (s); HRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$ 552.2281, found 552.2284.

***N*⁴,*N*⁴-Bis(Boc)-1-[(*E*)-5-diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-5-fluorocytosine (12b).** To a solution of *N*⁴,*N*⁴-bis(Boc)-5-fluorocytosine **11b** (113.5 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (1.5 mL) was added Cs_2CO_3 (123 mg, 0.38 mmol, 1.1 equiv.) and the *gem* difluorinated phosphonate **5** (121 mg, 0.38 mmol, 1.1 equiv.) at room temperature and stirred under an argon atmosphere for 3 h. The resulting mixture was then diluted with EtOAc (2 × 15 mL), quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography with petroleum ether/EtOAc (98 : 2 to 1 : 2) to give product **12a** (149 mg, 77%) as a yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.90–5.76 (m, 2H), 4.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H), 1.47 (s, 18H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.95 (d, *J* = 14.3 Hz), 153.84, 149.02, 142.02, 139.56, 133.07 (d, *J* = 34.73 Hz), 129.21, 126.94 (m), 84.89, 64.80 (d, *J* = 8.5 Hz), 51.57, 37.60 (m), 29.82, 27.86, 16.53 (d, *J* = 5.5 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -110.8, -111.1, -156.23; ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 6.23 (t, *J* = 105.8 Hz) HRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$ 570.2189, found 570.2187.

***N*¹-[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-cytosine (13a).** The title compound was prepared from phosphonate **12a** following procedure B to give **13a** (>98%) as a colorless oil; ¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ 7.95 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.87 (m, 2H), 4.44 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 2.87 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 153.7, 153.4, 146.6, 136.0, 134.0, 133.7, 120.6, 36.9 (td, *J* = 22.1, 15.6 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -113.19, -113.46, -170.84; ³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 4.79 (t, *J* = 106.19 Hz); HRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$ 312.03665 found 312.03645.

N^1 -[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-5-fluorocytosine (**13b**). The title compound was prepared from phosphonate following procedure B to give **13b** (>98%) as a colorless oil; ^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ 7.95 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.17–6.08 (m, 1H), 5.88 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.02–2.77 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 153.7, 153.4, 146.6, 136.0, 134.0, 133.7, 120.6, 36.9 (td, J = 22.1, 15.6 Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ –113.3 (t, J = 19.0 Hz), –113.6 (t, J = 18.9 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 5.68 (s), 5.04 (s), 4.40 (s); HRMS (ESI) m/z [M + H] $^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$ 295.0606 found 295.0607.

N^9 -[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-6-chloropurine (**15a**). The title compound was prepared from 6-chloropurine **14a** following procedure A to give **15a** (50%) as a colourless oil. ^1H NMR (400 MHz CDCl_3) δ 8.55 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 5.80 (m, 2H), 5.80 (dt, J = 15.6, 6.8 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.27 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.86 (m, 2H), 1.36 (t, J = 7.2 Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 152.2, 152.1, 151.7, 151.1, 145.1, 131.6, 130.1, 129.2, 125.8, 64.7, 45.5, 37.6, 37.4, 37.2, 37.0, 16.5; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ –114.1, –113.7; ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 6.3; HRMS (ESI): m/z [M + H] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{P}$: 395.084844, found: 395.084588.

N^9 -[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-2-amino-6-chloropurine (**15b**). The title compound was prepared from 6-chloro-2-aminopurine (**14b**) following procedure A to give **15b** (59%) as a colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (s, 1H), 5.90–5.75 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.68 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.26 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.85 (m, 2H), 1.35 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.1, 153.6, 151.3, 142.0, 129.7, 125.2, 124.8 (dd, J = 11.0, 5.6 Hz), 64.6 (d, J = 6.9 Hz), 44.9, 37.2 (td, J = 21.6, 15.6 Hz), 16.4 (d, J = 5.4 Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ –110.9 (t, J = 18.9 Hz), –111.2 (t, J = 18.9 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 7.10 (dt, J = 14.8, 7.3 Hz), 6.44 (dt, J = 14.6, 7.1 Hz), 5.78 (dt, J = 15.0, 7.3 Hz); HRMS (ESI) m/z [M + H] $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{O}_3\text{P}$ 410.0955 found 410.0958.

