



HAL
open science

Etude de fonctions chimiques clivables en milieux biologiques et leurs applications en protéomique chimique et imagerie de fluorescence

Geoffray Leriche

► **To cite this version:**

Geoffray Leriche. Etude de fonctions chimiques clivables en milieux biologiques et leurs applications en protéomique chimique et imagerie de fluorescence. Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF062 . tel-00945942

HAL Id: tel-00945942

<https://theses.hal.science/tel-00945942>

Submitted on 13 Feb 2014

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 des Sciences Chimiques

UMR 7199 – Laboratoire de Conception et Application de Molécules
Bioactives

THÈSE

présentée par :

Geoffray LERICHE

soutenue le : 28 juin 2012

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

Discipline/ Spécialité : Chimie/Chimie Organique

**Etude de fonctions chimiques clivables
en milieux biologiques et leurs
applications en protéomique chimique
et imagerie de fluorescence**

THÈSE dirigée par :
M. WAGNER Alain

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
M. JULLIEN Ludovic
M. ROMIEU Anthony

Professeur, École normale supérieure de Paris
Docteur, Université de Rouen

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Mme. HEITZ Valérie

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels (LFCS) de la faculté de pharmacie de Strasbourg et sous la direction du Docteur Alain Wagner.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Docteur Alain Wagner pour m'avoir fait confiance depuis le premier entretien jusqu'à la fin de cette thèse. Merci pour tes conseils, tes encouragements et pour avoir partagé tes multiples connaissances dans tous les domaines. Tes idées novatrices et audacieuses m'ont ainsi permis de développer mes connaissances au delà de ma formation initiale de chimiste organicien. J'espère avoir été à la hauteur de la liberté et des responsabilités que tu m'as confié.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury pour avoir accepté et pris le temps de juger mon travail : le Professeur Valérie Heitz de Strasbourg, le Docteur Anthony Romieu de Rouen et le Professeur Ludovic Jullien de Paris.

Que serait un chimiste sans la RMN et la spectrométrie de masse ? Pas grand chose. Alors un grand merci à Cyril Antheaume, Patrick Wehrung et Pascale Buisine. Mention spéciale pour Cyril véritable dieu de la RMN.

Michel, je souhaite te remercier doublement. Tout d'abord pour tes qualités de chimiste et ton approvisionnement constant en rhodamine, mais aussi pour ton côté MacGyver. Tu gères avec brio tous les aléas du labo.

Je voudrais également remercier l'ensemble de nos collaborateurs ayant participé de près ou de loin à mes recherches : les équipes du Professeur Alain Van Dorsselaer, du Docteur Laurent Brino, du Docteur Valérie Lamour, du Professeur Yves Mély, du Docteur Jean-Serge Rémy et du Docteur Dominique Bagnard.

Dans le cadre de notre collaboration avec le centre de recherche de Sanofi-Aventis de Toulouse, je souhaite remercier Sébastien Roudières et Alexandre Lebrun pour l'ensemble de leurs travaux et spécialement le Docteur François Autelitano pour son aide et sa disponibilité.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements au Docteur Andrey Klymchenko pour tout son savoir en fluorescence et sa disponibilité. Chacune de nos conversations m'ont permis d'avancer.

En tant que fidèle Padawan, je souhaite sincèrement remercier Ghyslain pour m'avoir appris tout ce qu'il savait, aidé, encadré, suivi, conseillé, ... (la liste est trop longue).

J'aimerais adresser un énorme merci à toutes ces personnes qui m'ont entouré et subi pendant ces quatre ans passés au laboratoire. Les très anciens : Pacou, Christelle, Cédric T., Cynthia et Géraldine. Les anciens : Martin, Manu, Antoine, Cédric G., Aurélia, Laure, Mathieu et Sylvie ma super labmate chantante. Ma génération : Manue, Samira et Hélène (pour toutes nos discussions et les nombreuses soirées). Les Jeunes : Mathias (pour n'avoir jamais voulu parler français), Coraline et Sacha (pour tout ...). Et enfin les bébés : Jessie et Marion.

Merci à tous les joueurs de foot de l'équipe LFCS.

Enfin, un grand merci à mes parents pour m'avoir permis d'arriver jusqu'ici mais surtout je ne pourrais jamais assez remercier Audrey qui partage ma vie et également ce travail de thèse par procuration. Ce manuscrit lui est dédié.

Sommaire

Préambule	1
I. Les liens clivables en chimie-biologie	3
I.1. Introduction	3
I.2. Article 1 : Cleavable linkers in chemical-biology	3
II. Développement de sondes clivables pour la protéomique chimique	16
II.1. Les sondes d'enrichissement clivables en protéomique chimique	17
II.1.1. Les liens enzymatiquement clivables	20
II.1.2. Les liens photochimiquement clivables	20
II.1.3. Les liens chimiquement clivables	21
II.1.4. Conclusion	23
II.2. Les azobenzènes comme lien clivable	24
II.2.1. Introduction	24
II.2.2. Synthèse et clivage d'un lien fonctionnel basé sur le composé de Bogyo	25
II.2.2.1. Synthèse	26
II.2.2.2. Evaluation du clivage du composé-modèle 9	27
II.2.2.3. Conclusion	28
II.3. Etude de la relation structure Azo/réactivité au dithionite	28
II.3.1. Article 2 : Optimization of the azobenzene scaffold for reductive cleavage by dithionite; Development of an azobenzene cleavable linker for proteomic applications	29
II.3.2. Article 2 : Partie expérimentale	35
II.4. Etude de l'enrichissement de gyrase en conditions non-dénaturantes	54
II.4.1. La gyrase comme modèle de complexes protéiques	54
II.4.2. Mise au point d'un enrichissement de gyrase et validation des conditions non-dénaturantes	55
II.4.2.1. Article 3: Nondenaturing chemical proteomics for protein complex isolation and identification	56
II.4.2.2. Article 3 : Partie expérimentale	60
II.5. Développement de marqueurs pour la fonctionnalisation chimique et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃	68
II.5.1. Synthèse d'une sonde Phosphine-HAZA-Biotine	68

II.5.2. Utilisation de la Phosphine-HAZA-Biotine pour la fonctionnalisation chimique et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N ₃	70
II.5.2.1. Fonctionnalisation de néo-glycoprotéines-N ₃ par réaction de Staudinger	70
II.5.2.2. Enrichissement de néo-glycoprotéines-N ₃ par élution au dithionite de sodium	72
II.5.3. Synthèse d'une sonde Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine	74
II.5.4. Perspectives	76
II.6. Conclusion	76
III. Mise au point de quencheurs chimiquement désactivables pour l'imagerie de fluorescence	79
III.1. Principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET)	80
III.2. Les sondes pro-fluorescentes de type "Förster Resonance Energy Transfer"	81
III.3. Principe d'un quencheur chimiquement désactivable	83
III.4. Validation du concept de quencheurs chimiquement désactivables	84
III.4.1. Développement d'un quencheur chimiquement désactivable	85
III.4.2. Synthèse d'une sonde fluorescente de type FRET incorporant un quencheur chimiquement désactivable	86
III.4.3. Etude en solution de la désactivation chimique du quencheur de la sonde fluorescente 20	87
III.4.4. Etude en cellules vivantes de la désactivation chimique du quencheur de la sonde fluorescente 20	90
III.4.5. Conclusion	93
III.5. Mise au point d'une sonde pro-fluorescente de type FRET activable par voie biologique et chimique	94
III.5.1. Article 4 : A FRET-based probe with a chemically deactivatable quencher	95
III.5.2. Article 4 : Partie expérimentale	99
III.6. Travaux préliminaires pour l'optimisation du système de quencheur chimiquement désactivable	117
III.6.1. Recherche de quencheurs chimiquement désactivables et absorbant à hautes longueurs d'ondes	117
III.6.2. Recherche de réactifs biocompatibles pour la désactivation de quencheur Azo	120
III.6.2.1. Présentation de la méthode de criblage	120
III.6.2.2. Choix des réactifs et résultats	122
III.6.2.3. Test de cytotoxicité	126
III.6.3. Conclusion	127
III.7. Conclusion	128

Chapitre IV. Développement d'une méthode pour l'évaluation de la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs : application aux liaisons pH-sensibles **130**

IV.1. Les groupements pH-sensibles pour la libération contrôlée de principes actifs **132**

IV.1.1. L'acidité lysosomale	132
IV.1.2. L'acidité tumorale	133
IV.1.3. Les structures pH-sensibles	135

IV.2. Les sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité de composés pH-sensibles **139**

IV.2.1. Le concept de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles	139
IV.2.2. Sélection d'un couple fluorophore/quencheur pour le développement de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles	140
IV.2.2.1. Etude des propriétés spectrales de la carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) en fonction du pH	141
IV.2.2.2. Etude du quencheur BHQ-2 (Black Hole Quencher)	142
IV.2.3. Synthèse et étude d'un conjugué TAMRA/BHQ-2	143
IV.2.3.1. Synthèse d'un conjugué TAMRA/BHQ-2	144
IV.2.3.2. Etude des propriétés spectroscopiques de TAMRA-Amide-BHQ-2	145
IV.2.4. Conclusion	147

IV.3. Validation de la méthode d'évaluation séquentielle pour l'étude d'un groupement spiro di-orthoester **148**

IV.3.1. Etude de l'hydrolyse d'un composé-modèle spiro di-orthoester	148
IV.3.1.1. Synthèse d'un composé-modèle spiro di-orthoester	148
IV.3.1.2. Etude de l'hydrolyse par HPLC d'un composé-modèle spiro di-orthoester	150
IV.3.2. Synthèse de la sonde pro-fluorescente TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)	151
IV.3.3. Synthèse de la sonde pro-fluorescente TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)	156
IV.3.4. Etude en solution de l'hydrolyse de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)	157
IV.3.4.1. Validation de la méthode d'évaluation	157
IV.3.4.2. Etude fine de la labilité du groupement spiro di-orthoester aux pH acides	159
IV.3.4.3. Conclusion	160
IV.3.5. Etude de l'hydrolyse en cellules vivantes de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)	160
IV.3.5.1. Suivi d'hydrolyse par microscopie de fluorescence	160
IV.3.5.2. Suivi d'hydrolyse par cytométrie de flux	165
IV.3.5.3. Conclusion	168
IV.3.6. Etude de l'hydrolyse en animal et en milieu tumoral de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)	168
IV.3.6.1. Validation de la méthode d'évaluation	169

IV.3.6.2. Conclusion	174
IV.3.7. Conclusion	175
IV.4. Généralisation de la méthode à l'évaluation comparative de la bio-labilité de motifs pH-sensibles	177
IV.4.1. Sélection et synthèse de motifs acido-sensibles pour le développement de sondes pro-fluorescentes pH-sensibles	177
IV.4.2. Etude comparative des motifs acido-sensibles aux pH 5,5 et 7,4	184
IV.4.3. Evaluation comparative des motifs acido-labiles étudiés et conclusion	190
IV.4.4. Synthèse de sondes pro-fluorescentes	191
IV.4.4.1. Synthèse de TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)	192
IV.4.4.2. Synthèse de TAMRA-THP-(BHQ-2)	197
IV.4.4.3. Synthèse de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)	199
IV.4.4.4. Synthèse de TAMRA-Acétal-(BHQ-2)	203
IV.4.5. Evaluation comparative en solution de la bio-labilité de motifs pH-sensibles	204
IV.4.5.1. Labilité en milieux acides	205
IV.4.5.2. Labilité en milieux oxydants	208
IV.4.5.3. Labilité en milieux nucléophiles	211
IV.4.5.4. Conclusion	213
IV.4.6. Evaluation comparative en cellules vivantes de la bio-labilité de motifs pH-sensibles	214
IV.4.6.1. Résultats	215
IV.4.6.2. Conclusion	216
IV.4.7. Conclusion	217
IV.5. Conclusion	218
Conclusion générale et perspectives	220
Partie expérimentale	225
Bibliographie	264

Abréviations

Abréviation	Nom complet
ABPP	Activity Based Probe Profiling
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AC ₄ ManNaz	4-azidoacetylmannosamine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Azo	Molécule basée sur une structure azobenzène
Boc	Tert-butyloxycarbonyle
BHQ	Black Hole Quencher
BODIPY-FL	Bore-dipyrométhène-FL
Cbz	Benzyloxycarbonyle
CCCP	Compound-centric chemical proteomics
Dabcyl	4-(diméthylamino)-azobenzène-4'-carboxylic acid
DCM	Dichlorométhane
DEAC	7-diéthylaminocoumarine-3-carboxylic acid
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMAP	N,N-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
Et ₂ O	Ether diéthylique
éq	Equivalent
EtOH	Ethanol
FRET	Förster resonance energy transfer
h	Heure(s)
HAZA	2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetraméthyl-uronium-hexafluorophosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	High-performance liquid chromatography
H ₂ O	Eau
gyrA	Gyrase A
gyrB	Gyrase B
j	Jour(s)
KCl	Chlorure de potassium
K _d	Constante de dissociation

kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de potassium
mM	Millimolaire
M	Molarité
MDA	Malondialdéhyde
MeOH	Méthanol
min	Minute
N	Normalité
nm	Nanomètre
novo	Novobiocine
MO	Micro-ondes
MS	Mass spectrometry
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NaNO ₂	Nitrite de sodium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium anhydre
Na ₂ S ₂ O ₄	Dithionite de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaH ₂ PO ₄	Dihydrogénophosphate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de sodium
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NH ₄ HCO ₂	Formiate d'ammonium
N ₃	Azoture
pTsOH	Acide paratoluènesulfonique
PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium
	hexafluorophosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayon X
sat	Saturé(e)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TA	Température ambiante
TAEA	Tris (2-aminoethyl)amine
TAMRA	Carboxytétraméthylrhodamine
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofuranne
THP	Ether de Tetrahydropyranyle
UV	Ultraviolet
μM	Micromolaire

Préambule

Une réaction chimique est une transformation moléculaire induite par la rupture ou la formation de liaisons chimiques particulières.

En chimie traditionnelle, la formation de liaisons fait souvent référence à la conception de voies de synthèse, tandis que la rupture d'une liaison particulière est surtout associée à la manipulation sélective de groupements protecteurs. Cependant dans les années 90, l'étude de la rupture sélective d'une liaison a trouvé un nouveau champ d'application avec le développement de liens clivables pour la chimie combinatoire et la synthèse sur phase solide.¹ Dans ces deux domaines, les coupures de liaisons peuvent être réalisées dans une grande variété de milieux (organiques ou aqueux), recourir non seulement à une grande diversité d'agents chimiques, mais aussi de conditions réactionnelles (température, pression, stœchiométrie, vitesse et séquence d'addition). En ajustant ces paramètres, il est alors possible d'optimiser les rendements de réactions.

Récemment, l'essor de la chimie-biologie a révélé un besoin constant de nouveaux outils chimiques pour interagir, manipuler et visualiser le vivant. Cette discipline a également souligné le peu de fonctions et réactifs chimiques compatibles avec les milieux biologiques ; en particulier le manque de liens clivables dont la coupure pourrait s'effectuer sans détruire ou dénaturer l'objet biologique. Dans ce domaine d'application, les conditions réactionnelles sont imposées par le milieu biologique. Une partie de la chimie a ainsi été "réinventée" pour s'adapter aux contraintes des milieux vivants. Cela a abouti à de nouvelles générations de réactions et de réactifs biocompatibles pouvant réagir sélectivement et efficacement dans des milieux aqueux dilués et à température ambiante.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la biocompatibilité de réactions et de réactifs conduisant à la rupture de liaisons chimiques dans le cadre de trois applications distinctes en chimie-biologie :

- le développement de liens clivables utilisables en protéomique chimique non-dénaturante.
- le développement de quencheurs chimiquement désactivables pour l'imagerie de fluorescence de stimuli biologiques.
- la mise au point d'une méthode d'évaluation de la labilité de liaisons chimiques en conditions biologiques natives.

Ces travaux de thèse ont donné lieu à plusieurs publications. C'est pourquoi ce manuscrit va s'organiser autour de quatre chapitres dont trois seront illustrés par les articles parus.

Dans un premier chapitre, une revue de l'état de l'art des groupements clivables utilisés en chimie-biologie sera présentée sous la forme d'un article récemment publié dans "*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*".

Le deuxième chapitre s'intéressera à une étude présentant le développement d'une sonde clivable pour l'enrichissement de complexes protéiques en conditions non-dénaturantes. Deux articles parus dans "*European Journal of Organic Chemistry*" et "*ChemBioChem*" présenteront les résultats respectivement obtenus lors de la mise au point d'un motif clivable en conditions douces et l'utilisation de ce dernier dans une étude protéomique. La synthèse de nouvelles sondes clivables pour l'enrichissement de néo-glycoprotéines sera également traitée.

Le troisième chapitre consistera à introduire le concept de quencheur désactivable avec le développement d'un nouveau type de sondes FRET activables à la fois par un stimulus biologique et un stimulus chimique. La mise au point et l'utilisation d'un quencheur désactivable seront présentées telles que publiées dans "*Chemical Communications*", puis une seconde partie traitera de la recherche de nouveaux réactifs capables de désactiver un quencheur en conditions biocompatibles.

Dans le quatrième chapitre, la mise au point d'une méthode d'évaluation de la labilité de liaisons chimiques en conditions biologiques natives sera présentée. Cette méthodologie sera plus particulièrement appliquée à l'étude de différents motifs pH-sensibles vis-à-vis de l'acidité biologique des lysosomes ou des tumeurs.

I. Les liens clivables en chimie-biologie

Dans cette partie nous nous proposons de réaliser un état de l'art des liens clivables utilisés dans le domaine de la chimie-biologie. Cette étude bibliographique sera présentée sous la forme d'une revue publiée dans "*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*".²

I.1. Introduction

En biologie, le développement de composés clivables est associé à quatre champs d'applications différents : les prodrogues, la protéomique, l'imagerie et le séquençage d'ADN. La première partie de la revue a consisté à justifier l'utilité de liens clivables pour chacun de ces domaines. Puis, un aperçu des différents groupements utilisés a été présenté en fonction de leurs conditions de clivages et indépendamment de leurs utilisations. Cette étude est ainsi organisée en sept parties, selon que le clivage soit réalisé par :

- des enzymes.
- des agents nucléophiles et basiques.
- des agents réducteurs.
- photo-irradiation.
- des agents électrophiles et acides.
- une catalyse métallique et organométallique.
- des agents oxydants.

Cette étude a pour but d'exposer les avantages et limitations de chacun des liens présentés. De plus, elle doit permettre de sélectionner une structure clivable en fonction des conditions de clivage souhaitées.

I.2. Article 1 : Cleavable linkers in chemical-biology



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Cleavable linkers in chemical biology

Geoffroy Leriche, Louise Chisholm, Alain Wagner*

Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch-Graffenstaden, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 30 July 2011

Keywords:

Cleavable linker
Chemical biology
Proteomic
ABPP
Biocompatible

ABSTRACT

Interest in cleavable linkers is growing due to the rapid development and expansion of chemical biology. The chemical constraints imposed by the biological conditions cause significant challenges for organic chemists. In this review we will present an overview of the cleavable linkers used in chemical biology classified according to their cleavage conditions by enzymes, nucleophilic/basic reagents, reducing agents, photo-irradiation, electrophilic/acidic reagents, organometallic and metal reagents, oxidizing reagents.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The ability to break chemical bonds that link two molecular entities can be an effective tool, and consequently many cleavable linkers with this capability have been developed. Applications of cleavable linkers have been characterized for organic synthesis and more recently chemical biology.

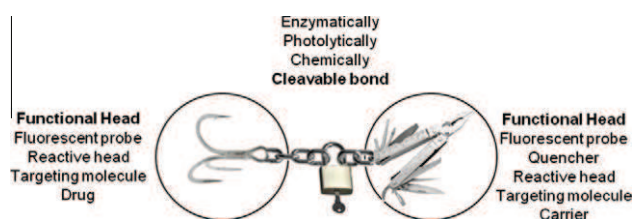
Progress in combinatorial chemistry, solid phase synthesis (SPS) and micro-chip chemistry in the early 1990s renewed the interest in cleavable linkers.^{1–4} These linkers connect the organic substrate to the solid support. They are required to be stable during the synthesis steps and are eventually cleaved to release the product. The choice of linker is crucial during the planning of the synthesis strategy. An array of linkers have been developed and optimized for specific small molecule synthetic strategies; these were optimized to be resistant to a diverse range of conditions involved in synthesis, while reactive towards other chemistries. Generally, these linkers are cleaved under harsh chemical conditions. The linker strategies in solid-phase organic synthesis have been extensively reviewed.⁵

The recent rise of chemical biology has led to the demand for cleavable linkers that are compatible with the biological molecules and systems. Chemists started to reassess potential functional groups and cleavage reactions that could be used in biological chemistry, since the harsh conditions required by organic synthesis linkers are unsuitable. The new types of cleavable linkers have to satisfy various challenging constraints, such as mild cleavage conditions, usage of bio-orthogonal reagents, high yield at low concentrations, and the ease of eliminating excess of reagents and by-products. Additional technical requirements will depend on

the specific application of the linker, for example often the objective of proteomic experiments is to isolate and identify labelled proteins, which are expressed at low levels, and to determine where the label is incorporated in the protein.^{6–9} Consequently, the ideal cleavable affinity purification linkers enable the quantitative and specific release of proteins in low abundance from solid supports, without generating by-products detrimental to subsequent analysis, such as mass spectrometry (MS). The linkers must be resistant to the labelling and purification steps, but are also required to be labile in mild conditions, so not to degrade the labelled proteins.

In this review, we define a linker as a molecule with two functional heads joined together through a cleavable bond (Scheme 1). The functional heads serve to interact with or to manipulate the biological target; they can be reactive groups for protein cross-linking, ligation or for click chemistry; fluorescent probes for diagnostic tools, proteomic analysis or cell imaging; tags for MS analysis or purification; targeting molecules for functional proteomics or activity based probe profiling (ABPP).

The flexibility in the design of the cleavable linkers has led to their application in many different biological disciplines including drug development, proteomics, imaging and DNA sequencing.



Scheme 1. General representation of a cleavable probe.

* Corresponding author. Fax: +33 368854306.

E-mail address: wagner@bioorga.u-strasbg.fr (A. Wagner).

1.1. Drug development

Many drugs often cause unwanted, dose-limiting, and debilitating side effects because they are untargeted, toxic compounds that act on the normal and disease cells alike. Prodrugs and drug delivery systems have been developed to try to reduce amount of off-target effects. Prodrugs are defined as chemicals which have little or no pharmacological activity undergoing biotransformation to a therapeutically active metabolite. The objective of prodrugs is to improve the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of the molecule.¹³⁹ Prodrugs generally consist of two elements, the active agent and a promoiety “carrier”, which are joined together by a linker and are frequently activated by enzymatic hydrolysis or chemical conditions specific to the diseased tissue.

Drug delivery systems aim to administer an active drug to achieve a therapeutic effect and to improve the product's efficacy and safety, compared to the drug alone. Many different drug delivery systems have been developed and can be prepared from soluble and insoluble, or biodegradable natural and synthetic polymers, microcapsules, cells, cell ghosts, lipoproteins, liposomes, and micelles. All of the different carriers must be able to carry, target and release the drugs within the required timeframe, and at the desired location. Cleavable linkers used for drug delivery should be sensitive to enzymatic hydrolysis or to chemical conditions.^{140,141}

1.2. Proteomics

Cross-linking agents aim to form a covalent bond between two spatially adjacent residues within one or two polypeptide chains. To identify protein binding partners, the cross linking agents need to be able to detect and stabilize transient interactions. The cross-linking agents frequently form covalent links between lysine or cysteine residues in the proteins. Alternatively, the cross-linking agent can be photoreactive. Cross-linking cleavable linkers can be used to distinguish between inter- and intra-protein interactions of receptors, signalling cascades, and the structure of multi-protein complexes.¹⁴²

Affinity purification is used to obtain an uncontaminated sample of a protein or to determine a physical interaction between a protein and interacting partners. The cleavable affinity purification probe can be used to conjugate the ligand to the solid support and it is cleaved to liberate the proteins under mild conditions. The li-

gand can be an inhibitor, a suicide substrate, a small molecule substrate (for ABPP), a metal ion chelate, or a drug. The identification of the proteins can be determined through MS, and the purified proteins could be used in functional studies.^{143,144}

1.3. Imaging

Medical imaging is used for instance to diagnose or examine diseases and to study anatomy and physiology. The detection and staging of tumors currently relies on computed tomography, which has the disadvantages of being expensive and using radiation; while magnetic resonance imaging (MRI) scans are cheaper, they are limited by the sensitivity of gadolinium chelates, or iron. Currently, 25% of the MRI examinations use contrast agents to increase the clarity of the soft tissue being visualized. Recently developed MRI scan contrast agents contain cleavable linkers, which enable the detection of enzymes involved in malignancy and metastasis.^{18,26}

Molecular imaging can be used to characterize biological processes or conditions in vivo, using animal and cellular models. Most molecular imaging probes use inducible fluorescence to monitor biological reactions. Some rely on a cleavable linker to separate the fluorophore from either a quencher or another fluorescent dye. The cleavable bonds can be responsive to specific conditions such as enzyme activity, or the presence of thiol compounds.

1.4. DNA sequencing

Recently developed DNA sequencing by synthesis has reduced the cost and increased the speed of sequencing. The development of this technology has been possible due to the conjugation of nucleotides bases to a fluorescent probe via a cleavable linker. These linkers can be cleaved via exposure to light, palladium, or by enzymes. In DNA sequencing by synthesis, a DNA polymerase incorporates a single fluorescently modified nucleotide, complementary to the template base, and this stops the sequencing reaction. The remaining unincorporated nucleotides are washed away. The identity of the incorporated nucleotide is recorded and then the fluorescent dye is removed by a cleavage reaction. The next incorporation step is started after washing. DNA sequencing is used in a wide range of research sectors including comparative genomics and evolution, forensics, epidemiology, and applied medicine for diagnostics and therapeutics.^{145,146}

Table 1
Examples of different cleavable groups and their applications

Cleavage conditions	Cleavable group	Applications
Enzymes	TEV, ¹⁰ trypsin, ^{11,12} thrombin, ¹³ cathepsin B, ¹⁴ cathepsin D, ¹⁵ cathepsin K, ¹⁶ caspase 1, ¹⁷ matrix metalloproteinase ^{18–20} sequences, phosphodiester, ^{21,22} phospholipid, ²³ ester, ²⁴ β -galactose ^{25,26}	Protein purification, imaging enzyme activity and tumor, drug delivery, DNA sequencing, metabolite enrichment
Nucleophilic/basic reagents	Dialkyl dialkoxysilane, ^{27–29} cyanoethyl group, ^{30,31} sulfone, ³² ethylene glycolyl disuccinate, ^{33,34} 2-N-acyl nitrobenzenesulfonamide, ³⁵ α -thiophenylester, ³⁶ unsaturated vinyl sulfide, ^{37,38} sulfonamide after activation, ^{39–41} malondialdehyde (MDA)-indole derivative, ⁴² levulinoyl ester, ⁴³ hydrazone, ⁴⁴ acylhydrazone, ⁴⁵ alkyl thioester ^{46–48}	Protein modification and purification, structural biology, imaging, synthesis of oligonucleotides
Reducing reagents	Disulfide bridges, ^{49–64} azo compounds ^{65–79}	Protein modification and purification, structural biology, tumor-targeting, imaging, visualization of PEG shedding, drug delivery
Photo-irradiation	2-Nitrobenzyl derivatives, ^{80–90} phenacyl ester, ^{91,92} 8-quinolinyl benzenesulfonate, ⁹³ coumarin, ^{94,95} phosphotriester, ⁹⁶ bis-arylhydrazone, ⁹⁷ bimine bi-thiopropionic acid derivative ⁹⁸	Protein purification, imaging protein activity, structural biology, drug delivery, DNA sequencing, metabolite enrichment
Electrophilic/acidic reagents	Paramethoxybenzyl derivative, ^{99,100} <i>tert</i> -butylcarbamate analogue, ¹⁰¹ dialkyl or diaryl dialkoxysilane, ¹⁰² orthoester, ^{103,104} acetal, ^{103,105} aconityl, ^{106,107} hydrazone, ^{55,108–110} β -thiopropionate, ^{111–113} phosphoramidate, ¹¹⁴ imine, ^{115,116} trityl, ¹¹⁷ vinyl ether, ¹¹⁸ polyketal, ^{119,120} alkyl 2-(diphenylphosphino)benzoate derivatives ¹²¹	Protein purification, structural biology, drug delivery
Organometallic and metal catalyst	Allyl ester, ^{122,123} 8-hydroxyquinoline ester, ¹²⁴ picolinate ester ¹²⁵	DNA sequencing
Oxidizing reagents	Vicinal diols, ^{126–136} selenium compounds ^{137,138}	Structural biology

In this review we will present an overview of cleavable linkers classified according to their cleavage conditions, along with a selection of their biological applications (Table 1).

2. Enzymatically cleavable linkers

In chemical biology, among the six different enzyme classes (oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, ligases), hydrolases are widely used to induce chemical-bond cleavage using water as the nucleophile. Many different types of bonds (ester, peptide, glycoside, etc.) are able to be cleaved but each one requires a specific enzyme (esterase, protease, glycosidase, etc.). This enzyme–substrate specificity distinguishes enzymes from other chemical catalysts and enables enzymes to be used as a cleavage reagent. Proteases (also called peptidases) are enzymes that catalyze the breakdown of proteins by hydrolysis of peptide bonds.

Hydrolytic activity is restricted when one amino acid or a specific sequence of amino acids is recognized by the enzyme. The longer the amino acid sequence required for the enzyme to recognize the cleavage site, the more specific the cleavage. Compared to commonly used proteases, such as pepsin, trypsin or chymotrypsin, virus proteases have more stringent sequence specificities.¹⁴⁷ Speers et al. designed a tobacco etch virus protease (TEV)-sensitive probe, using the ENLYFQG sequence as the cleavable linker, a biotin group for affinity purification and an azide for a click reaction.¹⁰ The probe was designed to be used in tandem orthogonal proteolysis (TOP) experiments. Following proteome labelling with an alkynyl ABPP probe, the cleavable biotin probe was attached to proteins by a click reaction. The proteins were captured on a solid support, purified from the cell lysate and digested by trypsin. The MS analysis of the tryptic peptides can be used to identify the protein. The proteins remaining on the solid support can be subsequently cleaved with TEV and analyzed by MS to identify the probe's labelling site. In this study, cleavage times were overnight and 12 h for trypsin and TEV proteases respectively. Based on this trypsin cleavable linker approach, the same group developed a protease cleavable probe strategy to chemically tag and enrich specific sets of metabolites based on shared functional-group composition.¹¹

Since proteases have key roles in many diseases, protease-responsive linkers are widely used in drug release systems¹³ or in diagnostic tools.^{18,19,148} MRI scan contrast agents can detect specific types of malignant and metastatic cancer. Activatable cell penetrating peptides (ACPPs) are polycationic cell penetrating peptides conjugated to a polyanionic inhibitory domain which minimizes the peptides' adsorption and cellular uptake. The release of the inhibitory domain by proteolytic cleavage leads to the uptake of the ACPP by surrounding cells. ACPPs labeled with Cy5 or gadolinium(III) can be 2 and 9, which are overexpressed in a wide variety of tumors.²⁰ This can be used for disease progression monitoring or for fluorescence guided surgery. The use of fluorescence imaging to visualize the tumor during surgery improved survival in murine models of cancer.

Proteases are not the only enzymes that can be exploited in chemical biology; other enzyme-sensitive linkers have been developed such as esterases and β -galactosidases. FRET-based probes were designed to image esterase activities. The insertion of phospholipid and phosphodiester groups between two fluorescent dyes or a dye/quencher pair allows the detection of phospholipase and phosphodiesterase cleavage activity, respectively.^{21–23}

According to our definition the linker's cleavable group needs to be modified on two positions; for enzymatically cleavable linkers this requirement can affect enzyme–substrate recognition. For example, β -galactosidase can only tolerate the modification of its substrate, β -galactopyranoside, on the anomeric carbon. Komatsu et al. used quinone methide chemistry to overcome this problem and developed a FRET-based probe by conjugating a trifunctional

4-hydroxymandelic acid to β -galactopyranoside on the phenol position, and adding two fluorescent dyes on the mandelate linkage, with a carbamate as the leaving group (Scheme 2).²⁵ In the presence of β -galactosidase, the sugar unit is removed to form quinone methide. The species created reacts with a nucleophile and releases acceptor of fluorescence to restore fluorescence of donor.

3. Nucleophile/base sensitive linkers

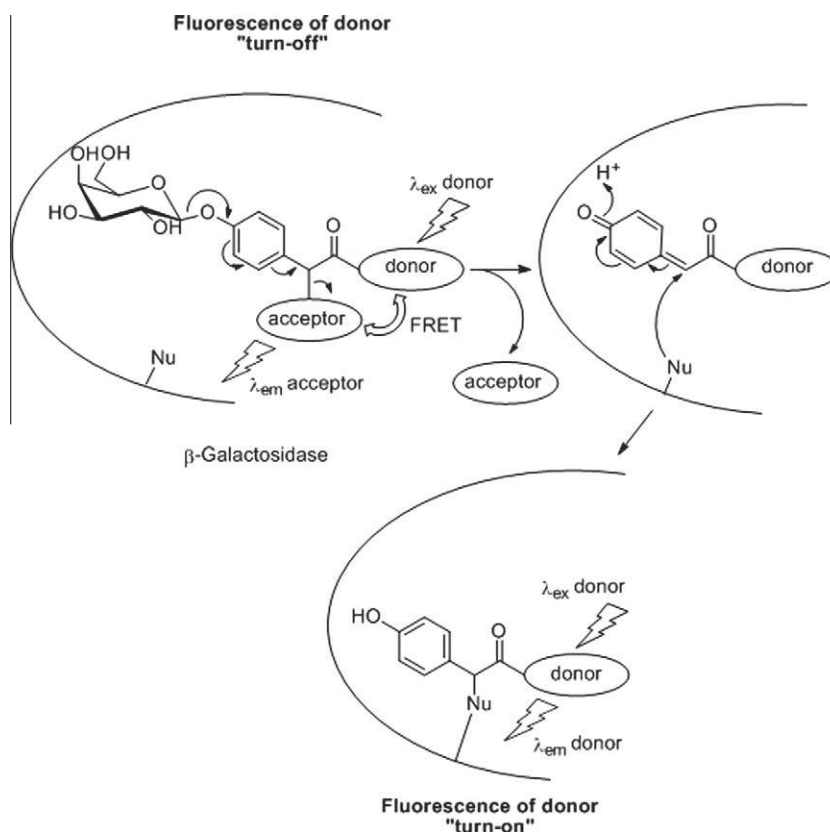
3.1. Halogen nucleophiles

Fluoridolizable linkers are widely used in organic chemistry as silicon-based protecting groups for alcohols. The high thermodynamic affinity of fluorine for silicon allows their removal in orthogonal and mild conditions using a fluorine source. In this reaction a fluoride ion reacts with silicon as nucleophilic species and the cleavage conditions depend on the steric hindrance of the silicon's alkyl group. Since amino acid residues or DNA bases are not covalently altered by fluoride ions, fluoridolizable linkers appear to be a suitable candidate for bioorthogonal and biocompatible cleavage conditions. Lin et al. were the first to describe silicon cleavage in physiological conditions.²⁷ The authors prepared a probe that contained a biotin group for affinity purification, a dialkoxysilane function as the cleavable group and a chloroacetyl ester to target the cysteine-protease papain. Once formed, the biotinylated protein was purified by affinity chromatography using potassium fluoride as eluent. It was shown that elution was temperature dependent, and 0.5 M potassium fluoride was required for a complete cleavage at 4 °C in less than 6 h. Since this work, this cleavage methodology has been used for oligonucleotide purification rather than in the proteomics field.^{28,29}

Fluoride ions can also trigger bond cleavage due to their basic properties. Knapp et al. designed a fluoride cleavable linker based on a 2-cyanoethyl function that is widely used as a protecting group in oligonucleotide synthesis.³⁰ In basic conditions, the labile acidic vicinal proton of the nitrile function is removed to induce the molecule dissociation by β -elimination. Associated with a reporter molecule (like azide or NHS group), this linker was used to reversibly label oligonucleotides. However, currently cleavage is limited to nonaqueous systems (TBAF 1 M in THF) and this linker is only used in organic synthesis.

3.2. Oxygen nucleophiles

According to our literature review, two different oxygen nucleophile sensitive linkers were used with reactivity toward hydroxyl ions. The first generation was developed for protein cross-linking and is based on a sulfone linker, which could be cleaved at pH 11.6 at 37 °C for 2 h.³² The second generation of linkers were the ester groups cleaved by saponification. The reactivity of the ester to cleavage can be enhanced by the use of electron-withdrawing groups. In chemical biology, ester-based cleavable compounds were initially used for protein purification¹⁴⁹ and in structural biology. The structure of protein complexes is determined by cross-linking the proteins and MS and MS/MS analysis; Petrotchenko et al. described a bi-reactive sulfo-NHS ester cross-linking reagent with a deuterated ethylene glycolyl disuccinate as the cleavable group.³³ After cross-linking and enzyme digestion, cross-linked peptides were incubated in a 1 M ammonium hydroxide cleavage solution for either 2 h or overnight at 25 °C. The cleavage cocktail was directly analyzed by MS and the interacting subunits of the HIV-reverse transcriptase complex were identified. For this approach, chemical cleavable cross-linkers were used to identify the interpeptide and intrapeptide interactions within the HIV-reverse transcriptase complex.



Scheme 2. FRET-based cleavable probe sensitive to β -galactosidase activity.

3.3. Thiols nucleophiles

In secondary amine synthesis or solid phase synthesis, nitrobenzenesulfonamides are known to be cleaved with a thiol nucleophile, like β -mercaptoethanol.^{150,151} Based on this reaction, Yokoshima et al. designed a cleavable photoaffinity probe which enables the release of proteins in a solution of 3% mercaptoethanol at pH 9.2 at 20 °C for 4 h.³⁵

Long et al. developed a FRET based ratiometric thiol probe inspired by native chemical ligation strategies and the well-known reactions between the *N*-terminal cysteine's nucleophilic thiol group and the electrophilic carbon of α -thioesters.^{36,152} The probe has a thiophenylester group as a cleavable linker, between a Bodipy molecule and rhodamine dye. Without a thiol reactive species, these dyes are closely coupled together in a restricted spatial environment and rhodamine quenches Bodipy's fluorescence via a FRET mechanism. In presence of free cysteines, the probe is turned-on: *trans*-thioesterification and intramolecular rearrangement of the probe affords a non-fluorescent rhodamine spirolactam compound, and a free Bodipy. This reaction can also be used in living cells to detect intracellular thiols, such as cysteine and glutathione, which play an important roles in redox related biological processes. A variety of human diseases with abnormal levels of biological thiols are associated with slow growth, liver damage, skin lesions, Alzheimer's diseases, cardiovascular diseases and coronary heart disease.³⁸

Cysteines can be modified by electron-deficient alkynes to form a vinyl sulfide linkage. Interestingly, depending on the structure of the alkynes used, the vinyl sulfide bond can be either stable or sensitive to thiol nucleophiles and DTT; however, they are consistently insensitive to TCEP. Shiu et al. reported that the modification of cysteines by terminal alkynes can result in a vinyl sulfide linkage, which can be cleaved by thiophenol, cysteine or β -mercaptoethanol via an addition/elimination mechanism (Scheme 3). Using this approach, it was possible to label peptides with biotin

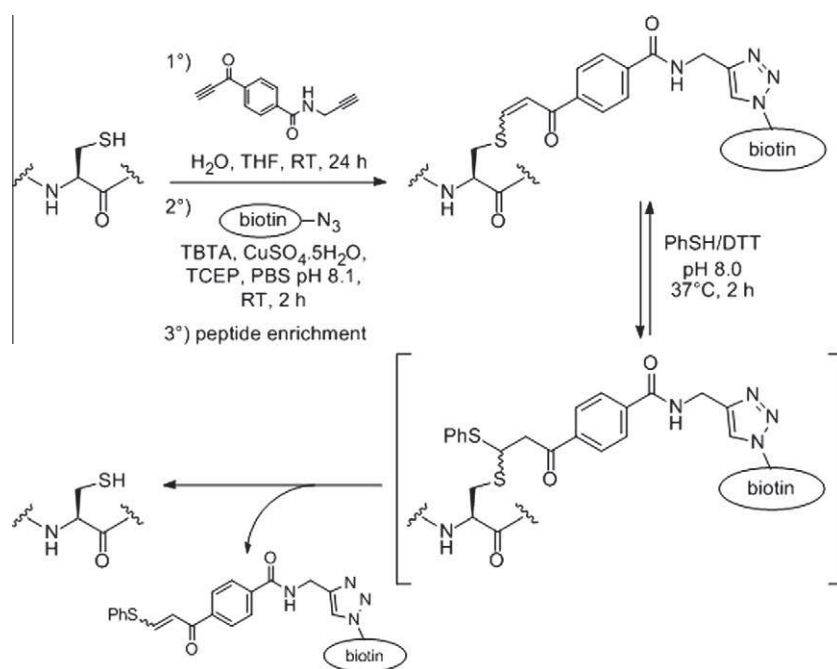
for purification from a solid support (71% yield). For this study, the cleavage cocktail was an aqueous solution of thiophenol/DTT at pH 8 at 37 °C for 2 h.³⁷ The same sensitive linker was also used to image thiols in cells using a quencher/dye pair.³⁸

3.4. Safety-catch linkers sensitive to nucleophiles upon activation

Safety-catch linkers allow greater control over the timing of the bond breakage, because the linker will remain stable until it is activated for cleavage by a chemical modification. This principle was first demonstrated by the acylsulfonamide linker in SPS.^{153,154} The main advantage of these molecules is their stability towards both basic and strongly nucleophilic reaction conditions. The linkers have to be activated via *N*-alkylation before they can be cleaved. The highly reactive *N*-acylsulfonamide species created provides the reactive linkage structure for cleavage by various nucleophiles. Park et al. were the first to describe the use of this two-step cleavable linker in proteomics.⁴⁰ They developed a probe that contains a sulfonamide linker surrounded by three functional groups: a biotin group for affinity purification, a ligand for galactose-specific lectins and a diazirine-based-photoprobe. After photo-cross-linking and washing the solid support; the linker was activated with 10 mM of iodoacetone nitrile (pH 9 for 1 h), and the addition of 20 mM ammonium hydroxide (1 h) cleaved the linker and released 76% of the proteins. Alternatively, during *N*-alkylation of the acylsulfonamide linker, iodoacetic acids salts in acidic medium (pH 5 for 10 min) can be used for instead of the iodoacetone nitrile.⁴¹ These milder reaction conditions can minimize protein degradation.

3.5. Nitrogen nucleophiles

Displacement reactions involving a specific nitrogen species as a nucleophile can occur in mild cleavable conditions. These



Scheme 3. Chemoselective cysteine modification by electron-deficient alkynes and cleavage of the formed vinyl sulfide linkage by thiophenol.

reactions can be classified into two groups; cleavage by aminolysis or exchange reaction.

For aminolysis cleavage, examples include the cleavage of a malondialdehyde (MDA) indole derivative by either pyrrolidine or hydrazine,⁴² and the cleavage of an ester linker by hydroxylamine³⁴ or hydrazine.⁴³ In organic synthesis, a levulinoyl ester, an acid stable protecting group, can be removed either by sodium borohydride, sulfite anion donors, or by hydrazinolysis.¹⁵⁵ The presence of the γ -keto ester group in levulinoyl esters allows the reaction with hydrazine to occur in mild conditions, generating the corresponding alcohol and dihydropyridazinone compounds. Geurink et al. fine-tuned the levulinoyl ester structure to overcome base lability.⁴³ An optimized affinity probe was designed to contain a cleavable levulinoyl ester linked to a biotin tag and a selective proteasome inhibitor. After capture and pull-down, proteins were quantitatively released from the solid support using 100 mM hydrazine solution at 38 °C at pH 7.5 for 15 h.

Acylhydrazones⁴⁴ and hydrazones^{45,156} can be used as cleavable linkers through transimination in a mildly acidic medium. An amine catalyst (e.g., aniline, *p*-anisidine or hydroxylamine) accelerates hydrolysis and enables the effective transition between stable and dynamic states, which is required for cleavage and exchange. This approach has the advantage of enabling the replacement of one functional group with another, when the linker is cleaved; this provides additional possibilities for protein labelling. For example, authors reported purification proteins by biotin–avidin capture followed by exchange of the biotin tag for a fluorescent dye or an isotope-coded affinity tag (ICAT) for further analysis. To identify new binding partners of anticoagulant protein S, Dirksen et al. modified protein S with a purification probe which contained a bisarylhydrazone cleavage site and a biotin tag (Scheme 4).⁴⁴ Proteins complexes were eluted using a mixture of 100 mM hydroxylamine and 100 mM aniline at pH 6.0 at room temperature for overnight. Since the use of strongly nucleophilic amines could induce protein denaturation, Dirksen et al. proposed an alternative strategy to cleave the hydrazone bond using an electrophilic reagent, like an aldehyde. However, this strategy also requires aniline as a catalyst for transimination, because the aldehyde cannot directly react with the hydrazone linkage. Although this method reduced the proteins

yield, it released aldehyde-functionalized proteins, which provided a new group for chemical modification.

4. Reduction sensitive linkers

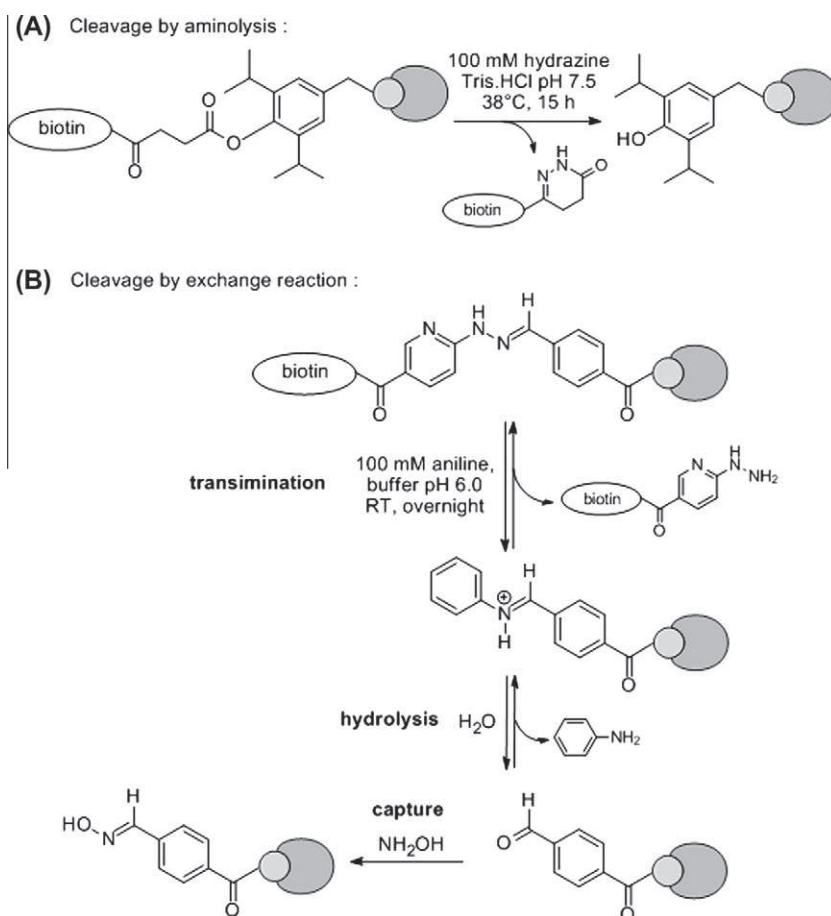
Reduction sensitive linkages have been used in chemical biology for a long time and it is a commonly used class of cleavable linker. However, there are only two types of cleavable linkers sensitive to reductive conditions: disulfide bridges and azo compounds.