N^9 -[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-hypoxanthine (**16a**). The title compound was prepared from the 6-chlorouracil phosphonate analogue **15a** by treatment reflux acid (HCl, 1 M) to give **16a** (54%) as a colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.31 (s, 1H), 8.08 (t, J = 10.6 Hz, 2H), 7.29–6.90 (m, 1H), 5.95–5.88 (m, 1H), 5.73–5.65 (m, 1H), 4.78 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 19.7 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.0, 148.6, 146.1, 140.4, 130.5, 124.7 (d, J = 5.0 Hz), 124.1, 45.1, 37.2, 37.0–36.5 (m); ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ –111.8 (t, J = 19.8 Hz), –112.1 (t, J = 19.8 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO) δ 4.12 (t, J = 4.0 Hz), 3.51 (t, J = 4.6 Hz), 2.91 (t, J = 4.5 Hz); HRMS (ESI) m/z [M – H] $^-$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{P}$ 319.0413, found 319.0417.

N^9 -[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-guanine (**16b**). The title compound was prepared from phosphonate **15b** by treatment reflux acid (HCl, 1 M) to give **16b** (60%) as a colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.08 (s, 2H), 8.11 (s, 1H), 6.02 (s, 4H), 4.88 (d, J = 3.9 Hz, 4H), 2.92 (t, J = 18.7 Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 162.0, 155.9, 153.7, 150.1, 136.6, 127.9–127.4 (m), 107.4, 46.1, 36.9 (d, J = 15.5 Hz); ^{19}F NMR (376 MHz, MeOD)

δ –113.1 (t, J = 18.8 Hz), –113.4 (t, J = 18.8 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 5.68 (s), 5.30 (d, J = 103.5 Hz), 4.35 (s); HRMS (ESI) m/z [M – H] $^-$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$ 334.0522, found 334.0529.

N^1 -[(*E*)-5-Diethoxyphosphoryl-5,5-difluoro-pent-2-en-1-yl]-3-carbamoyl-1,2,4-triazol (**18**). The title compound was prepared from 1*H*-1,2,4-triazole-3-carboxamide (**17**) following procedure A to give **18** (42%) as a colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.49 (s, 1H), 6.04–5.96 (m, 1H), 5.85–5.71 (m, 1H), 4.93 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.34–4.22 (m, 4H), 2.99–2.80 (m, 2H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.4, 149.6, 149.5–149.1 (m), 145.9, 130.7, 123.2 (dd, J = 10.9, 6.0 Hz), 120.4, 118.2, 64.8 (d, J = 7.0 Hz), 51.6, 45.7, 36.9 (dd, J = 21.6, 6.3 Hz), 15.4; ^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ –111.8 (t, J = 19.2 Hz), –112.1 (t, J = 19.2 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 7.21 (dt, J = 15.7, 7.9 Hz), 6.54 (dt, J = 15.8, 7.9 Hz), 5.87 (dt, J = 15.9, 7.9 Hz); HRMS (ESI) m/z [M + H] $^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{P}$ 354.1185, found 354.1187.

N^1 -[(*E*)-5,5-Difluoro-5-phosphono-pent-2-en-1-yl]-3-carbamoyl-1,2,4-triazole (**19**). The title compound was prepared from phosphonate following procedure B from **18** to give **19** (>98%) as an oil; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.07 (s, 1H), 6.02–5.73 (m, 2H), 5.29 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 2.97–2.72 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.5, 149.5, 145.9, 129.8, 127.3, 124.4 (d, J = 5.8 Hz), 51.8, 36.9–36.4 (m); ^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ –114.3 (t, J = 19.3 Hz), –114.6 (t, J = 19.3 Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 5.68 (s), 5.30 (d, J = 103.5 Hz), 4.75 (s); HRMS (ESI) m/z [M + H] $^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{P}$ 295.0413 found 295.0414.

Antiviral activity assays

The antiviral assays were based on inhibition of virus-induced cytopathicity or plaque formation in HEL 299 (ATCC® CCL-137™) cell culture against herpes simplex virus 1 (HSV-1) (KOS), HSV-2 (G), vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, cytomegalovirus (HCMV), and varicella-zoster virus (VZV). Moreover, the Vero (ATCC® CCL-81™) cell culture was utilized to test such compounds against parainfluenza-3, reovirus-1, Sindbis virus and Coxsackie B4. Furthermore, the novel compounds were evaluated in HeLa cell culture against vesicular stomatitis virus, Coxsackie virus B4, and respiratory syncytial virus or MDCK (ATCC® CCL-34™) [influenza A (H1N1; H3N2) and influenza B]. Confluent cell cultures (or nearly confluent for MDCK cells) in microtiter 96-well plates were inoculated with 100 CCID₅₀ of virus (1 CCID₅₀ being the virus dose to infect 50% of the cell cultures) or with 20 plaque forming units (PFU). After 1–2 h virus adsorption period, residual virus was removed, and the cell cultures were incubated in the presence of varying concentrations (200, 40, 8, 1.6, 0.32 μM) of the test compounds. Viral cytopathicity was recorded as soon as it reached completion in the control virus-infected cell cultures that were not treated with the test compounds. Antiviral activity was expressed as the EC₅₀ or concentration required reducing virus-induced cytopathogenicity or viral plaque (VZV) plaque formation by 50%. The minimal cytotoxic concentration (MCC) of the compounds was defined as the compound concentration that caused a microscopically visible alteration of cell morphology. Alternatively, cytotoxicity of the test compounds was measured

based on inhibition of cell growth. HEL cells were seeded at a rate of 5×10^3 cells per well into 96-well microtiter plates and allowed to proliferate for 24 h. Then, medium containing different concentrations of the test compounds was added. After 3 days of incubation at 37 °C, the cell number was determined with a Coulter counter.

The cytostatic concentration was calculated as the CC_{50} , or the compound concentration required reducing cell proliferation by 50% relative to the number of cells in the untreated controls.

Acknowledgements

This work was supported in part by the grant from LabEx SYNORG and FEDER (program COSMI). The authors's thanks are due to Mrs Leentje Persoons, Mrs Lies Van Den Heurck, Mrs Ellen De Waegenaere for the biological assays.

References

- 1 E. De Clercq, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **73**, 911–922.
- 2 E. De Clercq, A. Holý, I. Rosenberg, T. Sakuma, J. Balzarini and P. C. Maudgal, *Nature*, 1986, **323**, 464–467.
- 3 S. Eriksson, B. Munch-Petersen, K. Johansson and H. Eklund, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1327–1346.
- 4 F. Pertusati, M. Serpi and C. McGuigan, *Antiviral Chem. Chemother.*, 2012, **22**, 181–203, review.
- 5 O. Baszczynski and Z. Janeba, *Med. Res. Rev.*, 2013, **33**, 1304–1344, review.
- 6 D. Topalis, U. Pradère, V. Roy, C. Caillat, A. Azzouzi, J. Broggi, R. Snoeck, G. Andrei, J. Lin, S. Eriksson, J. A. C. Alexandre, C. El Amri, D. Deville-Bonne, P. Meyer, J. Balzarini and L. A. Agrofoglio, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 222–232.
- 7 V. D. Romanenko and V. P. Kukhar, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3868–3935.
- 8 S. Halazy, A. Ehrhard and C. Danzin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 315–317.
- 9 S. A. Diab, C. De Schutter, M. Muzard, R. Plantier-Royon, E. Pfund and T. Lequeux, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 2758–2768.
- 10 H. Kumamoto, D. Topalis, J. Broggi, U. Pradère, V. Roy, S. Berteina-Raboin, S. P. Nolan, D. Deville-Bonne, R. Snoeck, D. Garin, J. M. Crance and L. A. Agrofoglio, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 3517–3526.
- 11 O. Sari, M. Hamada, V. Roy, S. P. Nolan and L. A. Agrofoglio, *Org. Lett.*, 2013, **15**, 4390–4393.
- 12 M. Bessières, O. Sari, V. Roy, D. Warszycki, A. J. Bojarski, S. P. Nolan, R. Snoeck, G. Andrei, R. F. Schinazi and L. A. Agrofoglio, *ChemistrySelect*, 2016, **1**, 3108–3113.
- 13 D. J. Burton and Z. Yang, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 189–275.
- 14 D. J. Burton and L. G. Sprague, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 613–617.
- 15 J. Huang, E. D. St, S. P. Nola and J. L. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2674–2678.
- 16 S. Fustero, A. Simon-Fuentes, P. Barrio and G. Haufe, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 871–930, review.
- 17 M. Bessières, V. Roy and L. A. Agrofoglio, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 59747–59749.
- 18 A. Porcheddu, G. Giacomelli, I. Piredda, M. Carta and G. Nieddu, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 5786–5797.
- 19 M. Hamada, V. Roy, T. R. Mcbrayer, T. Whitaker, C. Urbina-blanco, S. P. Nolan, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei, R. F. Schinazi and L. A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **67**, 398–402.
- 20 J. H. Hong, S.-Y. Kim, C.-H. Oh, K. H. Yoo and J.-H. Cho, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2006, **25**, 341–350.
- 21 S. Hikishima, M. Isobe, S. Koyanagi, S. Soeda, H. Shimeno, S. Shibuya and T. Yokomatsu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1660–1670.