4.1. Disulfide bridges

In naturally occurring proteins, disulfide bridges generally play a role in maintaining the protein structure. They are known to be efficiently and rapidly cleaved by mild reducing agents like dithiothreitol (DTT), β -mercaptoethanol or tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). In chemical biology, disulfide bridges have been used in a wide range of applications including functional and structural proteomics,^{49–54} drug delivery,^{55–57} tumor imaging,^{59,60} DNA and protein–DNA complex purifications.^{61,62} The disulfide-based cleavable linker is commonly used due to its straightforward synthesis and rapid cleavage. However, these linkers have several disadvantages including their instability towards both electrophilic and nucleophilic polar reagents. This subjects disulfide linkers to thiol exchanges and can lead to non-specific cleavage in intracellular conditions.

Pullela et al. designed a fluorescent probe to detect thiols *in vitro* and *in vivo*.⁶³ Fluorescein and rhodamine dyes were introduced on either side of a phenyl disulfide linker, and the fluorescence was turned-on by endogenous thiols cleaving the linker in zebrafish embryos.

Based on extracellular disulfide exchange principle, Zhang et al. developed a prodrug system.⁵⁶ The anticancer drug Camptothecin (CPT) is a potent topoisomerase I inhibitor but it is poorly soluble and is instable under physiological conditions. The prodrug strategy adopted targeted CPT to the tumors by linking the drug to neuropeptide substance P (SP) via a disulfide bond. SP can specifically bind to the neurokinin-1 receptor, which is overexpressed in many



Scheme 4. Two amine sensitive linkers: (A) Aminolysis cleavage of levulinoyl ester by hydrazine; (B) Cleavage of bisaryl hydrazone by transamination reaction and capture of the formed aldehyde by hydroxylamine.

different types of cancer, and it is rapidly internalized. Following the internalization of the prodrug, the high glutathione concentration within the cells reduced the linker, and this released the active drug in the tumor cells. This prodrug increased the selectivity of treatment compared to unconjugated drug alone.

Gartner et al. proposed a hindered disulfide linker for quantitative proteomic applications to overcome base-lability toward thiols (Scheme 5).⁶⁴ A catch and release probe was designed containing a biotin group for affinity purification, a cysteine-reactive isotope label either side of a disulfide bridge. The cleavable linker was sterically hindered by a carbon framework rendering it inert to thiol exchange or reduction by DTT under alkylating conditions (10 mM DTT/6 M urea/buffer at room temperature for 60 °C). After proteins were immobilized on a solid support, they were eluted in denaturing conditions using 10 mM of TCEP in a mixture of ammonium bicarbonate/methanol (8:2) for 1 h at 50 °C. The authors underlined the critical importance of using the cosolvent to cleave the probe.

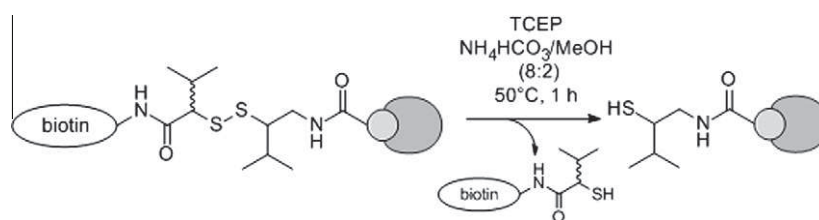
4.2. Azo compounds

Azo linkers are very appealing to chemical biologists since they are able to undergo cleavage following treatment with sodium dithionite, a mild and potentially bio-orthogonal reducing agent. The azo compound is reduced into two aniline moieties via an electrochemical reduction mechanism¹⁵⁷ and this allows the use of reducing agents that are commonly used in many biological protocols, such as TCEP, DTT. In chemical biology, azo compounds have been used to cross-link proteins for over a decade and more

recently for protein affinity purification.^{65–67} Verhelst et al. used this cleavable function to design a protein enrichment probe, which was based on a 4-(2'-hydroxy-phenylazo)-benzoic acid scaffold, with a biotin on one side of the azo and an activity-based probe for cathepsin on the other.^{68,69} After capture, the cathepsin proteases were released from streptavidin beads in three dithionite elutions (3 × 25 mM dithionite at pH 7.4 for 15 min) and the cleavage efficiency was greater than 90%. The functional groups surrounding the cleavable bond were modified and have been used in different proteomic studies.^{70–73} Landi et al. developed their own linker that could be cleaved with 300 mM dithionite solution at pH 6.5 for 10 min.⁷⁴ Hang and co-workers subsequently developed a second generation of azo linkers which elute proteins in a single step using 25 mM of dithionite for 30 min.⁷⁵

To enhance the reactivity of azo compounds towards dithionite at physiological pH and to decrease dithionite concentration, we decided to carry out an extensive structure/reactivity study to fine-tune the azo scaffold.⁷⁶ A 2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenyl-azo)benzoic acid (HAZA) was identified as an optimal structure for cleavage (Scheme 6). This compound was functionalized with a biotin on one side and an affinity probe targeting Gyrase-B, a subunit of DNA gyrase on the other. After capture and on-bead purification, proteins were rapidly eluted in 5 mM dithionite at pH 7.4 for 5 min.⁷⁷ Activity tests demonstrated that these extra-mild conditions permitted the recovery DNA gyrase A2B2 complex in its active form and demonstrated that the protein purification conditions were non-denaturing.

The use of azo reduction linkers is not restricted to functional proteomics, it can also be used to modify proteins on the interior



Scheme 5. Cleavage of hindered DTT resistant disulfide bond by TCEP.

surface of bacteriophages,⁷⁸ or to image hypoxia.⁷⁹ Kiyose et al. developed a smart FRET-based probe with a QCy5 fluorescent dye and BHQ3 azo based-quencher. The reducing conditions induced by hypoxia cleaved the azo bond in the quencher and turned on fluorescence. The probe was used for fluorescence imaging of hypoxic cells and real-time monitoring of ischemia in the liver and kidney of living mice. Based on this work, azo compounds might become a new platform for tumor drug delivery exploiting the hypoxic conditions of tumor cells.

5. Photocleavable linkers

Cleavable reactions triggered by light are highly selective. Moreover, photosensitive groups are stable in different chemical conditions (acidic, basic, etc.). For all these reasons, photocleavable molecules were widely used, as protecting groups in synthetic organic synthesis¹⁵⁸ and as cleavable linkers in SPS.¹ In the literature, we found many different examples for their use in the chemical biology; however, we will present just an overview. For a complete overview of “caged” compounds, we refer to these general reviews.^{159–161}

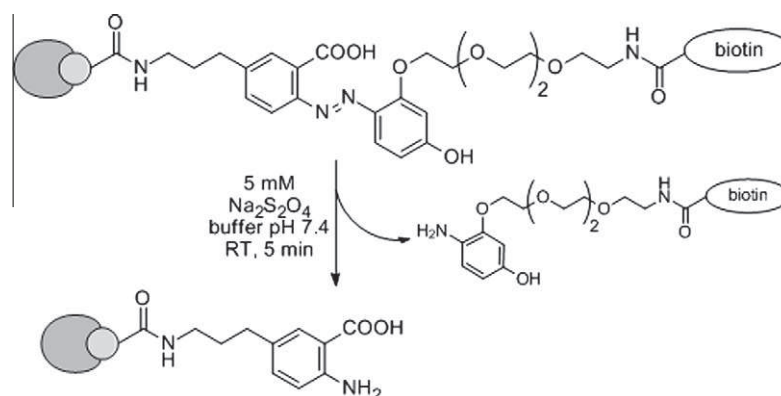
5.1. The *ortho*-nitrobenzyl derivatives

To the best of our knowledge, the most popular type of photolabile linker is the *ortho*-nitrobenzyl alcohol group and its derivatives. Typically, wavelength absorptions are located in the near-UV (300–365 nm) range of the spectrum and they can be fine-tuned by the addition of methoxy groups on the aromatic ring (Scheme 7).¹⁶² Photolysis rates can be increased by the presence of a methyl group on the benzylic carbon,¹⁶³ and the reaction generally occurs via a Norrish-type II mechanism. Nitro group excitation leads to intramolecular hydrogen abstraction in γ -position, followed by the formation of azinic acid, which is highly reactive and rearranges into a nitroso compound. One of the biggest drawbacks of *ortho*-nitrobenzyl derivatives is that the release of the nitroso reactive compound can be harmful in biological medium and can induce unwanted side

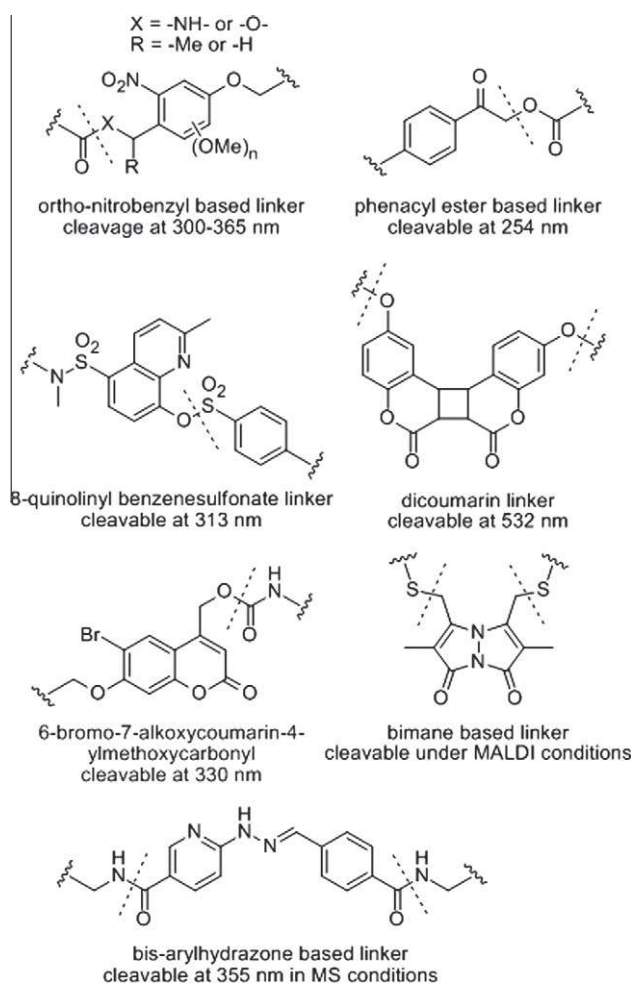
reactions.¹⁶⁰ In spite of this, many groups use this scaffold as a light-sensitive linker to study single nucleotide polymorphism,⁸⁰ record enzyme activity by fluorescence,⁸¹ quantitatively analyze proteomes,⁸² label proteins with fluorescent tags,⁸³ study protein–protein or peptide–DNA interactions by mass spectrometry,^{84,85} analyze hepatitis C virus RNA polymerase protein,⁸⁶ deliver drugs from silica nanoparticles,⁸⁷ and determine protein structures.^{88–90}

5.2. Phenacyl ester derivatives

Phenacyl ester derivatives can be cleaved by photosolvolysis through a radical scission of a carbon–oxygen bond. It is an alternative cleavable linker to *ortho*-nitrobenzyl derivatives and has higher yields following photolysis, and no reactive products are formed during the reaction (Scheme 7). However, phenacyl esters are sensitive to nucleophiles, unlike *ortho*-nitrobenzyl derivatives.¹⁶⁴ Recently, Orth et al. designed a photolabile probe to capture metabolites on a solid support.⁹¹ This trifunctional phenacyl ester linker bears an azide to link a metabolic catcher, a fluorescent dye for HPLC visualization of the trapped metabolites and a biotin group for enrichment. After capture and immobilization on solid support, metabolites were eluted by UV-induced cleavage at 254 nm for 7 min in 69% yield. Unfortunately, this linker cannot be used with all biomolecules, since wavelengths below 300 nm are absorbed by proteins and can cause their degradation. Okamoto et al. used a 4-hydroxy-phenacyl ester derivative to develop a molecule-releasing system based on the molecular-beacon strategy.⁹² An oligodeoxynucleotide (ODN) was functionalized at the 5' end by a triplet quencher and 3' end with a phenacyl ester and a biotin as the leaving functional molecule. In the initial state, the triplet quencher is in close proximity to the ester bond and inhibits cleavage. In presence of complementary target DNA, hybridization opens up the ODN hairpin-loop structure, which allows photolysis at 312 nm in biocompatible conditions. This study suggested that biotin could be replaced with a bioreactive agent and this molecule could be used in drug release.



Scheme 6. Cleavage of azo compound (HAZA scaffold) by sodium dithionite.



Scheme 7. Examples of photocleavable linkers; (dashed line = sites of cleavage).

5.3. Others photocleavable linkers

Other photolabile linkages were previously used to purify ligand–receptor complexes,⁹³ to generate photocleavable peptides/proteins⁹⁴ or for drug delivery (Scheme 7).⁹⁵ We will limit this section to the application of photo-sensitive linkages for MS analysis.

During MS analysis, the cleavage of photo-sensitive cross-linking agents needs to incorporate a label into the cross-linked peptides, which enables the identification of cross-linked peptides from other peptides. Gardner et al. presented two generations of cross-linking agents. The first is based on a triester phosphate group which is cleaved upon IR irradiation by a CO₂ laser.⁹⁶ The second is based on a bis-aryl hydrazone linker and is cleaved under UV irradiation at 355 nm.⁹⁷ In 2009, Petrotchenko et al. designed a new cross-linking agent: a bismane bithiopropionic acid *N*-succinimidyl ester (BiPS), which is photocleavable, fluorescent, homobifunctional, amine reactive and isotopically coded.⁹⁸ This molecule enables the identification of cross-linked proteins by fluorescence and MS. In this application, cleavage is laser photo-induced and occurs directly in MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) conditions.

6. Electrophile/acid sensitive linkers

Two different modes of electrophilic cleavage are used in chemical biology: acidic sensitive linkers that are sensitive to proton

sources, and alkyl 2-(diphenylphosphino)benzoate derivatives sensitive to azide compounds.

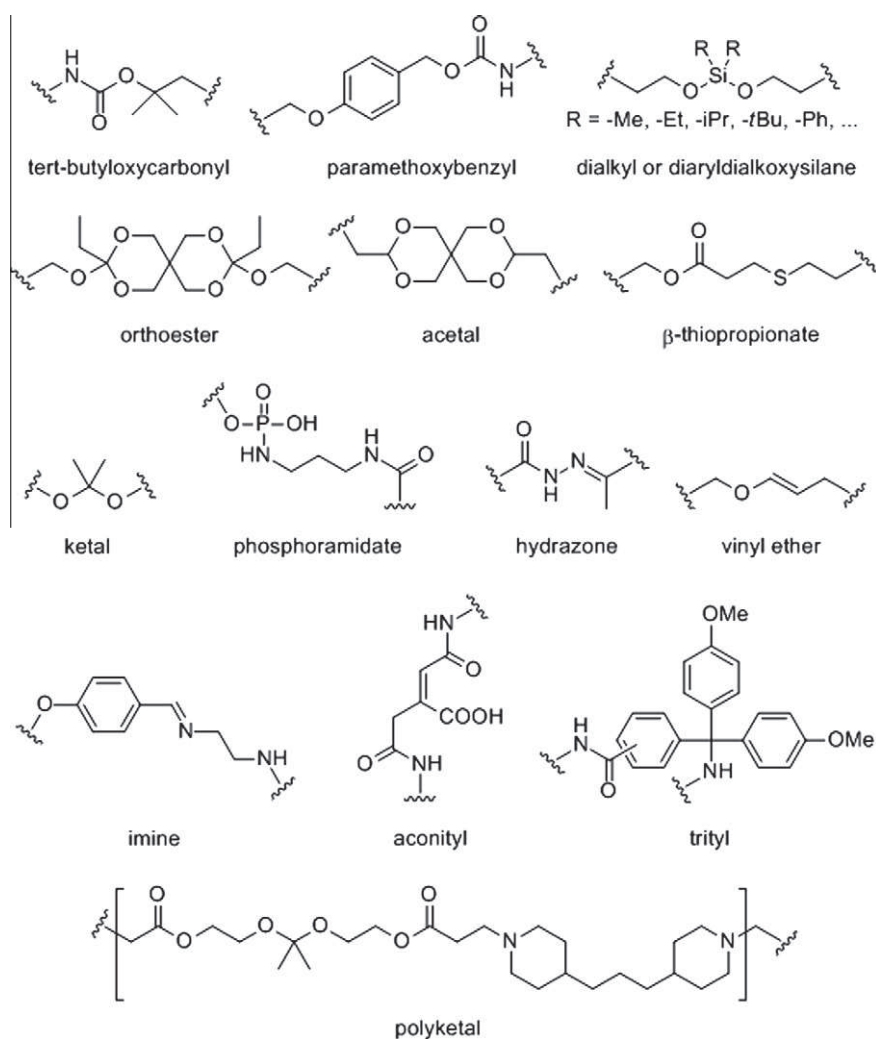
6.1. Acid cleavable linker

Proton sensitive bonds are among the most frequently used cleavable functions in organic chemistry; illustrated by the development of the BOC group which protects amines or the Merrifield resin used in solid phase synthesis. In organic chemistry, the cleavage conditions that can be tolerated are very flexible regarding the acids' reagents, solvents, temperatures and pH. In contrast, biocompatible acid cleavable linkers must be responsive to minor changes in pH. Strong acidic conditions can lead to the denaturation of proteins and DNA. Biocompatible acid cleavable linkers are chosen for their instability near physiological pH and are often different from the classical protecting groups, which are cleaved with strong acids. However, paramethoxybenzyl^{99,100} or tert-butylcarbamate¹⁰¹ scaffolds, which are both cleaved by trifluoroacetic acid, were previously used as probes for proteomic expression profiling analysis (Scheme 8). However, their use has been somewhat limited since trifluoroacetic acid denatures proteins and DNA and induce non-specific cleavage.

Recently Szychowski et al. designed an enrichment probe with a diphenyldialkoxysilane cleavable bond, a biotin as a purification tag and an azide as the chemical reactive group.¹⁰² Following the labelling of GFP, 95% of proteins were eluted from the solid support with 5% formic acid (at pH ≈2.5, incubated at room temperature, for 30 min). These elution conditions are milder than those previously described, but they are still denaturing. To the best of our knowledge, no probe has been described to be sensitive to mild acids for protein pull-downs. Only a few papers characterize reversible protein cross-linking probes sensitive to acidic conditions.^{103,106} This is due to the difficulties in designing linkers that are stable during protein capture and purification, but are cleaved under mild biocompatible conditions.

Acidic pH-gradients are widely used to trigger cleavage for drug delivery systems or responsive polymeric biomaterials. It is well known that the local acidic conditions are correlated with various diseased states, such as tumors, ischemia and inflammation.^{165,166} To ensure that drugs accumulate in these specific areas and not normal tissues, different rates of hydrolysis must be induced by even smaller differences in pH. Selectivity and efficiency of cleavage is based on its specific reaction kinetics. In contrast to classical linkers, this is not a simple turn on/off system stimulated by a chemical agent. In the literature, we found many different examples of acid-sensitive linkers for drug delivery and has been previously reviewed.¹⁶⁷ For example, an acid-sensitive linker was used as a part of a nanoparticle drug delivery system, which was based on the natural polysaccharide pullulan, and the anticancer drug, doxorubicin (Dox).¹⁰⁸ Dox is joined to the pullulan backbone by a pH-sensitive hydrazone bond, and these conjugates self-organize into nanoparticles due to the hydrophobic nature of the drug in water. The drug is released in acidic conditions of pH 5, which surrounds hypoxic tumor cells, but the conjugate is stable at pH 7. In comparison to the unmodified Dox, the pullulan–Dox conjugate has an improved biocirculation, biosafety and cardiotoxicity profile, while the anti-tumor effects remain comparable.

In the field of drug delivery, the most common cleavable structures are: dialkyl and diaryldialkoxysilane,⁵⁵ orthoester,¹⁰⁴ acetal,¹⁰⁵ acetyl,¹⁰⁷ hydrazone,^{109,110} β-thiopropionate,^{111–113} phosphoramidate,¹¹⁴ imine,^{115,116} trityl,¹¹⁷ vinyl ether,¹¹⁸ and polyketal (Scheme 8).^{119,120} Although a broad spectrum of groups have been used in physiological conditions, it is difficult to choose the best linker for cleavage at a specific pH, because a systematic study



Scheme 8. Examples of acidic sensitive linkers.

comparing the cleavable structure and their pH sensitivities has not yet been published.

6.2. Azide cleavable linker

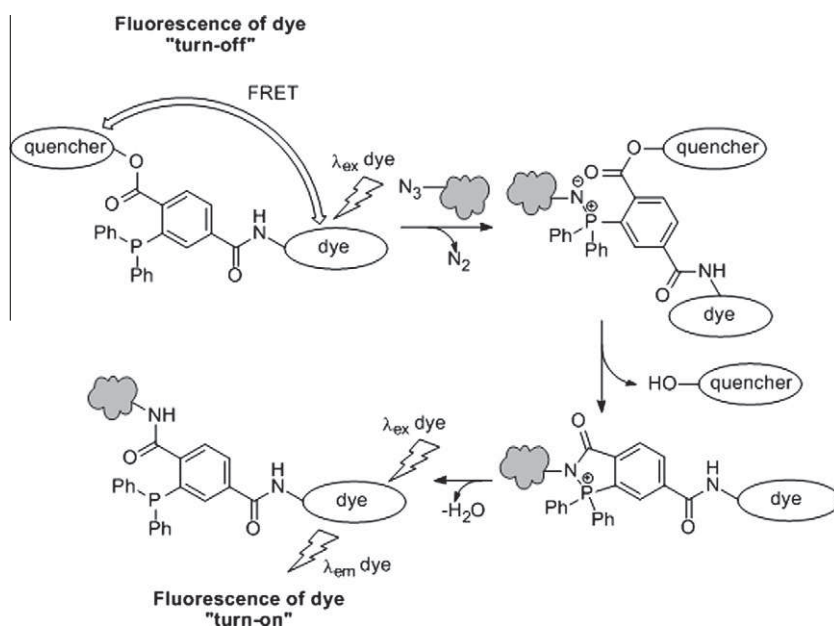
Chemical reactions that can break or form bonds in water can be used as the basis of a cleavable linker, for example the Staudinger ligation.^{168,169} This reaction is proceeded by the nucleophilic attack of an alkyl 2-(diphenylphosphino)benzoate derivative on an azide, to form an aza-ylide intermediate (Scheme 9). Then the ester traps the aza-ylide, which leads to the formation of an amide. In this process, the ester acts as a cleavable linker, and the azide as a bioorthogonal chemical agent, which guarantees a chemoselective and bioorthogonal cleavage.

To image azides in living cells, Hangauer et al. designed a FRET-based turn-on fluorogenic phosphine probe.¹²¹ Phosphine was derivatized with a fluorescent dye and the alkoxy residue was functionalized with a quencher, to form a turn-on probe by intramolecular FRET quenching. After labelling cellular glycans with an azide, the derivatized phosphine was incubated with the living cells for 8 h at 37 °C. The subsequent Staudinger ligation released the quencher and turned on the fluorescence. However, this system is hampered by its slow kinetics and the oxidation-sensitive linker.

7. Metal-assisted cleavage

Organometallic compounds are used to catalyze the modification of proteins containing non-natural amino-acids,¹⁷⁰ but their use as cleavage reagent in chemical biology has only been reported a few times. The allyl function is a commonly used protecting group for alcohols in organic synthesis and it is also used as a cleavable linker in DNA sequencing by synthesis.^{122,123} Nucleotides are capped on their 3'-OH by a fluorescent dye via an allyl carbamate linkage; this nucleotide can reversibly terminate transcription. Each nucleotide is labelled with a different fluorescent dye. The nucleotide can be incorporated into the growing DNA chain by the polymerase and the capped 3'-OH stops the polymerase reaction. The fluorescence is measured, and the allyl carbamate linkage is cleaved in a deallylation mixture (Thermopol reaction buffer/ $\text{Na}_2\text{PdCl}_4/\text{P}(\text{PhSO}_3\text{Na})_3$) at 70 °C for 30 s. These harsh cleavage conditions limit the use of this linker to synthesis reactions.

Metal cleavable linkers were also used in the design of peptide nucleic acids (PNAs), which were developed for enzyme-independent DNA/RNA hybridization methods. Two PNAs were synthesized, each containing one half of the complementary sequence to the DNA template; and either contained an ester linker or a chelating pyridylpyrazolyl ligand. In the presence of the DNA



Scheme 9. FRET-based cleavable probe triggered by a Staudinger ligation between a phosphine derivative and an azide.

template, the two PNAs are brought into close proximity and the Cu(II) complexation on the ester linkage leads to 73% cleavage in 30 min.¹²⁴ This technique has the disadvantage that a single mismatch within quinoline-derived PNA/DNA duplex reduced the rate of cleavage fourfold. This problem was overcome by Boll et al. who used a picolinate-ester instead of a 8-hydroxyquinoline ester, and their reaction is slightly more selective than the natural T4 DNA ligase enzyme.¹²⁵

8. Oxidation sensitive linkers

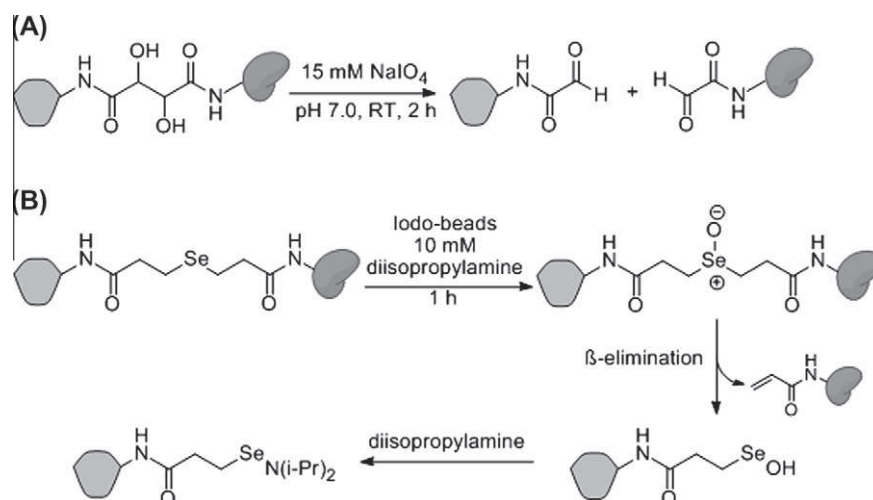
Sodium periodate is undoubtedly the most frequently used biocompatible oxidizing agent due to its ability to cleave vicinal diols to form two aldehydes compounds (Scheme 10). One example of this type of cleavable linker consists of a vicinal diol with a tartaric acid spacer and two functional groups at both ends. Using this structure as a base, Smith et al. designed two disuccinimidyl tartarate (DST) reagents to examine the ubiquinone cytochrome *c* reductase protein complex.¹²⁶ After cross-linking, both reagents were cleaved with 15 mM sodium periodate at pH 7.0 for 2 h. Since this study, water-soluble DST and DST-modified reagents have been made commercially available and have been used in many different protein cross-linking studies.^{127–133} Diepoxybutane is also a linker used in structural biology and forms, after cross-linking, the vicinal diols structure and can be cleaved by sodium periodate.^{134–136}

Selenium based linkers contain cleavable bonds sensitive to oxidizing agents, such as sodium periodate or *N*-chlorobenzenesulfonamide immobilized on polystyrene beads (iodo-beads).^{137,138} The trigger agent oxidizes the labile bond to selenium oxide, which is then cleaved directly via intramolecular β -elimination or rearrangement. Advantageously, sodium periodate does not react with DNA,¹⁷¹ or destroy disulfide linkages; consequently protein structure and complexes are frequently maintained (Scheme 10), in contrast to reductive cleavable agents. However, sodium periodate can damage RNA and some proteins; glycoproteins are particularly sensitive.

9. Summary and conclusions

This review outlines seven different classes of cleavable linker used in chemical biology. Although there is no systematic study

that comprehensively compares the advantages and disadvantages of the various cleavage strategies, some general observations can be drawn from the literature. The use of enzyme-sensitive linkages provides chemo-selectivity and biocompatibility. However, the specific peptide sequence required by the enzyme will impose certain biophysical restrictions that may limit their use and can be laborious to synthesize. Nucleophile sensitive linkers are mainly used in proteomic studies and can efficiently release proteins from a solid support. Significantly this cleavage strategy presents the opportunity to introduce an additional functionality to the probe via an exchange reaction. However, it appears that nucleophile sensitive linkers require a medium with a basic pH to enhance the nucleophilic character of the reagent. Currently, reducing agent sensitive linkers appear to be the most prominent class of linkers in chemical biology. Disulfide bridges were historically one of the first cleavable linkers, although their sensitivity to nucleophilic compounds and especially thiols results in unwanted cleavages. In the proteomics field, the cleavage of disulfide linkers might also trigger the reduction of proteins' disulfide bridges, changing the protein's structure. Azo compounds, cleaved by sodium dithionite, are an alternative for protein pull-down assays since they are also chemically stable in physiological conditions. Optimized azo-based cleavable linkers were recently described to isolate endogenous protein complexes in non-denaturing conditions. However, the compatibility of sodium dithionite with disulfide bridges has not yet been demonstrated, also azo linkers have not been used to study DNA. Photocleavable linkers are widely used in chemical biology and many different photo labile structures permit efficient cleavage. However, near-UV light is toxic for cells below 400 nm, and wavelengths above 300 nm must be used to prevent protein degradation. Photocleavable groups must be carefully selected if they are to be used in conjunction with photo-reactive groups (eg. diazirine, phenylazide and benzophenone) which are activated in near-UV light. Acid sensitive linkages are very versatile especially since they can be cleaved in mildly acidic medium. A wide panel of acid labile functions was developed to cover the complete range of pH sensitivity from 0 to 6. Using pH to influence the rate of hydrolysis has been used in drug delivery and imaging molecules. For protein purification, acid sensitive linkers usually require a high pH to be cleaved, which likely to lead to non specific cleavage and protein denaturation. Linkers sensitive to oxidative conditions



Scheme 10. (A) Cleavage of a tartaric acid derivative by sodium periodate; (B) cleavage of selenium linker by iodo-beads via a β -elimination and capture of the formed selenic acid by an amine.

can be cleaved by sodium periodate and have many applications in structural biology because it can preserve the protein's structure, including its disulfide bridges.

In conclusion, interest in cleavable linkers is growing due to the rapid development and expansion of chemical biology. Indeed, chemical constraints imposed by the biological conditions cause significant challenges for organic chemists. Reagents, reactions and functional groups have to comply with high selectivity, efficacy and mildness issues linked to proteomics, imaging, and drug delivery applications. This is an interesting time for chemists and biologists to work together to meet and surpass these challenges.

References and notes

- Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- Scott, P. J. H.; Steel, P. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 2251.
- Bräse, S. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 805.
- Sullivan, T. P.; Huck, W. T. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 17.
- Scott, P. Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis In Scott, P. J. H., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2009.
- Fonović, M.; Bogoy, M. *Expert Rev. Proteomics* **2008**, *5*, 721.
- Heal, W. P.; Tate, E. W. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 731.
- Cravatt, B. F.; Wright, A. T.; Kozarich, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383.
- Sadaghiani, A. M.; Verhelst, S. H.; Bogoy, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 1.
- Speers, A. E.; Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018.
- Carlson, E. E.; Cravatt, B. F. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 429.
- Dieterich, D. C.; Link, A. J.; Graumann, J.; Tirrell, D. A.; Schuman, E. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 9482.
- Tanihara, M.; Suzuki, Y.; Nishimura, Y.; Suzuki, K.; Kakimaru, Y. *Peptides* **1998**, *19*, 421.
- Ajaj, K. A.; Biniossek, M. L.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 390.
- Tung, C. H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4953.
- Jaffer, F. A.; Kim, D.-E.; Quinti, L.; Tung, C.-H.; Aikawa, E.; Pande, A. N.; Kohler, R. H.; Shi, G.-P.; Libby, P.; Weissleder, R. *Circulation* **2007**, *115*, 2292.
- Messerli, S. M.; Prabhakar, S.; Tang, Y.; Shah, K.; Cortes, M. L.; Murthy, V.; Weissleder, R.; Breakefield, X. O.; Tung, C.-H. *Neoplasia* **2004**, *6*, 95.
- Olson, E. S.; Jiang, T.; Aguilera, T. A.; Nguyen, Q. T.; Ellies, L. G.; Scadeng, M.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 4311.
- Bremer, C.; Tung, C. H.; Weissleder, R. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 743.
- Nguyen, Q. T.; Olson, E. S.; Aguilera, T. A.; Jiang, T.; Scadeng, M.; Ellies, L. G.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 4317.
- Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1653.
- Berkessel, A.; Riedl, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1481.
- Popov, A. V.; Mawn, T. M.; Kim, S.; Zheng, G.; Delikatny, E. J. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1724.
- Yi, L.; Cao, L.; Liu, L.; Xi, Z. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8947.
- Komatsu, T.; Kikuchi, K.; Takakusa, H.; Hanaoka, K.; Ueno, T.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15946.
- Louie, A. Y.; Hüber, M. M.; Ahrens, E. T.; Rothbächer, U.; Moats, R.; Jacobs, R. E.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 321.
- Lin, W. C.; Morton, T. H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6850.
- Fang, S.; Bergstrom, D. E. *Nucleic Acid Res.* **2003**, *31*, 708.
- Fang, S.; Fueangfung, S. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3720.
- Knapp, D. C.; D'Onofrio, J.; Engels, J. W. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1043.
- Knapp, D. C.; Serva, S.; D'Onofrio, J.; Keller, A.; Lubys, A.; Kurg, A.; Remm, M.; Engels, J. W. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2903.
- Zarling, D. A.; Watson, A.; Bach, F. H. J. *Immunol.* **1980**, *124*, 913.
- Petrotschenko, E. V.; Olkhovik, V. K.; Borchers, C. H. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1167.
- Abdella, P. M.; Smith, P. K.; Royer, G. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 734.
- Yokoshima, S.; Abe, Y.; Watanabe, N.; Kita, Y.; Kan, T.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Fukuyama, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6869.
- Long, L.; Lin, W.; Chen, B.; Gao, W.; Yuan, L. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 893.
- Shiu, H.-Y.; Chan, T.-C.; Ho, C.-M.; Liu, Y.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3839.
- Shiu, H.-Y.; Chong, H.-C.; Leung, Y.-C.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3308.
- Barton, V.; Ward, S. A.; Chadwick, J.; Hill, A.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4555.
- Park, J.-Jip.; Sadakane, Y.; Masuda, K.; Tomohiro, T.; Nakano, T.; Hatanaka, Y. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 814.
- Bongo, N. B.; Tomohiro, T.; Hatanaka, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 80.
- Sturm, M.; Leitner, A.; Lindner, W. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 211.
- Geurink, P. P.; Florea, B. I.; Li, N.; Witte, M. D.; Verasdonck, J.; Kuo, C.-L.; Van Der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6802.
- Dirksen, A.; Yegneswaran, S.; Dawson, P. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2023.
- Park, K. D.; Liu, R.; Kohn, H. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763.
- Muir, T. W.; Dawson, P. E.; Fitzgerald, M. C.; Kent, S. B. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 817.
- Dawson, P. E.; Fitzgerald, M. C.; Muir, T. W.; Kent, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7917.
- Yegneswaran, S.; Tiefenbrunn, T. K.; Fernández, J. A.; Dawson, P. E. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 2062.
- Traut, R. R.; Bollen, A.; Sun, T. T.; Hershey, J. W.; Sundberg, J.; Pierce, L. R. *Biochemistry* **1973**, *12*, 3266.
- Lomant, A. J.; Fairbanks, G. *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 243.
- Lambert, J. M.; Jue, R.; Traut, R. R. *Biochemistry* **1978**, *17*, 5406.
- Bennett, K. L.; Kussmann, M.; Björk, P.; Godzwon, M.; Mikkelsen, M.; Sørensen, P.; Roepstorff, P. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1503.
- Williams, S. J.; Hekmat, O.; Withers, S. G. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 116.
- Hekmat, O.; Kim, Y.-W.; Williams, S. J.; He, S.; Withers, S. G. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35126.
- Bildstein, L.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 3.
- Zhang, W.; Song, J.; Mu, L.; Zhang, B.; Liu, L.; Xing, Y.; Wang, K.; Li, Z.; Wang, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1452.
- Chen, Q.; Butler, D.; Querbes, W.; Pandey, R. K.; Ge, P.; Maier, M. A.; Zhang, L.; Rajeev, K. G.; Nechev, L.; Kotelianski, V.; Manoharan, M.; Sah, D. W. *J. Controlled Release* **2010**, *144*, 227.
- Gao, W.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6567.
- Texier, I.; Razkin, J.; Jossierand, V.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Coll, J.; Rizo, P. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **2007**, *571*, 165.
- Razkin, J.; Jossierand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-hui.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069.
- Soukup, G. A.; Cerny, R. L.; Maher, L. J. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 135.
- Shimkus, M.; Levy, J.; Herman, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 2593.
- Pullela, P. K.; Chiku, T.; Carvan, M. J.; Sem, D. S. *Anal. Chem.* **2006**, *352*, 265.
- Gartner, C. A.; Elias, J. E.; Bakalarski, C. E.; Gygi, S. P. *J. Proteome Res.* **2007**, *1482*.

65. Fasold, H.; Klappenberger, J.; Meyer, C.; Remold, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 795.
66. Jaffe, C. L.; Lis, H.; Sharon, N. *Biochemistry* **1980**, *19*, 4423.
67. Denny, J.; Blobel, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 5286.
68. Verhelst, S. H. L.; Fonović, M.; Bogyo, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284.
69. Fonović, M.; Verhelst, S. H. L.; Sorum, M. T.; Bogyo, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761.
70. Yang, Y.-Y.; Ascano, J. M.; Hang, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3640.
71. Rangan, K. J.; Yang, Y. Y.; Charron, G.; Hang, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 465.
72. Yount, J. S.; Moltedo, B.; Yang, Y.-Y.; Charron, G.; Moran, T. M.; López, C. B.; Hang, H. C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 610.
73. Grammel, M.; Zhang, M. M.; Hang, H. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5970.
74. Landi, F.; Johansson, C. M.; Campopiano, D. J.; Hulme, A. N. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56.
75. Yang, Y.-Y.; Grammel, M.; Raghavan, A. S.; Charron, G.; Hang, H. C. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1212.
76. Leriche, G.; Budin, G.; Brino, L.; Wagner, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 4360.
77. Budin, G.; Moune-Dimala, M.; Leriche, G.; Saliou, J.-M.; Papillon, J.; Sanglier-Cianfèrari, S.; Van Dorsselaer, A.; Lamour, V.; Brino, L.; Wagner, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2359.
78. Hooker, J. M.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718.
79. Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Oushiki, D.; Nakamura, T.; Kajimura, M.; Suematsu, M.; Nishimatsu, H.; Yamane, T.; Terai, T.; Hirata, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15846.
80. Hammond, N.; Koumi, P.; Langley, G. J.; Lowe, A.; Brown, T. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1878.
81. Pellois, J.-P.; Hahn, M. E.; Muir, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7170.
82. Zhou, H.; Ranish, J. A.; Watts, J. D.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 512.
83. Maurel, D.; Banala, S.; Laroche, T.; Johnson, K. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 507.
84. Chowdhury, S. M.; Munske, G. R.; Tang, X.; Bruce, J. E. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8183.
85. Olejnik, J.; Lüdemann, H. C.; Krzymanska-Olejnik, E.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F.; Rothschild, K. J. *Nucleic Acid Res.* **1999**, *27*, 4626.
86. Cho, S.; Lee, S.-H.; Chung, W.-J.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Kim, B.-G. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3730.
87. Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Wu, C.-W.; Lin, V. S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462.
88. Lemaire, R.; Stauber, J.; Wisztorski, M.; Van Camp, C.; Desmons, A.; Deschamps, M.; Proess, G.; Rudloff, I.; Woods, A. S.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2057.
89. Wang, Z.; Udeshi, N. D.; O'Malley, M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Hart, G. W. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 153.
90. Yang, L.; Tang, X.; Weisbrod, C. R.; Munske, G. R.; Eng, J. K.; Von Haller, P. D.; Kaiser, N. K.; Bruce, J. E. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3556.
91. Orth, R.; Sieber, S. A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8476.
92. Okamoto, A.; Tanabe, K.; Inasaki, T.; Saito, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2502.
93. Aoki, S.; Matsuo, N.; Hanaya, K.; Yamada, Y.; Kageyama, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3405.
94. Katayama, K.; Tsukiji, S.; Furuta, T.; Nagamune, T. *Chem. Commun.* **2008**, 5399.
95. Härtner, S.; Kim, H. C.; Hampp, N. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2443.
96. Gardner, M. W.; Vasicek, L. A.; Shabbir, S.; Anslyn, E. V.; Brodbelt, J. S. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4807.
97. Gardner, M. W.; Brodbelt, J. S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4864.
98. Petrotchenko, E. V.; Xiao, K.; Cable, J.; Chen, Y.; Dokholyan, N. V.; Borchers, C. H. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 273.
99. Chowdhury, S. M.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce, J. E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 899.
100. Van Der Veken, P.; Dirksen, E. H. C.; Ruijter, E.; Elgersma, R. C.; Heck, A. J. R.; Rijkers, D. T. S.; Slijper, M.; Liskamp, R. M. J. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2271.
101. Fauq, A. H.; Kache, R.; Khan, M. A.; Vega, I. E. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 248.
102. Szychowski, J.; Mahdavi, A.; Hodas, J. J. L.; Bagert, J. D.; Ngo, J. T.; Landgraf, P.; Dieterich, D. C.; Schuman, E. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351.
103. Srinivasachar, K.; Neville, D. M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2501.
104. Parrott, M. C.; Luft, J. C.; Byrne, J. D.; Fain, J. H.; Napier, M. E.; Desimone, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928.
105. Masson, C.; Garinot, M.; Mignet, N.; Wetzler, B.; Mailhe, P.; Scherman, D.; Bessodes, M. *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 423.
106. Blattler, W. A.; Kuenzi, B. S.; Lambert, J. M.; Senter, P. D. *Biochemistry* **1985**, *24*, 1517.
107. Shen, W. C.; Ryser, H. J. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *102*, 1048.
108. Lu, D.; Liang, J.; Fan, Y.; Gu, Z.; Zhang, X. *Adv. Eng. Mater.* **2010**, *12*, B496.
109. Shamay, Y.; Adar, L.; Ashkenasy, G.; David, A. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1377.
110. Di Stefano, G.; Lanza, M.; Kratz, F.; Merina, L.; Fiume, L. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 393.
111. Liu, R.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Agarwal, A.; Mueller, L. J.; Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1500.
112. Oishi, M.; Sasaki, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1426.
113. Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624.
114. Jeong, J. H.; Kim, S. W.; Park, T. G. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 473.
115. Zhao, Y.-L.; Li, Z.; Kabehie, S.; Botros, Y. Y.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13016.
116. Jia, Y.; Fei, J.; Cui, Y.; Yang, Y.; Gao, L.; Li, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1175.
117. Patel, V. F.; Hardin, J. N.; Mastro, J. M.; Law, K. L.; Zimmermann, J. L.; Ehlhardt, W. J.; Woodland, J. M.; Starling, J. J. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 497.
118. Shin, J.; Shum, P.; Thompson, D. H. *J. Controlled Release* **2003**, *91*, 187.
119. Heffernan, M. J.; Murthy, N. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1340.
120. Sankaranarayanan, J.; Mahmoud, E. A.; Kim, G.; Morachis, J. M.; Almutairi, A. A. C. S. *Nano* **2010**, *4*, 5930.
121. Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394.
122. Bi, L.; Kim, D. H.; Ju, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2542.
123. Ju, J.; Kim, D. H.; Bi, L.; Meng, Q.; Bai, X.; Li, Z.; Li, X.; Marma, M. S.; Shi, S.; Wu, J.; Edwards, J. R.; Romu, A.; Turro, N. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 19635.
124. Brunner, J.; Mokhir, A.; Kraemer, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410.
125. Boll, I.; Krämer, R.; Brunner, J.; Mokhir, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849.
126. Smith, R. J.; Capaldi, R. A.; Muchmore, D.; Dahlquist, F. *Biochemistry* **1978**, *17*, 3719.
127. Jin, R. Z.; Karol, M. H. *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 281.
128. Predescu, S. A.; Predescu, D. N.; Palade, G. E.; Jolla, L. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 1019.
129. Fang, G.; Cech, T. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 6056.
130. Bragg, P. D.; Hou, C. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *106*, 495.
131. Jahn, O.; Eckart, K.; Brauns, O.; Tezval, H.; Spiess, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12055.
132. Haberland, J.; Becker, J.; Gerke, V. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24717.
133. Parry, D. A.; Marekov, L. N.; Steinert, P. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39253.
134. Brockmüller, J.; Kamp, R. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3372.
135. Bergmann, U.; Wittmann-Liebold, B. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2880.
136. Pohl, T.; Wittmann-Liebold, B. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4293.
137. Buchardt, O.; Elsnér, H. I.; Nielsen, P. E.; Petersen, L. C.; Suenson, E. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 87.
138. Koch, T.; Suenson, E.; Henriksen, U.; Buchardt, O. *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 296.
139. Testa, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 338.
140. Nori, A.; Kopeček, J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 609.
141. Mahato, R.; Tai, W.; Cheng, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 659.
142. Leitner, A.; Walzthoeni, T.; Kahraman, A.; Herzog, F.; Rinner, O.; Beck, M.; Aebersold, R. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1634.
143. Peters, K.; Richards, F. M. *Ann. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 523.
144. Kaake, R. M.; Wang, X.; Huang, L. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1650.
145. Gao, L.; Lu, Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387*, 421.
146. Metzker, M. L. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *11*, 31.
147. Babé, L. M.; Craik, C. S. *Cell* **1997**, *91*, 427.
148. Law, B.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1683.
149. Jahng, W. J.; David, C.; Nesnas, N.; Nakanishi, K.; Rando, R. R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6159.
150. Fukuyama, T.; Jow, C.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373.
151. Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hidai, Y.; Kan, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5831.
152. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* **1994**, *266*, 776.
153. Kenner, G.; McDermott, J.; Sheppard, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 636.
154. Backes, B.; Ellman, J. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322.
155. Timokhin, B. V.; Baransky, V. A.; Eliseeva, G. D. *Russ. Chem. Rev.* **1999**, *68*, 73.
156. Klement, E.; Lipinski, Z.; Kupihár, Z.; Udvardy, A.; Medzihradský, K. F. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2200.
157. Geaney, A. H. *Dyes and Pigments* **2002**, *54*, 201.
158. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006.
159. Bochet, C. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2002**, 125.
160. Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
161. Yu, H.; Li, J.; Wu, D.; Qiu, Z.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464.
162. Adams, S. R.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957.
163. Holmes, C. P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370.
164. Tjoeng, F. S.; Heavner, G. A. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 355.
165. Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373.
166. Stubbs, M.; McSheehy, P. M. J.; Griffiths, J. R.; Bashford, C. L. *Mol. Med. Today* **2000**, *6*, 15.
167. Gao, W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7*, 1913.
168. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007.
169. Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141.
170. Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Kigawa, T.; Sakamoto, K.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Tachibana, K.; Yokoyama, S. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134.
171. Nauwelaerts, K.; Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kempeneers, V.; Rozenski, J.; Rosemeyer, H.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Lacey, J. C.; Efimtseva, E.; Mikhailov, S.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. *Nucleic Acid Res.* **2003**, *31*, 6758.

II. Développement de sondes clivables pour la protéomique chimique

Après avoir étudié les différentes catégories de liens clivables utilisés en chimie-biologie, nous avons exploité leurs propriétés de clivage dans le domaine de la protéomique chimique, avec le développement de sondes d'enrichissement clivables en conditions non-dénaturantes.

La protéomique chimique permet l'étude ciblée d'un sous-protéome à l'aide de deux techniques différentes basées sur :

- l'étude d'une famille particulière d'enzyme à partir de leurs activités (Activity Based Probe Profiling ou ABPP).³
- l'étude d'un ensemble de protéines ayant de l'affinité pour une petite molécule bioactive appelé ligand (Compound-Centric Chemical Proteomics ou CCCP).⁴

Quelle que soit la technique utilisée, la protéomique chimique implique toujours l'utilisation d'une sonde pour le marquage de protéines. Par interactions plus ou moins fortes avec les protéines, les sondes d'affinité permettent la capture de protéines et l'incorporation de marqueurs sans modifier leurs structures et leurs activités biologiques.³ Des marqueurs de type fluorophore sont utilisés pour la détection des protéines, tandis que les marqueurs d'enrichissements permettent la purification de protéines par chromatographie d'affinité.

Lorsque ce projet a été initié, aucune technique de protéomique chimique ne permettait l'étude de complexes protéiques en conditions natives. Il n'était donc pas possible d'appliquer la protéomique chimique à l'étude ou le profilage des interactions protéine-protéine. Or, ces interactions se retrouvent au centre de nombreux mécanismes biologiques tels que la transcription et la réplication, la transduction du signal basée sur la formation transitoire de rencontre et d'assemblage des complexes protéiques.

Nous avons donc abordé le développement d'une boîte à outils moléculaires permettant l'étude de complexes protéiques en conditions natives. Dans la première partie de ce projet réalisé au laboratoire, les Dr. Ghyslain Budin et Martin Moune Dimala ont développé une nouvelle stratégie de marquage de protéines par un fluorophore en conditions non-covalente et non-dénaturante.⁵ Dans la continuité de ce travail, l'étude menée ici a consisté à extrapoler une technique d'enrichissement protéique non-dénaturante afin d'isoler et de purifier des complexes protéiques fonctionnels. Cette méthodologie doit permettre, d'une part, la caractérisation de la fonction biologique des complexes protéiques contrôlant les processus cellulaires, et d'autre part, l'étude des différentes interactions formant ces complexes.

Les différentes sondes d'enrichissement clivables connues seront présentées et comparées les unes aux autres. Cette analyse a permis de sélectionner une structure de type azobenzène comme point de départ pour une optimisation structurale devant conduire à en augmenter la vitesse de coupure par action du dithionite de sodium. Ces travaux seront présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal "*The European Journal of Organic Chemistry*".⁶ A partir de cette structure optimisée, un lien clivable a été élaboré. Sa capacité à libérer des complexes protéique fonctionnels a été validée en utilisant la novobiocine comme ligand, et le complexe protéique A2B2 de gyrase comme cible biologique. Les résultats obtenus seront présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal "*ChemBioChem*".⁷ Enfin, la synthèse de nouvelles sondes clivables pour l'enrichissement de néo-glycoprotéines modifiées par des azotures sera également traitée.

De part son approche pluridisciplinaire, ce sujet regroupe trois laboratoires différents :

- Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels : Geoffray Leriche et le Dr. Ghyslain Budin pour la synthèse organique.
- Laboratoire de Biologie Structurale et Génomique (Inserm U964 UMR7104) : Julie Papillon et le Dr. Martin Moune Dimala pour l'étude en biologie moléculaire.
- Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, UMR 7178 : Dr. Jean-Michel Saliou pour l'analyse en spectrométrie de masse des protéines purifiées.

II.1. Les sondes d'enrichissement clivables en protéomique chimique

L'enrichissement protéique consiste à extraire une protéine ciblée par une sonde d'enrichissement comportant un ligand de cette protéine et un marqueur d'enrichissement (Figure 1). Les protéines reconnues par le ligand sont alors immobilisées sur un support d'affinité, par interactions non-covalentes, puis séparées des autres constituants du milieu biologique par des séquences de lavages. La dernière étape consiste à libérer les protéines du support d'affinité en déstabilisant les interactions marqueur d'enrichissement/support d'affinité ou protéine/ligand et en utilisant respectivement des excès de marqueur d'enrichissement ou de ligand (Figure 1, voies A et B). Ces deux systèmes d'éluion peuvent présenter des inconvénients. Pour permettre une éluion par déplacement de l'équilibre entre le support d'affinité et le marqueur d'enrichissement, ces interactions ne doivent pas être trop fortes. Cependant, si l'affinité n'est pas assez importante, il y a un risque de perdre les

protéines capturées, lors des étapes de lavage. Dans le cas où l'élution est réalisée par un excès de ligand, le risque est d'enrichir uniquement des protéines peu spécifiques du ligand utilisé.

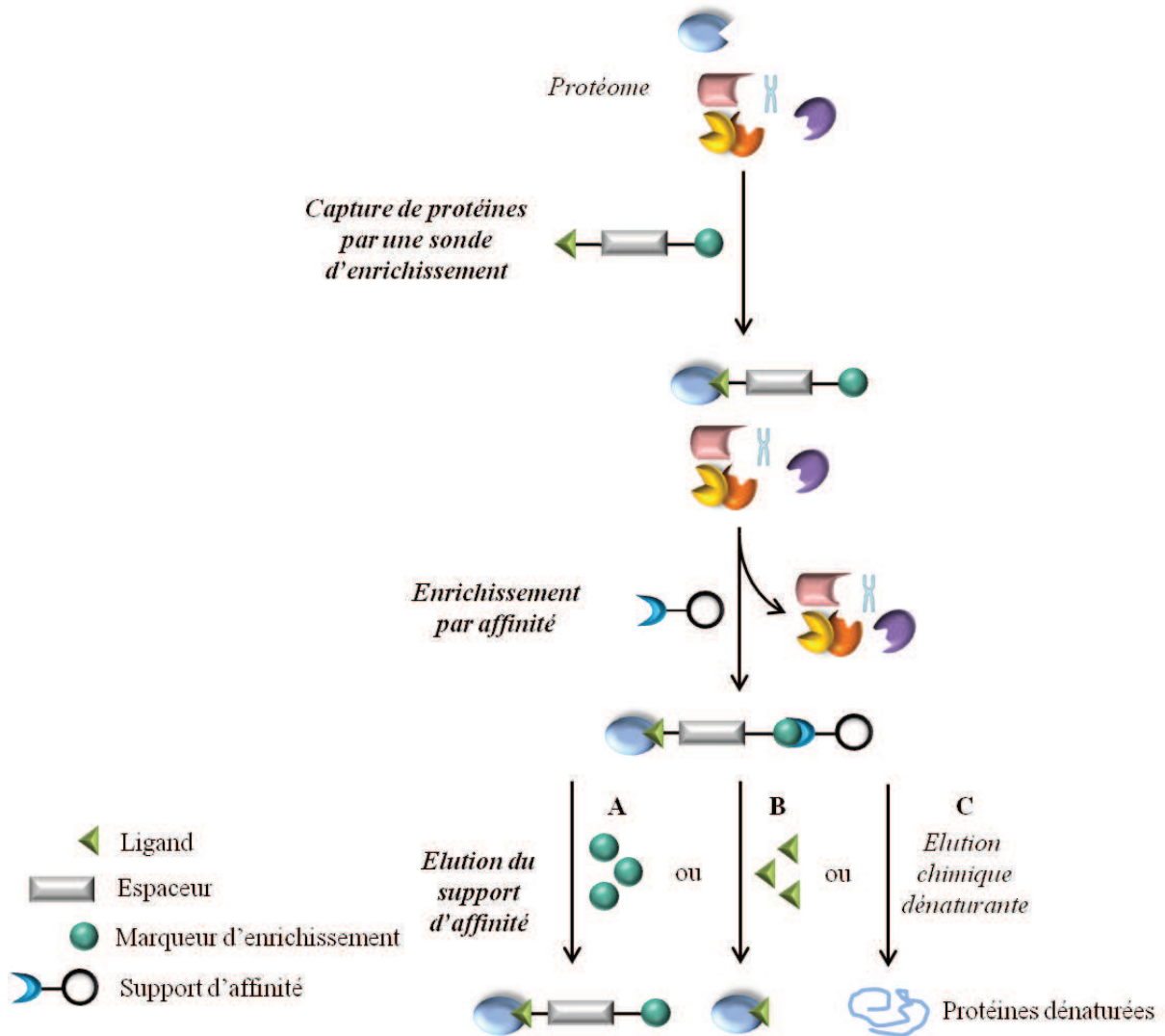


Figure 1 : Principe d'utilisation d'une sonde d'enrichissement pour la purification de protéines.

Dans les méthodes d'enrichissement protéiques, l'immobilisation et la purification des protéines sont réalisées par chromatographie d'affinité. La force des interactions marqueur d'enrichissement/support d'affinité est donc essentielle pour permettre une bonne élution. Les trois principaux types d'affinité existants sont :

- l'affinité substrat-enzyme
- l'affinité ligand-récepteur
- l'affinité anticorps-antigène

Basé sur une affinité ligand-récepteur, le couple biotine-avidine est le système le plus utilisé en protéomique chimique. En effet, la biotine est considérée comme un marqueur d'enrichissement stable, petit et n'interférant que très rarement avec les protéines d'intérêt. L'avidine et ses dérivés (streptavidine et neutravidine) sont, quant à elles, des protéines tetramériques permettant de lier quatre molécules de biotine par interactions non-covalentes. A ce jour, l'interaction biotine-avidine est la plus forte interaction non-covalente connue entre une protéine et son ligand ($K_d = 10^{-15}$ M).⁸ La formation de ce complexe est très rapide et, une fois établi, ce dernier est peu sensible aux variations de pH et de températures, aux solvants organiques et autres conditions dénaturantes. Pour rompre cette interaction, il est nécessaire d'utiliser des milieux très astringents comme un tampon 8 M guanidine•HCl (pH 1,5) ou une solution bouillante de SDS (Figure 1, voie C). Si la force de l'interaction biotine-avidine est un atout pour les étapes de purification, c'est en revanche un inconvénient majeur dans le but d'obtenir des protéines sous leurs formes natives. L'élution étant réalisée en conditions dénaturantes, aucune activité biologique de la protéine ciblée ne peut donc être conservée. De plus, cette stratégie peut également conduire à une contamination de l'échantillon final par des monomères d'avidine, des protéines liées de manière non-spécifiques à la streptavidine ou des protéines biotinylées endogènes. Une nouvelle purification par gel d'électrophorèse est alors nécessaire avant l'analyse par spectrométrie de masse.

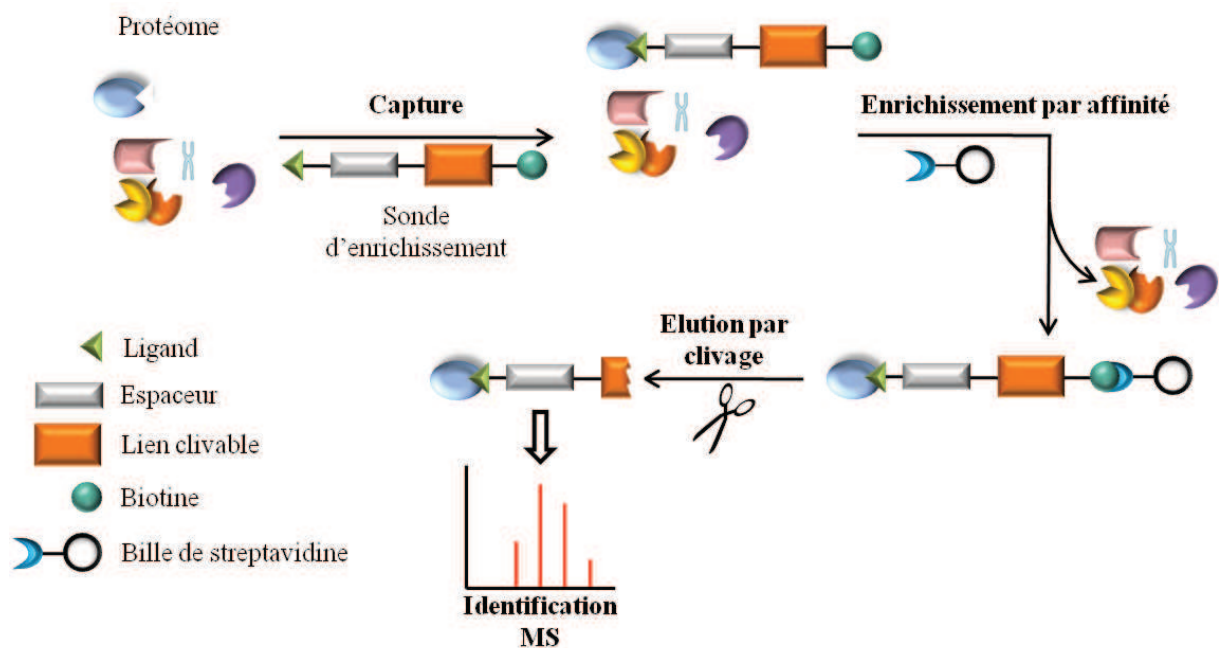


Figure 2 : Principe d'utilisation d'une sonde d'affinité clivable pour l'enrichissement protéique.⁹

Pour répondre à ces limitations, différentes stratégies existent, comme l'utilisation d'analogues de biotine moins affins^{10,11} ou encore des mutants de la streptavidine.¹² Cependant, diminuer l'affinité biotine-avidine ne permet pas d'obtenir un bon compromis pureté/rendement. Avec ce type de système, un nombre trop important de lavages induisent un échantillon final pur mais en faible quantité. Une autre stratégie consiste à incorporer un lien clivable entre la biotine et la protéine capturée. Tous les avantages du support d'affinité sont ainsi conservés pour l'enrichissement, et les contraintes d'élution du système biotine/avidine sont contournées (Figure 2). La biocompatibilité de l'élution se retrouve ainsi associée aux conditions de clivages. Comme cela a été présenté dans le chapitre précédent, ces liens clivables peuvent être classés en trois groupes selon les stimuli de clivage utilisés : enzymatiques, photochimiques ou chimiques.

II.1.1. Les liens enzymatiquement clivables

Lors de la mise au point d'une sonde d'enrichissement clivable, la chimio-spécificité du clivage est un paramètre déterminant pour la qualité du résultat final. Dans le cas d'une coupure enzymatique, ce paramètre dépend de la spécificité de l'enzyme pour son substrat. Afin de conserver les protéines capturées sous leurs formes natives, il est donc inenvisageable d'utiliser des enzymes de digestion non spécifiques comme la pepsine, la chymotrypsine ou la trypsine. Concernant les protéases, plus la séquence peptique reconnue est longue, plus l'enzyme sera spécifique.¹³ Une fois éluee du support solide, la protéine d'intérêt est alors obtenue en mélange avec l'enzyme utilisée comme agent de clivage. Une nouvelle étape de purification sur gel d'électrophorèse est donc nécessaire pour obtenir un échantillon pur de la protéine ciblée. Malgré une excellente biocompatibilité, des contraintes biophysiques et des voies de synthèses contraignantes font qu'il n'existe que très peu d'exemples décrivant des sondes d'enrichissement clivables par voie enzymatique.^{14,15}

II.1.2. Les liens photochimiquement clivables

Tout comme le clivage enzymatique, le grand intérêt du photoclivage réside dans sa spécificité. De plus, les groupements photosensibles sont connus pour être stables dans de nombreuses conditions chimiques (acides, basiques, ...). Pour une application en protéomique chimique, la principale contrainte imposée par les protéines concerne la longueur d'onde d'irradiation. Elle doit être supérieure à 300 nm afin de ne pas dégrader le matériel biologique. A notre connaissance, les principaux groupements photosensibles utilisés sont les

dérivés de type *ortho*-nitrobenzyle.¹⁶⁻²⁰ Cependant, ces derniers présentent l'inconvénient de libérer des groupements nitroso hautement réactifs. La formation de ces espèces chimiquement non-inertes comme intermédiaires réactionnels ou produits de clivage, constitue aujourd'hui la principale limitation d'utilisation de groupements photoclivables en protéomique chimique.

II.1.3. Les liens chimiquement clivables

Pour la mise au point de sondes d'enrichissement clivables, la littérature propose un large éventail de réactifs pouvant cliver une liaison d'un groupement chimique (Tableau 1). Cette partie consiste en l'inventaire des groupements chimiquement clivables utilisés pour l'enrichissement de protéines.

Connus pour se cliver rapidement en présence d'agents réducteurs et pour être facilement accessibles en synthèse organique, les ponts disulfures sont historiquement les liens clivables les plus utilisés en chimie biologique (Tableau 1, entrée 1).²¹⁻²³ Cependant, la présence de ponts disulfures dans l'organisation structurale des protéines endogènes rend impossible un clivage hautement spécifique d'une sonde d'enrichissement. La réactivité de ces composés en présence de thiols libres conduit à un échange de soufre qui peut se traduire par un clivage prématuré et non-spécifique.

Alors que des conditions acides ou basiques sont largement utilisées en synthèse organique, peu d'exemples décrivent leur utilisation comme solution de clivage en protéomique chimique. Quels que soient les groupements (esters,²⁴⁻²⁶ carbamate²⁷ ou dérivés de dialkoxydiphenylsilane²⁸), l'utilisation de pH non physiologique, aussi bien faible que fort, peut conduire à la fois à la dénaturation des protéines et à un clivage non spécifique (Tableau 1, entrées 2-5).

Basés sur le principe "safety catch" développé pour la synthèse sur support solide, les dérivés de sulfonamides peuvent être clivés par un traitement chimique réalisé en deux étapes (Tableau 1, entrée 6).²⁹ Ce système repose sur la différence de réactivité face aux nucléophiles entre un dérivé sulfonamide et son analogue *N*-alkylé. Un premier traitement réalisé en présence d'iodoacétonitrile permet l'activation du lien clivable. Puis, un second traitement, réalisé en présence d'un nucléophile (pH 9), conduit au clivage de ce lien. La principale limitation de la méthode est l'utilisation d'agents d'alkylation pouvant réagir de manière non-sélective avec de nombreux acides aminés formant les protéines. L'emploi de sulfonamides

préalablement méthylé sur l'azote offre une alternative à ce problème (Tableau 1, entrée 7). Le clivage est alors réalisé en présence de thiol comme composé nucléophile.³⁰

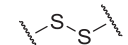
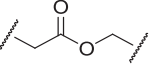
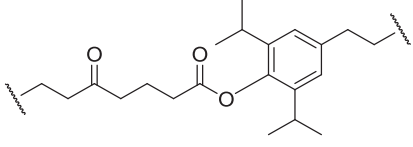
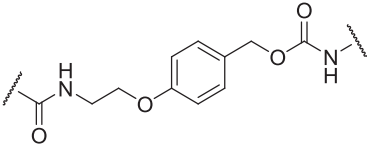
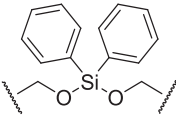
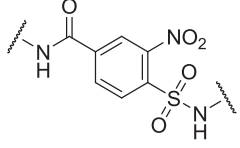
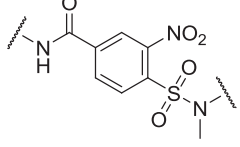
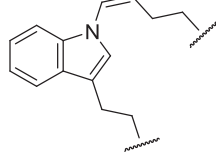
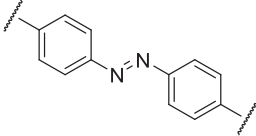
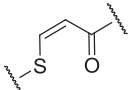
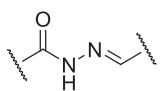
Entrée	Groupe clivable	Réactif de clivage	Références
1		thiols, DTT, TCEP,	21–23
2		base, hydroxylamine, hydrazine	24,25
3		hydrazine	26
4		acide trifluoroacétique	27
5		acide formique 5%	28
6		agent d'alkylation puis thiols	29
7		thiols	30
8		pyrrolidine	31
9		dithionite de sodium (Na ₂ S ₂ O ₄)	32–42
10		β-mercaptoéthanol, DTT, L-cystéine, thiophenol	43
11		aniline, hydroxylamine	44–46

Tableau 1 : Systèmes groupement clivable/réactif pour la mise au point de sondes d'enrichissement clivables.

Développé pour le marquage réversible de tryptophanes,⁴⁷ un conjugué indole-malondialdéhyde (MDA) a également été employé pour l'extraction et la purification de

protéines (Tableau 1, entrée 8).³¹ Sur ce composé, l'atome d'azote de l'indole est lié à un aldéhyde α,β -insaturé. En milieu basique et sous l'action d'un nucléophile comme la pyrrolidine, un mécanisme d'addition-élimination permet de couper la liaison carbone-hydrogène et de libérer la sonde du support solide.

En présence de dithionite de sodium et à pH physiologique, la fonction azobenzène est irréversiblement réduite sous forme de deux anilines (Tableau 1, entrée 9). Réduits en conditions bioorthogonales, les dérivés de type azobenzène (Azo) ont ainsi été la première génération de lien clivable en conditions douces, pour la protéomique chimique.^{35,36} Depuis 2007 et les travaux de Bogyo *et al.*, de nombreuses études ont utilisé les dérivés Azo comme sondes d'enrichissement protéiques clivables.³⁷⁻⁴²

En 2009, Shiu *et al.* ont développé un système de capture réversible de protéines.⁴³ L'addition de l'atome de soufre d'une cystéine sur un alcyne déficient en électrons permet un marquage covalent de protéines *via* la formation d'un sulfure vinylique (Tableau 1, entrée 10). Une fois enrichi sur support solide, la protéine est alors libérée après traitement de la sonde par un excès de thiols en milieu basique et la formation d'un dithioacétal comme intermédiaire réactionnel.

Malgré une instabilité à pH faiblement acide, les acylhydrazones peuvent également être utilisées comme groupements clivables à pH neutre ou légèrement alcalin (Tableau 1, entrée 11).^{45,46} Le clivage est alors basé sur un mécanisme de transimination entre l'hydrazone et une amine nucléophile. Cette réaction d'échange peut se faire avec de nombreuses amines primaires. Ce système réversible a permis de réaliser successivement deux marquages différents : un premier, par un marqueur d'enrichissement qui permet de purifier la protéine, puis un second, par un marqueur de détection introduit par transimination. Une fois les marqueurs échangés, l'acylhydrazone peut être réduit en présence de cyanoborohydrure de sodium afin d'obtenir un dérivé acylhydrazine plus stable et ainsi éviter un clivage non-spécifique.⁴⁴

II.1.4. Conclusion

En 2008, lorsque le projet a été initié, le nombre de liens clivables chimiquement n'était pas aussi important qu'aujourd'hui. A cette date, seuls les dérivés azobenzène permettaient la purification de protéines en conditions douces avec un clivage rapide, sélectif et quasi-

quantitatif. Ce groupement clivable a donc été sélectionné pour être incorporé dans une sonde d'enrichissement clivable. Le système biotine/streptavidine a été choisi pour réaliser l'enrichissement sur support d'affinité.

II.2. Les azobenzènes comme lien clivable

II.2.1. Introduction

Au sens strict, l'azobenzène est une molécule composée de deux noyaux phényles liés par une double liaison N=N. D'une manière plus générale, le terme "Azo" ou azobenzène fait souvent référence à toutes molécules qui possèdent la structure de la molécule d'azobenzène avec différents groupements fonctionnels sur les phényles. Les dérivés azo sont connus pour leur gamme de couleurs rouge-jaune résultant d'une importante délocalisation électronique. Dans le monde, la production annuelle d'Azo s'élève à 1 million de tonne en tant que colorant synthétique.⁴⁸ Récemment, ces composés ont suscité un double intérêt dans le domaine de la biologie moléculaire : premièrement comme système photocommutable basé sur l'isomérisation (Z)/(E) photoinduite de motif N=N,⁴⁹ et deuxièmement, comme lien clivable en biologie structurale et en protéomique chimique.³²⁻⁴²

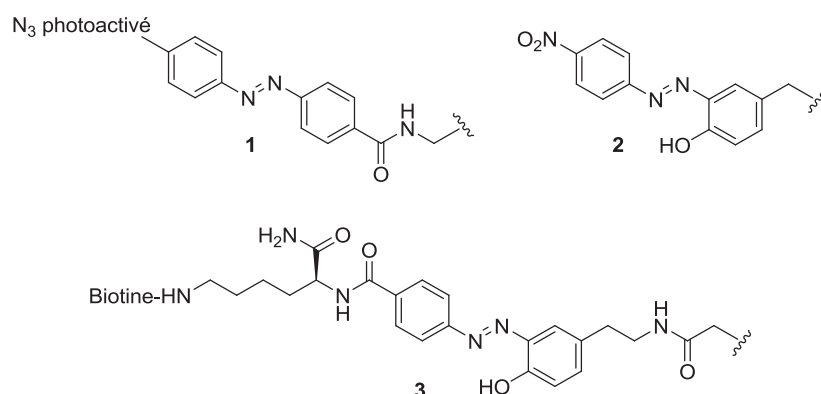


Figure 3 : Présentation d'Azo clivables utilisés en biologie structurale et en protéomique.

En 1980, Jaffe *et al.* ont développé un lien Azo bi-fonctionnel comme agent de réticulation clivable pour l'étude de l'organisation membranaire.³³ Dans un premier temps, le composé 1 est couplé à la membrane par réaction chimique entre une amine et un groupement ester activé situé sur l'un des phényles de l'Azo (Figure 3). Puis, un azoture d'aryle situé sur le second phényle de l'Azo permet de réaliser un photo-marquage intra-membranaire. Dans ce cas, l'addition au milieu réactionnel de dithionite de sodium (100 mM, 25 min), à température

ambiante, permet le clivage de la sonde et confirme si la réticulation est inter- ou intramoléculaire. Dans un autre contexte, Hooker *et al.* ont utilisé la réduction d'Azo par le dithionite afin de générer une aniline comme site de bio-conjugaison à la surface d'un virus.^{50,51} Pour cela, ce virus est traité en présence d'un sel de diazonium de *para*-nitro aniline. La réaction avec un dérivé tyrosine, introduit par mutagénèse dirigée, permet alors la formation du composé **2** (Figure 3). La réduction de cet Azo par du dithionite (200 mM, 2 heures) conduit à l'obtention d'une ortho-amino-tyrosine à la surface du virus.

A partir de ces deux précédentes études, Bogyo *et al.* ont développé un lien Azo clivable **3** pour la protéomique chimique (Figure 3).^{35,36} Ce composé a été obtenu par couplage diazoïque entre l'acide 4-aminobenzoïque et la tyramine, puis fonctionnalisé de part et d'autre de l'Azo par une biotine et une séquence reconnue par des cathepsines. Incubée en lysat cellulaire, cette sonde a permis les captures de quatre cathepsines. Puis, une élution au dithionite (100 mM, 30 min) a été utilisée pour libérer les protéines du support solide. Cette étude a également démontré qu'il est préférable d'utiliser une triple élution de dithionite (25 mM) pendant 15 min plutôt qu'une seule avec une forte concentration d'agent de clivage. Dans les meilleures conditions, le rendement de purification est de 90%.

Composé	[Na ₂ S ₂ O ₄], temps	Références
1	200 mM, 25 min ou 100 mM, 25 min	33,34
2	200 mM, 2 h	50,51
3	100 mM, 30 min ou 3*25 mM, 3*15 min	35,36

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des conditions utilisées dans la littérature, en 2008, pour le clivage de composés Azo par le dithionite de sodium.

D'après l'ensemble de la littérature connue en 2008, le lien clivable Azo décrit par Bogyo *et al.* semblait proposer les conditions les plus douces (Tableau 2). De plus, il est facilement dérivatisable de part et d'autre de l'azo par couplage peptidique. Ce composé a donc été synthétisé pour obtenir une première sonde d'enrichissement.

II.2.2. Synthèse et clivage d'un lien fonctionnel basé sur le composé de Bogyo

Des études préliminaires menées sur de la gyrase B recombinante ont permis d'évaluer l'influence du dithionite sur l'intégrité des protéines (voir section II.5.). L'analyse du profil de migration de la gyrase B sur gel natif a démontré qu'une concentration de 25 mM en dithionite de sodium pendant 15 minutes induit une dénaturation ou une précipitation des

protéines. En revanche, à 10 mM, l'intégrité de la protéine a été conservée. La sonde d'enrichissement clivable développée doit donc permettre un clivage total en 15 minutes avec une concentration maximal en dithionite de 10 mM.

II.2.2.1. Synthèse

En vue d'une fonctionnalisation par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre, une première sonde bi-fonctionnelle possédant une biotine et un alcyne a été synthétisée (Figure 4).

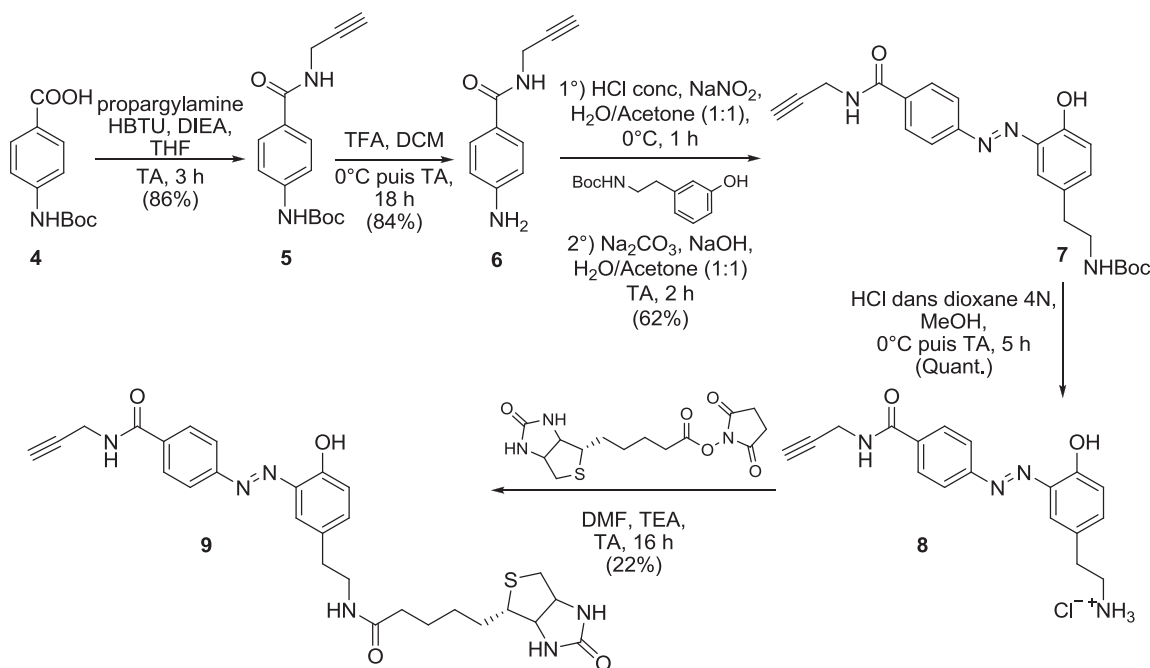


Figure 4 : Synthèse du composé-modèle 9.

L'acide 4-(Boc-amino)benzoïque a été couplé à la propargylamine en présence de HBTU comme agent de couplage. Le composé 5 obtenu a ensuite été traité en présence de TFA pour déprotéger l'aniline et former le composé 6 avec 72% de rendement global sur les deux étapes. Un diazonium a été formé après réaction de 6 avec de l'acide nitreux, puis ce dernier a été engagé dans une réaction de couplage diazoïque avec de la *N*-Boc-tyramine. Le dérivé Azo 7 a ainsi été obtenu avec 62% de rendement. Pour finir, l'amine de la tyramine a quantitativement été déprotégée par une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane puis couplée avec la biotine dont l'acide carboxylique a été activé sous la forme d'un ester NHS. Il est à noter que le composé Azo-biotine 9 a été obtenu avec un faible rendement de 22% dû à des difficultés de purification, et non pas par un manque de réactivité.

II.2.2.2. Evaluation du clivage du composé-modèle **9**

Les composés Azo étant utilisés comme colorant, chacun d'entre eux possède un maximum d'absorption compris entre 300 et 500 nm. Le clivage du motif N=N par le dithionite entraîne une perte de la conjugaison et ainsi un changement du profil d'absorption. Il est donc possible de suivre la cinétique de réduction de composés Azo par spectrophotométrie UV-visible. Il est à noter que le mécanisme de réduction d'Azo s'effectue en deux étapes, en passant par la formation d'un intermédiaire réactionnel de type hydrazine (Figure 5). Ainsi, un changement de profil UV ne confirme pas la double réduction de l'Azo en deux anilines. Un clivage ne peut être validé que par une technique séparative de type HPLC.

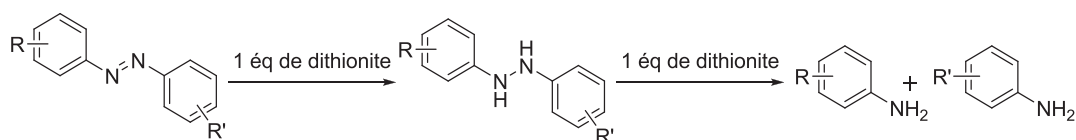


Figure 5 : Réduction d'un Azo par deux équivalents dithionite.

Pour s'assurer de conditions reproductibles, la réduction au dithionite a été réalisée dans un tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) à pH 7,4. Des premiers essais ont démontré que 6 mM de dithionite acidifie un tampon à 10 mM. Différentes concentrations en sels de phosphate ont donc été testées afin de rechercher les conditions optimales permettant de conserver l'effet tampon (Tableau 3). Les résultats ont montré qu'à partir de 100 mM en sels de phosphate, le dithionite n'avait plus d'effet sur le pH.

Entrée	[phosphate] en mM	pH
1	10	6,7
2	50	6,8
3	80	7,2
4	100	7,4
5	125	7,4
6	250	7,4

Tableau 3 : Effet du dithionite (6 mM) sur le pH de tampons phosphate à différentes concentrations.

L'enregistrement du spectre UV d'une solution de dithionite à 6 mM a démontré une saturation du signal entre 200 et 370 nm. Un premier test de clivage du composé **9** a donc été réalisé et suivi par spectrophotométrie UV-visible à 376 nm (Figure 6).

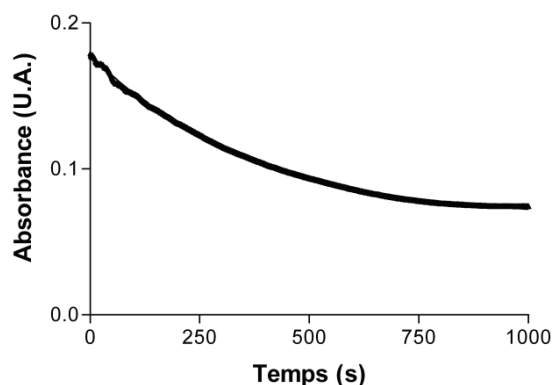


Figure 6 : Cinétique de réduction de 9 (50 μM) en présence de dithionite de sodium (6 mM) dans un tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) (100 mM, pH 7,4).

La cinétique enregistrée a montré un clivage lent. Le temps nécessaire pour réduire 50% de l'Azo, appelé également temps de demi-vie ($t_{1/2}$), est de 487 s. Après 15 minutes, la réaction a été stoppée et le milieu réactionnel analysé par LC/MS. Le résultat a confirmé la présence des deux produits issus du clivage, en mélange avec le produit de départ. Une faible quantité du produit de mono-réduction a également été observée, mais non quantifiée.

II.2.2.3. Conclusion

La synthèse d'une première sonde composée d'un alcyne, d'une biotine et d'un Azo clivable a été réalisée. Cependant, l'utilisation de dithionite (6 mM, 15 min) n'a pas permis d'obtenir un clivage total de ce composé dans les conditions recherchées. Afin d'utiliser un minimum de dithionite et un temps de clivage court, le développement d'une structure Azo plus réactive vis-à-vis du dithionite de sodium a été nécessaire.

II.3. Etude de la relation structure Azo/réactivité au dithionite

Une étude bibliographique a été réalisée pour tenter de mettre en évidence la relation existant entre la nature des substituants aromatiques et la réactivité des Azo pour leurs réductions au dithionite de sodium. Cependant très peu d'information ont été trouvées dans la littérature. Il est seulement décrit qu'un effet électronique "push-pull" favorise le clivage.⁵² Une étude complète s'est donc imposée. Différentes structures Azo ont été synthétisées, puis leur clivage caractérisé par spectrophotométrie UV-visible. Les molécules ont ensuite été comparées les unes aux autres par rapport à leurs temps de demi-vie. Par cette méthode, des groupements chimiques favorisant ou non la réduction de la fonction $\text{N}=\text{N}$ par le dithionite

ont été identifiés. Ce travail a permis l'identification d'un composé **10**, de structure "2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid" ou HAZA, et se clivant totalement en 10 secondes seulement avec une concentration d'agent de clivage de 1 mM (Figure 7). A partir de cette molécule, un composé protégé **Fmoc-HAZA-Boc** a été conçu et synthétisé. La dérivatisation de ce dernier a ensuite abouti à la sonde **Alcyne-HAZA-Biotine**. En présence de 1 mM de dithionite, ce composé a également démontré un clivage total en moins de 10 secondes.

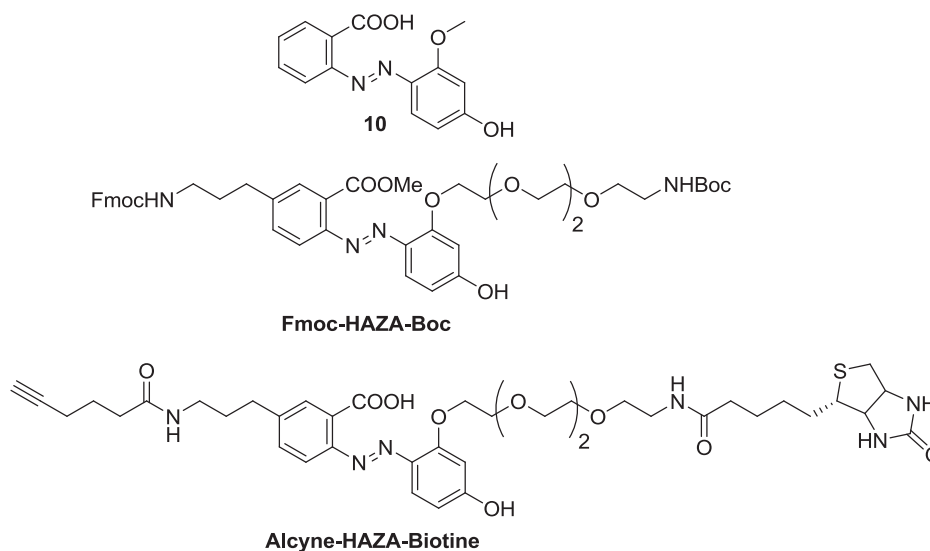


Figure 7 : Structures des composés **10**, **Fmoc-HAZA-Boc** et **Alcyne-HAZA-Biotine**.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal "*The European Journal of Organic Chemistry*".⁶ Si l'ensemble des résultats présentés ont été réalisés par moi-même, le Dr. Ghyslain Budin a doublement participé à cet article : tout d'abord dans le cadre de la synthèse de la molécule **29** de l'article, et par sa participation à l'encadrement de ce projet. Le Dr. Laurent Brino a contribué au développement de la problématique.

II.3.1. Article 2 : Optimization of the azobenzene scaffold for reductive cleavage by dithionite; Development of an azobenzene cleavable linker for proteomic applications

Optimization of the Azobenzene Scaffold for Reductive Cleavage by Dithionite; Development of an Azobenzene Cleavable Linker for Proteomic Applications

Geoffroy Leriche,^[a] Ghyslain Budin,^[a] Laurent Brino,^[b] and Alain Wagner*^[a]

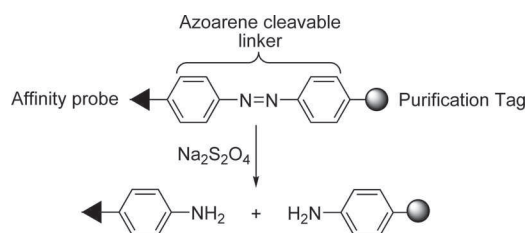
Keywords: Affinity purification / Azo compounds / Proteomics / Cleavable linkers / Reduction

In this paper we conducted an extensive reactivity study to determine the key structural features that favour the dithionite-triggered reductive cleavage of the azo-arene group. Our stepwise investigation allowed identification of a highly reactive azo-arene structure **25** bearing a carboxylic acid at the *ortho* position of the electron-poor arene and an *ortho*-O-alkyl-resorcinol as the electron-rich arene. Based on this 2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HAZA) scaffold,

the orthogonally protected difunctional azo-arene cleavable linker **26** was designed and synthesized. Selective linker deprotection and derivatization was performed by introducing an alkyne reactive group and a biotin affinity tag. This optimized azo-arene cleavable linker led to a total cleavage in less than 10 s with only 1 mM dithionite. Similar results were obtained in biological media.

Introduction

Since the discovery of “aniline yellow” in 1861 by Mene,^[1] azo-arenes have become the largest class of synthetic dyes. More recently, these compounds attracted much attention for the development of molecular switches and cleavable linkers in biological applications. The specific and reversible photo-induced (*Z*)/(*E*) isomerization of the N=N motif enabled the control of peptide conformations,^[2] remote control of ion channels in excitable cells^[3] and the switch-cell adhesion on surfaces coated with arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptides.^[4] Because of its ability to undergo smooth cleavage upon treatment with dithionite, a mild and potentially bio-orthogonal reducing agent,^[5] azo-arene compounds are used as cleavable linkers. Azo-arene reduction found innovative applications in protein cross linking^[6] and very recently in functional proteomics.^[7a] In the latter application, the incorporation of an azo-arene cleavable linker between a protein's affinity probe and a purification tag, allows specific elution of captured proteins (Scheme 1).^[7] Noteworthy, azo-arene reductions require multiple washings and high concentrations of the reducing agent, which can involve denaturation of the proteins and presence of strong background signals.



Scheme 1. Cleavage of the azo-arene probe with sodium dithionite.

With the continuous need for improved tools for modern proteomics, the search of mild cleavable linkers is a very active field of research. Vinyl sulfide,^[8] acylhydrazone,^[9] diaryl hydrazone^[10] or azo-arene^[7] based cleavable linkers are therefore object of recent research. In this paper we report our study to fine-tune the structure of azo-arenes toward dithionite reduction. This study led to the design of a new orthogonally diprotected cleavable linker, which can be derivatized by many tags.

Results and Discussion

Many studies have been published dealing with the sensitivity of azo-arene dyes under reducing biological conditions.^[11] However, only scarce data concerning the reactivity of these compounds toward dithionite were reported.^[12] In order to optimize the sensitivity of the azo-arene motif toward dithionite reduction, we therefore decided to carry out an extensive structure/reactivity study. A set of substituted azo-arene compounds was synthesized by using classical procedures.^[13] Cleavage assays were performed under standardized condition at room temperature with 47.5 μ M azo-arene and 6 mM sodium dithionite in phosphate buffer

[a] Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch-Graffenstaden, France
Fax: +33-3-68854306

E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr

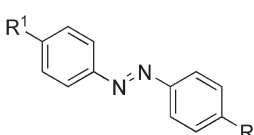
[b] Laboratory of Structural Biology and Genomics, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, Inserm U964 UMR7104 CNRS UoS, B. P. 10142, 67404 Illkirch-Graffenstaden, France

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201000546>.

(pH = 7.4). Azo bond cleavage was monitored by UV/Vis spectrophotometry at 376 nm (measurement every second) and the half-life was calculated for each compound (Tables 1, 2, 3, 4, and 5). This wavelength was chosen, because below 376 nm dithionite perturbations were observed in the UV spectra.^[14]

As a first set, substrates bearing combinations of electron-withdrawing and electron-donating groups (EWGs and EDGs) at the *para* position of each aromatic ring were assayed (Table 1). Introducing a hydroxy group on one aromatic ring (**2**) resulted in a clear acceleration of the reduction compared to unsubstituted compound **1** (Table 1, Entries 1 and 2). Introducing a carboxylic acid (**3**) decreased the kinetics of cleavage compared to the phenol derivative (Table 1, Entry 3). The reduction kinetics of symmetric compounds **4** and **5** were less effective than those of **2**, and the best result was obtained with 4-(4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid (**6**) (Table 1, Entries 4–6). These observations confirm the literature results stating that azo-arenes substituted with both EDGs and EWGs are reduced faster than their analogues bearing only EDGs.^[11a] Due to their reduction efficiency, azo compounds possessing an electron-poor arene (A) and an electron-rich arene (B) will therefore be used for further investigations (Figure 1).

Table 1. Half-lives of azo-arenes substituted by a combination of EDGs and EWGs at the 4- and 4'-positions.



Entry	R ¹	R ²	Azo-arene	Half-life [s]
1	H	-H	1	455 ^[a]
2	H	-OH	2	39
3	COOH	-H	3	121
4	COOH	-COOH	4	110
5	OH	-OH	5	185
6	COOH	-OH	6	20

[a] Cleavage in a mixture of acetonitrile/phosphate buffer (2:8).

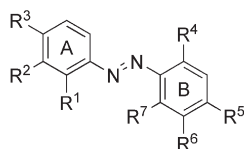


Figure 1. General structure of azo-arene compounds synthesized for the structure/reactivity study.

The influence of the structure of ring A was first evaluated. In the following set of experiments, the phenol group was fixed in position R⁵ and different EWGs in position R³ were introduced (Table 2).