Florian CHEVRIER

Synthèse d'analogues nucléotidiques visant l'inhibition de la Thymidylate Synthase Flavine-Dépendante

Résumé :

Ces dernières années, l'OMS a émis un signal d'alarme à propos de l'occurrence majeure de résistance bactérienne qui constitue un problème de santé publique global. A ce titre, la recherche de nouvelles cibles enzymatiques et le développement de nouveaux antibactériens ciblant ces dernières de manière sélective constitue alors un enjeu actuel impératif. La mise en évidence d'une nouvelle enzyme de la famille des thymidylates synthases par l'équipe de Myllykallio en 2002 et son étude a permis de faire de cette dernière une cible de choix pour la conception de nouveaux antibactériens par sa présence exclusive chez des bactéries pathogènes pour l'Homme, sa non-similarité structurale avec l'enzyme thymidylate synthase classique et son mécanisme particulier mettant en jeu un couple de cofacteurs oxydo-réducteurs (NADPH/FAD). Ce manuscrit, divisé en trois grandes parties, s'intéresse dans un premier temps à la synthèse métallo-catalysé de nouveaux analogues nucléotidiques du FAD substitué sur l'azote centrale par une chaîne acyclique de type alkényle phosphonate. Dans un second temps, le manuscrit traite de la translation de cette même chaîne latérale sur l'azote N_7 couplée à un large panel de base hétéroaromatique bicycliques ou tricycliques par deux réactions clés : une alkylation régiosélective en conditions de Vorbrüggen et une étape de métathèse croisée. Enfin, la troisième partie porte sur la préparation d'acyclonucléosides comportant un motif d'intérêt de type *gem*-difluorométhylphosphonate connu comme étant un mime isostérique et isoélectronique du groupement phosphate. L'incorporation de ce motif a permis la synthèse de petite librairie d'ANPs inédits à visée anti-FDTS et anti-virales.

Mots clés : résistance bactérienne, antibactériens, FDTS, thymidylate synthase, flavine, 5-déazaflavine, phosphononucléosides, alkényles phosphonates, métathèse, difluorométhylphosphonates.

Synthesis of nucleotides analogs targeting the inhibition of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase

Abstract :

In recent years, WHO has warned against the major occurrence of bacterial resistance as a global public health problem. As such, the search for new enzymatic targets and the development of new antibacterials targeting them selectively is therefore an imperative challenge. The discovery of a new enzyme among the family of thymidylate synthases by Myllykallio's team in 2002 and its study has made it a prime target for the design of new antibacterials by its sole presence in pathogenic bacteria, its structural dissimilarity with the classical thymidylate synthase enzyme and its singular mechanism involving a pair of oxido-reducing cofactors (NADPH / FAD). This manuscript, divided into three main parts, is initially interested in the metallocatalytic synthesis of new nucleotide analogues of FAD substituted on the central nitrogen by an alkenyl phosphonate acyclic chain. In the second part, the manuscript deals with the translation of this same side chain on nitrogen N_7 on a large panel of bicyclic or tricyclic heteroaromatic base through two key reactions: a regioselective alkylation under Vorbrüggen conditions and a cross metathesis step. Finally, the third part relates to the preparation of acyclonucleosides comprising a *gem*-difluoromethylphosphonate functional group which is known to be an isosteric and isoelectronic mimic of the phosphate group. The incorporation of this moiety has allowed the synthesis of a small library of novel ANPs for anti-FDTS and anti-viral purposes.

Keywords : bacterial resistance, antibacterials, FDTS, thymidylate synthase, flavin, 5-deazaflavin, phosphonucleosides, alkenyl phosphonates, metathesis, difluoromethylphosphonates.



ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de
Chartres - 45067 Orléans cedex 2