For this series, comparable half-lives were observed (Table 2, Entries 1–4) except for the nitro compound **10**, which cleaved in more than 500 s (Table 2, Entry 5). This surprising result could be ascribed to a possible competitive reduction of the nitro group, giving an unfavorable elec-

Table 2. Half-lives of azo-arenes substituted with different EWGs at the R³ position (R¹, R², R⁴, R⁶, R⁷ = H; R⁵ = OH).

Entry	R ³	Azo-arene	Half-life [s]
1	COOH	6	20
2	PO(OEt) ₂	7b	9
3	CN	8	12
4	SO ₃ H	9	16
5	NO ₂	10	576

tron-rich azo-arene substrate.^[15] A carboxylic acid group was chosen as the most convenient EWG to ease post-functionalizations of the scaffold in order to obtain our difunctional cleavable linker. We next investigated the influence of carboxylic acid positions on the reduction kinetic (Table 3).

Table 3. Half-lives of azo-arenes substituted with carboxylic acid in different positions of ring A (R⁴, R⁶, R⁷ = H; R⁵ = OH).

Entry	R ¹	R ²	R ³	Azo-arene	Half-life [s]
1	H	H	COOH	6	20
2	H	COOH	H	11	70
3	COOH	H	H	12	<1

As anticipated, due to mesomeric effects, substrate **11** with the COOH group in position R² showed a longer half-life than the previous compound **6** bearing the acid group in position R³ (Table 3, Entries 1 and 2). With the acid group in position R¹, a significant decrease in half-life was observed with a cleavage in less than 1 s (Table 3, Entry 3). Assuming that the carboxylic acid might be used as a straightforward conjugation point to introduce a reactive linker, we decided to study the effect of acid modifications on the half-life (Table 4).

Table 4. Half-lives of azo-arenes substituted with carboxylic acid analogues at the R¹ position (R², R³, R⁴, R⁶, R⁷ = H; R⁵ = OH).

Entry	R ¹	Azo-arene	Half-life [s] ^[a]	Half-life [s] ^[b]
1	COOH	12	<1	<1
2	COOMe	13	<1	13
3	CONH(CH ₂ C≡CH)	14	40	193

[a] 6 mM dithionite. [b] 1 mM dithionite.

With a 6 mM dithionite solution, ester analogue **13** and free acid **12** were cleaved in less < 1 s, whereas amide analogue **14** displayed a longer half-life (Table 4, Entries 1–3). The dithionite concentration was lowered to 1 mM in order to discriminate compounds **12** and **13**. Under these conditions, the free acid proved to undergo a significantly faster reduction. It thus appeared that for linker development purposes the carboxylic acid had to remain free. The derivatization point, enabling conjugation with the molecular probe or the affinity tag, will be introduced at the R³ position of ring A through C–C linkage.

We then investigated the effect of the substitution pattern of electron-rich arene ring B to further improve the cleavage efficiency. In order to enable accurate half-life measurements, kinetics were slowed down by using unsubstituted ring A. Several azo-arenes with different substituents on ring B were synthesized and assayed (Table 5).

Table 5. Half-lives of azo-arenes substituted on ring B by different EDGs (R^1 , R^2 , $R^3 = H$).

Entry	R^4	R^5	R^6	R^7	Azo-arene	Half-life [s]
1	H	NH ₂	H	H	15	94
2	H	NEt ₂	H	H	16	890
3	H	NHAc	H	H	17	1839
4	H	OH	H	H	2	39
5	H	OMe	H	H	18	2694
6	OH	H	Et	H	19	46
7	OH	OH	H	H	20	121
8	OMe	OH	H	H	21	4
9	OH	OMe	H	H	22	1540
10	OMe	OH	H	OH	23	3354
11	OMe	OH	H	OMe	24	7

Of all R^5 -monosubstituted arenes, 4-(hydroxyphenylazo)-benzene (**2**) remained the most efficient (Table 5, Entry 4). In fact, aniline **15**, *N*-alkylaniline **16** and *N*-acylaniline **17** were found to undergo much slower cleavages (Table 5, Entries 1–3). The reduction of the *O*-methylated analogue **18** showed a dramatic decrease of the cleavage kinetics compared to those of **2** (Table 5, Entry 5). The hydroxy position was then investigated, and we observed that a hydroxy group in position R^4 gives a similar result than a hydroxy group in position R^5 (Table 5, Entries 4 and 6). A series of disubstituted phenol substrates were then assayed (Table 5, Entries 7–9). According to the literature, the results obtained with substrates **21** and **22** were quite unexpected (Table 5, Entries 8 and 9).^[7a] A hydroxy group in position R^4 appears to be not essential for an efficient azo-arene reduction. We found that the combination with a methoxy group in position R^4 and a hydroxy group in position R^5 (**21**) was more reactive than the reverse combination (**22**). A similar trend was observed in the phloroglucinol series (Table 5, Entries 10 and 11). This set of experiments clearly showed that a hydroxy group in position R^5 and an alkoxy group in position R^4 is by far the most suitable substitution pattern of ring B. This scaffold offers a significant improvement of the kinetic rate compared with that of a hydroxy group in position R^4 already described.^[7a–7d] Furthermore, the alkoxy group could be used as a straightforward conjugation point.

With all these prerequisites in hand, the optimal compound **25** bearing an *ortho*-carboxylic acid at the electron-poor arene ring A and an *ortho-O*-alkylresorcinol as the electron-rich arene ring B was synthesized (Figure 2). As expected, this optimized compound showed a half-life < 1 s and a total cleavage time of < 5 s upon treatment with 6 mM sodium dithionite. A decrease of the reducing agent concentration to 1 mM gave the same result and a total cleavage in < 15 s.

Starting from this scaffold, 2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HAZA) **26** was designed with one orthogonal protecting group on each side of the cleavable bond. *tert*-Butoxycarbonyl (Boc) and (fluorenylmethoxy)-carbonyl (Fmoc) groups were chosen because of their versatile well-established chemistry. Selective deprotection will

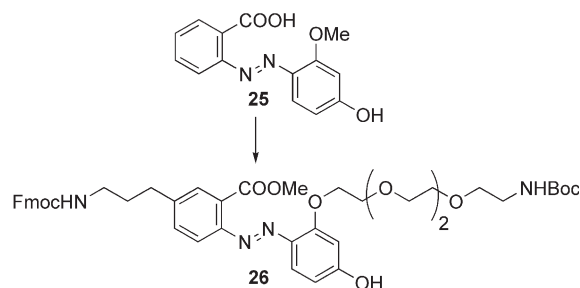


Figure 2. Structure of optimal compound **25** for azo-arene reduction by sodium dithionite and deduced orthogonally protected azo-arene cleavable linker **26**.

allow the subsequent introduction of a bioorthogonal chemical hook (e.g. alkyne, phosphane, azide, ...) at one end and the introduction of different tags such as biotin or a fluorescent dye at the other end. In addition, the carboxylic acid will be kept protected to avoid side-reaction and purification problems. On the phenol side, three units of an ethylene glycol spacer will be introduced to increase the water solubility (Figure 2).

A convergent approach was used to synthesize protected azo-arene **26** by a diazonium coupling reaction between aniline **28** and resorcinol **30** as the key-step (Figure 3). On the one hand, the amine derivative **28** was obtained from 2-amino-5-iodobenzoic acid. After amine and carboxylic acid protection, *N*-Fmoc-propargylamine was introduced into the protected iodide derivative by Sonogashira–Hagihara coupling reaction. The corresponding aniline **28** was obtained by deprotection and reduction by hydrogen (4 steps, 17% overall yield). On the other hand, a triethylene glycol spacer terminated by the Boc-protected amine **29**, was obtained in 5 steps with 53% overall yield.^[13] Briefly, phenol derivative **30** was easily prepared by alkylation of resorcinol with the tosylated spacer **29**. Diazotation of aniline **28** and reaction with phenol **30** gave the orthogonally protected HAZA **26** with 56% of yield. The desired *ortho*-alkylated compound was confirmed by NOESY NMR spectroscopy.

Alkyne as reactive group and biotin as affinity tag have been chosen to exemplify the chemoselective deprotection and derivatization sequence of HAZA **26**. Piperidine treatment and further coupling with *N*-succinimidyl-5-hexynoate gave HAZA **31** with 78% yield. Under acidic conditions, the Boc group was removed, and the linker derivatization was achieved by coupling with biotin in 78% yield. Final hydrolysis of the methyl ester provided the water-soluble functionalized HAZA **32** in good yield.

The reduction of the final alkyne–HAZA–biotin **32** was monitored by UV spectroscopy at 463 nm, which showed a half-life < 1 s and a total cleavage time of < 10 s with 1 mM dithionite (Figure 4). Under these conditions, no side products were observed and the total cleavage was confirmed by mass spectrometry.^[13] The reaction of **32** with 1 mM dithionite, in the presence of *E. coli* cell lysate, lead to a total cleavage time of < 10 s (Figure 4). This result confirmed that dithionite is a potent bioorthogonal reagent and dem-

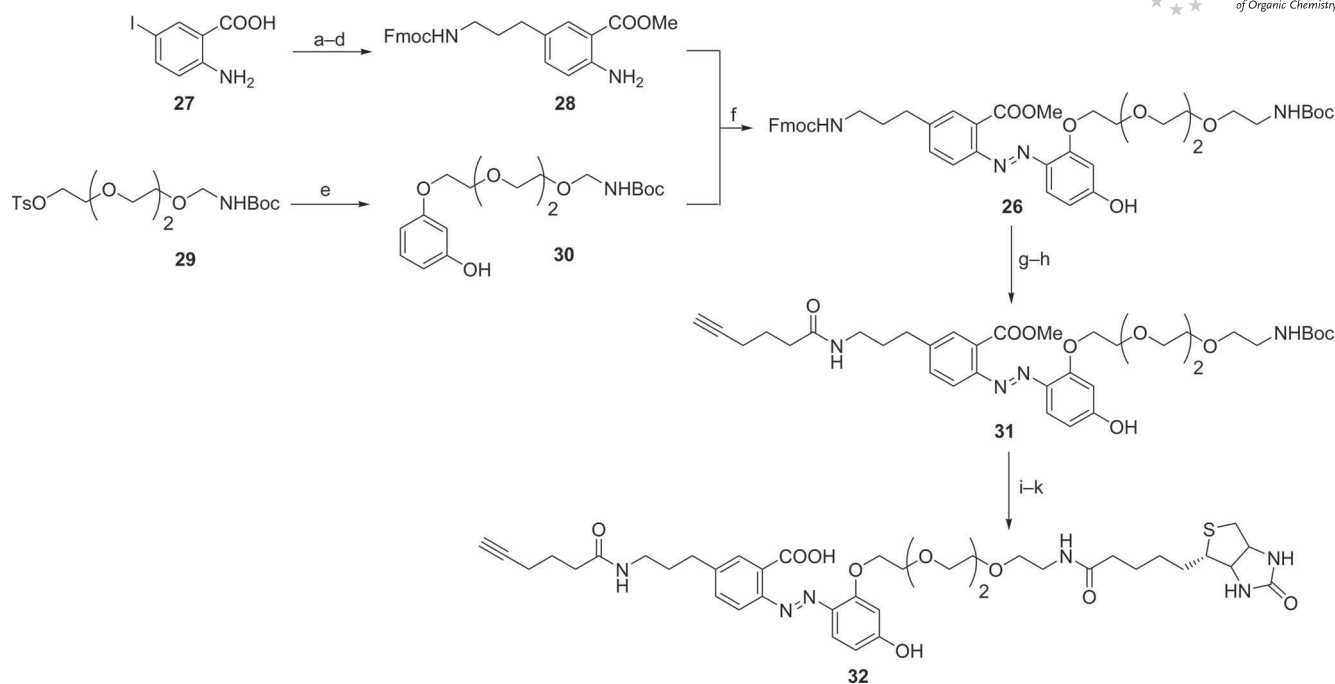


Figure 3. Reaction pathway for the formation of alkyne-HAZA-biotin **32**: (a) benzyl chloroformate, 0.1 mol-% β -CD, H₂O, room temp., 16 h, 71%; (b) dimethyl sulfate, K₂CO₃, acetone, 40 °C, microwaves, 20 min, 63%; (c) *N*-Fmoc-propargylamine, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, TEA, DMF, room temp., 16 h, 60%; (d) H₂, Pd/C, DMF/EtOAc, room temp., 16 h, 65%; (e) K₂CO₃, DMF, microwaves, 120 °C, 20 min, 57%; (f) NaNO₂, HCl, H₂O/acetone (1:1), 0 °C, 45 min, then Na₂CO₃, NaOH, H₂O/acetone (1:1), 0 °C to room temp., 10 min, 54%; (g) piperidine, DCM, room temp., 3 h; (h) 5-hexynoic acid-NHS, TEA, DMF, room temp., 16 h, 78% (for two steps); (i) TFA, DCM, room temp., 16 h; (j) biotin, HBTU, TEA, DMF, room temp., 16 h 78% (for two steps); (k) LiOH, MeOH/H₂O (4:1), 40 °C, 16 h, 61%.

onstrates the potency of alkyne-HAZA-biotin **32** as a highly efficient cleavable linker for future proteomic studies.

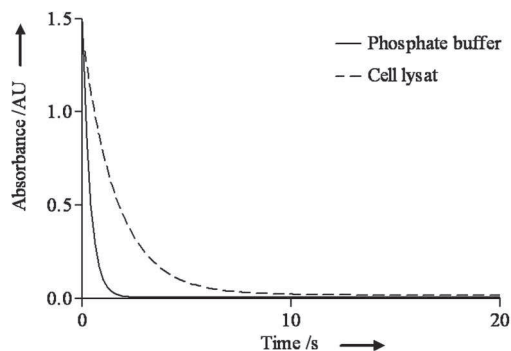


Figure 4. Reduction kinetics of alkyne-HAZA-biotin **32** with 1 mM sodium dithionite in two different medias: phosphate buffer (solid line) and cell lysate (dashed line).

Conclusions

Structural optimization of the azobenzene scaffold enabled the development of an efficient HAZA linker. This difunctional orthogonally protected linker can be conveniently conjugated with various molecular tags and affinity probes. Most interestingly, instead of using elution with 100 mM dithionite or several elutions with 25 mM dithionite to reduce N=N bond as it was needed with previous genera-

tions of linkers,^[7] alkyne-HAZA-biotin **32** can be reduced in < 10 s with 1 mM reducing agent, and the reactivity was 500-fold increased with respect to our reference.^[13] Furthermore, the presence of a carboxylic acid group and the triethylene glycol spacer provided a very good water solubility. The application of the HAZA linker **26** for protein complex enrichment is currently under investigation and will be reported in due course.

Supporting Information (see footnote on the first page of this article): Experimental procedures and spectroscopic data for all compounds.

- [1] H. Zollinger, *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and Pigments*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, p. 166.
- [2] Z. Zhang, D. C. Burns, J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 824.
- [3] R. H. Kramer, J. J. Chambers, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 360.
- [4] J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16107.
- [5] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718.
- [6] a) H. Fasold, J. Klappenberger, C. Meyer, H. Remold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 795; b) C. L. Jaffe, H. Lis, N. Sharon, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4423; c) J. B. Denny, G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5286.
- [7] a) M. Bogyo, V. H. L. Stephen, F. Marko, *US patent* 60/825,548, **2006**; b) S. H. L. Verhelst, M. Fonović, M. Bogyo, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1306; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284; c) M. Fonović, S. H. L. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogyo, *Mol. Cell Proteomics* **2007**, *6*, 1761; d) Y.-Y. Yang, J. M. Ascano, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3640; e) F.

- Landi, C. M. Johansson, D. J. Campopiano, A. N. Hulme, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56.
- [8] H.-Y. Shiu, T.-C. Chan, C.-M. Ho, Y. Liu, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3839.
- [9] K. D. Park, R. Liu, H. Kohn, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763.
- [10] a) A. Dirksen, S. Yegneswaran, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2023.
- [11] a) S. Zbaida, A. M. Stoddart, W. G. Levine, *Chem. Biol. Interact.* **1989**, *69*, 61; b) W. G. Levine, *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23*, 253; c) K.-T. Chung, S. E. Stevens, C. E. Cerniglia, *Crit. Rev. Microbiol.* **1992**, *18*, 175; d) K.-T. Chung, S. E. Stevens Jr., *Toxicol. Environ. Chem.* **1993**, *12*, 2121; e) S. Zbaida, *Drug Metab. Rev.* **1995**, *27*, 497; f) H. An, Y. Qian, X. Gu, W. Z. Tang, *Chemosphere* **1996**, *33*, 2533; g) A. Stolz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 69; h) F. P. van der Zee, G. Lettinga, J. A. Field, *Chemosphere* **2001**, *44*, 1169.
- [12] a) S. Zbaida, W. G. Levine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *260*, 554; b) A. H. Gemeay, *Dyes Pigm.* **2002**, *54*, 201.
- [13] See Supporting Information.
- [14] S. Hashimoto, J. Sunamoto, K. Sato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2860.
- [15] a) C. R. Wasmuth, C. Edwards, R. Hutcherson, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 423; b) M. Sokolovsky, J. F. Riordan, B. L. Vallee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 20.

Received: April 20, 2010

Published Online: July 9, 2010

II.3.2. Article 2 : Partie expérimentale

Supporting Information

Optimization of the azobenzene scaffold for reductive cleavage by dithionite; development of a novel azobenzene cleavable linker for proteomic applications

Geoffray Leriche^[a], Ghyslain Budin^[a], Laurent Brino^[b] and Alain Wagner^{[a]}*

[a] Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199

74 Route du Rhin, 67401, Illkirch-Graffenstaden (France)

[b] Laboratory of Structural Biology and Genomics

*Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology Inserm U964 UMR7104
CNRS Uds*

BP10142, Illkirch-Graffenstaden (France)

E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr

General experimental procedures. Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an atmosphere of argon in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred *via* syringe. When required, solutions were degassed by bubbling of argon through a needle. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 15-30 torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an ethanolic solution of cerium sulfate, followed by treatment with a heat gun. Column chromatography was carried out as “Flash Chromatography” using silica gel G-25 (40-63 μM) from Macherey-Nagel.

Materials. All reagents were obtained from commercial sources and used without further purifications. Dry MeOH and DMF were obtained from Aldrich. Dichloromethane was passed through a column of activated alumina under nitrogen. Azobenzene (**1**), 4-(phenylazo)phenol (**2**), 4-(phenylazo)benzoic acid (**3**), 4-(4'-hydroxy-phenylazo)phenol (**5**), 2-(4'-hydroxy-phenylazo)benzoic acid (**12**), 4-(phenylazo)aniline (**15**), *N,N*-dimethyl-4-(phenylazo)aniline (**16**), methoxy-(4-phenylazo)phenol (**18**) were purchased from commercial suppliers and used without further purification.

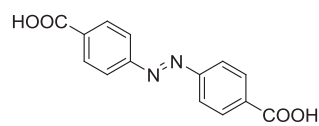
Instrumentation. UV-Vis spectra and kinetic were recorded on Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. Melting points were taken on a Stuart Scientific SMP3 apparatus from Bibby and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Nicolet 380 FT-IR spectrometer from Thermo Electron Corporation as a CH₂Cl₂ solution or solid on a diamond plate. ¹H, ¹³C and ³¹P NMR spectra were recorded at 23°C on a Bruker 400 or Bruker 300 MHz spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent. Data are represented as follows: Chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (*J*, Hz) and integration. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Agilent Q-TOF(time of flight) 6520 and mass spectra using a Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL. Microwave reactions were carried out in an Initiator BIOTAGE reactor at constant temperature.

General procedure for cleavage. A 10 mM azo-arene solution was prepared in DMSO and diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) to obtain 50 μM of azo-arene compound solution. Then, 950 μL of this solution was added to 50 μL of freshly prepared solution of sodium dithionite at 121 mM. Color disappearance was followed by UV/VIS spectrophotometry at 376 nm.

General procedure for azo coupling reaction (Method 1). Aniline compound (1.2 eq) was suspended in a mixture of acetone/water (1:1) (0.41 mM). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath. Then, concentrated HCl (1.15 mL) was added dropwise. After 5 min of stirring, a solution of NaNO₂ (1.4 eq) in water (1.79 mM) was added dropwise into the reaction mixture. This solution was stirred for 1 h at 0°C and then cannulated in a mixture of water/acetone (1:1) (0.34 mM), phenol compound (1.0 eq), Na₂CO₃ (2.0 eq) and NaOH (4.0 eq) at 0°C. Stirring was continued for 3 h while the mixture was warmed up to RT. Acetone was evaporated and a mixture of 1N HCl solution and dichloromethane was added to the residue. Layers were separated and aqueous layer was extracted twice with dichloromethane. The combined solution were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The crude reaction mixture was purified by chromatography on silica gel giving the desired product.

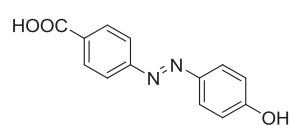
General procedure for azo coupling reaction (Method 2). Aniline compound (1.2 eq) was suspended in a mixture of acetone/water (1:1) (0.41 mM). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath. Then, concentrated HCl (1.15 mL) was added dropwise. After 5 min of stirring, a solution of NaNO₂ (1.4 eq) in water (1.79 mM) was added dropwise into the reaction mixture. This solution was stirred for 1 h at 0°C and then cannulated in a mixture of water/acetone (1:1) (0.34 mM), phenol compound (1.0 eq), Na₂CO₃ (2.0 eq) and NaOH (4.0 eq) at 0°C. Stirring was continued for 3 h while the mixture was warmed up to RT. Acetone was evaporated off and reaction crude was diluted with 1N HCl solution. Then, precipitated solid was filtered, washed successively with water, dichloromethane, ether and dried by lyophilization to give the desired compound.

Synthesis of azo-arene compounds for structure reactivity study

Azobenzene-4-4'-dicarboxylic acid **4**

This compound was synthesized following a reported protocol¹ to give **4** (345 mg, 23%) as a pink solid.

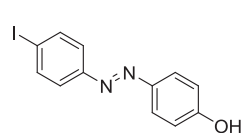
Rf: 0.00 (dichloromethane/MeOH 8:2); m.p. > 300°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 8.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 166.6, 154.1, 133.4, 130.7, 122.8; IR (neat): 1678, 1423, 1290 cm⁻¹; ESI-MS: 269.0 [M-H]⁻. HRMS [M+Na]⁺ *m/z* calcd 293.0533 for C₁₄H₁₀N₂O₄Na, found 293.0528.

4-(4'-hydroxy-phenylazo)benzoic acid **6**

This compound was synthesized by the reaction between 4-aminobenzoic acid (3.65 mmol) and phenol (3.04 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using

dichloromethane/MeOH (9:1) to give **6** (502 mg, 68%) as an orange solid.

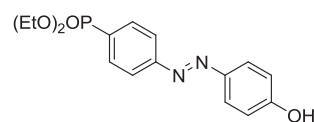
Rf: 0.53 (dichloromethane/MeOH 9:1); m.p. 273°C; ¹H NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄) δ, 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.87 (m, 4H), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, MeOD-*d*₄) δ 169.4, 163.0, 156.9, 147.7, 133.1, 131.9, 126.6, 123.3, 117.0; IR (neat): 3184, 1682, 1593, 1504, 1407, 1199 cm⁻¹; ESI-MS: 243.0 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z* calcd 243.0764 for C₁₃H₁₁N₂O₃, found 243.0768.

4-(4'-iodo-phenylazo)phenol **7a**

This compound was synthesized by the reaction between 4-iodoaniline (2.62 mmol) and phenol (2.18 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (8:2) to give **7a**

(570 mg, 81%) as an orange solid.

Rf: 0.45 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 170°C; ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆) δ 9.10 (s, 1H), 7.90-7.87 (m, 2H), 7.84-7.80 (m, 2H), 7.62-7.58 (m, 2H), 7.00-6.95 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, acetone-*d*₆) δ 162.0, 153.1, 147.05, 139.3, 126.01, 125.0, 116.8, 96.9; IR (neat): 3190, 1593, 1504, 1468, 1440, 1384, 1243 cm⁻¹; ESI-MS 324.9 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z* calcd 324.9832 for C₁₂H₁₀IN₂O found 324.9834.

Diethyl 4-(4'-hydroxy-phenylazo)phenylphosphonate **7b**

This compound was synthesized following reported conditions.² To a mixture of tetrakis(triphenylphosphine) palladium (16 mg, 0.014 mmol) in degassed and anhydrous THF (1.2 mL) were added **7a**

(100 mg, 0.309 mmol), diethyl phosphite (37 μL, 0.283 mmol) and triethylamine (0.1 mL, 0.708 mmol). The mixture was flushed with argon for 5 min and the

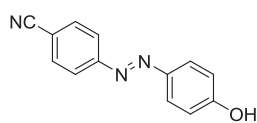
¹ S. Gerlich, L. Hackermüller, K. Hornberger, A. Stibor, H. Ulbricht, M. Gring, F. Golfarb, T. Savas, M. Müri, M. Mayor, M. Arndt, *Nat. Phys.* **2007**, *3*, 711.

² M. Kalek, A. Ziadi, J. Stawinski, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4637.

reaction mixture was then heated under microwaves at 120°C for 10 min. After cooling, THF was evaporated off and the residue was diluted with dichloromethane (20 mL). Organic layer was washed with 1N HCl solution and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (95:5) to give **7b** (43 mg, 42%) as an orange oil.

Rf: 0.28 (dichloromethane/MeOH 95:5); ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃-d₁) δ 18.54; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.98-7.87 (m, 6H), 7.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.26-4.11 (m, 4H), 1.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 161.0, 155.4, 146.5, 132.7 (d, *J*_{C-P} = 10.7 Hz), 128.5 (d, *J*_{C-P} = 191.3 Hz), 125.5, 122.5 (*J*_{C-P} = 16.1 Hz), 116.1, 62.8 (d, *J*_{C-P} = 5.8 Hz), 16.3 (d, *J*_{C-P} = 6.6 Hz); IR (neat): 3133, 1587, 1505, 1467, 1433, 1392, 1213 cm⁻¹; ESI-MS 335.0 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 335.1155 for C₁₆H₂₀N₂O₄P, found 335.1158.

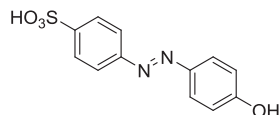
4-(4'-hydroxy-phenylazo)benzonitrile **8**



This compound was synthesized by the reaction between 4-cyanoaniline (1.74 mmol) and phenol (1.45 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (8:2) to give **8** (280 mg, 87%) as an orange solid.

Rf: 0.24 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 205°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 10.54 (s, 1H), 8.02-7.99 (m, 2H), 7.93-7.90 (m, 2H), 7.87-7.83 (m, 2H), 6.99-6.95 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 162.0, 154.3, 145.2, 133.7, 125.6, 122.7, 118.5, 116.1, 112.2; IR (neat): 3314, 2283, 1586, 1461, 1280, 1213 cm⁻¹; ESI-MS 224.1 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 224.0818 for C₁₃H₁₀N₃O, found 224.0817.

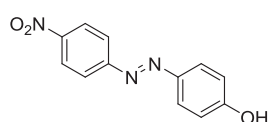
4-(4'-hydroxy-phenylazo)benzenesulfonic acid **9**



This compound was synthesized by the reaction between sulfanilic acid (1.31 mmol) and phenol (1.09 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 2). **9** (47 mg, 13%) was obtained as a red solid.

Rf: 0.00 (dichloromethane/MeOH 8:2); m.p. > 250°C; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.58 (m, 4H), 7.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-d₄) δ 161.1, 151.9, 149.5, 145.2, 126.6, 124.9, 121.6, 116.0; IR (neat): 2925, 1593, 1538, 1370, 1319, 1149 cm⁻¹; ESI-MS 279.0 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 279.0434 for C₁₂H₁₁N₂O₄S, found 279.0442.

4-(4'-nitro-phenylazo)phenol **10**



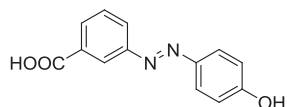
This compound was synthesized by the reaction between 4-nitroaniline (1.45 mmol) and phenol (1.21 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (8:2) to give

10 (270 mg, 92%) as an orange solid.

Rf: 0.26 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 221°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 10.60 (s, 1H), 8.40-8.37 (m, 2H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.90-7.85 (m, 2H), 7.00-6.96 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 162.3, 155.5, 147.7, 145.4, 125.8, 125.0, 123.0, 116.2; IR (neat): 3423,

1605, 1586, 1504, 1343, 1142 cm^{-1} ; ESI-MS 244.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 244.0717 for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$, found 244.0713.

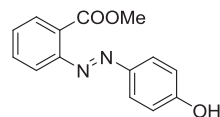
3-(4'-hydroxy-phenylazo)benzoic acid **11**



This compound was synthesized by the reaction between 3-aminobenzoic acid (2.14 mmol) and phenol (1.79 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 2). **11** (258 mg, 53%) was obtained as an orange solid.

Rf: 0.45 (dichloromethane/MeOH 9:1); m.p. 217°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 8.32 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.05 (dd, $J = 1.9, 7.5$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 166.8, 161.4, 152.1, 145.2, 132.0, 130.8, 129.7, 126.9, 125.1, 121.9, 116.0; IR (neat): 3239, 1691, 1593, 1505, 1229 cm^{-1} ; ESI-MS: 243.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 243.0764 for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$, found 243.0770.

Methyl 2-(4'-hydroxy-phenylazo)benzoate **13**

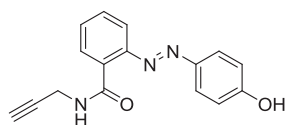


This compound was synthesized by the reaction between methyl 2-aminobenzoate (2.59 mmol) and phenol (2.16 mmol), following the general procedure for azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (7:3)

to give **13** (405 mg, 73%) as a red solid.

Rf: 0.37 (cyclohexane/EtOAc 7:3); m.p. 126°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 10.40 (s, 1H), 7.78-7.62 (m, 5H), 7.55 (dt, $J = 1.5, 7.3$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 167.6, 161.4, 150.7, 145.2, 131.9, 129.6, 129.1, 128.3, 125.1, 119.3, 116.0, 52.2; IR (neat): 3347, 1705, 1588, 1506, 1434, 1266, 1141 cm^{-1} ; ESI-MS 257.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z *calcd* 279.0740 for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_3$, found 279.0749.

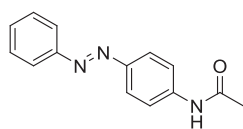
2-(4'-hydroxy-phenylazo)-N-(prop-2-ynyl)benzamide **14**



To a stirred solution of 2-(4'-hydroxy-phenylazo)benzoic acid (3.70 g, 15.3 mmol) in THF (65.0 mL), were added successively, DIEA (5.33 mL, 30.5 mmol) and propargylamine (1.46 mL, 22.9 mmol).

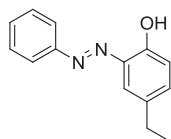
The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath, then HBTU (6.37 g, 16.8 mmol) was added. Stirring was continued for 16 h while the mixture was warmed up to RT. THF was evaporated off and the residue was diluted in dichloromethane (100 mL). Organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (95:5) to give **14** (2.22 g, 52%) as an orange solid.

Rf: 0.55 (dichloromethane/MeOH 95:5); m.p. 207 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$ and $\text{MeOD-}d_4$) δ 9.35 (s, 1H), 8.13 (dt, $J = 1.7, 7.6$ Hz, 1H), 7.86-7.79 (m, 3H), 7.46-7.49 (m, 3H), 6.95-6.91 (m, 2H), 4.26-4.24 (m, 2H), 2.52 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$ and $\text{MeOD-}d_4$) δ 163.3, 151.2, 147.5, 133.4, 131.9, 131.7, 131.5, 127.3, 117.4, 117.4, 73.5, 30.9; IR (neat): 3267, 3152, 1638, 1585, 1286, 1141 cm^{-1} ; ESI-MS 278.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 280.1081 for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$, found 280.1085.

N*-(4-(phenylazo)phenyl)acetamide **17*


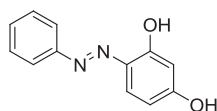
4-aminoazobenzene (383 mg, 1.97 mmol) was dissolved in acetic anhydride (1.9 mL, 19.7 mmol) and reaction mixture was stirred for 2 min until solid precipitated. Solid was dissolved in EtOAc (10 mL) and organic layer was washed with saturated NaHCO₃ and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (2:8) to give **17** (400 mg, 85%) as an orange solid.

Rf: 0.53 (dichloromethane/MeOH 95:5); m.p. 155°C; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.89-7.86 (m, 4H), 7.76-7.74 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 3H), 2.16 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 171.9, 154.2, 150.2, 143.0, 132.0, 130.3, 124.8, 123.8, 121.2, 24.1; IR (neat): 2360, 1655, 1599, 1505, 1392 cm⁻¹; ESI-MS 240.1 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 240.1131 for C₁₄H₁₄N₃O, found 240.1134.

N*-(4-ethyl-2-(phenylazo)phenol) **19*


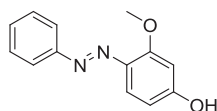
This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.38 mmol) and 4-ethylphenol (1.98 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (97:3) to give **19** (222 mg, 50%) as an orange solid.

Rf: 0.63 (cyclohexane/EtOAc 95:5); m.p. 45°C; ¹H NMR (400 MHz, dmsO-*d*₆) δ 11.02 (br, 1H), 7.99-7.96 (m, 2H), 7.60-7.51 (m, 4H), 7.27 (dd, *J* = 2.3, 8.4 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.6 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, dmsO-*d*₆) δ 152.4, 151.4, 137.9, 135.0, 133.3, 131.1, 129.4, 122.5, 122.1, 118.0, 27.1, 15.6; IR (neat) 1496, 1457, 1274 cm⁻¹; ESI-MS 227.1 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 227.1179 for C₁₄H₁₅N₂O, found 227.1177.

N*-(4-(phenylazo)benzene-1,3-diol) **20*


This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.37 mmol) and resorcinol (1.98 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (98:2) to give **20** (301 mg, 71%) as an orange solid.

Rf: 0.21 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 174 °C; ¹H NMR (400 MHz, dmsO-*d*₆) δ 12.47 (s, 1H), 10.59 (br, 1H), 7.86-7.83 (m, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 7.48-7.44 (m, 1H), 6.51 (dd, *J* = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, dmsO-*d*₆) δ 163.0, 156.4, 150.6, 132.2, 130.2, 130.1, 129.4, 121.6, 109.1, 103.0; IR (neat): 1619, 1487, 1456, 1244 cm⁻¹. ESI-MS 215.0 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 215.0815 for C₁₂H₁₁N₂O₂, found 215.0816.

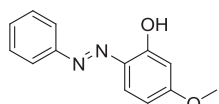
N*-(4-(3-methoxy-4-(phenylazo)phenol) **21*


This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.37 mmol) and 3-methoxyphenol (1.98 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (7:3) to give **21**

(293 mg, 65%) as an orange solid.

Rf: 0.64 (cyclohexane/EtOAc 5:5); m.p. 145°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 10.34 (s, 1H), 7.77-7.75 (m, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 7.47-7.43 (m, 1H), 6.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 2.4, 8.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 162.8, 159.1, 152.6, 134.9, 129.9, 129.2, 122.0, 117.5, 108.0, 100.0, 55.8; IR (neat): 3063, 1585, 1515, 1433, 1236 cm⁻¹; ESI-MS 229.1 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 229.0972 for C₁₃H₁₃N₂O₂, found 229.0978.

5-methoxy-2-(phenylazo)phenol **22**

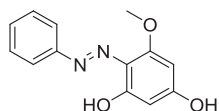


This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.37 mmol) and 3-methoxyphenol (1.98 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (8:2) to give **22**

(25 mg, 6%) as an orange solid.

Rf: 0.73 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 155°C; ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆) δ 13.24 (s, 1H), 7.89-7.87 (m, 2H), 7.82 (dd, *J* = 3.0, 9.0 Hz, 1H), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.51-7.47 (m, 1H), 6.71-6.67 (m, 1H), 6.52-6.51 (m, 1H), 3.90 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, acetone-*d*₆) δ 165.3, 157.0, 151.6, 134.9, 133.8, 131.4, 130.4, 122.6, 109.0, 102.3, 56.3; IR (neat): 1601, 1588, 1575, 1435, 1372, 1280, 1206, 1186 cm⁻¹; ESI-MS 229.0 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 229.0972 for C₁₃H₁₃N₂O₂, found 229.0973.

5-methoxy-4-(phenylazo)benzene-1,3-diol **23**

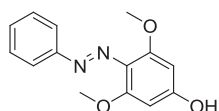


This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.15 mmol) and 5-methoxyresorcinol (1.79 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (5:5) to give **23**

(54 mg, 64%) as an orange solid.

Rf: 0.44 (cyclohexane/EtOAc 5:5); m.p. 197 °C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 14.90 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 7.73-7.71 (m, 2H), 7.53-7.49 (m, 2H), 7.40 (tt, *J* = 1.2, 7.3 Hz, 1H), 6.07 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 165.4, 160.4, 159.4, 149.1, 129.5, 129.1, 123.5, 120.5, 95.8, 92.3, 56.0; IR (neat): 1613, 1525, 1470, 1454, 1204 cm⁻¹; ESI-MS 245.1 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 245.0921 for C₁₃H₁₃N₂O₃, found 245.0923.

3,5-dimethoxy-4-(phenylazo)phenol **24**



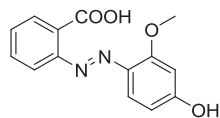
This compound was synthesized by the reaction between aniline (2.15 mmol) and 3,5-dimethoxyphenol (1.79 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (9:1) to give

24 (332 mg, 72%) as an orange solid.

Rf: 0.44 (dichloromethane/MeOH 9:1); m.p. 163 °C; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 3.90-3.79 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 188.8, 165.1, 162.2, 144.1, 130.5, 126.1, 122.8,

117.18, 101.9, 101.3, 57.0; IR (neat) : 3292, 1626, 1597, 1519, 1449, 1251 cm^{-1} ; ESI-MS 259.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 259.1077 for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$, found 259.1083.

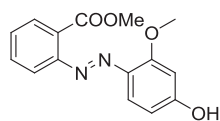
2-(4-hydroxy-2-methoxyphenylazo)benzoic acid 25



To a solution of **33** (295 mg, 1.03 mmol) in MeOH/water (8:2) (179 mL) was added LiOH (741 mg, 30.90 mmol) in one portion. The reaction mixture was stirred at 40°C for 16 h. Methanol was evaporated off, and the residue was diluted with 1N HCl solution (30 mL). Then, precipitated solid was filtered, washed successively with water, ether and dried by lyophilization to give **25** (267 mg, 95%) as a red solid.

Rf: 0.05 (dichloromethane/MeOH 95:5); decomposition at 218 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 7.84 (dd, $J = 1.6, 7.7$ Hz, 1H), 7.66-7.68 (m, 2H), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.49-7.45 (m, 1H), 6.55 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 2.2, 8.9$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 168.1, 158.6, 150.2, 134.3, 132.3, 129.9, 128.6, 127.5, 123.8, 116.6, 110.6, 100.6, 55.9; IR (neat) : 3445, 3155, 1738, 1631, 1584, 1489, 1440, 1325, 995 cm^{-1} ; ESI-MS 273.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 287,0954 for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$, found 287.1034.

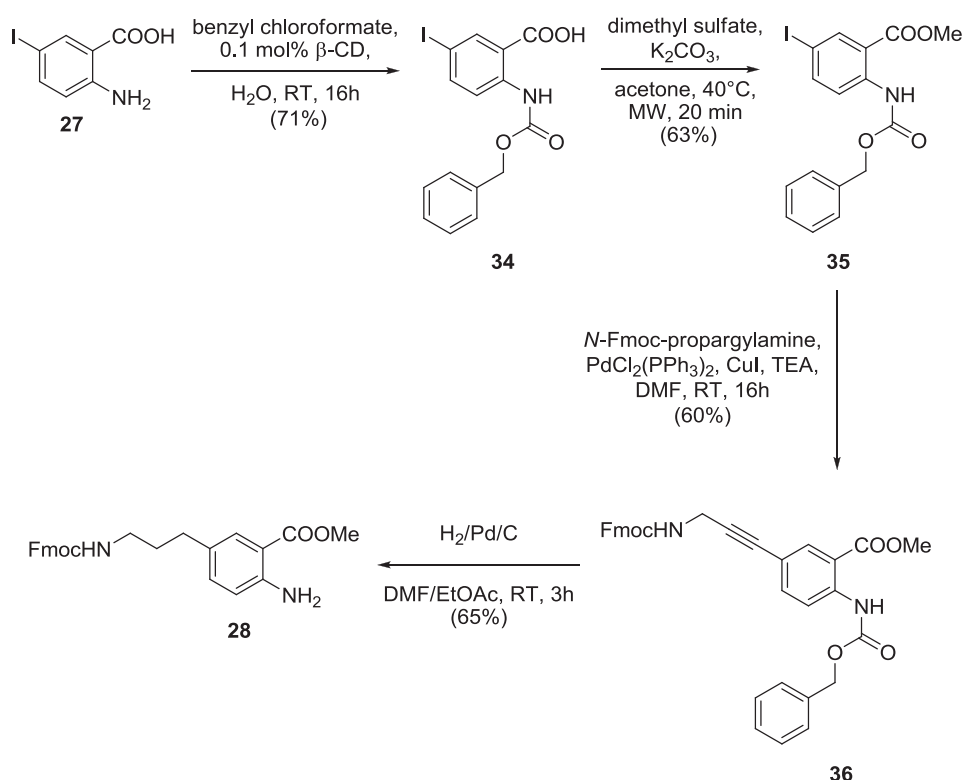
Methyl 2-(4-hydroxy-2-methoxyphenylazo)benzoate 33



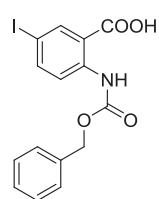
This compound was synthesized by the reaction between methyl anthranilate (7.02 mmol) and 3-methoxyphenol (5.85 mmol), following the general procedure of azo coupling reaction (Method 1). The crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (95:5) to give **33** (1.43 g, 84%) as an orange solid.

Rf: 0.52 (dichloromethane/MeOH 95:5); m.p. 163 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 10.46 (s, 1H), 7.70-7.63 (m, 2H), 7.58-7.48 (m, 3H), 6.61 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.47 (dd, $J = 2.4, 8.9$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 167.7, 163.4, 159.4, 151.3, 134.9, 131.7, 129.0, 128.9, 128.1, 119.6, 117.9, 108.2, 99.9, 55.8, 52.1; IR (neat) : 3181, 1738, 1698, 1628, 1503, 1431, 1317, 1267, 1080 cm^{-1} ; ESI-MS 287.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 273,0797 for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$, found 273.0876.

Synthesis of aniline compound 28



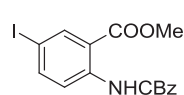
2-(benzyloxycarbonylamino)-5-iodobenzoic acid 34



Protected amine was synthesized using described procedure.³ β -cyclodextrine (1.93 g, 1.69 mmol) was dissolved in water (170 mL), then 2-amino-5-iodobenzoic acid (4.47 g, 16.99 mmol) was added and the reaction mixture stirred for 5 min at RT. Cbz-Cl (2.4 mL, 16.99 mmol) was added and stirring was continued at RT for 4h. The mixture was extracted twice with ethyl acetate (200 mL). Organics were combined and washed consecutively twice with water (300 mL) and brine (300 mL) then dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed under vacuum to afford **34** as a white solid (4.81 g, 71 %) without further purification.

Rf: 0.26 (dichloromethane/MeOH 9:1); m.p. 225°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ 10.71 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 2.2, 9.0$ Hz, 1H), 7.43-7.35 (m, 5H), 5.18 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$): δ 168.3, 152.5, 142.4, 140.6, 139.1, 136.1, 128.5, 128.2, 120.5, 117.8, 84.9, 66.5; IR (neat): 3306, 1724, 1661, 1592, 1575, 1513, 1385, 1297, 1246, 1206 cm^{-1} ; ESI-MS 396 $[\text{M}-\text{H}]^-$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ calcd 397.9884 for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{INO}_4$, found 397.9884.

Methyl 2-(benzyloxycarbonylamino)-5-iodobenzoate 35



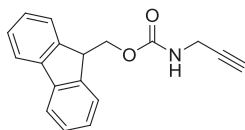
In a microwave vial, **34** (292 mg, 0.74 mmol) was dissolved in acetone (3 mL) then, dimethylsulfate (77 μL , 0.81 mmol) and K_2CO_3 (132 mg, 0.96 mmol) were added. The mixture was flushed with argon and heated at 40°C for 20 min under microwaves. Acetone was evaporated off and reaction crude was diluted

³ V. Pavan Kumar, M. Somi Reddy, M. Narender, K. Surendra, Y.V.D. Nageswar, K. Rama Rao, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6393-6396.

with 1N HCl solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed successively with 1N HCl solution, brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (95:5) to give **35** (190 mg, 63%) as a yellow solid.

Rf: 0.54 (cyclohexane/EtOAc 9:1); m.p. 91°C ; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 10.24 (s, 1H), 8.15-8.14 (m, 1H), 7.93-7.92 (m, 2H), 7.43-7.35 (m, 5H), 5.18 (s, 2H), 3.83 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 166.4, 152.6, 142.4, 139.7, 138.5, 136.0, 128.5, 128.2, 128.1, 121.5, 118.6, 85.5, 66.5, 52.7; IR (neat): 3290, 1731, 1685, 1582, 1513, 1433, 1402, 1235, 1204 cm⁻¹;

N-Fmoc-propargylamine

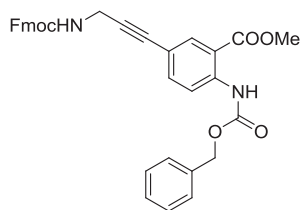


Protected propargylamine was synthesized using described procedure.⁴

To a solution of propargylamine (0.78 mL, 12.22 mmol) in DCM (37 mL) were added at 0°C (9H-fluoren-9-yl)methyl 2,5-dioxopyrrolidine-1-carboxylate (4.12 g, 12.22 mmol), DMAP (0.15 g, 1.22 mmol) and DIPEA (2.12 mL, 12.22 mmol). The resulting mixture was stirred at RT for 4h then transferred into a separatory funnel. The Organic layer was washed successively with 1N HCl solution, a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, and evaporated under reduce pressure affording **N-Fmoc-propargylamine** (3.26 g, 96 %) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 7.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H) 7.77 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 2.5, 5.6 Hz, 2H), 3.11 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 155.9, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.1, 120.1, 81.4, 73.0, 65.7, 46.6, 29.8.

*Methyl*5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)prop-1-ynyl)-2-(benzyloxycarbonylamino)benzoate **36**

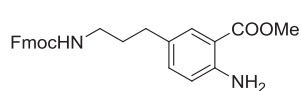


Compound **35** (10.30 g, 28.03 mmol) and *N*-Fmoc-propargylamine (6.96 g, 25.48 mmol) were dissolved in degassed DMF (120 mL). The mixture was degassed for adding 10 min with argon, before PdCl₂(PPh₃)₂ (0.54 g, 0.76 mmol), CuI (380 mg, 1.99 mmol), and TEA (9.8 mL, 76.40 mmol) were added. The solution was degassed again for 10 min and let stirred at RT for overnight. The reaction mixture was poured into 1N HCl solution (1000 mL) and extracted

three times by EtOAc. Organics were combined and washed three times with 1N HCl solution and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, and evaporated under reduce pressure. Silica gel chromatography cyclohexane/EtOAc (8:2) gave **36** (9.43 g, 60%) as a white solid.

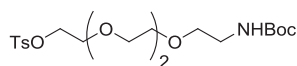
Rf: 0.23 (cyclohexane/EtOAc 8:2); m.p. 204°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 10.36 (s, 1H), 8.18-8.15 (m, 1H), 7.91-7.83 (m, 4H), 7.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.44-7.32 (m, 9H), 5.19 (s, 2H), 4.35 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.04 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 167.0, 152.7, 142.6, 139.6, 139.4, 137.4, 136.5, 136.1, 133.3, 128.9, 128.5, 128.2, 128.1, 127.3, 121.4, 120.0, 119.5, 116.9, 116.5, 109.7, 92.2, 79.9, 66.5, 52.6, 31.2. IR (neat): 3470, 3361, 3333, 1688, 1526, 1500 1439, 1267, 1235, 1203 cm⁻¹; ESI-MS [M+Na]⁺-Fmoc 339.0; HRMS [M+Na]⁺ *m/z* *calcd* 583.1845 for C₃₄H₂₈N₂NaO₆, found 583.1836.

⁴ J.K. Pokorski, L.M.M. Jenkins, H. Feng, S.R. Durell, Y. Bai, D.H. Appella, *Org. Lett.* **2007**, 9 (12), 2381-2383.

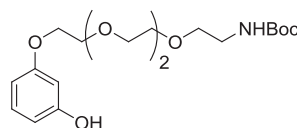
Methyl 5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propyl)-2-aminobenzoate 28


36 (0.78 g, 1.39 mmol) was dissolved in DMF (100 mL) and then EtOAc (100 mL) and Pd/C 10% (80 mg) were added. The mixture was degassed under vacuum and stirred under H₂ for 3 hours. Pd/C was then filtrated through Celite and 1N HCl solution (500 mL) was added to the filtrate. Layers were separated and organic layer was washed twice with 1N HCl solution and brine. Silica gel chromatography using DCM 100% gave a white solid **28** (0.39 g, 65%).

Rf: 0.36 (cyclohexane/EtOAc 7:3); m.p. 140°C; ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆) δ 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.34-7.29 (m, 3H), 7.11 (dd, *J* = 2.4, 8.5 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.97 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, dms_o-d₆) δ 167.8, 156.1, 149.5, 143.9, 140.7, 134.5, 129.5, 127.7, 127.5, 127.0, 125.1, 120.1, 116.7, 108.5, 65.1, 51.2, 46.7, 31.3, 31.2; IR (neat): 3469, 3360, 1690, 1671, 1588, 1528, 1439, 1250, 1201 cm⁻¹; ESI-MS 431.0 [M+H]⁺; HRMS [M+H]⁺ *m/z* calcd 431.1965 for C₂₆H₂₇N₂O₄, found 431.1985.

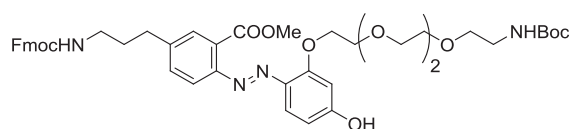
Ethylene linker spacer 29


Starting of tetraethylene glycol, ethylene glycol spacer **29** was synthesized using described procedure in 5 steps (53% of overall yield).⁵

Tert-butyl 2-(2-(2-(2-(3-hydroxyphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethylcarbamate 30


In a microwave vial, resorcinol (621 mg, 4.53 mmol) was dissolved in DMF (11 mL) then, **29** (674 mg, 1.51 mmol) and potassium carbonate (229 mg, 1.66 mmol) were added. The mixture was flushed with argon and heated at 120°C for 20 min under microwaves. Reaction crude was dissolved in 1N HCl solution (150 mL) and extracted with EtOAc (3*50 mL). The combined organic solution was washed with 1N HCl solution, brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (2:8) to give 334 mg (57%) of uncolored oil.

Rf: 0.52 (cyclohexane/EtOAc 2:8); ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.05 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.42-6.36 (m, 3H), 4.08-4.06 (m, 2H), 3.83-3.80 (m, 2H), 3.71-3.57 (m, 8H), 3.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 161.6, 159.9, 158.57, 131.0, 109.2, 106.8, 103.2, 80.2, 71.8, 71.7, 71.4, 71.2, 71.0, 68.6, 41.44, 28.9; IR (neat): 1684, 1596, 1507, 1457, 1289, 1153 cm⁻¹; ESI-MS 286.2 [M+H]⁺-Boc. HRMS [M+H]⁺ *m/z* calcd 386.2173 for C₁₉H₃₂NO₇, found 386.2184.

Methyl 5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propyl)-2-(((2-(2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)oxy)-4-hydroxyphenyl)phenylazo)benzoate 26


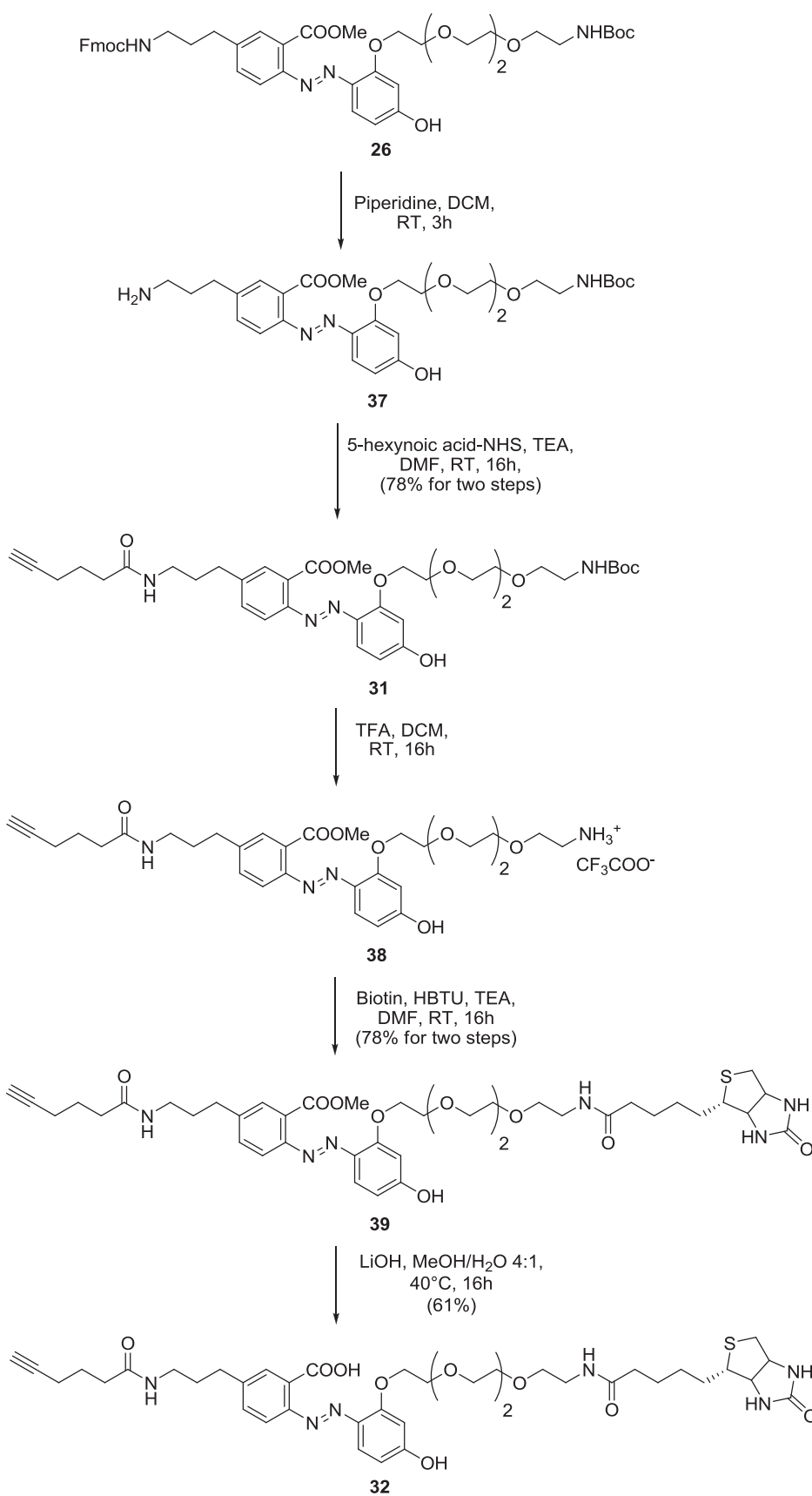
This compound was synthesized by the reaction between **28** and **30**, following the general procedure for azo coupling reaction (Method 1).

⁵ F.J. Dekker, N.J. de Mol, J. van Ameijde, M.J.E. Fischer, R. Ruijtenbeek, F.A.M. Redegeld, R.M.J. Liskamp, *ChemBioChem* **2002**, 3, 238-242.

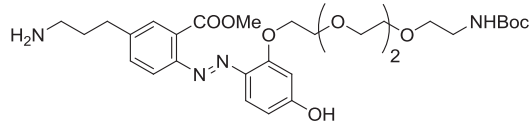
After purification by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (97:3), desired azo **26** (208 mg, 54%) was obtained as an orange solid.

Rf: 0.51 (dichloromethane/MeOH 95:5); m.p. 63°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 13.62 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.41-7.29 (m, 5H), 7.19 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.97 (br, 1H), 4.87 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.37 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.71-3.68 (m, 2H), 3.63-3.51 (m, 6H), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.29-3.23 (m, 4H), 2.66 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.86 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ 187.0, 167.7, 159.5, 156.6, 156.1, 144.1, 143.3, 141.5, 139.7, 136.3, 135.1, 130.5, 127.9, 127.2, 125.5, 125.2, 120.2, 115.9, 114.1, 106.3, 79.4, 70.9, 70.8, 70.4, 70.4, 68.8, 68.4, 66.7, 52.4, 47.5, 40.8, 40.6, 32.5, 31.7, 28.6; IR (neat): 3470, 1690, 1626, 1526, 1499, 1438, 1249, 1201 cm^{-1} ; ESI-MS 827.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 827.3862 for $\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{11}$, found 827.3851.

Derivatization of compound 26

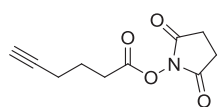


Methyl-5-(3-aminopropyl)-2-((2-(2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yloxy)-4-hydroxyphenyl)phenyl)benzoate 37



To a solution of **26** (207 mg, 0.25 mmol) in DCM (2.50 mL) was added piperidine (0.25 mL, 2.5 mmol) at 0°C and reaction mixture was stirred at RT for 3 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude amine was directly engaged in the next step.

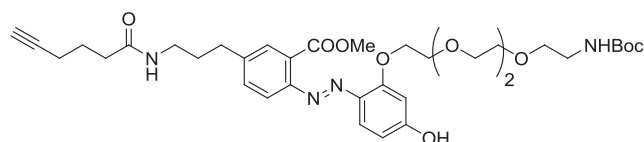
N-Succinimidyl-5-hexynoate



Activated acid was synthesized according to a published procedure,⁶ yet with slight modifications. 5-hexynoic acid (1.38 g, 12.33 mmol) was dissolved in DCM/DMF (7.7 mL, 9:1) and stirred. Then, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (2.84 g, 14.80 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.70 g, 14.80 mmol) were added to the solution, and the reaction was stirred for 8 hours. The reaction was then diluted with DCM (50 mL) and washed with 1N HCl solution (3*30 mL), saturated NaHCO₃ solution (3*50 mL) and dried over Na₂SO₄. Solvent was evaporated under reduce pressure to give ***N*-Succinimidyl-5-hexynoate** (2.43 g, 94%) as a brown oil.

Rf: 0.83 (cyclohexane/EtOAc); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 2.83 (s, 4H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.33 (dt, *J* = 2.1, 7.5 Hz, 2H), 2.01 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 1.95 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 169.3, 168.3, 82.6, 70.0, 29.8, 25.8, 23.5, 17.8; IR (neat): 3282, 1812, 1782, 1728, 1367, 1200 cm⁻¹.

Methyl-2-((2-(2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yloxy)-4-hydroxyphenyl)phenylazo)-5-(3-hex-5-ynamidopropyl)benzoate 31



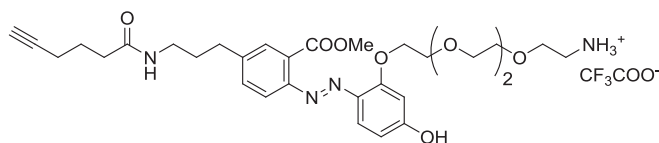
To a stirred solution of **37** crude (0.25 mmol) and anhydrous DMF (4.0 mL) were added under argon atmosphere, ***N*-succinimidyl-5-hexynoate** (105 mg, 0.50 mmol) and TEA (70 μL, 0.50 mmol). The reaction mixture was stirred for 19 h at RT. Solvent was evaporated off and crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (95:5) to give **31** (136 mg, 78% for two steps) as an orange oil.

Rf: 0.47 (dichloromethane/MeOH 95:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 13.58 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 1.5, 9.8 Hz, 1H), 5.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.81 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.36 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.1 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.70-3.49 (m, 8H), 3.46 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.32-3.24 (m, 4H), 2.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.26 (dt, *J* = 2.7, 7.5 Hz, 2H), 1.98 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.90-1.81 (m, 4H), 1.43 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 187.0, 172.4, 167.7, 159.5, 156.2, 143.3, 139.7, 136.3, 135.0, 130.5, 125.5, 115.9, 114.1, 106.3, 83.7, 79.4, 70.9, 70.7, 70.4, 70.3, 69.3, 68.8, 68.3, 52.4, 40.5, 39.2, 35.2, 32.6, 31.4, 28.6, 24.3, 18.0; IR (neat): 3296, 2931, 1698, 1624, 1499, 1438, 1239, 1175

⁶ M.D. Disney, J.L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2007**, 8, 649-656.

cm^{-1} ; ESI-MS 699.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 699.3600 for $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_{10}$, found 699.3634.

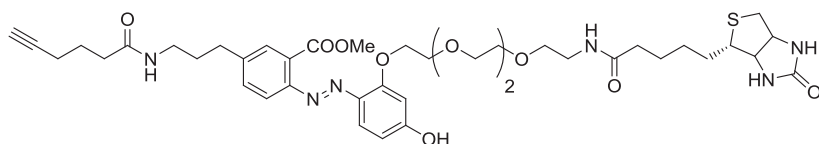
Trifluoroacetate salt of methyl 2-((2-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-4-hydroxyphenyl)phenylazo)-5-(3-hex-5-ynamidopropyl)benzoate 38



To a solution of **31** (136 mg, 0.20 mmol) in DCM (3.50 mL) was added trifluoroacetic acid (145 μL , 1.95 mmol) at 0°C and reaction mixture was stirred 3 h at RT. The reaction mixture was

concentrated under reduced pressure and the crude amine was directly engaged in the next step.

Methyl 5-(3-hex-5-ynamidopropyl)-2-((E)-(4-hydroxy-2-(13-oxo-17-((4S)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptacycloxy)phenyl)diazenyl)benzoate 39

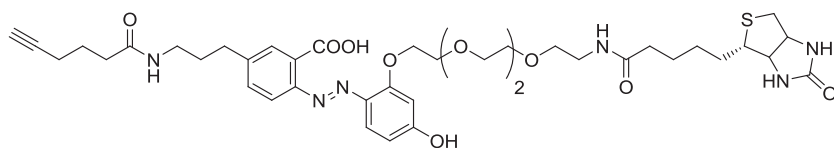


To a stirred solution of **38** crude (0.20 mmol) and anhydrous DMF (3.2 mL) were added successively, biotin (71 mg, 0.29 mmol),

TEA (81 μL , 0.59 mmol) and HBTU (110 mg, 0.29 mmol). The reaction mixture was stirred for 19 h at RT. Solvent was evaporated off and crude was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/MeOH (95:5 to 90:10) to give **39** (125 mg, 78% for two steps) as an orange oil.

Rf: 0.47 (dichloromethane/MeOH 9:1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 6.76 (br, 1H), 6.63 (br, 1H), 6.41 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 6.00 (m, 1H), 4.51-4.32 (m, 4H), 4.10 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.71-3.47 (m, 10H), 3.38-3.28 (m, 4H), 3.13 (m, 1H), 2.90-2.72 (m, 2H), 2.67 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.28-2.17 (m, 4H), 1.99 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.90-1.83 (m, 4H), 1.70-1.60 (m, 4H), 1.43-1.40 (m, 4H); IR (neat): 3347, 1705, 1588, 1506, 1434, 1377, 1266, 1141 cm^{-1} ; ESI-MS 825.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 825.3851 for $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$, found 825.3876.

Alkyne-HAZA-Biotin 32



To a solution of **39** (118 mg, 0.14 mmol) in MeOH/water (8:2) (25 mL) was added LiOH (102 mg, 4.30 mmol) in one

portion. The reaction mixture was stirred at 40°C for 16 h. Methanol was evaporated off, and the residue was diluted with 1N HCl solution (30 mL). Aqueous layer was extracted twice with a mixture of dichloromethane/MeOH (9:1). The combined solution was dried over Na_2SO_4 and solvent was evaporated to give **32** as a red oil (71 mg, 61%).

Rf: 0.31 (dichloromethane/MeOH 8:2); ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 7.96 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.90-7.73 (m, 2H), 7.57-7.47 (m, 3H), 6.50 (dd, $J = 2.2, 9.3$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 4.6, 8.4$ Hz, 1H), 4.41-4.39 (m, 2H), 4.26 (dd, $J = 4.6, 8.4$ Hz, 1H), 4.04-4.02 (m, 2H), 3.72-3.70 (m, 2H), 3.62-3.59 (m, 2H), 3.56-3.53 (m, 2H), 3.48-3.42 (m, 4H), 3.35 (s, 1H), 3.29-3.21 (m, 4H), 3.15 (td, $J = 5.0, 8.7$ Hz, 1H), 2.75-2.66 (m, 3H), 2.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.27-2.20 (m, 3H), 2.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.88-1.79 (m, 4H), 1.74-1.51 (m, 4H), 1.42-1.35 (m, 2H); IR (neat): 3273, 2925, 1690, 1645, 1622, 1496, 1439, 1235, 1183, 1113 cm^{-1} ; ESI-MS 811.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z *calcd* 811.3695 for $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$, found 811.3727.

LC-MS data of Alkyne-HAZA-Biotin 32 reduction

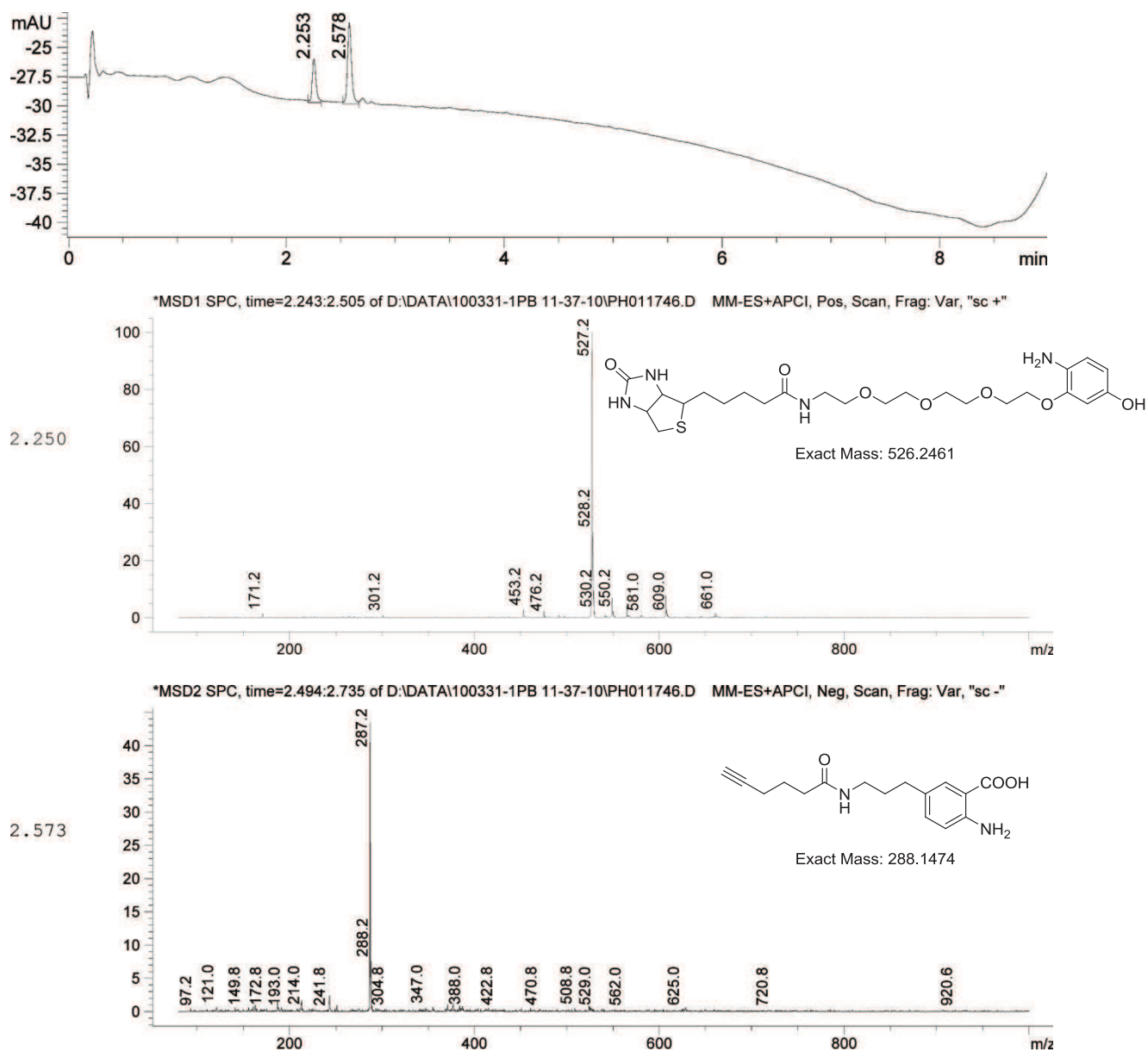


Figure S1: LC-MS data of alkyne-HAZA-biotin (32) reduction with 47.5 μ M of azo-arene and 1 mM of dithionite for 5 min.

Half life of reference compound

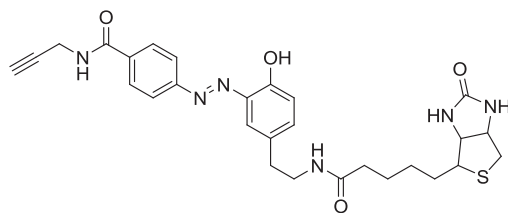


Figure S2: Following general procedure of azo cleavage, our reference scaffold⁷ showed 487 s of half-life.

⁷ a) M. Bogyo, V. H. L. Stephen, F. Marko, *US patent* 60/825,548, **2006**; b) Steven H. L. Verhelst, M. Fonović, M. Bogyo, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1306; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284; c) M. Fonović, S. H. L. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761

II.4. Etude de l'enrichissement de gyrase en conditions non-dénaturantes

La précédente étude a non seulement permis l'identification d'un groupement Azo hautement réactif vis-à-vis du dithionite, mais également la synthèse d'une sonde d'enrichissement derivatisable **Alcyne-HAZA-Biotine**.⁶ Ce composé a alors été fonctionnalisé par un ligand afin d'évaluer sa capacité à enrichir des protéines en conditions non-dénaturantes. Pour réaliser cette étude, la gyrase a été choisie comme modèle de complexes protéiques.

II.4.1. La gyrase comme modèle de complexes protéiques

La gyrase est une topoisomérase de type II rencontrée chez *Escherichia coli*. C'est une protéine tetramérique de type A2B2 avec, respectivement, des poids moléculaire de 105 et 95 kDa pour la gyrase A (gyrA) et la gyrase B (gyrB).⁵³ Son activité caractéristique dépend directement de sa structure et consiste à provoquer des superenroulements négatifs dans l'ADN double brin en présence d'ATP. Elle catalyse également des ruptures spécifiques d'ADN double brin, l'hydrolyse d'ATP et la formation ou résolution de nœuds ou caténanes dans de l'ADN double brin.⁵⁴ Il n'existe pas de complexe A2B2 de gyrase recombinant, mais la production et la purification de gyrB recombinante est connue et maîtrisée par le Laboratoire de Biologie Structurale et Génomique (Inserm U964 UMR7104).

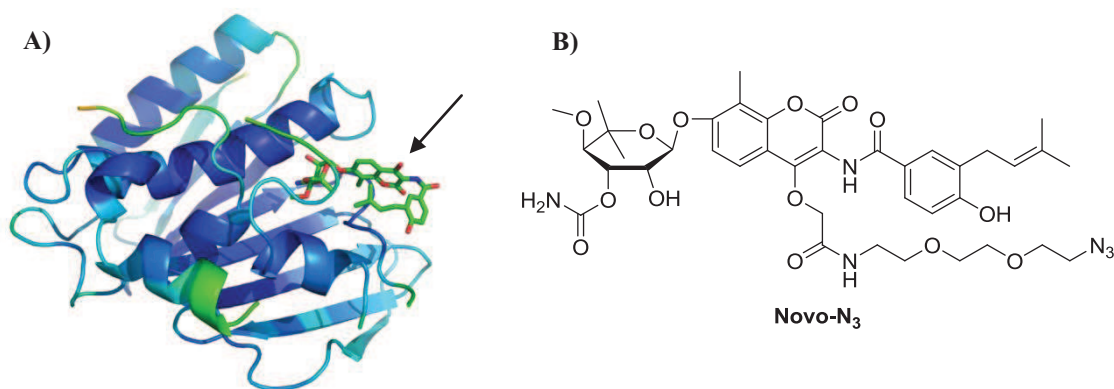


Figure 8 : A) Structure cristallographique de la poche de l'ADN-Gyrase 24 kDa liée à la Novobiocine. (PDB ID 1AJ6); B) Structure de la novobiocine derivatisée par un azoture (Novo-N₃).

Pour développer une sonde d'enrichissement capable de capturer un complexe A2B2 de gyrase, nous avons utilisé un ligand du nom de novobiocine **Novo-N₃** précédemment développé au laboratoire par le Dr. Ghyslain Budin (Figure 8). Cette molécule possède une très forte affinité pour la gyrB ($K_d \approx 10^{-7}$ M) et permet ainsi un marquage non-covalent de la

protéine. C'est cette approche qui a été utilisée par les Dr. Ghyslain Budin et Martin Moune Dimala pour le développement d'une nouvelle stratégie de marquage de protéines par un fluorophore en conditions non-covalentes et non-dénaturantes.⁵

Pour notre étude, la gyrase est donc un modèle de complexes protéiques puisque :

- un ligand de gyrB peut être utilisé pour capturer les protéines
- de la protéine recombinante gyrB peut être utilisée pour mettre au point des conditions de capture et d'enrichissement d'un complexe endogène A2B2 de gyrase.
- un test d'activité de relaxation de l'ADN peut confirmer l'intégrité d'un complexe A2B2 de gyrase et ainsi confirmer des conditions non-dénaturantes.

II.4.2. Mise au point d'un enrichissement de gyrase et validation des conditions non-dénaturantes

A partir de la molécule **Alcyne-HAZA-Biotine**,⁶ une sonde d'enrichissement clivable **Novo-HAZA-Biotine** a été synthétisée et évaluée pour l'analyse d'un complexe A2B2 de gyrase (Figure 9). Les conditions d'éluion ont tout d'abord été mises au point à partir d'un lysat cellulaire enrichi en gyrB recombinante. Dans un second temps, cette sonde a permis d'enrichir un complexe A2B2 protéique de gyrase endogène à partir d'un lysat naturel. Un test d'activité enzymatique de relaxation de l'ADN effectué sur le complexe gyrA/gyrB purifié a démontré le caractère non-dénaturant de la méthode.

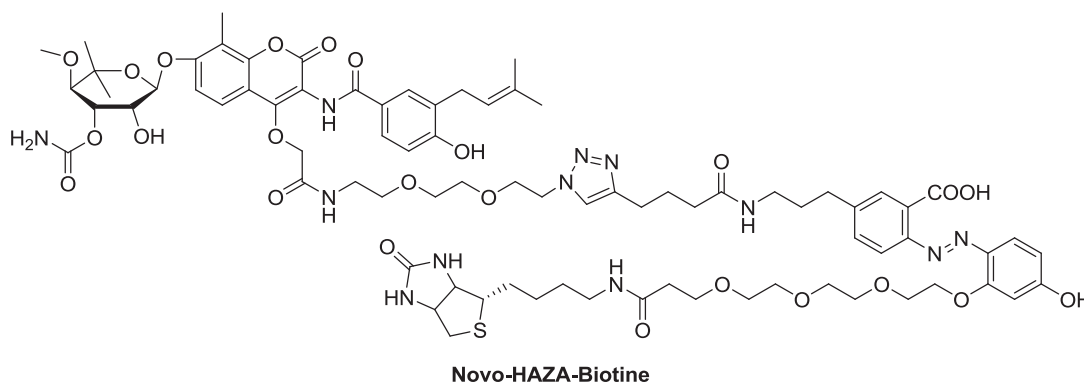


Figure 9 : Structure de la sonde d'enrichissement clivable Novo-HAZA-Biotine

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal à comité de lecture "*ChemBioChem*".⁷ Ma contribution à ce projet a consisté en la synthèse de la sonde **Novo-HAZA-Biotine**. Le Dr. Ghyslain Budin a d'une part synthétisé le composé **Novo-N₃**, et d'autre part, mis au point l'enrichissement de gyrase en collaboration avec le Dr. Martin Moune Dimala. Le Dr. Jean-Michel Saliou a réalisé l'analyse des protéines purifiées par

spectrométrie de masse. Julie Papillon a réalisé le test d'activité de relaxation de l'ADN sur le complexe A2B2 de gyrase purifié.

II.4.2.1. Article 3: Nondenaturing chemical proteomics for protein complex isolation and identification

DOI: 10.1002/cbic.201000574

Nondenaturing Chemical Proteomics for Protein Complex Isolation and Identification

Ghyslain Budin,^[a] Martin Moune-Dimala,^[b] Geoffray Leriche,^[a] Jean-Michel Saliou,^[c] Julie Papillon,^[b] Sarah Sanglier-Cianféran,^[c] Alain Van Dorsselaer,^[c] Valérie Lamour,^{*,[b, d]} Laurent Brino,^{*,[b]} and Alain Wagner^{*,[a]}

The isolation and identification of proteins by chemical proteomics relies on the use of a chemical probe that targets and allows the extraction of a specific class of protein.^[1] This technology allows the full proteomic study of a drug's secondary targets as well as the study of primary targets and their associated complexes.

Efficient recovery of the target protein is often carried out under harsh and denaturing conditions, which can lead to contamination by nonspecific materials and the loss of protein partners, structural information, and protein function. To reduce protein contamination, linkers that can be cleaved chemically in biological media have been introduced by using the properties of the azo function, disulfide bond, vinyl sulfide, or acylhydrazone.^[2–6] In particular, structural optimization of the azo function significantly improved the reduction kinetics with sodium dithionite.^[7] The use of mild reducing conditions circumvents harsh and denaturing conditions during chemical proteomic experiments and affords opportunities for the direct functional or structural analysis of isolated biological targets and their associated macromolecular complexes.

In this study, we designed a linker, **1**, that contains 2-(4'-hydroxy-2'-alkoxy phenylazo)benzoic acid (HAZA) as an optimized cleavable site possessing on one side a biotin affinity tag for enrichment and on the other side an alkyne moiety that can be conveniently linked to various molecular probes by a click reaction.^[8] HAZA linker **1** can be cleaved in less than ten seconds with 1 mM sodium dithionite.^[7] The use of this cleavable linker enabled us to capture and release native functional proteins complexes (Scheme 1). In order to target a specific protein in a complex mixture, a chemical probe is linked to **1**

(step A). The biological target and associated proteins are pulled out from a complex cell lysate through affinity purification with capture beads (step B). The immobilized protein complexes are then released by chemoselective elution with sodium dithionite (step C). Eluted target protein and associated proteins can be separated by SDS-PAGE (step D) and identified by mass spectrometry (step E). At this stage, a functional study of the eluted complex can be performed (step F).

We used the bacterial type II topoisomerase, DNA gyrase, as the target protein and its inhibitor, the aminocoumarin novobiocin, as the molecular hook. This model system, a 320 kDa A2B2 tetrameric multidomain enzyme has already been validated by previous experiments.^[9] DNA gyrase introduces negative supercoils into closed, circular, duplex DNA in an ATP-dependent fashion by cleaving both strands of a DNA duplex and transporting a second duplex through the double-strand break.^[10] This supercoiling activity is essential for DNA replication, transcription, and recombination. DNA gyrase is also able to relax supercoiled DNA in an ATP-independent manner.^[11] The DNA gyrase B subunit ATP binding site is targeted by the antibiotic novobiocin.

An affinity probe **2** was synthesized by coupling a novobiocin azide group^[7] with the HAZA linker by click chemistry (Scheme 2). The reductive cleavage of this probe with 6 mM of dithionite was achieved in less than 20 s, as determined by UV spectroscopy. Cleavage was also confirmed by MS analysis (Scheme 2 and Figure S1 in the Supporting Information).

We first evaluated the effect of sodium dithionite on protein integrity to confirm that linker cleavage would not affect the protein structure. DNA gyrase subunit B was thus incubated under typical dithionite concentrations,^[2,4] and analyzed by native gel electrophoresis. We observed that denaturation of the protein occurred at concentrations of dithionite above 10 mM (Figure S3). Interestingly, this shows that the dithionite concentrations commonly used to reduce azo-arene-based linkers (3 × 25 mM)^[2a] would not be compatible with nondenaturing protocols. In order to obtain the highest quantity of released protein while retaining a nondenaturing procedure, we investigated the capture and release of recombinant purified DNA gyrase B (Gyr-B) by optimizing the dithionite concentration and elution time. For this study, probe **2** was first incubated with streptavidin magnetic beads for 1 h at room temperature. Excess probe was removed by several washes in a magnetic separator, then Gyr-B was added to the resuspended magnetic beads and incubated for 1.5 h at room temperature. Excess proteins were discarded, and the remaining proteins were cleaved off by using freshly prepared dithionite solutions at different concentrations up to 6 mM for 15 min at room temperature (Figure S4). Optimal cleavage was achieved by

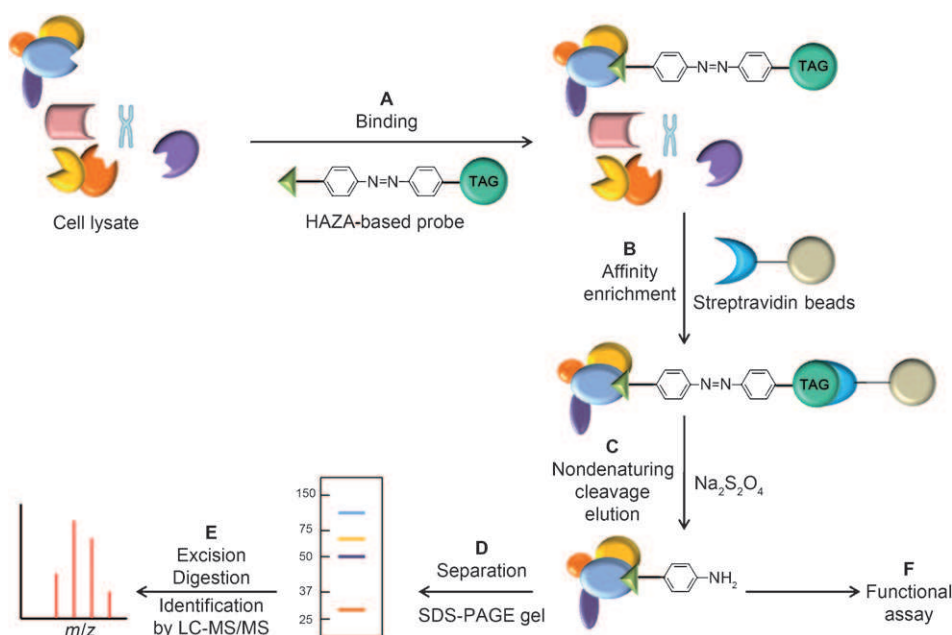
[a] Dr. G. Budin, G. Leriche, Dr. A. Wagner
Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199
74 Route du Rhin, 67401 Illkirch-Graffenstaden (France)
Fax: (+33) 368-854-306
E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr

[b] Dr. M. Moune-Dimala, J. Papillon, Dr. V. Lamour, Dr. L. Brino
Laboratory of Structural Biology and Genomics
Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology
Inserm U964 UMR7104 CNRS Uds
B.P. 10142, 67404 Illkirch-Graffenstaden (France)

[c] Dr. J.-M. Saliou, Dr. S. Sanglier-Cianféran, Prof. A. Van Dorsselaer
Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien IPHC
CNRS, UMR 7178, Université de Strasbourg UDS
ECPM, 25 Rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)

[d] Dr. V. Lamour
Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology
Hautepierre-Strasbourg Hospitals
Avenue Molière, B.P. 49, 67098 Strasbourg (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201000574>.



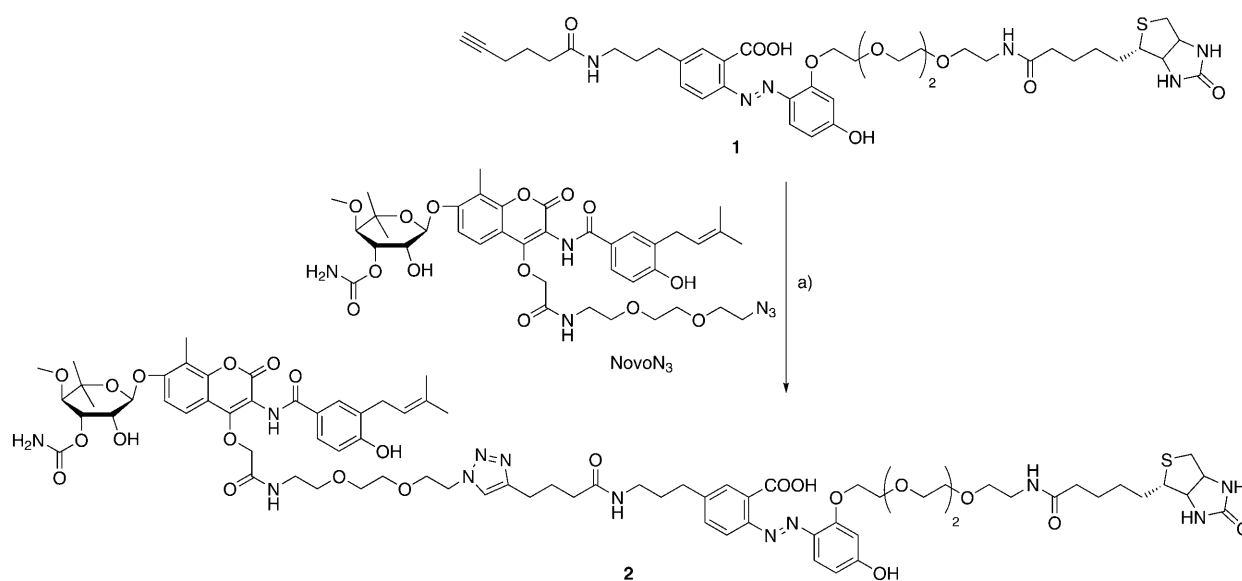
Scheme 1. General strategy of cleavable azo linker (HAZA) for the isolation, detection and identification of protein complexes under nondenaturing conditions. A) Binding, B) affinity enrichment, C) elution, D) separation, E) identification, and F) functional assay.

using 4 to 5 mM. Below this concentration and down to 1 mM, cleavage worked, but complete protein release may require additional elution steps (Figure S5). Cleavage kinetics were then studied as a function of incubation time. Elutions were performed after incubation of 5 mM dithionite with functionalized beads for up to 20 min (Figure S6). Integration of the band intensities showed maximum cleavage after just five minutes of incubation with the elution buffer. After that time, a plateau was reached (Figure S7). In conclusion, eluting for 5 min with 5 mM dithionite proved to be optimal for cleavage of probe 2 in biological media.

as no protein was released subsequently to washes with a solution without dithionite (Figure 1, lanes 4–5). All nonspecifically captured proteins were also recovered on the magnetic beads in the control experiment (Figure 1, lane 6).

Analysis of the band intensities by using image-analysis software (NIH Image J) revealed that approximately 95% of the protein was recovered in the first cleaved elution (determined by the ratio of lanes 1 and 6, Figure 1). Quasi-quantitative and clean cleavage was thus achieved with only one elution during five minutes of incubation with 5 mM dithionite.

The two major bands at 90 and 100 kDa were analyzed by in-gel digestion followed by LC-MS/MS analysis. The two bands



Scheme 2. Structures and synthesis of the cleavable linker 2. a) Sodium ascorbate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 38%.

The selectivity of the probe, as well as the efficiency and chemoselectivity of the cleavable linker, was then investigated in a complex mixture. Endogenous Gyr-B was captured in an *E. coli* cell lysate by using the optimized procedure and divided into two samples. Functionalized magnetic beads were either eluted twice with sodium dithionite or with a control buffer without dithionite. After SDS-PAGE, two major bands were detected in the first eluted mixture. The control elution did not contain any other released proteins (Figure 1, lanes 1–2). Unreleased proteins were detected between 28 and 72 kDa on the magnetic beads and corresponded to non-specifically captured proteins (Figure 1, lane 3). Gel analysis clearly demonstrates the very high specificity of the cleavage,

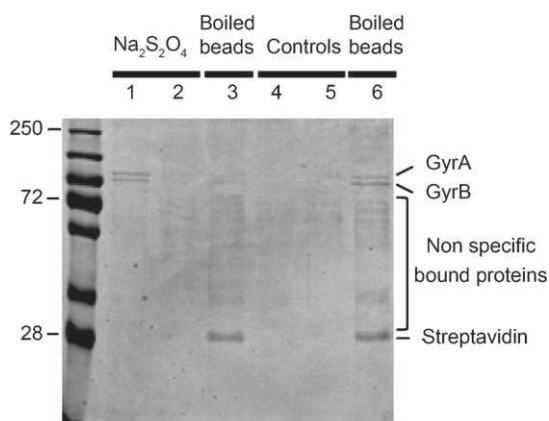


Figure 1. Specificity and sensitivity of dithionite reduction of the HAZA linker in cell lysate. Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the protein pull-down and selective cleavage by dithionite. Lane 1: specific cleavage of labeled protein by dithionite (5 mM) for 5 min. Lane 2: second elution with dithionite for 5 min. Lane 3: remaining proteins on the magnetic beads released by nonselective denaturing conditions. Lane 4: nonspecific cleavage of labeled protein by buffer solution (HEPES) for 5 min. Lane 5: second elution with buffer solution (HEPES) for 5 min. Lane 6: remaining proteins on the magnetic beads released by nonselective denaturing conditions. Note the presence of excess streptavidin in the boiled beads samples (lanes 3, 6).

were identified as the endogenous Gyr-B and Gyr-A of *E. coli* (Table 1), thus showing an enrichment of the native DNA gyrase A2B2 complex by our affinity probe targeting the Gyr-B ATP binding site.

To investigate whether the elution protocol would preserve the active form of the protein complex, we evaluated the ATP-independent DNA relaxation activity of the gyrase A2B2 complex released from the magnetic beads by dithionite treatment. We first checked that the novobiocin affinity probe bound in the ATP binding site of Gyr-B does not inhibit this enzymatic activity. A DNA-relaxation-assay control experiment showed that the relaxation activity of recombinant DNA gyrase is not modified by the addition of 0.2 mM of novobiocin (Figure 2, lanes 2–3). Using the eluted DNA gyrase we showed that the relaxation activity was not affected by the pull-down process (Figure 2, lane 4); this proved that the enzyme structure is preserved during the catalytic cycle.

At this stage, it cannot be excluded that the reducing conditions affect the function of some proteins from particular eukaryotic cell compartments by disrupting intramolecular or intermolecular disulfide bridges. However, our results demonstrate that the extra-mild cleavage conditions enabled by the

Table 1. Proteins targeted by probe 2 identified by mass spectrometry after chemoselective cleavage from immobilized streptavidin.		
Protein	$N_p^{[a]}$	Sequence coverage
DNA gyrase subunit A, <i>E. coli</i> (Uniprot Acc. Numb. P0AES4)	39	51 %
DNA Gyrase subunit B, <i>E. coli</i> (Uniprot Acc. Numb. P0AES6)	41	61 %

[a] N_p = number of identified peptides.

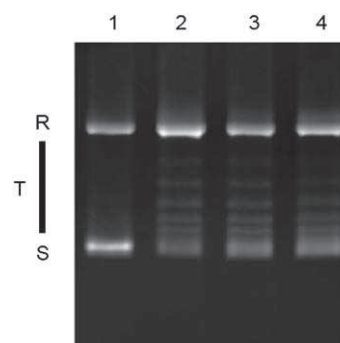


Figure 2. The DNA-relaxation activity assay of recombinant DNA gyrase pulled down from the magnetic beads functionalized with 2 and eluted by dithionite elution was checked on a 1 % agarose gel stained with ethidium bromide. Supercoiled (S), topoisomer (T), and relaxed (R) DNA bands. Lane 1: pUC19 plasmid control without protein, lane 2: pUC19 plasmid incubated with 200 ng of purified recombinant DNA gyrase, lane 3: pUC19 in presence of 0.2 mM of novobiocin, lane 4: pUC19 plasmid incubated with 200 ng of purified recombinant DNA gyrase eluted from the functionalized magnetic beads by using a 5 mM dithionite solution (lane 4).

use of the HAZA linker allow the recovery of functionally active proteins, even with the complexity of our model system, namely a large 320 kDa allosteric enzyme performing multiple enzymatic steps. This nondenaturing procedure could enable the isolation of endogenous protein complexes targeted by drugs, and structural and functional studies of these proteins under native conditions.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-06-BLAN-0217-01), the Region Alsace, and the French Ministry of Research.

Keywords: affinity purification · azo compounds · cleavable linkers · nondenaturing conditions · proteomics

- [1] a) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 822–827; b) B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383–414.
- [2] a) M. Bogyo, V. H. L. Stephen, F. Marko, US Patent 60/825,548, **2006**; b) S. H. L. Verhelst, M. Fonović, M. Bogyo, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1306; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284; c) M. Fonović, S. H. L. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761.
- [3] Y.-Y. Yang, J. M. Ascano, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3640.
- [4] F. Landi, C. M. Johansson, D. J. Campopiano, A. N. Hulme, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56.
- [5] H.-Y. Shiu, T.-C. Chan, C.-M. Ho, Y. Liu, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3839.
- [6] K. D. Park, R. Liu, H. Kohn, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763–772.
- [7] G. Leriche, G. Budin, L. Brino, A. Wagner, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *23*, 4360–4364.
- [8] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192.
- [9] G. Budin, M. M. Dimala, V. Lamour, P. Oudet, C. Mioskowski, S. Meunier, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 79–82.
- [10] J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369–413.
- [11] R. J. Reece, A. Maxwell, *Crit. Rev. Biochem.* **1991**, *26*, 335–375.

Received: September 22, 2010

Published online on November 4, 2010

II.4.2.2. Article 3 : Partie expérimentale

Supporting Information

Non-Denaturing Chemical Proteomics for Protein Complex Isolation and Identification

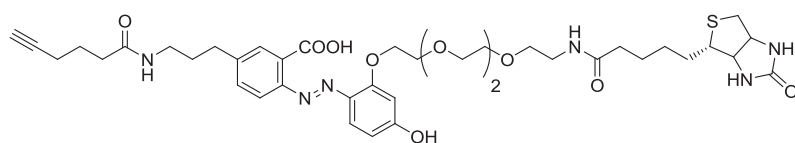
Ghyslain Budin,^[a] Martin Moune-Dimala,^[b] Geoffray Leriche,^[a] Jean-Michel Saliou,^[c] Julie Papillon,^[d] Sarah Sanglier-Cianféran,^[c] Alain Van Dorsselaer,^[c] Valérie Lamour*,^[b,d] Laurent Brino*^[b] and Alain Wagner*^[a]

General methods All reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purifications. Reactions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an ethanolic solution of cerium sulfate, followed by treatment with a heat gun. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 15-30 torr. UV-Vis spectra and kinetic were recorded on Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and mass spectra using a Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL. The semi-preparative HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a 2487 detector (Waters), a 5 ml sample loop and a Sunfire C₁₈ column (150 mm × 19 mm i.d., 5 µm, Waters).

General procedure for cleavage. A 10 mM azo solution was prepared in DMSO and diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) to obtain 50 µM of azo compound solution. Then, 950 µL of this solution was added to 50 µL of freshly prepared solution of sodium dithionite at 121 mM. Color disappearance was followed by UV/VIS spectrophotometry at 467 nm.

Experimental section

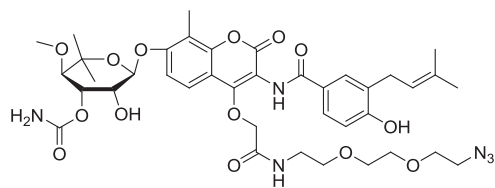
Alkyne-HAZA-Biotin (1)



Starting with 2-amino-5-iodobenzoic acid, the linker **1** was synthesized as previously reported by our group in 12 steps (3% of overall yield).⁸

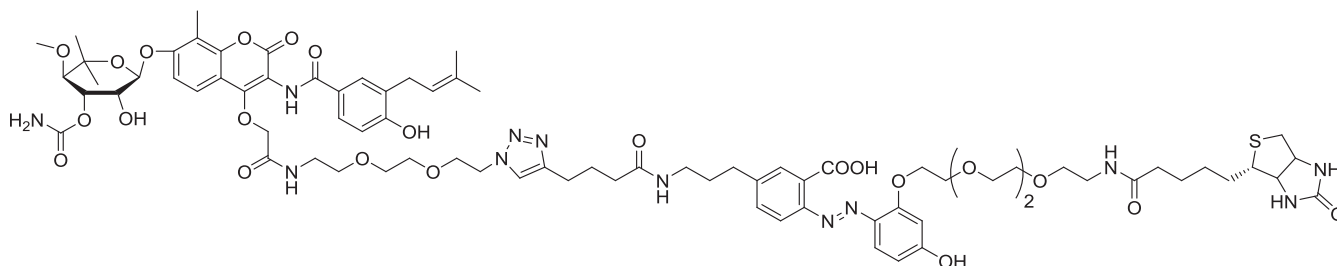
⁸ G. Leriche, G. Budin, L. Brino, A. Wagner, *Eur J. Org. Chem.*, **2010**, 23, 4360-4364

Novobiocin-azide (Novo-N₃)



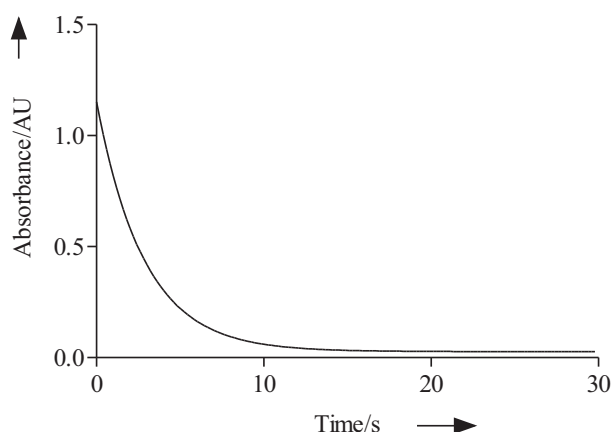
Starting of novobiocin, **Novo-N₃** was synthesized using described procedure in 5 steps from novobiocin (20% of overall yield).⁹

Novo-HAZA-Biotine (2)



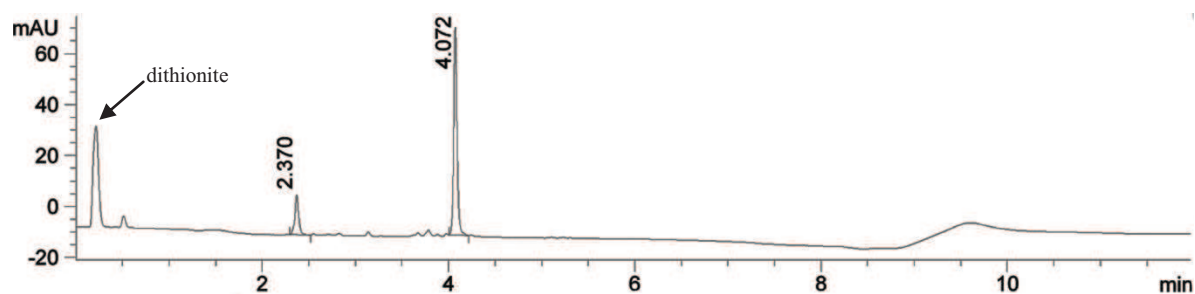
Compound **1** (20.0 mg, 0.025 mmol) was suspended in a mixture of *t*BuOH/water (1:1) (0.4 mL). The reaction mixture was stirred and a solution of **NovoN₃** (15.0 mg, 0.053 mmol) in DMSO (50 μ L), copper(II) sulfate pentahydrate (1.4 mg, 0.005 mmol) and sodium ascorbate (2.2 mg, 0.011 mmol) were successively added. Stirring was continued for 16 h at room temperature. Solvents were evaporated under reduce pressure and residue was purified by preparative HPLC to give compound **2** as an orange oil (10 mg, 38%). ESI-MS 1637.2 [M+H]⁺. HRMS [M+H]⁺ *m/z calcd* 1637.7080 for C₇₉H₁₀₆N₁₂O₂₄S⁺, found 1637.7054.

Reduction of Novo-HAZA-biotin probe 2

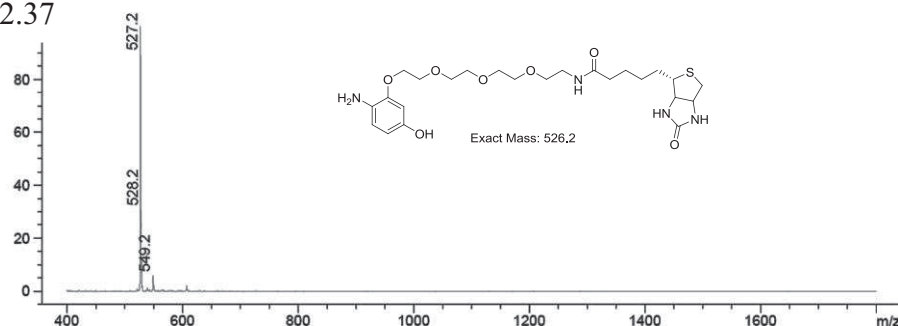


Supplementary Figure 1: UV data recorded at 467 nm for the reduction of the probe **2** with dithionite (6 mM).

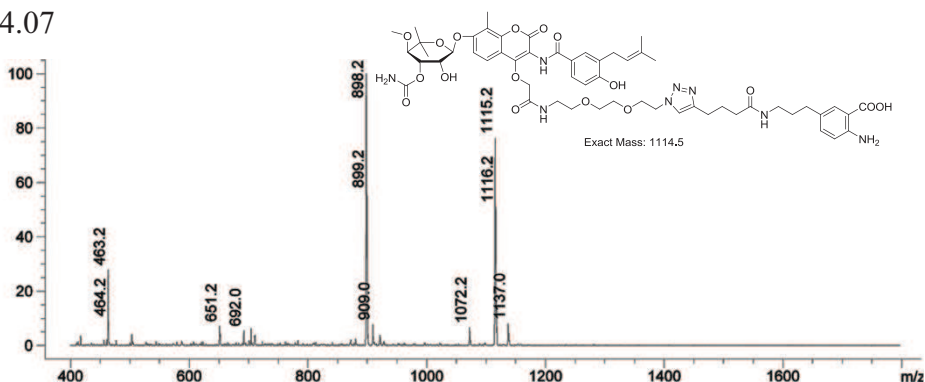
⁹ G.Budin, M. Moune Dimala, V. Lamour, P. Oudet, C. Mioskowski, S. Meunier, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 79-82.



RT = 2.37



RT = 4.07



Supplementary Figure 2: LC-MS data of **2** after reduction with dithionite.

Proteomic procedures.

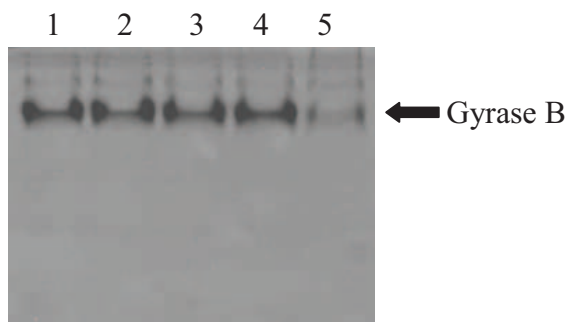
Thermus thermophilus Gyrase B, expression and purification.

The Gyrase B gene was amplified from *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA using Deep Vent polymerase and inserted into the Nde1-BamH1 cloning sites of pET15b (Novagen). Plasmid-transformed *E. coli* BL21 DE3 cells were grown in LB medium at 37°C and IPTG (1 mM) was added at OD_{600nm} 1 for 4h30min at 30°C to induce expression of the N-terminal 6His-tagged GyrB. The culture was then centrifuged and the cell pellet was washed in cold Phosphate Buffered Saline (PBS). Following resuspension in 20 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM PMSF, 1mM β-mercaptoethanol, protein cocktail inhibitor (ROCHE). The lysate was sonicated and then centrifuged at 18,000 rpm at 4°C for 1h. The supernatant was collected and loaded on a Hi-trap Ni-NTA affinity column (Pharmacia) and fractions containing GyrB were collected in the same buffer with 250 mM imidazole. Protein eluate was dialysed overnight in 10 mM Tris-Cl pH 8, 80 mM NaCl, 5% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, at 4°C in the presence of thrombin protease for the removal of the histidine tag. Cleaved GyrB was purified by exchange ion Hi-trap Q-sepharose

chromatography (Pharmacia) followed by gel filtration (Superdex 200, Pharmacia). Recombinant purified GyrB protein was resuspended in 10 mM Tris-Cl pH8, 200 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and stored in aliquots at -80°C.

Determination of non-denaturing dithionite concentration

Purified Gyrase B (5 µg) was added in 30 µL of cleavage solution (Na₂S₂O₄ in PBS) at 0, 1, 5, 10, 25 mM and incubated for 15 min at RT. The reaction mixture was treated with native gel loading buffer (0.004% bromophenol blue, 20% glycerol, and water) and analyzed by electrophoresis in Tris-Glycine 7% non-denaturing acrylamide gels (Figure S3).



Supplementary Figure 3: Coomassie stained non-denaturing acrylamide gel of recombinant GyrB from *Thermus thermophilus* (5 µg) incubated with sodium dithionite. The black arrow shows the band corresponding to monomeric GyrB.

Lane 1 : 0 mM, lane 2 : 1 mM, lane3 : 5 mM, lane 4 : 10 mM, lane 5 : 25 mM.

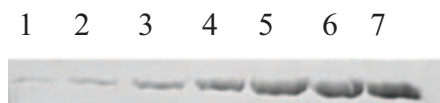
General procedure of capture and release of purified Gyrase B

50 µL of magnetic beads (Pierce 10 mg/mL) were washed three times with reaction buffer (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) using a magnetic separator. Then a solution of **2** (2.5 µM in reaction buffer, stock solution : 10 mM in DMSO) was incubated with magnetic beads for one hour at RT. Functionalized beads were washed three times with reaction buffer, then purified GyrB (50 µg) in reaction buffer was added to the beads. After 1.5 h of binding at RT, excess proteins were removed and magnetic beads were washed three times with reaction buffer to remove any unspecifically bound protein (The analysis of each eluted fractions by electrophoresis gel did not show premature cleavage of target protein and in the third wash no more protein was released). The resulting magnetic beads were resuspended in 30 µL of cleavage solution (Na₂S₂O₄ in Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) for indicated concentration and times. Elution was repeated a second time. Supernatants were collected and treated with 3X SDS sample buffer. Next, streptavidine beads were washed with Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 % buffer and boiled with SDS sample buffer for 5 min at 95°C. Samples were loaded on a 10 % SDS-PAGE gel and proteins were determined by coomassie gel staining.

Optimization of dithionite concentration

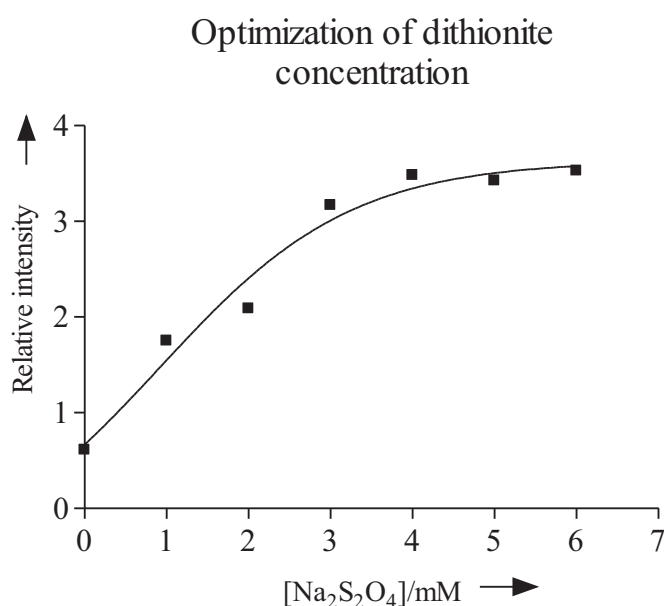
Following the general procedure of capture and release described above, functionalized magnetic beads were divided in seven aliquots and resuspended twice in 30 µL of different

cleavage solution ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 mM respectively. Resulting supernatants were loaded on a 10 % SDS-PAGE, and then the gel was stained with Coomassie Blue .



Supplementary Figure 4: Optimization of dithionite concentration on the cleavage yield. The Coomassie stained SDS-PAGE gel of recombinant GyrB from *Thermus thermophilus* was incubated with sodium dithionite.

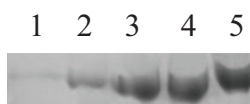
Lane 1 : 0 mM, lane 2 : 1 mM, lane 3 : 2 mM, lane 4 : 3 mM, lane 5 : 4 mM, lane 6 : 5 mM, lane 7 : 6 mM



Supplementary Figure 5 : Optimization of dithionite concentration

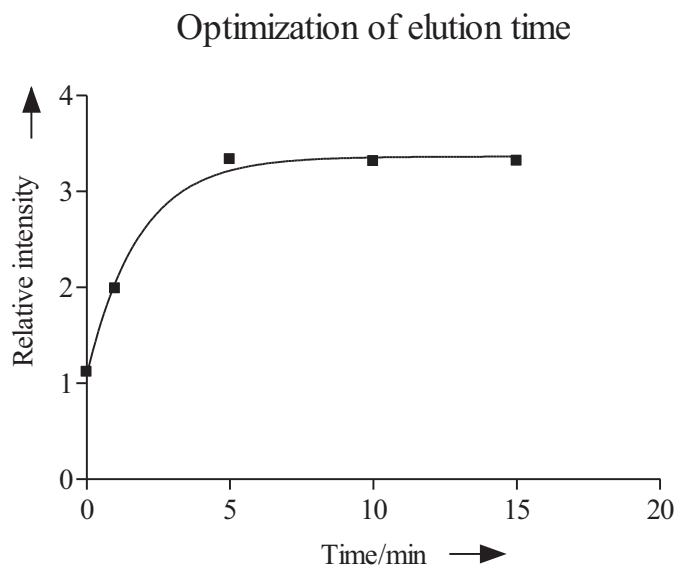
Optimization of elution times

Following the general procedure of capture and release described above, functionalized magnetic beads were divided in five aliquots and resuspended twice in 30 μL of a 5 mM cleavage solution ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) for 0, 1, 5, 10, 15 minutes respectively. Resulting supernatants were loaded on a 10 % SDS-PAGE, and then the gel was stained with Coomassie Blue.



Supplementary Figure 6: Optimization of elution time. Coomassie stained SDS-PAGE gel of recombinant GyrB from *Thermus thermophilus* was incubated with sodium dithionite (5 mM).

Lane 1 :0 min, lane 2 :1 min, lane 3 : 5 min, lane 4 : 10 min, lane 5 : 15 min



Supplementary Figure 7 : Optimization of elution time

General procedure of capture and release of gyrase from cell lysate

50 μ L of magnetic beads (Pierce 10 mg/mL) were washed three times with reaction buffer (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) using magnetic separator. Then a solution of **2** (2.5 μ M in reaction buffer, stock solution 10 mM in DMSO) was incubated with magnetic beads for one hour at RT. Functionalized beads were washed three times with reaction buffer, then *E.Coli* cell lysate (10 mg) was added. After 1.5 h of binding at RT, excess proteins were removed and magnetic beads were washed three times with reaction buffer to remove unspecifically bound proteins. The resulting magnetic beads were resuspended in 30 μ L of cleavage solution (Na₂S₂O₄ 5 mM in Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 %) for 5 minutes (or in buffer alone) and repeated a second time. Supernatants were collected and treated with 3X SDS sample buffer. Streptavidine beads were then washed with Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween²⁰ 0,1 % buffer and boiled with SDS sample buffer for 5 min at 95°C. Samples were loaded on a 10 % SDS-PAGE gel and proteins were determined by Coomassie gel staining.

MS-based protein identifications.

In gel digestion of gel slices was performed as previously described.¹⁰ The resulting peptide extracts were analyzed by nanoLC-MS/MS on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, UK) coupled to a SYNAPT HDMS hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Waters, Milford, UK) equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system.

Peptide mixtures were loaded on a Symmetry C18 trap precolumn (180 μ m inner diameter \times 20 mm, particle size 5 μ m; Waters, Milford, UK) and peptides were separated on a

¹⁰ L. Miguet, G. Bchade, L. Fornecker, E. Zink, C. Felden, C. Gervais, R. Herbrecht, A. Van Dorsselaer, L. Mauvieux, S. Sanglier-Cianferani, *J. Prot. research* **2009**, 8, 5406.

ACQUITY UPLC® BEH130 C18 column, 75 µm x 200 mm, 1.7 µm particle size (Waters, Milford, UK).

The solvent system consisted of 0.1 % formic acid in water (solvent A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (solvent B). Trapping was performed during 3 min at 5 µL/min with 99 % of solvent A and 1 % of solvent B. Elution was performed at a flow rate of 400 nL/min, using 1-50 % gradient (solvent B) over 35 min at 45°C followed by 65 % (solvent B) over 5 min.

The general mass spectrometric parameters were as follows: the capillary voltage was set at 3,500V and the cone voltage at 35V. Mass calibration of the TOF was achieved using [Glu1]-fibrinopeptide B (GFP) on the m/z 50-2000 range in the positive ion mode. Online correction of this calibration was achieved using lock-mass on product ions derived from the [Glu1]-fibrinopeptide B (GFP). The ion $(M+2H)^{2+}$ at m/z 785.8426 is used to calibrate MS data and the fragment ion $(M+H)^+$ at m/z 684.3469 is used to calibrate MS/MS data during the analysis. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The 4 most abundant peptides, preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation. MS/MS fragmentation was performed using argon as collision gas. The complete system was fully controlled by MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters, Milford, UK). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted with ProteinLynx Browser 2.3 (23, Waters, Milford, UK) into *.pkl peak list format. The MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. algorithm (Matrix Science, London, UK) to search against the Swissprot database (57.13). Spectra were searched with a mass tolerance of 0.3 Da for MS and 0.3 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one missed cleavage with trypsin and with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines specified as variable modifications.

Protein name : DNA gyrase subunit A			Protein name : DNA gyrase subunit B		
Protein accession numbers : P0AES4			Protein accession numbers : P0AES6		
Number of unique peptides : 39			Number of unique peptides : 41		
Percentage sequence coverage : 51,1%			Percentage sequence coverage : 60.9%		
Peptide	Peptide sequence	Peptide Mass (Da)	Peptide	Peptide sequence	Peptide Mass (Da)
7	EITPVNIEEELK	1 413,75	2	SNSYDSSSIK	1 087,49
19	SSYLDYAMSIVVGR	1 560,77	77	GIPTGIHP EEGVSAAEVIMTVLHAGGK	2 670,39
48	VLYAMNVLGNDWNK	1 636,82	104	FDDNSYK	888,374
69	VVGDVIGK	786,4727	111	VSGGLHGVGVSVVNALSQK	1 808,00
77	YHPHGDSAVYDTIVR	1 729,83	130	LELVQR	870,5414
92	MAQPFSLR	949,493	143	QIYEHGVPQAPLAVTGETEK	2 167,10
100	YMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMR	2 275,01	193	ELSLNLSGVSIR	1 321,71
130	IAHELMADLEK	1 269,65	210	DGKEDHFHYEGGK	1 631,75
141	ETVDFVDNYDGTEK	1 631,71	224	AFVEYLNK	983,5202
141	ETVDFVDNYDGTEKIPDVMPTK	2 513,18	232	NKTPHNPNIYFSTEK	1 936,00
155	IPDVMPTK	900,4867	234	TPHNPNIYFSTEK	1 693,86
228	GIEEAYR	837,4107	277	DGGTHLAGFR	1 030,51
246	AEVEVDAK	860,4366	292	TLNAYMDK	955,456
257	ETIIVHEIPYQVNK	1 682,91	317	EGLIAVVSVK	1 014,62
408	TALVANPWQLGNVAAMLER	2 054,09	338	DKLVSSEVK	1 004,56
427	AGDDAARPEWLEPEFGVR	2 014,96	347	SAVEQQMNELLA EYLLNPTDAK	2 606,27
445	DGLYYL TEQQAQAILDLR	2 110,08	395	KGALDLAGLPGK	1 139,68
480	ELLDQIAELLR	1 312,75	396	GALDLAGLPGK	1 011,58
504	EELELVR	887,4839	407	LADCQERDPALSELVVEGDSAGGSAK	2 851,34
518	RTEITANSADINLEDLITQEDVVVTL SHQGYVK	3 671,88	414	DPALSELVVEGDSAGGSAK	1 978,96
519	TEITANSADINLEDLITQEDVVVTL SHQGYVK	3 515,78	439	KNQAILPLK	1 024,65
551	YQPLSEYEAQR	1 383,65	440	NQAILPLK	896,5571
572	IKEEDFIDR	1 164,59	461	MLSSQEVATLITALGCGIGR	2 077,08
581	LLVANTHDHILCFSSR	1 882,96	481	DEYNPDKLR	1 149,55
604	VYQLPEATR	1 076,57	490	YHSIIIMTDADV DGSHIR	2 043,00
616	GRPIVNLLPLEQDER	1 748,97	508	TLLLTFFYR	1 173,67
631	ITAILPVTEFEEGVK	1 645,91	517	QMPEIVER	1 017,50
646	VFMATANGTVK	1 154,59	525	GHVYIAQPPLYK	1 385,76
657	KTVLTEFNR	1 107,62	583	LVSEYNATQK	1 152,59
658	TVLTEFNR	979,5213	608	ELIYQPTL TEADLSDEQTVTR	2 422,20
713	AMGCNTTGVR	1 066,48	629	WVNALVSELNDK	1 387,72
726	LGEQDKVVS LIVPR	1 481,87	629	WVNALVSELNDKEQHGSQWK	2 368,17
732	VVSLIVPR	882,5777	649	FDVHTNAEQNLFEPIVR	2 029,01
755	RTAVAEYPTK	1 135,61	668	THGVDTDYPLDHEFITGGEYR	2 422,10
756	TAVAEYPTK	979,5101	699	GLLEEDAFIER	1 291,65
780	NGLVVGAVQVDDCDQIMMITDAGTLVR	2 890,41	713	RQPVASFEQALDWLVK	1 887,01
809	VSEISIVGR	959,5526	714	QPVASFEQALDWLVK	1 730,91
818	NTQGVILIR	1 013,61	741	GLGEMNPEQLWETTMDPESR	2 320,02
827	TAEDENVVGLQR	1 330,66	769	DAIADQLFTTLMGDAVEPR	2 134,05
			789	RAFIEENALK	1 190,65
			790	AFIEENALK	1 034,55

DNA relaxation assay.

200 ng of pUC19 plasmid was incubated with 200 ng of DNA gyrase A2B2 in a buffer containing 20 mM Tris acetate pH8, 10mM magnesium acetate, 50mM potassium acetate, 1mM DTT and 1mg/mL BSA to a final volume to 10 μ L. The mixture was incubated 30 minutes at 37°C then the reaction was stopped with loading buffer containing 0.1% SDS. Reactions were loaded on a 1% agarose gel in TBE1X (Tris Borate EDTA) electrophoresed during 1.5 h at 120V. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL) and scanned with a Typhoon™ 8600 imager.

II.5. Développement de marqueurs pour la fonctionnalisation chimique et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃

Une technique de protéomique chimique consiste à marquer spécifiquement des néo-glycoprotéines nouvellement formées à partir de la machinerie biologique, en substituant un constituant naturel par un composé modifié par un azido.^{15,55} Ces néo-glycoprotéines-N₃ peuvent alors être spécifiquement fonctionnalisées à l'aide d'une réaction chimique comme la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre ou la ligation de Staudinger.⁵⁶ Dans le cadre de ce projet portant sur l'étude de protéines en conditions natives, nous avons souhaité associer les technologies d'élution en condition non-dénaturantes et de fonctionnalisation chimique. Précédemment, la ligation de Staudinger a permis le développement d'une stratégie de fonctionnalisation chimique en conditions non-dénaturantes.⁵ Cette réaction entre une phosphine et un azido a donc été choisie pour développer une sonde d'enrichissement clivable, capable de réaliser la fonctionnalisation et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃ natives. La sonde à mettre au point, de type **Phosphine-HAZA-Biotine**, doit donc incorporer : un dérivé de triarylphosphine, le motif clivable au dithionite HAZA et une biotine.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'unité exploratoire du centre de recherche de Sanofi-Aventis à Toulouse. L'ensemble des travaux de protéomique chimique a été réalisé par Sébastien Roudières et Alexandre Lebrun sous la direction du Dr. François Autelitano.

II.5.1. Synthèse d'une sonde **Phosphine-HAZA-Biotine**

La synthèse d'un composé **Phosphine-HAZA-Biotine** a été envisagée à partir du composé **Fmoc-HAZA-Boc** développé (voir section II.4.). Précédemment, la fonctionnalisation de ce composé a consisté en deux séquences de déprotection/couplage. Dans le cas de la synthèse de la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine**, cette stratégie a été adaptée afin d'incorporer le composé triarylphosphine, sensible à l'oxydation, à la fin de la séquence réactionnelle.

Le composé **Fmoc-HAZA-Boc** a été traité par de l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane pour déprotéger l'amine du lien éthylène glycol (Figure 10). Le produit **11** obtenu a été mis en réaction avec la biotine dans les conditions classiques de couplage, et **12** a été obtenu avec 56% de rendement. Un traitement basique de ce composé en présence

d'hydroxyde de lithium a permis d'une part la saponification de l'estér méthylique et d'autre part l'élimination du groupement Fmoc avec 97% de rendement. Le couplage entre **13** et une phosphine-NHS a été réalisé. Une purification dans les conditions classiques d'HPLC préparative (0.05% TFA H₂O/ACN) a conduit à la dégradation du composé final. Pour éviter cela, une méthode d'éluion en conditions basiques (NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5) a été utilisée. Le composé **Phosphine-HAZA-Biotine** a finalement été obtenu en 4 étapes avec 38% de rendement global.

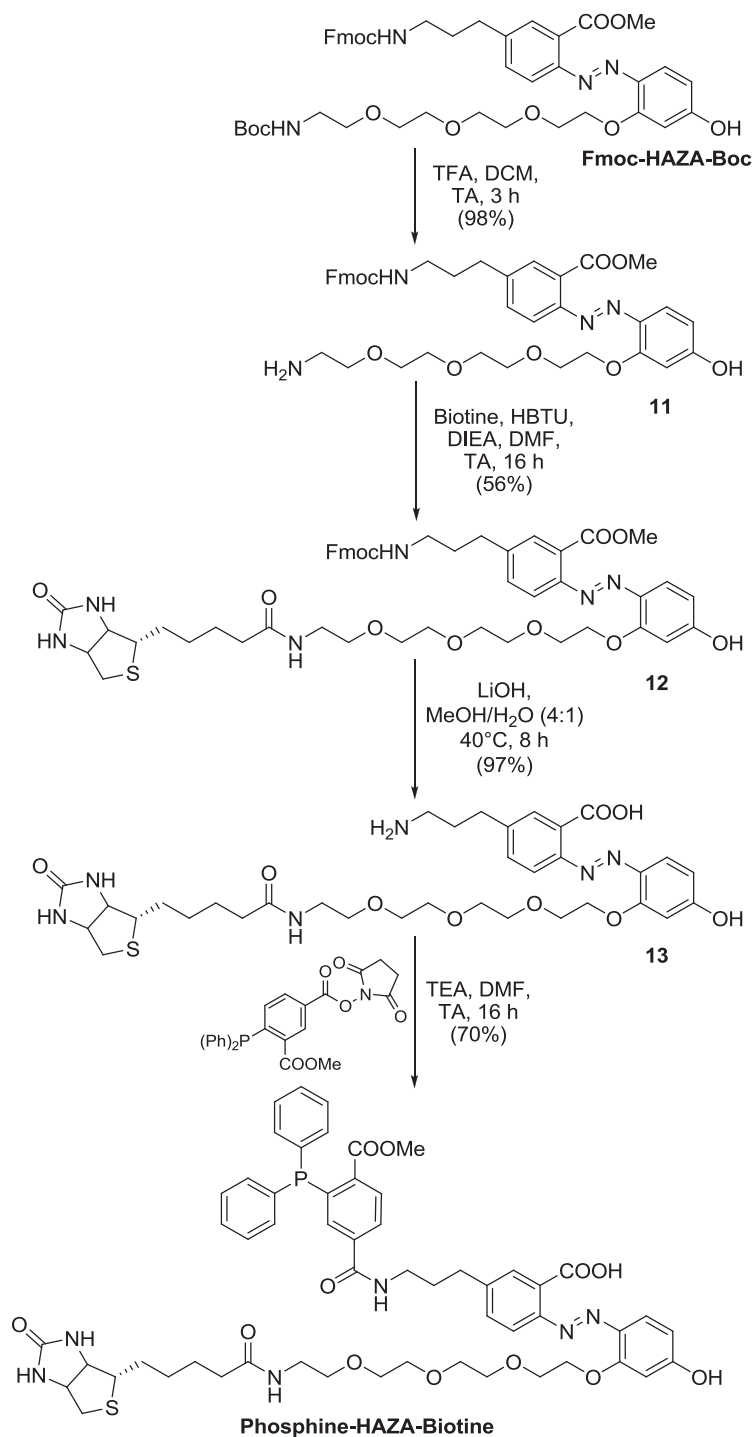


Figure 10 : Voie de synthèse du composé Phosphine-HAZA-Biotine.

II.5.2. Utilisation de la **Phosphine-HAZA-Biotine** pour la fonctionnalisation chimique et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃

Pour enrichir des néo-protéines-N₃ à partir d'un milieu biologique, deux étapes sont nécessaires : la fonctionnalisation chimique de protéines modifiées par des azotures et une élution par le dithionite des protéines immobilisées sur un support d'affinité. Avant d'étudier l'aspect dénaturant ou non de ces deux étapes, nous avons vérifié si le groupement HAZA :

- ne perturbait pas la réaction de ligation de Staudinger entre des néo-glycoprotéines-N₃ et la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine**.
- permettait l'élution de glycoprotéines immobilisées sur un support d'affinité *via* un clivage au dithionite.

II.5.2.1. Fonctionnalisation de néo-glycoprotéines-N₃ par ligation de Staudinger

Dans cette expérience, la fonctionnalisation de néo-glycoprotéines-N₃ a été évaluée vis-à-vis de conditions optimisées et utilisées en routine par Sanofi-Aventis, avec un composé **Phosphine-Biotine** non-clivable (Figure 11). Cette même molécule sera utilisée comme contrôle pour évaluer l'influence du groupement HAZA sur la ligation de Staudinger.

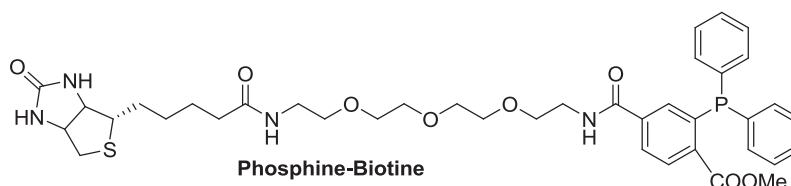


Figure 11 : Structure du composé Phosphine-biotine utilisé comme molécule-contrôle non-clivable.

Pour fonctionnaliser des protéines par ligation de Staudinger, ces dernières doivent posséder des groupements azido dans leurs structures. Des cellules HCT-116 ont été traitées par un dérivé de mannose azidé (AC₄ManNaz) (25 μM, 2j) afin de réaliser un marquage métabolique de leurs néo-glycoprotéines de surface sialylées.⁵⁶ Puis les cellules ont été incubées en présence des composés **Phosphine-HAZA-Biotine** et **Phosphine-Biotine** (50 μM, 3h).

Après lavage, les cellules ont été lysées, puis les lysats obtenus analysés par gels SDS-PAGE. Une coloration au rouge de Ponceau a permis de colorer l'ensemble des protéines tandis qu'une analyse par Western-Blot avec un anticorps Streptavidine-HRP a uniquement révélé les protéines biotinyllées par les sondes. Pour mesurer la spécificité du marquage, le même protocole a été réalisé à partir de cellules non-traitées par AC₄ManNaz (Figure 12).

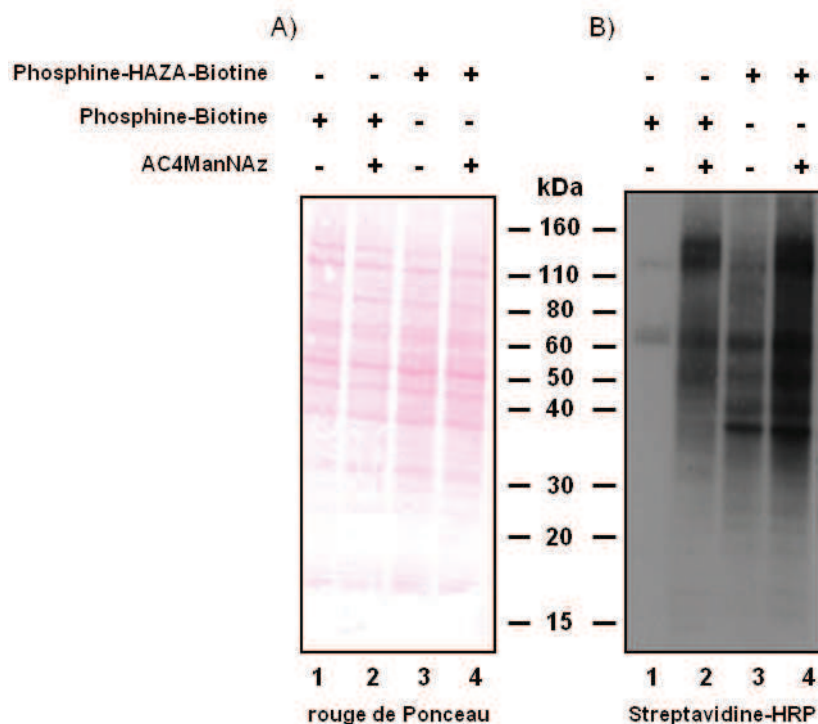


Figure 12 : Evaluation de la fonctionnalisation de glycoprotéines, modifiées par des azotures, en cellules HCT-116 (incubées ou non avec AC₄ManNAz), par réaction de Staudinger, avec les composés Phosphine-HAZA-Biotine et Phosphine-Biotine (50 μ M, 3h, 37°C). Après la lyse des cellules, analyse des lysats correspondants par gel SDS-PAGE (\approx 5 μ g de protéines/piste) ; A) Révélation au rouge de Ponceau, B) Révélation avec un anticorps Streptavidine-HRP.

L'analyse des lysats associés au composé **Phosphine-Biotine** a démontré une fonctionnalisation spécifique de différentes protéines à 50 kDa et entre 110 et 160 kDa (Figure 12, pistes 2A et 2B). Dans l'expérience contrôle réalisée sans azoture, la protéine de 70 kDa, révélée par l'anticorps Streptavidine-HRP, est une protéine endogène biotinylée (Figure 12, piste 1B). En l'absence d'azoture, la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine** a montré un marquage non-spécifique plus important que le composé non-clivable (Figure 12, pistes 3B). En revanche, la comparaison des pistes 2B et 4B a révélé une fonctionnalisation plus efficace avec la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine** (Figure 12).

Avec le protocole utilisé, il ressort que le groupement HAZA ne perturbe pas la ligation de Staudinger. Pour diminuer la fonctionnalisation non-spécifique observée avec la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine**, il pourrait être envisagé de diminuer les concentrations utilisées. Avant toute optimisation, nous avons conservé le protocole utilisé et directement étudié l'enrichissement des néo-glycoprotéines fonctionnalisées par **Phosphine-HAZA-Biotine**.

II.5.2.2. Enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃ par élution au dithionite de sodium

Des lysats cellulaires de glycoprotéines conjuguées au composé **Phosphine-HAZA-Biotine** ont été préparés, puis incubés en présence de billes de streptavidine-agarose (2h). Les protéines n'étant pas fixées au support solide ont alors été retirées du milieu par centrifugation et conservées en vue d'une analyse ultérieure (Figure 13, pistes 2). Après deux lavages, une partie des billes a été éluée en conditions dénaturantes (100°C, SDS) (Figure 13, pistes 3), tandis qu'une autre a été incubée en présence d'une solution fraîchement préparée de dithionite de sodium (5 mM, 30 min) pour permettre le clivage du groupement HAZA (Figure 13, pistes 4). Après l'élution, les billes obtenues ont également été traitées en conditions dénaturantes pour libérer les protéines non-éluées par le dithionite (Figure 13, pistes 5). L'ensemble des fractions collectées ont alors été analysées par gel SDS-PAGE. Les gels obtenus ont été révélés par Western-Blot avec un anticorps Streptavidine-HRP pour révéler les protéines biotinylées et par une coloration au nitrate d'argent pour révéler l'ensemble des protéines.

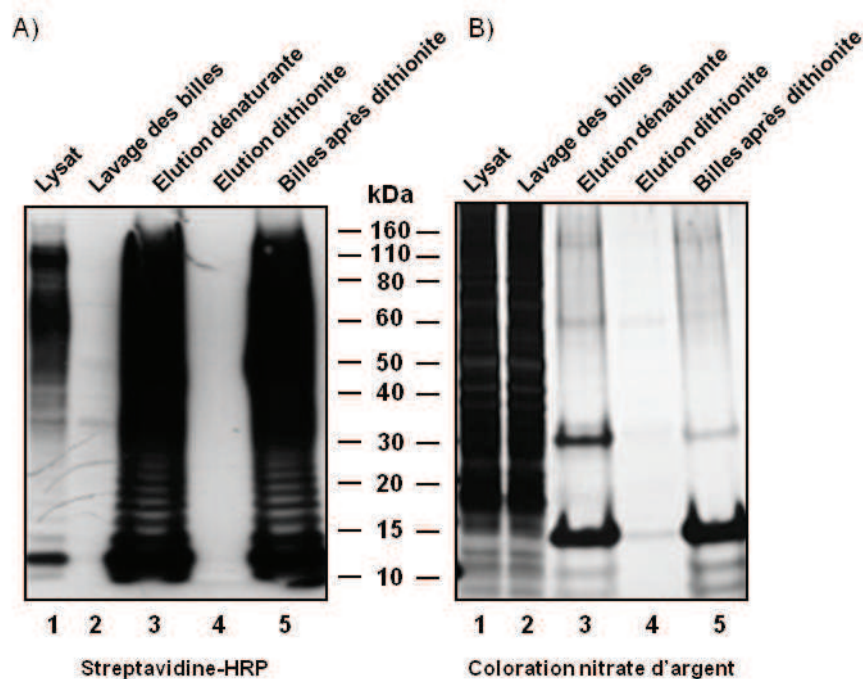


Figure 13 : Evaluation du clivage de Phosphine-HAZA-Biotine par du dithionite de sodium après capture de glycoprotéines modifiées par des azotures et enrichissement sur billes d'agarose. Après la lyse des cellules, capture sur billes de streptavidine-agarose (2h) puis élution au dithionite (5 mM, 30 min) et analyse par gel SDS-PAGE ($\approx 5\text{-}20 \mu\text{g}$ de protéines/piste) ; A) Révélation avec un anticorps Streptavidine-HRP, B) Coloration au nitrate d'argent.

L'analyse des eaux de lavage, puis une coloration au nitrate d'argent, a montré un nombre important de protéines non-immobilisées sur le support d'affinité (Figure 13, piste 2B).

L'anticorps Streptavidine-HRP a également révélé l'absence de protéines biotinylées dans ces mêmes eaux (Figure 13, piste 2A). Cela indique que toutes les glycoprotéines fonctionnalisées par **Phosphine-HAZA-Biotine** ont été immobilisées sur le support.

L'élution en conditions non-dénaturantes des protéines immobilisées sur le support d'affinité a confirmé la présence d'un nombre important de protéines fonctionnalisées par de la biotine (Figure 13, pistes 3). En revanche, l'analyse de l'élution au dithionite avec une coloration au nitrate d'argent a révélé l'absence de protéines (Figure 13, piste 3B). Après l'élution au dithionite, la quantité de protéines restées sur les billes est identique à celle observée avant traitement (Figure 13, comparaison pistes 3 et 4).

Cette absence d'élution par le dithionite démontre une absence de clivage du motif HAZA dans les conditions utilisées (dithionite 5 mM, 30 min) et mises au point pour l'étude de la gyrase (section II.5.2.1). Pourtant, la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine** seule a démontré, en solution, un clivage instantané en présence de 5 mM de dithionite. Pour tenter d'expliquer l'absence de clivage observé, trois hypothèses peuvent être formulées :

- 1) la concentration en dithionite n'est pas suffisante.
- 2) le support d'affinité perturbe le clivage.
- 3) les glycoprotéines perturbent le clivage.

Pour confirmer ou infirmer les hypothèses 1 et 2, le clivage de la sonde après fonctionnalisation des néo-glycoprotéines-N₃ a été étudié directement en lysat et avec de fortes concentrations en dithionite.

Des lysats cellulaires de néo-glycoprotéines-N₃ fonctionnalisées par **Phosphine-HAZA-Biotine** ont été préparés, puis incubés en présence de différentes concentrations de dithionite (0, 5, 20, 200 mM) pendant 30 minutes. Chaque lysat, associé à une concentration, a ensuite été analysé par gels SDS-PAGE. Ces gels ont été révélés soit par Western-Blot avec un anticorps Streptavidine-HRP soit par une coloration au rouge de Ponceau (Figure 14).

La coloration au rouge de Ponceau a permis de révéler une quantité équivalente de protéines quelle que soit la concentration de dithionite utilisées (Figure 14A, pistes 1-8). Le dithionite ne semble donc pas avoir d'influence sur le sous-protéome étudié. Toutes les néo-protéines marquées par le composé **Phosphine-HAZA-Biotine** sont restées biotinylées après traitement chimique même en présence d'importantes concentrations de dithionite (Figure

14B, pistes 2, 4, 6 et 8). Ceci a de nouveau confirmé une absence de clivage de la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine** après fonctionnalisation avec les glycoprotéines.

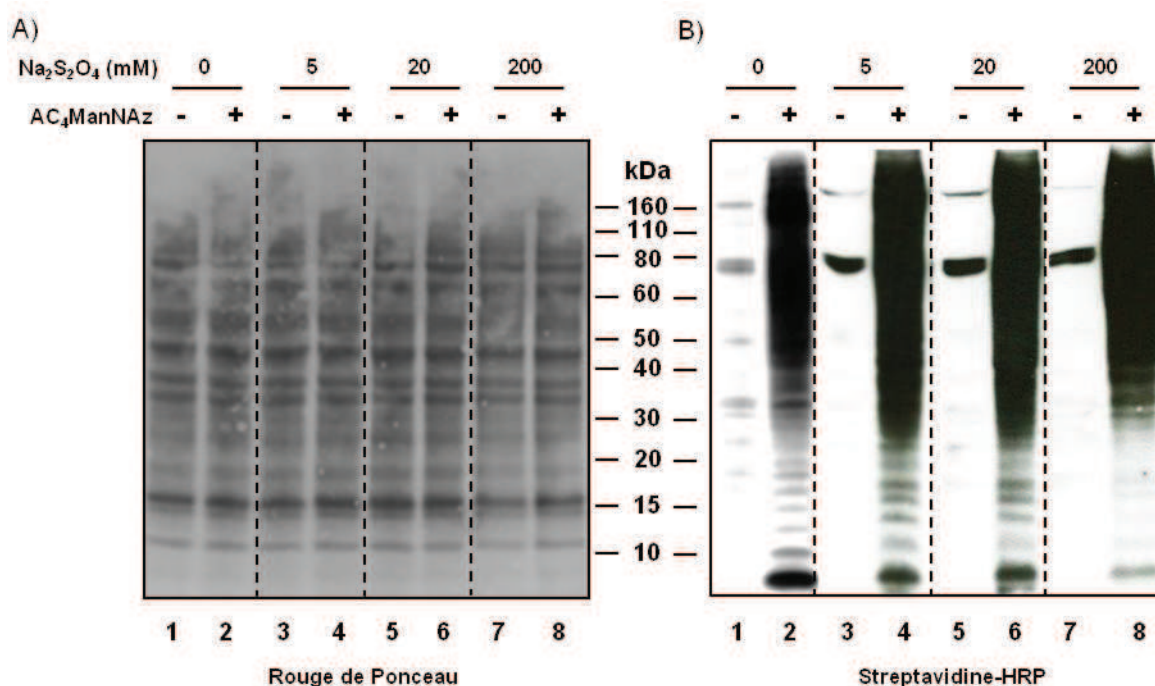


Figure 14 : Evaluation du clivage en lysat cellulaire, de Phosphine-HAZA-Biotine par du dithionite de sodium après capture de glycoprotéines modifiées par des azotures. Après la lyse des cellules marquées, incubation des lysats obtenus avec du dithionite (concentration variable, 30 min) puis analyse par gel SDS-PAGE ($\approx 5\mu\text{g}$ de protéines/piste) ; A) Révélation au rouge de ponceau, B) Révélation avec un anticorps Streptavidine-HRP.

Les néo-glycoprotéines étudiées semblent jouer un rôle prépondérant sur le clivage du motif HAZA par le dithionite. Le manque d'accessibilité du lien clivable après fonctionnalisation peut être incriminé. Pour valider cette hypothèse, nous avons envisagé la synthèse d'une seconde génération de phosphine clivable présentant une distance moléculaire plus importante entre la phosphine et le lien clivable HAZA.

II.5.3. Synthèse d'une sonde **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine**

L'utilisation d'un espaceur hexaéthylène glycol a été envisagée entre la phosphine et le lien clivable HAZA. La voie de synthèse proposée pour le composé **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine** est similaire à celle réalisée précédemment. La dérivatisation du composé **Fmoc-HAZA-Boc** a consisté en trois séquences de déprotection/couplage pour introduire la biotine, l'espaceur hexaéthylène glycol puis la phosphine (Figure 15).

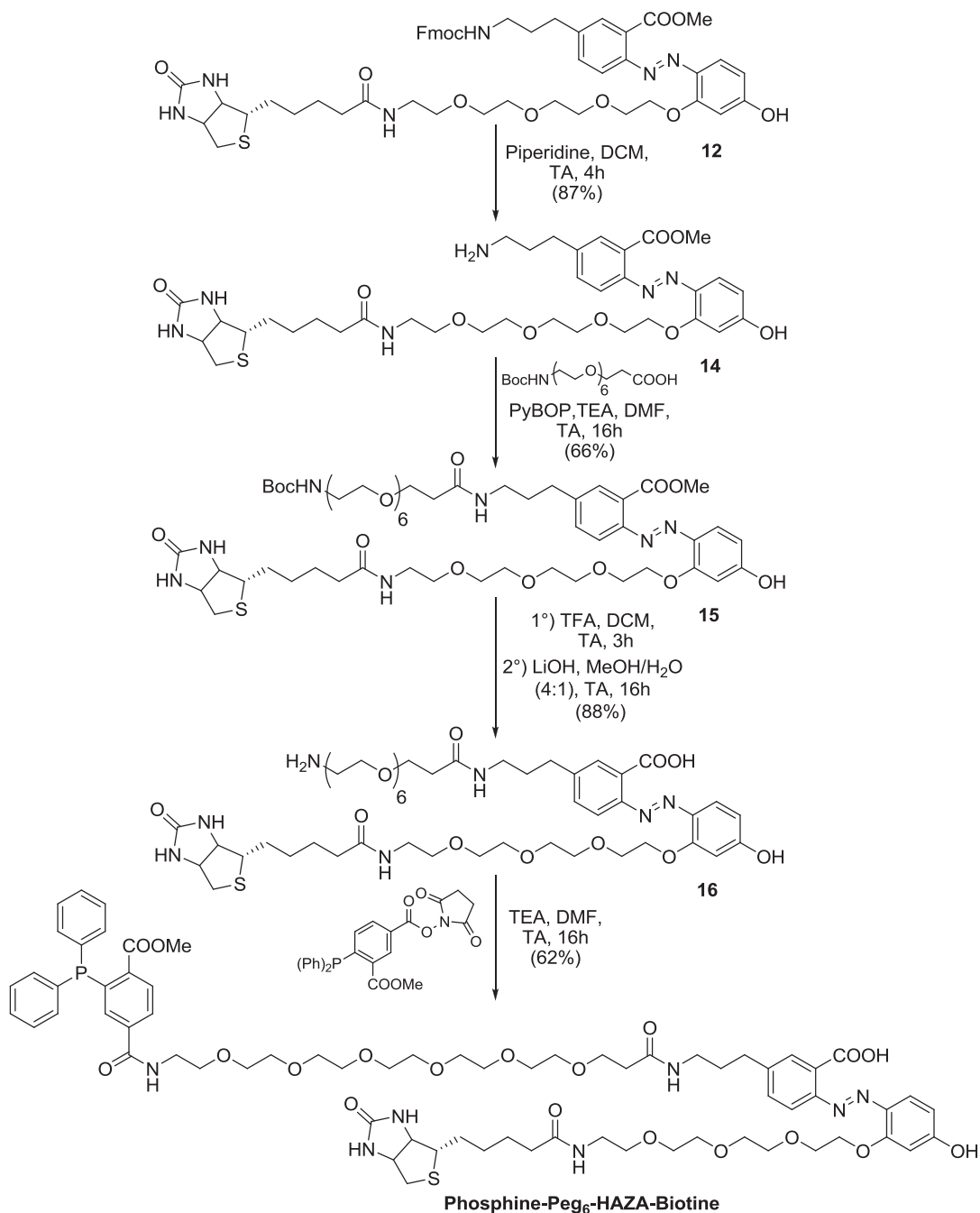


Figure 15 : Voie de synthèse du composé Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine.

Le composé **12** a été traité par de la pipéridine dans du dichlorométhane afin d'éliminer le groupement Fmoc avec 87% de rendement. Le produit obtenu a alors été couplé avec l'acide 21-(Boc-amino)-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoïque en présence de PyBOP comme agent de couplage. Une double déprotection de **15** a été réalisée par une première réaction en milieu acide avec du TFA et une seconde en milieu basique avec de l'hydroxyde de lithium. Le composé **16** a ainsi été obtenu avec 88% de rendement. Le couplage entre **16** et une phosphine-NHS, puis une purification par HPLC préparative en conditions basiques

(NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5), a conduit à l'obtention du produit **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine** en 5 étapes et avec 31% de rendement global.

II.5.4. Perspectives

Comme pour la sonde **Phosphine-HAZA-Biotine**, le composé **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine** va être évalué pour la fonctionnalisation et l'enrichissement de néo-glycoprotéines-N₃. En présentant une distance moléculaire importante entre la phosphine réactive et le groupement clivable HAZA, cette sonde devrait permettre de confirmer si la non-réactivité du motif clivable observée est due aux glycoprotéines. Ces expériences sont actuellement en cours dans le centre de recherche de Sanofi-Aventis de Toulouse. Parallèlement, la première sonde **Phosphine-HAZA-Biotine** et le composé **Alcyne-HAZA-Biotine** précédemment développés vont être étudiés pour la fonctionnalisation et l'élution de néo-protéines intracellulaires modifiées par des groupements azido.

II.6. Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au clivage d'un groupement azobenzène pour le développement de sondes d'enrichissement clivables en conditions non-dénaturantes, dans le domaine de la protéomique chimique.

Basées sur un motif azobenzène sensible au dithionite de sodium, les premières sondes décrites dans la littérature³⁵ ont présenté des cinétiques de clivages lentes dans les conditions non-dénaturantes recherchées (< 10 mM de dithionite de sodium). Une étude entre la structure des azobenzènes et leurs réactivités au dithionite a donc été réalisée. Ce travail a permis l'optimisation structurale d'un groupement Azo et l'obtention d'un composé HAZA extrêmement sensible au dithionite de sodium. Cette structure a notamment démontré un clivage total en 10 secondes avec une concentration de dithionite de seulement 1 mM.

Afin d'évaluer si les conditions de clivage du groupement HAZA étaient suffisamment douces pour être non-dénaturantes, une sonde d'enrichissement clivable **Novo-HAZA-Biotine** a été conçue, synthétisée et évaluée pour l'analyse de complexes A2B2 de gyrase. Les conditions d'élution ont tout d'abord été mises au point à partir d'un lysat cellulaire enrichi en gyrase B recombinante. Dans un second temps, cette sonde a permis d'enrichir un complexe

protéique gyrA/gyrB endogène à partir d'un lysat naturel. Un test d'activité enzymatique de relaxation de l'ADN, effectué sur le complexe A2B2 de gyrase purifié, a démontré le caractère non-dénaturant de notre méthode.

Pour généraliser nos outils non-dénaturants à une autre étude de protéomique chimique, une nouvelle génération de sonde d'enrichissement HAZA a été conçue pour enrichir en conditions natives des néo-glycoprotéines-N₃. L'utilisation de réactions de Staudinger a permis la fonctionnalisation de néo-glycoprotéines-N₃ par une sonde de type **Phosphine-HAZA-Biotine**. Néanmoins, les premiers essais d'enrichissement réalisés sur support solide n'ont pas abouti à l'élution des protéines capturées, faute de clivage du motif HAZA par le dithionite. Des études complémentaires sont actuellement en cours pour comprendre ce phénomène. Il est également envisagé d'étendre la technique de fonctionnalisation par réaction de Staudinger à des néo-protéines intracellulaires modifiées métaboliquement par des groupements azotures.

Cette étude a démontré la possibilité d'optimiser la structure d'un groupement chimique afin d'en augmenter sa réactivité vis-à-vis d'un agent chimique utilisé en conditions biocompatibles. Dans le cas où une modification structurale n'est pas possible, il pourrait également être envisagé d'optimiser le choix du réactif. Par exemple, dans son utilisation, le dithionite de sodium a révélé certaines limitations. En-deçà de 1 mM, l'oxygène contenu dans les milieux aqueux a engendré une dégradation du réducteur (voir section III.6.2.2.). Des concentrations inférieures à 1 mM n'ont donc pas pu être utilisées. De plus, aucune étude n'a réellement mesuré l'influence du dithionite sur les ponts disulfures. La bioorthogonalité de cet agent reste donc à démontrer.

Dans le domaine de la protéomique chimique, la conception d'outils bioorthogonaux est un véritable défi pour manipuler et étudier des protéines dans leurs environnements natifs. Les sondes développées dans ce chapitre ouvrent d'intéressantes perspectives, notamment pour l'étude des interactions multi-protéiques associées à des contextes physiopathologiques. L'enrichissement en conditions dénaturantes pourrait également permettre l'identification de cibles secondaires dans le domaine biomédical.

En chimie-biologie, l'utilisation de conditions dites biocompatibles dépend finalement de l'environnement biologique utilisé. Après avoir étudié la réduction de motifs Azo en lysat cellulaire pour des applications en protéomique chimique, nous nous sommes intéressés à la

réduction de ces mêmes structures en cellules vivantes, avec le développement de quencheurs chimiquement désactivables pour l'imagerie de fluorescence.

III. Mise au point de quencheurs chimiquement désactivables pour l'imagerie de fluorescence

Dans la seconde partie, le clivage de groupements chimiques en présence de deux types de stimuli, biologique (bio-stimulus) et chimique, a été étudié en cellules vivantes. Les travaux présentés dans ce troisième chapitre sont principalement dédiés à l'imagerie de fluorescence avec le développement de quencheurs de type Azo, chimiquement désactivables par le dithionite.

L'imagerie moléculaire est une méthode non-invasive pour visualiser, *in-vivo*, le fonctionnement cellulaire.⁵⁷ Pour cela, deux grandes techniques d'imagerie sont utilisées : la tomographie par émission de positrons (PET) avec des éléments radioactifs^{58,59} et l'imagerie optique avec l'utilisation de fluorophores.⁶⁰ L'imagerie par fluorescence est aujourd'hui incontournable pour l'étude de phénomènes biologiques jusqu'à l'échelle du petit animal. Comparés à l'utilisation d'éléments radioactifs, les fluorophores permettent un marquage spécifique par adressage, une fois ce fluorophore couplé à un ligand. A travers l'utilisation de sondes fluorescentes dites "activables" ou pro-fluorescentes, l'imagerie optique présente la caractéristique unique d'être commutable.⁶¹ En effet, dans son état initial, une sonde activable ne présente pas ou très peu de fluorescence. En revanche, lorsqu'elle est soumise à un stimulus, sa fluorescence est alors fortement activée permettant ainsi de révéler sa présence. Cette génération de sondes a notamment permis le marquage *in-vivo* de tumeurs pour des applications pré-cliniques.⁶² Trois types de sondes pro-fluorescentes se distinguent :

- les pro-fluorophores dont la fluorescence dépend d'environnements spécifiques comme le pH ou la présence de métaux.^{63,64}
- les pro-fluorophores dont la fluorescence est activée par une réaction chimique qui induit une modification structurale.⁶⁵⁻⁶⁹ Cette réaction peut être le clivage d'un groupement fonctionnel ou une cyclisation intramoléculaire.
- les systèmes basés sur un transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) dont la fluorescence est activée après le clivage d'un espaceur qui lie de façon covalente un donneur et un accepteur de fluorescence.⁷⁰⁻⁷²

Quel que soit le système utilisé, ces sondes activables permettent la détection *in-vivo* de nombreux bio-stimuli.⁶⁰ Cependant, certaines limitations peuvent restreindre leurs utilisations en imagerie de fluorescence. Par exemple, lorsque le signal observé est trop faible, il est difficile de savoir si cela est dû à une mauvaise internalisation ou localisation cellulaire de la sonde, ou alors à une absence de bio-stimulus. De plus, l'impossibilité d'évaluer facilement la concentration intracellulaire de sonde empêche la quantification du stimulus étudié. Afin de

lever ces restrictions, nous avons développé une stratégie consistant à révéler la totalité de la sonde présente dans le milieu intracellulaire par une seconde voie d'activation chimique. Pour cela, nous avons envisagé le développement d'un nouveau type de sondes FRET activables à la fois par un stimulus biologique et un stimulus chimique. Une première voie d'activation doit consister au clivage d'une liaison bio-sensible pour désactiver l'extinction d'un donneur de fluorescence par un accepteur. Quant à la seconde voie, elle doit consister en la désactivation chimique par le dithionite d'un quencheur de type Azo, utilisé comme accepteur de fluorescence.

Après avoir introduit le principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) et son utilisation pour la mise au point de sondes pro-fluorescentes de type FRET, le concept de quencheurs chimiquement désactivables sera présenté. Les résultats d'une première étude permettront de valider ce concept. Puis, une sonde pro-fluorescente de type FRET activable à la fois par des enzymes de la famille des caspases, comme la caspase-3, et du dithionite de sodium sera mise au point. Les résultats de ces travaux seront présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal "*Chemical Communications*".⁷³ Cette partie sera conclue par des travaux préliminaires effectués pour optimiser le système de quencheur chimiquement désactivable.

Pour cette étude, la culture cellulaire a été réalisée par deux laboratoires différents :

- La plateforme de transfection cellulaire : Amélie Weiss (études préliminaires).
- Le Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie : Zeinab Darwich et le Dr. Andrey Klymchenko.

III.1. Principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET)

Le mécanisme de FRET est un processus physique qui consiste en un transfert d'énergie non-radiatif entre deux chromophores, un donneur (**D**) et un accepteur (**A**) (Figure 16). Ce transfert est uniquement possible dans un environnement proche, soit une distance intermoléculaire inférieure à 10 nm. Son efficacité est proportionnelle à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux molécules (Figure 16A).⁷⁴ Sous l'effet d'une source extérieure, comme la lumière, le donneur passe de l'état fondamental à un état électronique excité. Son retour à son niveau basal peut soit se faire par une émission (chaleur ou lumière),

soit par un procédé de transfert non-radiatif dans le cas où un accepteur est dans son environnement proche. Pour que ce transfert soit possible, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure 16B).

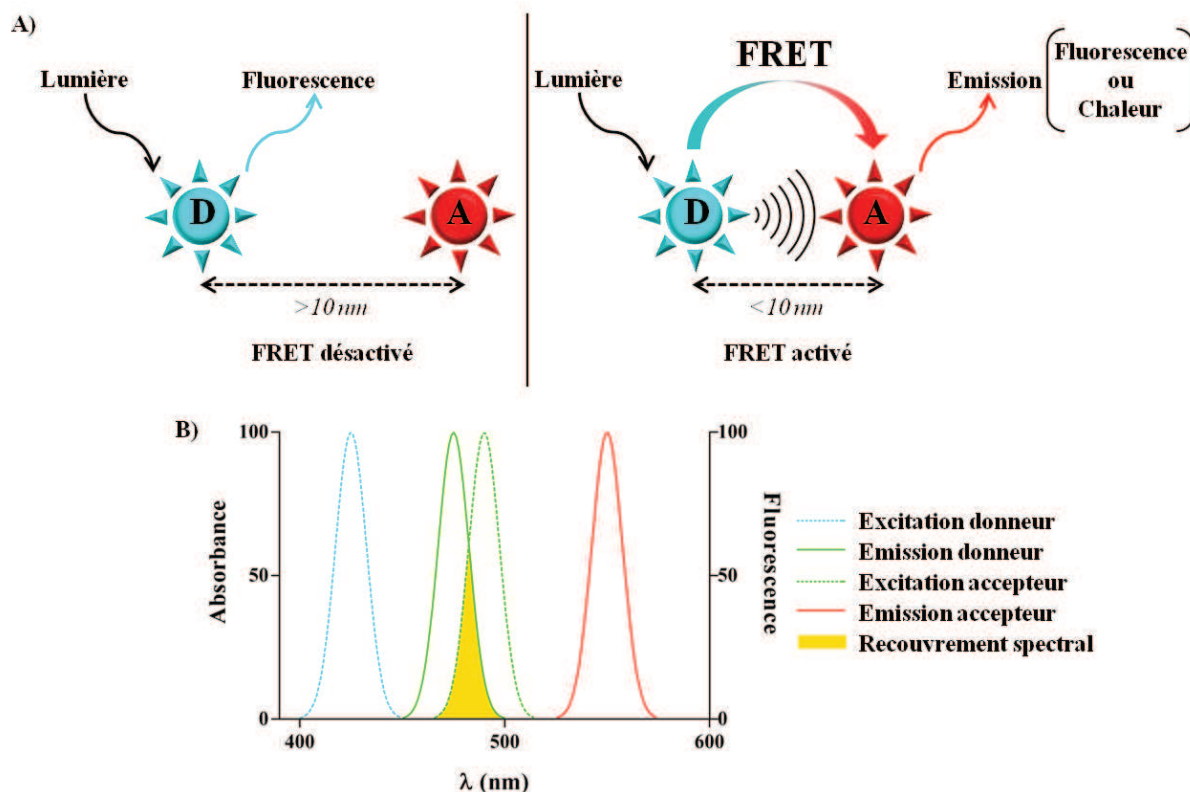


Figure 16 : A) Représentation schématique du mécanisme de FRET entre un donneur (D) et un accepteur (A); B) Représentation schématique du recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur.

Dans le cas où l'accepteur est un fluorophore, l'énergie transmise par FRET permet une émission en fluorescence à la longueur d'onde d'émission de ce fluorophore. Si l'accepteur est simplement un chromophore, alors cette molécule retourne à son état fondamental par une émission de chaleur. Aucune fluorescence n'est produite, cet accepteur est alors appelé quencheur. C'est ce principe de désactivation de fluorescence par un quencheur spectral qui est utilisé dans la conception de sondes pro-fluorescentes de type FRET.

III.2. Les sondes pro-fluorescentes de type "Förster Resonance Energy Transfer"

Les sondes pro-fluorescentes de type FRET sont composées d'un fluorophore lié de manière covalente à un quencheur, *via* l'intermédiaire d'une liaison clivable par un stimulus biologique (enzyme, métabolite, ...). L'activation de la sonde est ainsi induite sous l'action

d'un bio-stimulus qui conduit à la rupture de la liaison "bio-sensible" et permet ainsi la séparation du couple fluorophore/quencheur et l'apparition de fluorescence (Figure 17).

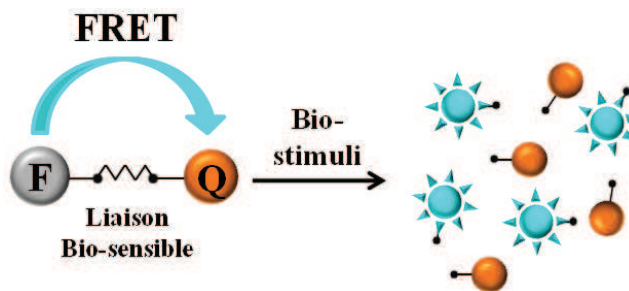


Figure 17 : Principe général des sondes fluorescentes activables de type FRET.

Pour qu'une sonde fluorescente soit jugée performante pour l'imagerie biologique, il est souhaitable qu'elle soit excitable à haute longueur d'onde, brillante, photostable et non-toxique.⁶⁰ La plupart de ces paramètres dépendent uniquement du fluorophore. Avec les sondes pro-fluorescentes de type FRET, il n'existe pas de restrictions sur le choix du fluorophore car des quencheurs existent pour l'ensemble de la gamme spectrale (400-800 nm) (Tableau 4).^{75,76}

Fluorophore	λ em.	Quencheur															
		Dabcyl	BHQ-1	BHQ-2	BHQ-3	Cy5Q	Cy7Q	Iowa Black F	Iowa Black R	IRDye QC-1	QSY35	QSY7	QSY21	QXL520	QXL570	QXL610	QXL680
Coumarine	472																
Alexa Fluor 488-X	517																
Oregon Green 448-X	518																
Fluorescéine	520																
Rhodamine Green-X	531																
Alexa Fluor 532	553																
Cy3	564																
BODIPY 558/568	568																
Alexa Fluor 546	571																
TAMRA	583																
ROX	608																
Alexa Fluor 594	616																
Texas Red-X	617																
BODIPY 630/650-X	653																
Cy5	668																
Alexa Fluor 647	670																
IRDYE680	702																
IRDYE700DX	700																
Cy5.5	706																
Alexa Fluor 750	775																
IRDye800CW	789																
IRDye800	809																

Tableau 4 : Liste de fluorophores et de quencheurs compatibles (case grisée = compatible). Source : IRDye QC-1 Dark Quencher - The Next Step in Near Infrared Fluorescence - LI-COR Biosciences -Application notes 2011.

De part leurs structures et la gamme de réactivité des liaisons bio-sensibles, les sondes pro-fluorescentes de type FRET peuvent être associées à la détection de nombreux stimuli. Pour la mesure d'activité enzymatique, comme celle des protéases, le motif clivable est souvent une séquence de plusieurs acides aminés.^{61,77-82} Dans le cas d'hydrolases de type phospholipase, un groupement phospholipide peut être clivé.^{83,84} Associés à des structures comme des ponts disulfures⁸⁵⁻⁸⁷ ou des sulfures vinyliques,⁸⁸ ces systèmes ont également permis la détection de thiols libres *in-vivo*.⁸⁹ Cette approche a également été utilisée pour la conception de sondes acide-sensibles avec des groupements acido-labiles comme un orthoester⁹⁰ ou une acylhydrazone.⁹¹

III.3. Principe d'un quencheur chimiquement désactivable

Pour "révéler la présence de sondes fluorescentes non-activées", un nouveau type de sondes FRET activables par deux modes d'action orthogonaux a été développé. Une première voie d'activation consiste au clivage d'une liaison bio-sensible pour désactiver l'extinction d'un fluorophore par un quencheur (Figure 18A). Quant à la seconde voie, elle consiste en la désactivation chimique d'un quencheur utilisé comme accepteur de fluorescence (Figure 18B). Dans ce système, le réactif chimique utilisé doit être orthogonal au bio-stimulus, ne pas interagir avec le fluorophore et ne pas interférer avec le milieu vivant.

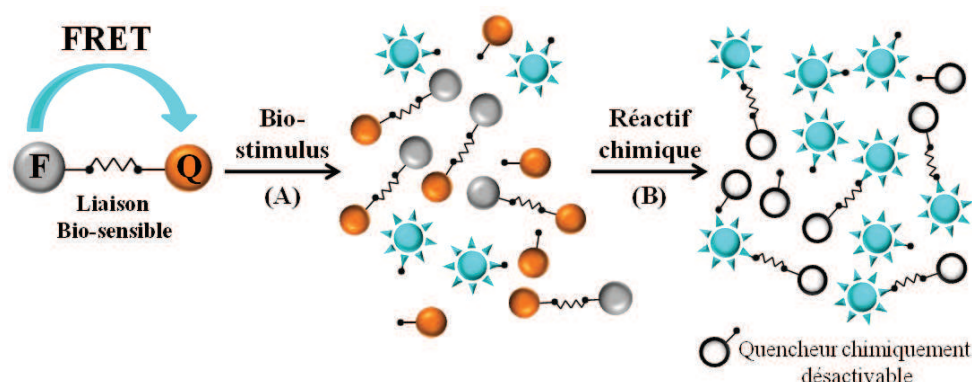


Figure 18 : Principe d'une sonde FRET activable par un stimulus biologique et un stimulus chimique. A) Le clivage de la liaison bio-sensible par un bio-stimulus, permet de détecter une activité biologique en mesurant une apparition de fluorescence. B) L'utilisation d'un quencheur chimiquement désactivable permet alors de révéler la présence de sonde non-activée à l'aide d'un traitement chimique.

Comme cela a été vu précédemment, il existe dans la littérature de nombreux quencheurs (Tableau 4). Une grande majorité correspond à des analogues de fluorophores non-fluorescents comme par exemple des motifs biaryl-rhodamine pour les dérivés QSY.⁹² Historiquement, la première structure non-fluorescente utilisée comme accepteur était de type Azo avec l'acide 4-(diméthylamino)-azobenzène-4'-carboxylique (Dabcyl) (Figure 19). Ce quencheur a été particulièrement utilisé pour la détection d'acides nucléiques.⁹³⁻⁹⁶ Cependant, son maximum d'absorption, situé à 474 nm, limite l'utilisation de cet accepteur à des fluorophores émettant à basses longueurs d'ondes. Ce problème a été récemment contourné avec le développement de nouveaux chromophores Azo, comme le BHQ-3, capables d'absorber jusqu'à 700 nm (Tableau 4).^{97,98}

Dans le cadre de notre étude basée sur la désactivation chimique d'un quencheur, les dérivés Azo présentent donc un double intérêt car ce sont d'une part de bon accepteur de fluorescence, mais surtout des structures sensibles aux agents réducteurs comme le dithionite de sodium. Ainsi, une fois lié à un fluorophore, la réduction du quencheur Azo doit permettre la désactivation de ses propriétés d'extinction et ainsi une libération de fluorescence. D'après de nombreuses études réalisées sur cellules vivantes, le dithionite est non seulement connu pour être un agent chimique biocompatible, mais également pour son manque de stabilité à pH physiologique et sa mauvaise perméabilité membranaire.⁹⁹⁻¹⁰² Comme lors de notre étude précédente, il nous a donc semblé essentiel d'utiliser une structure Azo très réactive vis-à-vis du dithionite pour envisager sa réduction en cellules vivantes.

III.4. Validation du concept de quencheurs chimiquement désactivables

Lors du développement de sondes d'enrichissement clivables pour la protéomique chimique, la relation entre la structure d'un Azo et sa réactivité vis-à-vis du dithionite a été établie.⁶ Les résultats ont démontré que, pour être clivée rapidement, une molécule Azo doit avoir un effet "push-pull", c'est-à-dire qu'elle doit comporter deux parties électroniquement conjuguées : l'une fortement donneuse et l'autre fortement attractrice d'électrons. Pour la partie donneuse d'électrons, un noyau aromatique de type *O*-alkyl résorcinol a démontré les meilleurs résultats. Le quencheur Dabcyl est également un Azo basé sur une structure "push-pull" (Figure 19). En revanche, son noyau aromatique électro-donneur est de type dialkyl aniline. Or l'étude précédente a révélée que ce type de groupement ne favorisait pas la

réduction d'une structure Azo par le dithionite (voir section II.4.). Pour développer un quencheur très réactif vis-à-vis du dithionite, nous avons donc envisagé la synthèse d'un Azo **17**, analogue du Dabcyl et incorporant un noyau aromatique de type *O*-alkyl résorcinol (Figure 19).

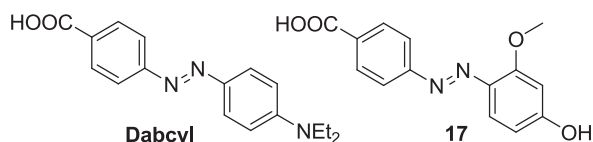


Figure 19 : Structures du Dabcyl et du composé **17**.

III.4.1. Développement d'un quencheur chimiquement désactivable

Le composé **17** a été synthétisé, son profil d'absorption caractérisé et sa réactivité au dithionite mesurée, en vue de son utilisation comme quencheur désactivable dans une sonde fluorescente de type FRET. La molécule de **Dabcyl** a également été caractérisée dans les mêmes conditions afin d'étudier l'influence de la modification structurale apportée.

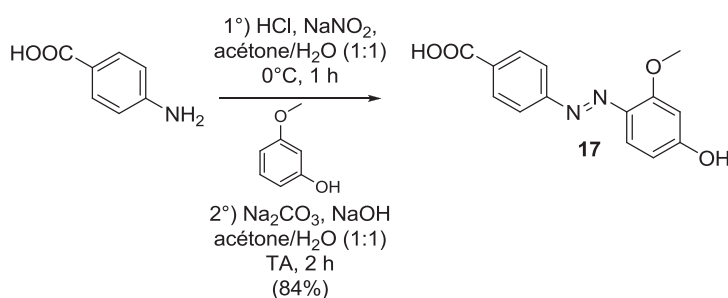


Figure 20 : Voie de synthèse du composé **17**.

Le composé **17** a été obtenu avec un rendement de 84% lors d'une réaction de couplage diazoïque entre l'acide 4-aminobenzoïque et le 3-méthoxyphénol (Figure 20).

Les spectres d'absorption du **Dabcyl** et de la molécule **17** ont ensuite été enregistrés à 50 μ M dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) (Figure 21A). Puis la réduction des deux composés par une solution de 1 mM de dithionite de sodium a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible à 438 nm pour **17** et 460 nm pour le **Dabcyl** (Figure 21B).

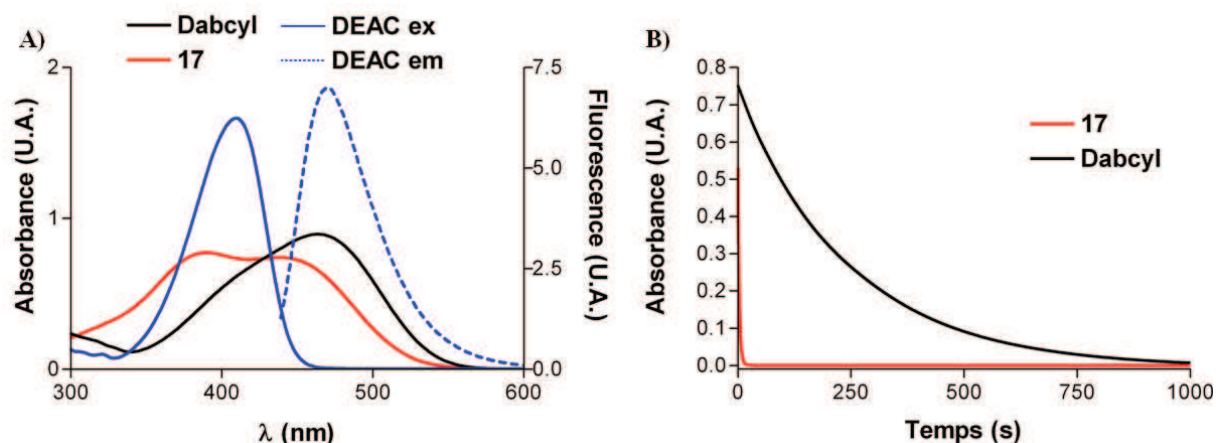


Figure 21 : A) Spectres d'absorption des composés **17** et **Dabcyl** à 50 μM ; Spectres d'absorption et d'émission du **DEAC** à 2 μM ; B) Cinétique de réduction des composés **17** (à 438 nm) et **Dabcyl** (à 460 nm) en présence de 1 mM de dithionite de sodium. Tous les spectres et cinétiques sont enregistrés dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4).

Les spectres d'absorption des composés **17** et **Dabcyl** ont démontré un bon recouvrement spectral entre 400 et 460 nm (Figure 21A). Alors que la réduction totale de l'Azo **17** a été achevée en moins de 10 secondes, celle du **Dabcyl** a nécessité près de 13 minutes. Le composé **17** a donc présenté des caractéristiques spectrales similaires au **Dabcyl** et une meilleure réactivité chimique vis-à-vis du dithionite. Son utilisation comme quencheur chimiquement désactivable a donc été envisagée dans une sonde fluorescente de type FRET.

III.4.2. Synthèse d'une sonde fluorescente de type FRET incorporant un quencheur chimiquement désactivable

Aux vues du profil d'absorption de l'Azo **17**, un fluorophore de type acide 7-diethylaminocoumarine-3-carboxylique (**DEAC**) a été sélectionné pour permettre un bon recouvrement spectral entre les deux composés et donc une bonne extinction de la fluorescence (Figure 21A). Excité à 409 nm, ce fluorophore réémet une fluorescence dans le bleu à 470 nm. Par analogie avec le **Dabcyl**, la dérivation du quencheur **17** a été envisagée par couplage peptidique au niveau de l'acide benzoïque. Le fluorophore a donc été modifié pour introduire une fonction amine (Figure 22).

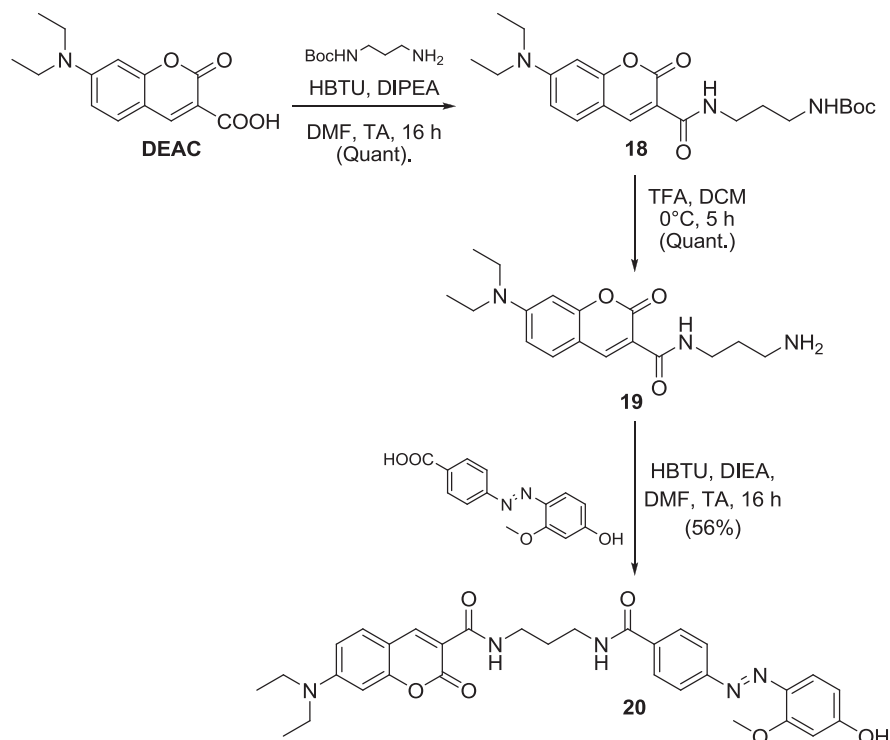


Figure 22 : Voie de synthèse d'une sonde fluorescente de type FRET incorporant un quencheur chimiquement désactivable.

Une réaction de couplage entre l'acide 7-diéthylaminocoumarine-3-carboxylique et la *N*-Boc-1,3-propanediamine a permis l'obtention quantitative de la coumarine fonctionnalisée **18** (Figure 22). Dans un second temps, le groupement Boc a été éliminé par un traitement acide au TFA, puis l'amine déprotégée a été couplée avec l'acide carboxylique de l'Azo **17**. La sonde fluorescente **20** a ainsi été obtenue dans des conditions classiques de couplage avec 56% de rendement global sur les 3 étapes.

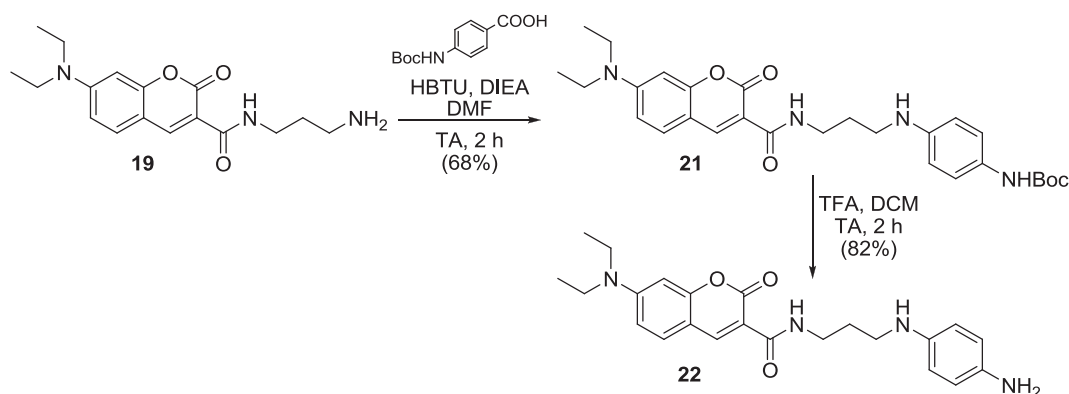


Figure 23 : Voie de synthèse du composé-contrôle **22** théoriquement obtenu après double réduction de la fonction Azo de **20** par le dithionite.

Afin de confirmer une désactivation totale des propriétés d'extinction du quencheur par le dithionite, le composé-contrôle **22**, issu de la réduction de la fonction Azo de **20**, a été

synthétisé en deux étapes (Figure 23). La coumarine **19** a été couplée avec de l'acide 4-(Boc-amino)benzoïque en utilisant HBTU comme agent de couplage. Puis, le composé **21** formé avec 68% de rendement a été traité en milieu acide afin d'obtenir le dérivé aniline **22** avec 82% de rendement sur cette étape de déprotection.

III.4.3. Etude en solution de la désactivation chimique du quencheur de la sonde fluorescente **20**

Les absorptions et émissions de fluorescence des composés **20** et **22** ont été étudiées en solution afin de non seulement mesurer l'extinction du fluorophore par le quencheur développé, mais aussi étudier l'influence de la désactivation chimique du quencheur sur l'émission de fluorescence.

Les deux composés **20** et **22** ont été étudiés à 2,5 μM en solution et dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) (Figure 24A). Pour une meilleure solubilité, le composé **20** a été utilisé en solution avec 5% de DMSO.

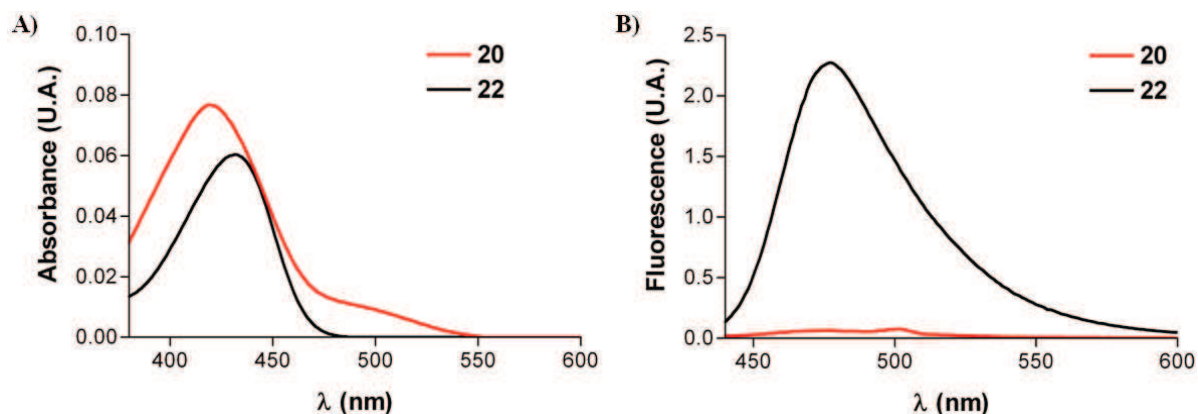


Figure 24 : Spectres d'absorption A) et d'émission de fluorescence B) des composés **20** et **22** à 2,5 μM dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4). Pour la fluorescence, une longueur d'onde d'excitation de 430 nm a été utilisée.

Le spectre d'absorption du conjugué **20**, fluorophore-quencheur, a démontré l'additivité spectrale des chromophores Azo et DEAC (Figure 24A). Contrairement à **22**, le composé **20** a montré une absorption entre 475 nm et 550 nm correspondant au chromophore Azo. Afin de vérifier l'extinction du fluorophore par le quencheur, les spectres d'émission en fluorescence des composés **20** et **22** ont été enregistrés en excitant le fluorophore à 430 nm (Figure 24B).

D'après les résultats obtenus, la fluorescence du composé-contrôle **22** est de 2,26 U.A. alors que celle du composé **20** n'est que de 0,06 U.A (Figure 24B). L'efficacité d'extinction a

été calculée suivant la formule : $\text{Eff}_{20} = 1 - (I_{20}/I_{22}) * 100$ soit $\text{Eff}_{20} = 97\%$. Le quencheur développé de type acide (2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoïque permet ainsi l'extinction de plus de 97% de la fluorescence du fluorophore **DEAC**.

L'extinction du fluorophore ayant été confirmée, l'influence du dithionite (1 mM) sur la fluorescence des sondes **20** et **22** a été étudiée.

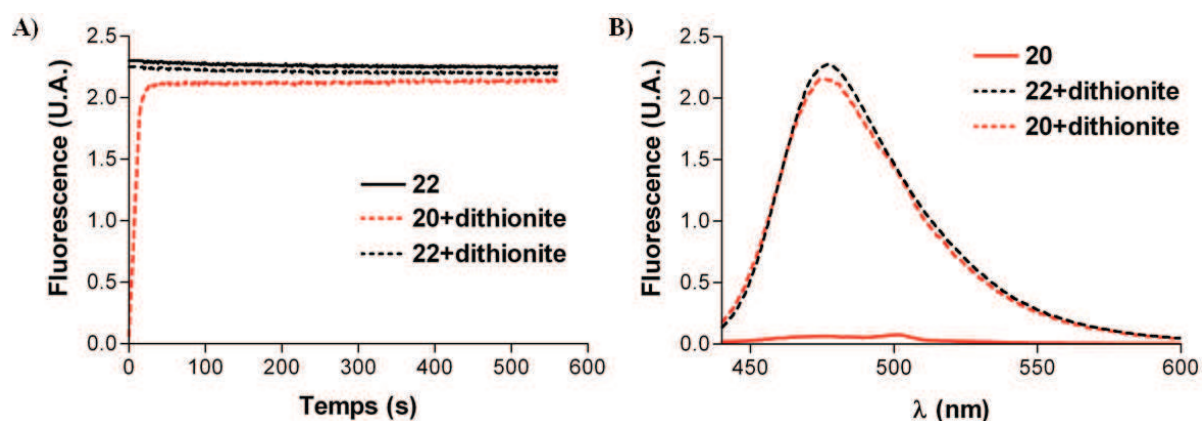


Figure 25 : A) Cinétique de désactivation du quencheur de 20 par du dithionite de sodium (1 mM) et mesure de la stabilité de 22 vis-à-vis du dithionite de sodium (émission de fluorescence mesurée à 476 nm); B) Spectres d'émission de fluorescence de 20 et 22 avant (lignes pleines) et après (lignes pointillées) traitement au dithionite (1 mM). Les composés ont été utilisés à 2,5 μM dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4).

Dans un premier temps, les stabilités photochimique et chimique du fluorophore **22** ont été mesurées pendant 10 minutes (Figure 25A). En l'absence de dithionite, la stabilité du signal fluorescent de **22** enregistré au cours du temps a confirmé une absence de photoblanchiment du fluorophore. Puis, la même expérience a été réalisée en présence de 1 mM de dithionite. Le signal fluorescent enregistré s'est révélé stable tout au long de l'expérience, et identique à celui mesuré sans dithionite. Ce résultats indique que le fluorophore **DEAC** est stable chimiquement vis-à-vis du dithionite.

L'incubation de la sonde fluorescente **20** en présence de 1 mM de dithionite de sodium a montré une augmentation rapide de la fluorescence jusqu'à l'obtention d'un plateau après 20 secondes de réaction (Figure 25A). Pour ce composé, un temps de demi-vie d'environ 5 secondes a été calculé. Après 10 minutes de traitement au dithionite, des intensités de fluorescence quasi-identiques ont été mesurées pour les composés **20** et **22**. Les spectres d'émission des deux composés traités chimiquement ont montré une parfaite superposition confirmant ainsi une réactivation totale de la fluorescence (Figure 25B). Pour le composé **20**,

la réaction au dithionite a permis l'augmentation de la fluorescence d'un facteur 33. Cela a confirmé l'efficacité d'extinction de 97% calculée précédemment.

Pour confirmer la réactivation de la fluorescence par le clivage du motif Azo, les spectres d'absorption de **20** et **22** traités par le dithionite ont été enregistrés et comparés (Figure 26).

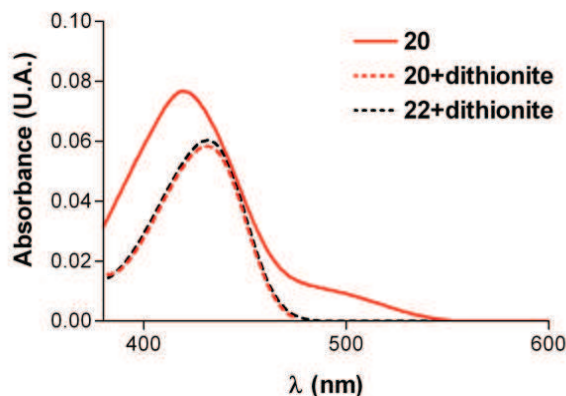


Figure 26 : Spectres d'absorptions de **20** et **22** avant (lignes pleines) et après (lignes pointillées) traitement au dithionite (1 mM). Tous les composés ont été utilisés à 2,5 μM dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4).

La superposition des spectres d'absorption des composés **20** et **22** après traitement au dithionite, et l'absence de signal entre 460 et 550 nm, ont à nouveau confirmé le clivage du quencheur par réduction au dithionite (Figure 26). Le composé **20** a donc été sélectionné pour l'étude de la désactivation chimique d'un quencheur en cellules vivantes.

III.4.4. Etude en cellules vivantes de la désactivation chimique du quencheur de la sonde fluorescente **20**

La désactivation du quencheur de la sonde fluorescente **20**, par le dithionite, a été suivie sur cellules vivantes de type HuH-7. Les deux paramètres étudiés ont été la concentration et le temps d'incubation de dithionite.

Le composé **20** a été incubé sur cellules HuH-7 pendant 4 heures et à une concentration de 100 μM. Puis, les cellules ont été lavées trois fois et incubées pendant 15 minutes avec des solutions de dithionite à différentes concentrations dans un tampon HBSS. Après l'incubation au dithionite, deux lavages supplémentaires ont été effectués, les cellules ont été fixées puis visualisées par microscopie à épi-fluorescence. La double acquisition en lumière transmise et en fluorescence (Filtre GFP) a permis de juger, respectivement, la biocompatibilité des traitements et l'efficacité de la désactivation chimique du quencheur (Figure 27).

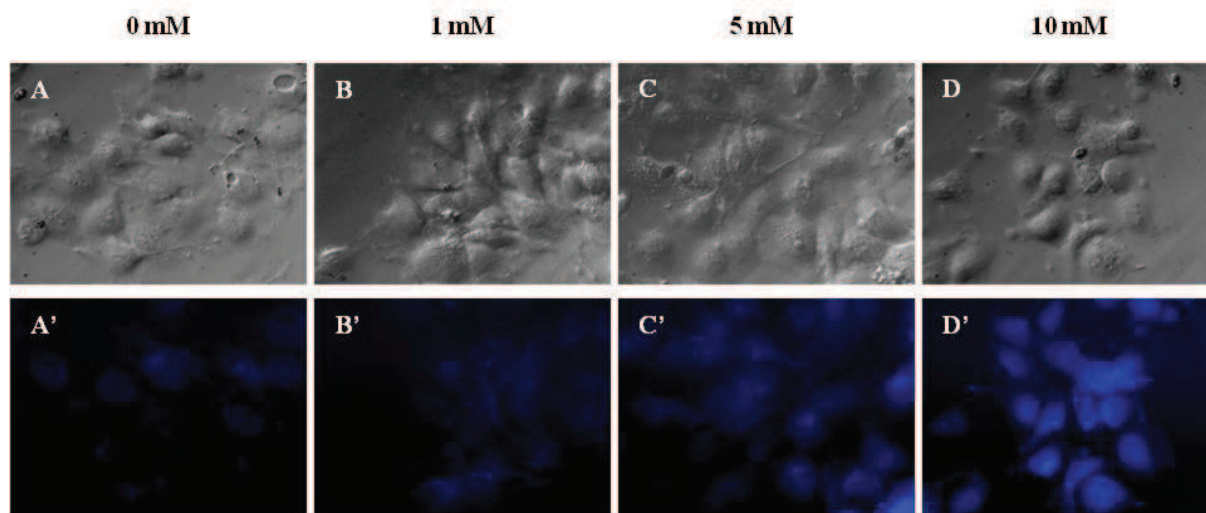


Figure 27 : Effet de la concentration de dithionite sur la désactivation du quencheur de **20**. Cellules de type HuH-7 incubées avec **20** (100 μ M, 4h) puis avec dithionite (C_{variable} , 15 min). Images en contraste de phase (A-D) et en fluorescence (A'-D'). Echelle d'intensité en fluorescence : 200-530.

En l'absence de traitement au dithionite, un très faible niveau de fluorescence a été observé (Figure 27, image A'). Ce dernier correspond au bruit de fond du composé fluorescent **20**. L'analyse des images obtenues en lumière transmise n'a pas démontré de changement de morphologies entre les cellules traitées (Figure 27, images B-D) et non traitées au dithionite (Figure 27, image A). Une incubation de 15 minutes à 10 mM d'agent réducteur est donc apparue comme biocompatible. Comparé au contrôle non-traité (Figure 27, image A'), les cellules traitées au dithionite ont révélé un signal fluorescent localisé dans les noyaux (Figure 27, images B'-D'). Cette expérience a d'une part confirmé la capacité du dithionite à pénétrer la membrane cellulaire, et d'autre part, prouvé la possibilité de désactiver le quencheur de **20** par réduction de la fonction Azo en cellules vivantes.

Pour les cellules traitées, l'augmentation de la concentration a induit une augmentation progressive du signal fluorescent (Figure 27, images B'-D'). Afin de vérifier si le signal observé à 10 mM de dithionite correspond à 100% de désactivation du quencheur, des concentrations plus importantes ont été testées. Cependant, au-delà de 10 mM, le dithionite s'est révélé cytotoxique (images non présentées). Des temps d'incubation plus long ont donc été envisagés à une concentration de 10 mM.

Pour étudier l'influence du temps d'incubation sur la désactivation du quencheur de **20**, une concentration en dithionite de 10 mM a été conservée. Dans cette expérience, les cellules ont été préparées comme précédemment et chimiquement traitées par le dithionite pendant 60 minutes (Figure 28).

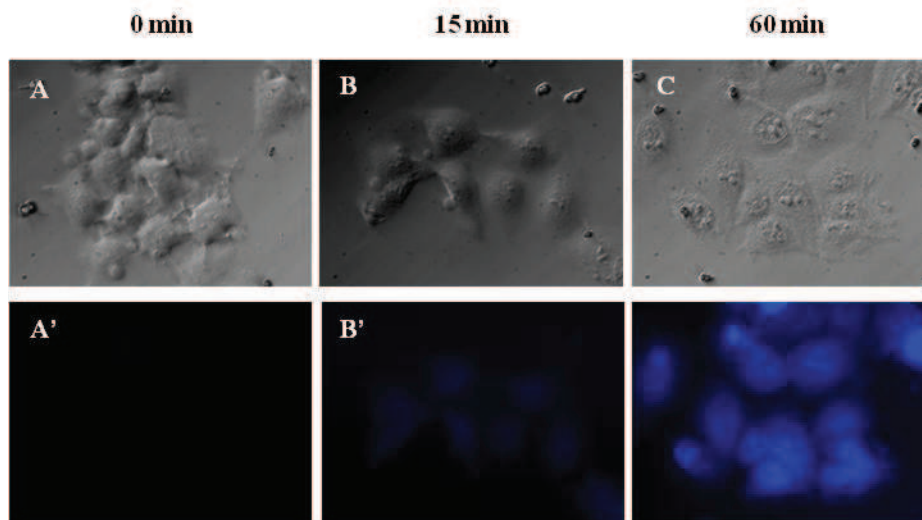


Figure 28 : Effet du temps d'incubation de dithionite (10 mM) sur la désactivation du quencheur de **20**. Cellules de type HuH-7 incubées avec **20** pendant 4 h puis avec dithionite à des temps variables. Images en contraste de phase (A-D) et en fluorescence (A'-D'). Echelle d'intensité en fluorescence : 200-1500.

Un temps d'incubation de 60 minutes à 10 mM en dithionite a clairement démontré une augmentation de la fluorescence par rapport à un temps court (Figure 28, images B'-C'), tout en restant biocompatible (Figure 28, image C). En revanche, un temps plus long de 2 heures a généré une mort cellulaire quasi-totale (images non présentées).

Pour valider l'efficacité de la désactivation du quencheur de **20**, le composé-contrôle **22**, a été incubé dans les conditions précédemment mise au point. L'expérience a été réalisée en l'absence et en présence de dithionite (10 mM, 60 min) (Figure 29).

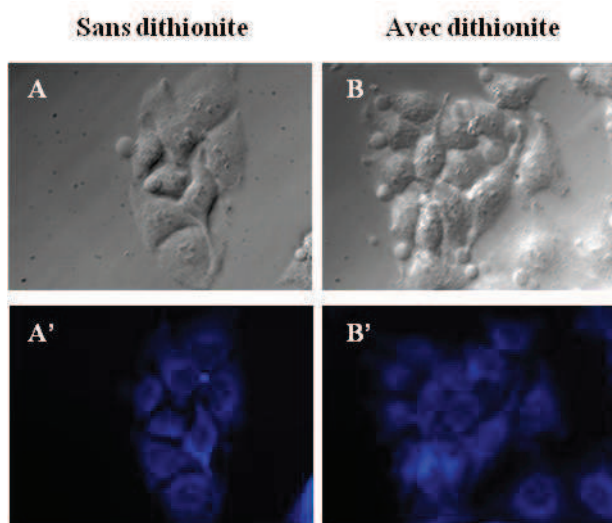


Figure 29 : Marquage de cellules HuH-7 avec le composé **22** (100 μ M, 4h) en l'absence (A et A') ou en présence (B et B') de dithionite de sodium (10 mM, 60 min). Echelle d'intensité en fluorescence : 200-1500.

Comme démontré en solution (Figure 25A), le dithionite ne semble pas avoir d'influence sur le fluorophore puisque l'intensité du composé **22** est équivalente quel que soit le traitement effectué (Figure 29, images A' et B'). Utilisé aux mêmes concentrations et après traitement au dithionite, les composés **20** et **22** émettent un signal fluorescent d'intensité similaire (Figure 29B' et Figure 28C'). En revanche, la localisation est différente selon le produit utilisé. Pour le dérivé aniline **20**, le marquage est majoritairement localisé dans le cytoplasme alors que pour le conjugué fluorophore-quencheur **22**, devenu fluorescent après traitement chimique, ce marquage est situé au niveau des noyaux cellulaires. Cela peut-être dû à des interactions de type π -stacking entre les structures aromatiques du quencheur et des bases de l'ADN.

Grâce au traitement chimique permettant la désactivation du quencheur, cette expérience a démontré qu'un même composé fluorescent pouvait avoir une localisation différente selon la forme sous laquelle il pénètre dans la cellule. Outre la localisation, on peut également envisager des différences d'internalisation entre les deux composés. Pour cette même raison, il n'a pas été possible d'utiliser le composé **22** comme un étalon interne, pour le calcul d'un rendement de désactivation du quencheur de **20**.

III.4.5. Conclusion

Basé sur un analogue du **Dabcyl**, un premier quencheur clivable a été développé et conjugué à un fluorophore de type **DEAC**. La sonde fluorescente synthétisée de type FRET a démontré, en solution, une réactivation totale de la fluorescence en 20 secondes avec 1 mM de dithionite. En cellules vivantes, la désactivation du quencheur a été réalisée avec 10 mM de dithionite pendant 60 minutes. Cette différence de temps et de concentrations peut s'expliquer par la faible diffusion du dithionite à travers la membrane cellulaire.

Après avoir démontré le concept de quencheur chimiquement désactivable en solution et en cellules vivantes, nous avons cherché à mettre au point une seconde génération de quencheur chimiquement désactivable. Comparé au dérivé Azo **17**, cette nouvelle structure doit être plus réactive vis-à-vis du dithionite afin de permettre une réactivation totale *in-cellulo*.

III.5. Mise au point d'une sonde pro-fluorescente de type FRET activable par voie biologique et chimique

Un nouveau quencheur dérivatisable a été développé à partir du dérivé Azo **10**, identifié lors de l'étude de structure/réactivité entre des composés Azo et le dithionite (voir section II.4.). Après couplage à un fluorophore de type DEAC et déprotection, une sonde fluorophore-quencheur désactivable **23** a été obtenue (Figure 30). En présence de dithionite de sodium, ce composé a démontré une désactivation totale du quencheur en moins de 20 secondes.

Dans un second temps, le quencheur **23** a été incorporé au sein d'une sonde pro-fluorescente de type FRET et sensible au Caspase-3. Ce composé **24** a été obtenu après synthèse d'une séquence peptidique de type DEVD, spécifique aux Caspase-3, qui a été ensuite dérivatisée par le fluorophore DEAC et un quencheur chimiquement désactivable basé sur la structure de **10** (Figure 30). L'incubation de **24** avec la Caspase-3 humaine recombinante a conduit, comme attendu, à une activation de la fluorescence par clivage de la sonde pro-fluorescente de type FRET. Puis, un ajout de dithionite en fin de réaction a permis de révéler un excès de sonde et ainsi mis en évidence un empoisonnement de l'enzyme par le produit de réaction.

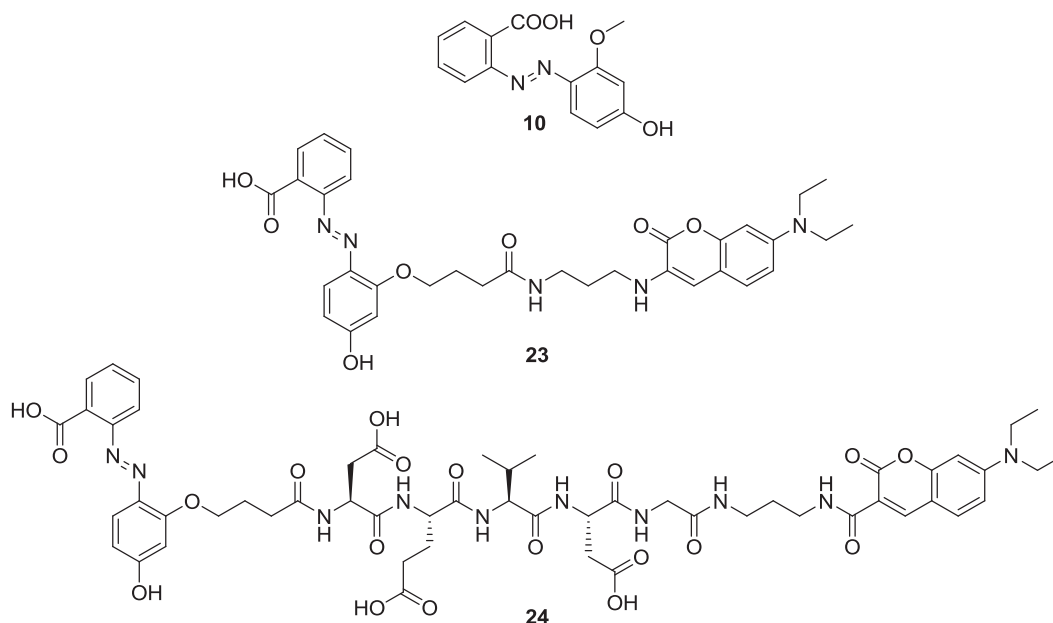


Figure 30 : Structures des composés **10**, **23** et **24**.

Afin de démontrer la bioorthogonalité et la biocompatibilité de la désactivation chimique du quencheur par le dithionite, des expériences ont été réalisées sur des cellules Hela saines et des cellules Hela apoptotiques dans lesquelles la Caspase-3 est activée. La réactivation au dithionite a confirmé la présence du composé dans les cellules saines et a ainsi prouvé la spécificité du peptide pour la Caspase-3.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article accepté dans le journal "*Chemical Communications*".⁷³ Dans cet article, la synthèse des composés, leurs études *in-vitro* et la microscopie ont été réalisées par moi-même. Le Dr. Ghyslain Budin a réalisé la synthèse du composé **22** (section III.2) et a été l'initiateur du projet. Zeinab Darwich a réalisé la culture cellulaire tandis que le Dr. Andrey Klymchenko a supervisé l'étude en microscopie. Enfin, l'évaluation de la cytotoxicité du dithionite a été réalisée par le Dr. Denis Weltin.

III.5.1. Article 4 : A FRET-based probe with a chemically deactivatable quencher

Cite this: *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3224–3226

www.rsc.org/chemcomm

COMMUNICATION

A FRET-based probe with a chemically deactivatable quencher†

Geoffray Leriche,^a Ghyslain Budin,^a Zeinab Darwich,^b Denis Weltin,^c Yves Mély,^b Andrey S. Klymchenko^b and Alain Wagner*^a

Received 2nd December 2011, Accepted 27th January 2012

DOI: 10.1039/c2cc17542h

A new concept of a chemically deactivatable quencher is proposed for a FRET-based probe that turns-on its fluorescence by either an enzymatic cleavage or a chemical reagent (sodium dithionite). This concept allowed us to quantify the caspase-3 cleavage activity in solution and to reveal unreacted probes in cell experiments.

Fluorescence is widely used to study biological processes in living cells. Recently, turn-on probes have been developed to measure cell enzymatic activity, pH alterations and to detect singlet oxygen, nitric oxide and highly reactive oxygen species (hROS).¹

Common turn-on probes are designed by linking a fluorescent dye and a quencher together *via* a biologically labile covalent bond. The most frequently used quencher moieties are non-emitting dyes, which act as FRET acceptors for the covalently bound fluorescent dye. The fluorescence is often turned-on by the enzymatic cleavage of the linker, resulting in separation of the fluorescent dye from the quencher (Scheme 1A). This strategy was used to image different enzymes activities such as cathepsins, caspases and MMPs.² Recently, this approach was also used to image free thiols in cells by the cleavage of either a disulfide bridge³ or a vinyl sulfide group.⁴

Currently used turn-on fluorescent probes are not detectable until activation leading to a high signal-to-noise ratio, which is advantageous for live cell imaging. However, in the case where there is no or weak signal, it is impossible to assess whether this is due to weak biological activity, insufficient probe concentration or inappropriate cellular localization of the probe. Having the ability to detect the substrate entering within the cells would have far reaching applications in biology.

The strategy developed here relies on the design of a probe whose fluorescence can be turned-on either by a biological stimulus or by a chemical reagent. The probe contains a central biosensitive bond that links a fluorescent dye and a chemically deactivatable quencher. When the labile bond is cleaved, the fluorescence is turned-on enabling the biological stimulus to be detected (Scheme 1A). Then, a chemical reagent capable of deactivating the quencher can be used to turn-on fluorescence of the unreacted probe (Scheme 1B), allowing estimation of biological cleavage. This

is particularly important for intracellular studies where the probe localisation and concentration are difficult to predict.

We selected an azo-based molecule as a suitable quencher⁵ and dithionite as a chemical reagent of relatively low toxicity.⁶ The azo-groups are known to react readily and under mild reduction conditions with dithionite⁷ leading to N=N bond cleavage. Consequently, when the azo-quencher is linked to a fluorescent dye, dithionite can deactivate the quencher and turn-on the fluorescence.

Dabcyl (4-(4'-dimethylamino-phenylazo)benzoic acid) is a common azo-based quencher widely used in a variety of biomolecular applications and nucleic acid probes.⁸ To the best of our knowledge no information on Dabcyl reduction with dithionite has been published. The **Dabcyl** dye was then incubated with a 1 mM sodium dithionite solution in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM) and the azo bond cleavage was monitored using UV spectrophotometry at 460 nm. The half-life of **Dabcyl** was longer than 13 minutes (Fig. S1, ESI†) and could not be transposed to live cells. To overcome this low reactivity, we used a highly reactive (4-hydroxy-2-methoxy-phenylazo) benzoic acid **CDQ** (Fig. 1) as a suitable chemically deactivatable quencher candidate.⁹ This molecule has a UV profile similar to **Dabcyl**, but undergoes a faster cleavage. With a 1 mM sodium dithionite solution, this compound exhibited a half-life of less than 1 second and total cleavage was achieved in less than 15 seconds (Fig. S1 and S2, ESI†).

Considering these results, we linked the chemically deactivatable quencher (**CDQ**) to a fluorescent dye. Its absorption spectrum overlaps with the emission of the 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid (**DEAC**), which has a 470-nm emission maximum (Fig. S3, ESI†). The corresponding chemically deactivatable probe **2** (Fig. 1) was synthesized in five steps with an overall yield of 19% (see ESI†).

Quencher deactivation kinetics was investigated by adding dithionite (1 mM) to the FRET-based probe **2**. A rapid 17-fold increase of fluorescence intensity was observed following cleavage of **2**, with a short half life of ~10 seconds (Fig. 2A and B). We verified the photostability of the fluorescent dye **1** and its stability towards dithionite (Fig. 2A). The deactivation of **2** in the presence of dithionite was complete, as it can be seen from the disappearance of its absorption peak at 490 nm (Fig. S4, ESI†). Since **2** showed very good quencher deactivation properties, we used this couple of **CDQ/DEAC** groups in the design of a fluorometric dual turn-on caspase-3 sensitive probe.¹⁰

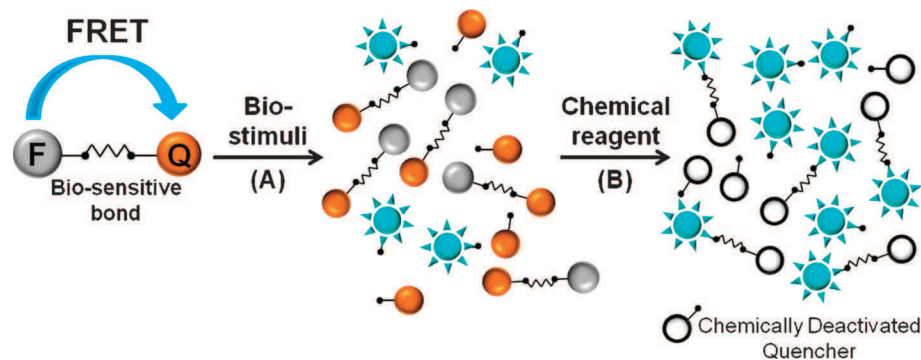
We synthesized a dual probe: **CDQ-DEVD-G-DEAC 3**. This probe consists of three parts: an L-amino acid effector caspase-3 recognition sequence (**DEVD**)¹¹ that is flanked by

^a *Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199, 74 Route du Rhin, 67401, Illkirch, France. E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr; Fax: +33 368854306*

^b *Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie, UMR 7213 CNRS, 74 Route du Rhin, 67401, Illkirch, France*

^c *PhytoDia SAS, Boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France*

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2cc17542h



Scheme 1 Principle of FRET-based probe with a chemically deactivatable quencher. (A) In the presence of biological stimuli, the labile bond is cleaved and the fluorescence is turned-on enabling the biological stimuli to be detected. (B) The introduction of a chemically deactivatable quencher allows us to reveal the presence of an inactivated probe by treatment with a chemical reagent.

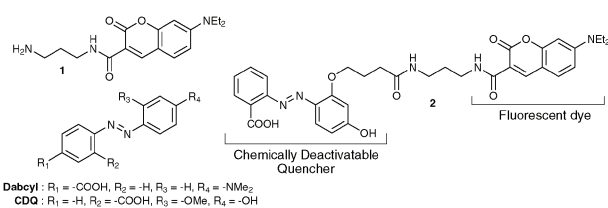


Fig. 1 Structures of cleavable quenchers (DabcyI and CDQ), modified DEAC 1, and probe 2.

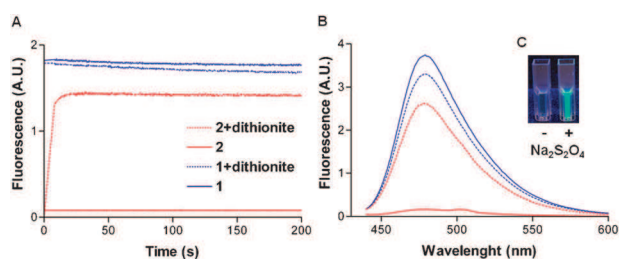


Fig. 2 Quencher deactivation analysis in FRET-based probe. (A) Deactivation kinetics of **1** (dashed blue line) and **2** (dashed red line) with 1 mM of sodium dithionite. Photo-stability of **1** (solid blue line) and **2** (solid red line). Excitation and emission wavelengths were 430 and 476 nm, respectively. (B) Emission fluorescence spectra of compounds **1** (blue lines) and **2** (red lines) before (solid lines) and after deactivation with 1 mM of dithionite solution (dashed lines). All data were recorded with a probe concentration of 2 μ M in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM). (C) Cuvettes under a UV-lamp containing **2** (20 μ M) without and with dithionite (1 mM).

the chemically deactivatable quencher (CDQ) and the fluorescent dye (DEAC). Probe **3** was synthesized in 12 steps using Fmoc chemistry in solution (see ESI[†]). After the quencher moiety of **3** was deactivated by dithionite, the fluorescence signal was increased by 22-fold (Fig. S5, ESI[†]). Thus, the quenching efficacy and therefore the turn-on property of probe **3** was as good as those of probe **2**, despite the longer peptide linker length in the former.

In vitro enzyme kinetic studies were performed using human recombinant caspase-3 enzyme, probe **3**, and the commercially available turn-on fluorescent substrate Ac-DEVD-AMC **4**, used as control (AMC = 7-amino-4-methylcoumarin). Both probes were incubated with caspase-3 at 25 °C in buffer and showed comparable fluorescence enhancement kinetics (Fig. 3A and Fig. S6, ESI[†]). This result indicates that the CDQ/DEAC pair does not perturb the enzymatic activity of caspase-3. After 300 minutes, when saturation curves were

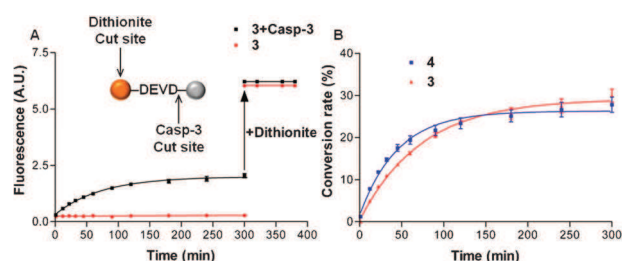


Fig. 3 Response to caspase-3 cleavage and dithionite quencher deactivation. (A) Cleavage kinetics of **3** at 2 μ M by human recombinant caspase-3 at 25 or 0 ng mL⁻¹ (black and red lines, respectively). The arrow indicates the addition of dithionite (1 mM for 1 min) to cleave probe excess. (B) Conversion rates for **3** and **4** calculated from dithionite cleavage or AMC standard, respectively.

observed, dithionite (1 mM, 1 min) was added to the reaction mixture with **3**. A 3.1-fold fluorescence increase was observed, indicating that some unreacted probe was still present. This incomplete conversion might be imputed to enzyme inhibition by the reaction product. The chemical deactivation of the quencher enables us to calculate the total concentration and the conversion rate of the fluorescent substrate (Fig. 3B). After 300 minutes, 30% of **3** had been enzymatically cleaved by the recombinant caspase-3. To estimate the amount of unreacted probe **4**, the fluorescence intensity was compared to the free fluorescent dye, AMC, at the same concentration (2 μ M). A 3.5-fold difference was recorded, which is similar to the signal observed for probe **3** (Fig. S6, ESI[†]). Thus, the chemically deactivatable quencher allows direct estimation of the probe conversion rate.

In the control experiment, a competitive inhibition study of caspase-3 was performed using a commercially available inhibitor, Ac-DEVD-CHO **5** (Fig. S7, ESI[†]). As expected, an increase in the inhibitor concentration slowed down the enzymatic cleavage.

The chemical activation of **3** was then studied in tissue culture. HeLa cells were incubated for 1 hour with **3**. After washing out probe excess, cells were incubated with dithionite. In the control experiment, cells were treated with HEPES buffer, instead of dithionite (Fig. 4A). The quencher deactivation was monitored using live-cell imaging (Fig. 4). Fluorescence could be clearly seen in dithionite treated cells after 15 minutes and the intensity continued to increase for 45 minutes. After 45 minutes, a maximum intensity was reached indicating that all the probes were chemically turned-on. It confirms that dithionite can abolish the

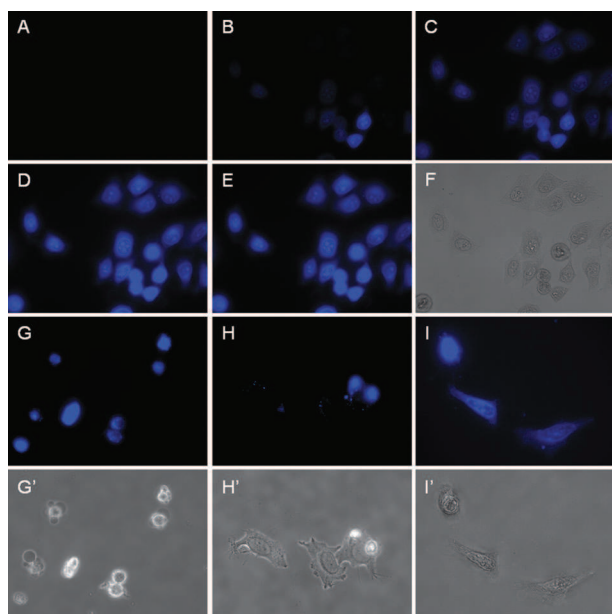


Fig. 4 Fluorescence and brightfield microscopy images of HeLa cells treated with **3** (40 μM , 1 h). (A–F) Quencher deactivation kinetics with dithionite (10 mM) at different time points: 15 (B), 30 (C), 45 (D), 60 min (E). In the control experiment (A), the cells were incubated with HEPES buffer. (F) Brightfield image of cells after 60 min of dithionite treatment. (G–H') Response of **3** to apoptotic cells (pre-treated with Actinomycin D (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 18 h)). (I and I') Quencher deactivation with dithionite (10 mM, 45 min) in apoptotic cells. The images were acquired with the same camera settings, but with a different fluorescence scale ranging from 2700 to 7360 (G–H) and from 7880 to 36010 (all others). The image size was $219 \times 163 \mu\text{m}$ (A–H') and $146 \times 109 \mu\text{m}$ (I and I').

FRET-quenching in **3** in healthy cells. Compared to an *in vitro* experiment, *in vivo* dithionite-mediated quencher deactivation is much slower due to the low dithionite membrane permeability. It should be noted that the cells treated with dithionite showed slightly different morphology, which could be connected with cell shrinkage (Fig. S8, ESI[†]). However, after dithionite treatment the morphology remained unchanged for the experiment timescale. According to luciferase ATP assay, the dithionite cytotoxicity was low, even at a 10 mM concentration (Fig. S9, ESI[†]). Numerous reports showed that dithionite can be used as a reductive agent in cell culture, without strong cytotoxicity effects at the millimolar range.¹²

Then we assessed cell internalization of probe **3** as a function of incubation time. Cells were treated with 40 μM of **3** for different times (15, 30, 60 and 120 min), washed and incubated with 10 mM of dithionite for 45 min (Fig. S8, ESI[†]). Results showed an increase in the probe internalization during the first hour of incubation, and then reached a plateau. This allowed us to determine the optimal incubation time of the cells with the probe, which would not be possible for classical turn-on probes.

The biological activation of **3** in live HeLa cells was then tested. Apoptosis was induced to activate caspase-3, which can cleave the DEVD peptide linker in **3**. Cells were incubated with Actinomycin D for 18 hours and then with **3** for 1 hour. Cells undergoing apoptosis were recognized by their rounded morphology and bright blue fluorescence, indicating that **3** had been cleaved in these cells. In addition, we observed different levels of fluorescence intensity for the Actinomycin-D-treated cells, which is most likely due to the cells being in different stages of apoptosis

(Fig. 4G and G'). In contrast, cells with a healthy morphology had only very low levels of fluorescence (Fig. 4H and H'), in line with data on non-treated HeLa cells (Fig. 4A). The quencher was further deactivated in the cells by 10 mM dithionite treatment for 45 minutes. A strong increase in fluorescence was observed in both apoptotic and healthy cells (Fig. 4I and I'), indicating the presence of uncleaved probe **3** in the both cell populations and confirms the presence of the probe in non-fluorescent healthy cells. Thus, we have shown that the fluorescence of probe **3** is only turned-on in apoptotic cells, and the “chemically deactivatable quencher” confirms the presence of the probe in all cells.

In conclusion, we have developed a caspase-3 activity-sensitive probe containing a DEVD peptide which was used to link a fluorescent dye and a “chemically deactivatable quencher”. The synthesized probe was shown to turn-on its fluorescence in response to both recombinant and endogenous caspase-3 stimuli, whereas it can be turned-on independently by dithionite deactivation of the quencher. The advantages of this novel strategy over traditional “turn-on” probes include control for internalization and localization of the probe in living cells, irrespective of whether they contain the biological stimulus or not. The “chemically deactivatable quencher” concept can be applied to all “turn-on probes” with a fluorescent dye-linker-quencher structure for assaying different biological stimuli. These results pave the way for the development of a new generation of enzymatic probes containing an internal control.

We thank D. Dujardin and R. Vauchelles from PIQ imaging platform for help with fluorescence imaging.

Notes and references

- H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2620–2640.
- (a) R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood and A. Bogdanov, *Nat. Biotechnol.*, 1999, **17**, 375–378; (b) C. Bremer, C.-H. Tung and R. Weissleder, *Nat. Med.*, 2001, **7**, 743–748; (c) C.-H. Tung, *Pept. Sci.*, 2004, **76**, 391–403.
- (a) J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z.-H. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.-L. Coll and I. Texier, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 1069–1072; (b) W. Gao, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6567–6571.
- H.-Y. Shiu, H.-C. Chong, Y.-C. Leung, M.-K. Wong and C.-M. Che, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 3308–3313.
- K. E. Sapsford, L. Berti and I. L. Medintz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 4562–4589.
- (a) J. M. Bergen, E. J. Kwon, T. W. Shen and S. H. Pun, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 377–384; (b) O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mély and A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4907–4916.
- (a) T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs and M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3718–3723; (b) G. Budin, M. Moune-Dimala, G. Leriche, J.-M. Saliou, J. Papillon, S. Sanglier-Cianfèrari, A. Van Dorselaer, V. Lamour, L. Brino and A. Wagner, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 2359–2361.
- (a) S. Tyagi, S. a. Marras and F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 1191–1196; (b) S. Bernacchi and Y. Mély, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, E62.
- G. Leriche, G. Budin, L. Brino and A. Wagner, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **2010**, 4360–4364.
- M. Hu, L. Li, H. Wu, Y. Su, P.-Y. Yang, M. Uttamchandani, Q.-H. Xu and S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 12009–12020.
- R. V. Talanian, C. Quinlan, S. Trautz, M. C. Hackett, J. A. Mankovich, D. Banach, T. Ghayur, K. D. Brady and W. W. Wong, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 9677–9682.
- (a) J. C. McIntyre and R. G. Sleight, *Biochemistry*, 1991, **30**, 11819–11827; (b) L. Dafik, V. Kalsani, A. K. L. Leung and K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 12091–12093.

III.5.2. Article 4 : Partie expérimentale

FRET-Based probe with a chemically deactivatable quencher

**Geoffray Leriche,^a Ghyslain Budin,^a Zeinab Darwich,^b Denis Weltin,^c Yves Mély,^b
Andrey S. Klymchenko^b and Alain Wagner^{*a}**

^a *Laboratory of Functional Chemo-Systems UMR 7199, 74 Route du Rhin, 67401, Illkirch (France). Fax: (+) 33 368854306; E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr*

^b *Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie, UMR 7213 CNRS, 74 Route du Rhin, 67401, Illkirch (France).*

^c *PhytoDia SAS, Boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch (France).*

General Methods

General experimental procedures: Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an atmosphere of argon in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred *via* syringe. When required, solutions were degassed by bubbling of argon through a needle. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 15-30 torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an ethanolic solution of cerium sulfate, followed by treatment with a heat gun. Column chromatography was carried out as "Flash Chromatography" using silica gel G-25 (40-63 μ M) from Macherey-Nagel.

Materials: All reagents were obtained from commercial sources and used without further purifications. Dry MeOH and DMF were obtained from Aldrich. Dichloromethane was passed through a column of activated alumina under nitrogen. For enzymatic activity study, Human recombinant caspase-3, buffer (20 mM HEPES, pH 7.4 with 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS, and 5 mM DTT), fluorescent probe Ac-DEVD-AMC (**4**) and caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO (**5**) were purchased from Aldrich in a Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetric (Catalog Number CASP3F).

Instrumentation: UV-Vis spectra and kinetic were recorded on Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. Melting points were taken on a Stuart Scientific SMP3 apparatus from Bibby and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Nicolet 380 FT-IR spectrometer from Thermo Electron Corporation as a CH₂Cl₂ solution or solid on a diamond plate. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 23°C on Bruker 400 and 500 spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent. Data are represented as follows: Chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (*J*, Hz) and integration. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and low resolution mass spectra using a Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL. GC-MS analyses were performed by means of Agilent 7890A Gas Chromatograph equipped with DB-5MS 30 m x 0.25 mm column and JEOL AccuTOF-GCv. The semi-preparative HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a 2487 detector (Waters), a 5 ml sample loop and a Sunfire C18 column (150 mm x 19 mm i.d., 5 μ m, Waters) with a 40 minutes gradient from 5% to 95% acetonitrile.

Dithionite cleavage procedure

Dithionite cleavage procedure for CDQ and Dabcyl: A 10 mM azo solution was prepared in DMSO and diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) to obtain 50 μ M of azo compound solution. Then, 950 μ L of this solution was added to 50 μ L of freshly prepared solution of sodium dithionite at 20.2 mM. Color disappearance was followed by UV/VIS spectrophotometry at 438 nm for **CDQ** and 460 nm for **Dabcyl**.

Dithionite cleavage procedure for 2 and 3: A 1 mM probe solution was prepared in DMSO and diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) to obtain 2 μ M of probe solution. Then, 950 μ L of this solution was added to 50 μ L of freshly prepared solution of sodium dithionite at 20.2 mM. Increase in fluorescence intensity was followed by fluorescence spectrophotometry. Excitation and emission wavelengths were 430 and 476 nm, respectively.

Enzymatic assay

Procedure for fluorimetric assay of caspase-3 activity using 3 and 4: A 1 mM probe solution was prepared in DMSO and diluted in buffer (20 mM HEPES, pH 7.4 with 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS, and 5 mM DTT). 965 μ L of this solution was added into a cuvette and 10 μ L of buffer or caspase-3 inhibitor was added. Then 25 μ L of buffer or 1 μ g/mL Human recombinant caspase-3 was added to the reaction mixture and kinetic was monitored at room temperature. (excitation - 360 nm for 4 and 430 for 3) (emission - 430 nm for 4 and 476 for 3). When saturation curves were observed, 50 μ L of freshly prepared solution of sodium dithionite (21 mM) were added in the reaction including 3. After 1 min of reaction at room temperature, fluorescence emission was recorded.

Cell Culture

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, high glucose, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco-Invitrogen) in a humidified incubator with 5% CO₂ /95% air atmosphere at 37°C. Cells plated on a 75 cm² flask at a density of 10⁶ cells/flask were harvested at 80% confluence with trypsin-EDTA (Sigma) and seeded onto a chambered coverglass (IBiDi) at a density of 5 \times 10⁴ cells/IBiDi 24h before the microscopy measurements. To prepare apoptotic cells, the cells were treated with actinomycin D (0.5 μ g/ml) for 18h prior the experiments.

Finally, cells in iBiDi dishes were washed with HBSS *Hank's Buffered Salt Solution* (SIGMA). Then, a solution of peptide in Opti-MEM was added. Microscopy images were taken after 1h of incubation at 37°C with the peptide.

Fluorescence spectroscopy and microscopy

Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer at room temperature. Fluorescence images were taken on a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with a Leica DC350FX CCD camera and a thermostated chamber (Life Imaging Services, Basel Switzerland) for maintaining the temperature at 37°C. A 40 \times HCX PL APO (1.25 NA) objective and a CFP Filter (excitation 436/20nm, dichroic mirror 455nm, emission 480/40nm) were used.

ATP/Luciferase assay

In vitro cytotoxicity was measured using an Adenosine triphosphate monitoring luminometric assay (ATPlite™, Perkin Elmer). The experiments were performed in 96-well plates containing MCF-7 cells grown to confluence in culture media (DEMEM media at 1 g/L of Gluc., supplemented with 10% fetal calf serum and non essential aminoacids (NEAA, 0.1mM) 100 µl per well). Cells were incubated with sodium dithionite at indicated concentrations (100 µM to 20 mM) at 37°C for 1 hour and the content in ATP was measured according to the supplier's instructions. Briefly, after the one hour dithionite treatment, the supernatant was discarded and replaced by PBS (100 µl). 50µl of a mammalian cell lysis solution were added to each well. After a five min shaking step, 50µl of a substrate solution were added to each well. After a further five min shaking step, the plate was allowed to stand in the dark for 10 min before the luminescence was measured using a microplate luminometric reader (Synergy HT, Biotek). The cell viabilities were expressed as percent of untreated control cells.

Cleavage kinetics of CDQ and Dabcyl

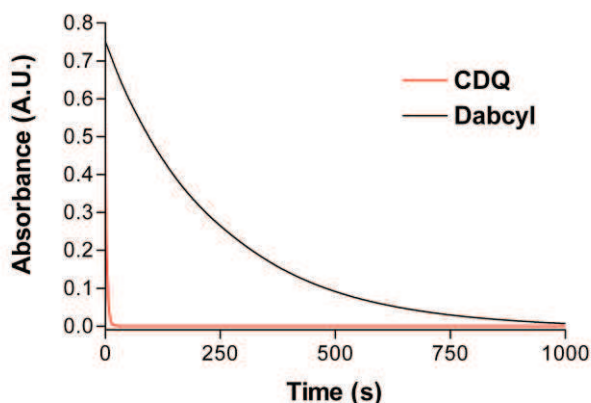


Fig. S1: Cleavage kinetics of **CDQ** and **Dabcyl** (50 μ M) with 1 mM of sodium dithionite in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), monitored by the absorbance at 449 and 463 nm, respectively.

Dithionite effect on absorption spectra of CDQ

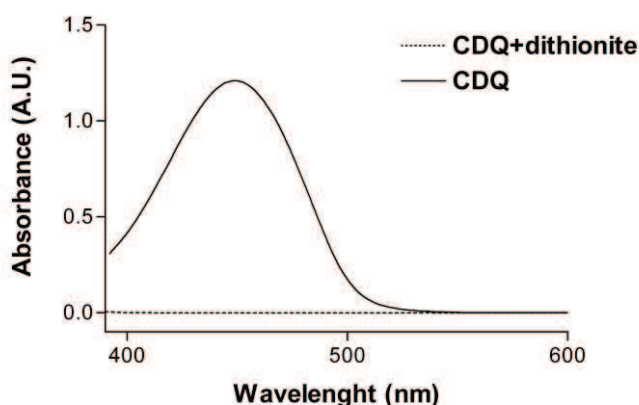


Fig. S2: Absorbance spectra of compound **CDQ** (50 μ M) with (dashed line) and without (solid line) 1 mM of dithionite solution.

Absorption spectra of CDQ, Dabcyl and DEAC

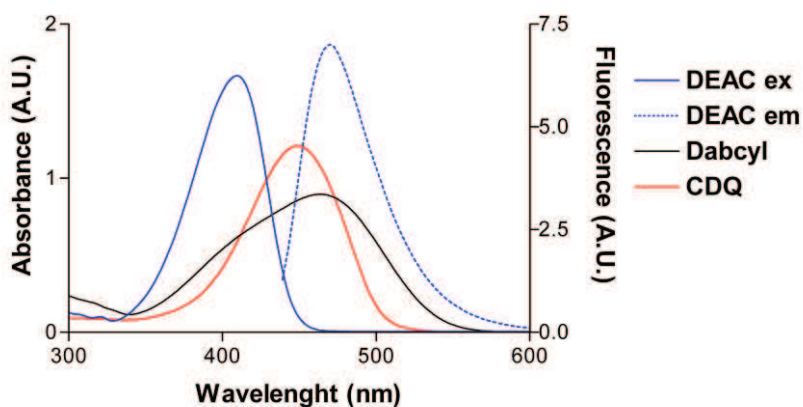


Fig. S3: Absorption spectra of compound **CDQ** (red line), **Dabcyl** (black line) and **DEAC** (blue line) at 50 μ M in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM). Fluorescence spectrum of **DEAC** (dashed blue line) at 2 μ M in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM).

Absorption spectra of 1 and 2 with and without dithionite

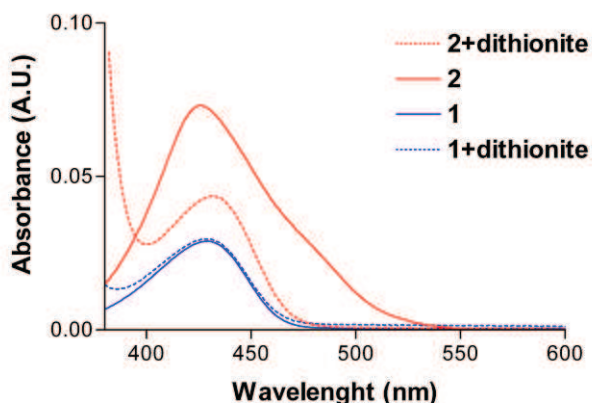


Fig. S4 : Absorption spectra of compounds **1** (blue lines) and **2** (red lines), at 50 μ M in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM), before (solid lines) and after deactivation with 1 mM of dithionite solution (dashed lines).

Fluorescence spectra of 3 with and without dithionite

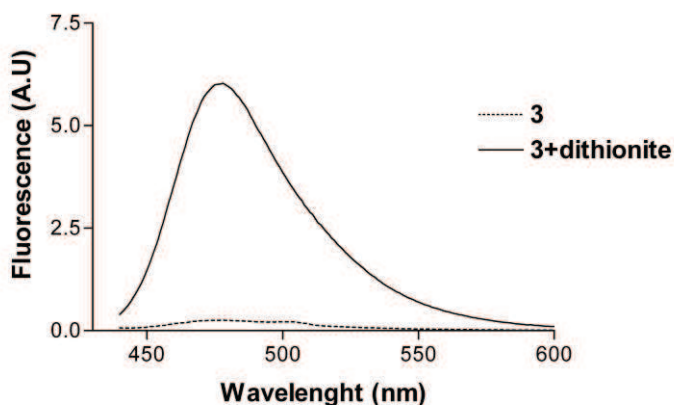


Fig. S5: Fluorescence spectra of compound **3** at 2 μ M in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mM) with (solid line) and without (dashed line) 1 mM of dithionite solution.

Cleavage kinetics of 4 by Human recombinant caspase-3

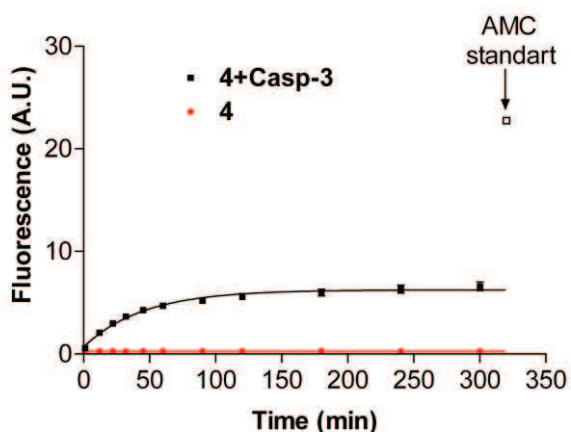


Fig. S6: Cleavage kinetics of **4** at 2 μ M by Human recombinant caspase-3 at 25 or 0 ng/mL in buffer, (black and red lines respectively) monitored by fluorescence intensity at 430 nm. To calculate the rate of conversion, fluorescence intensity of a standard AMC solution at the same concentration (2 μ M) was also measured.

Competitive inhibition study of caspase-3

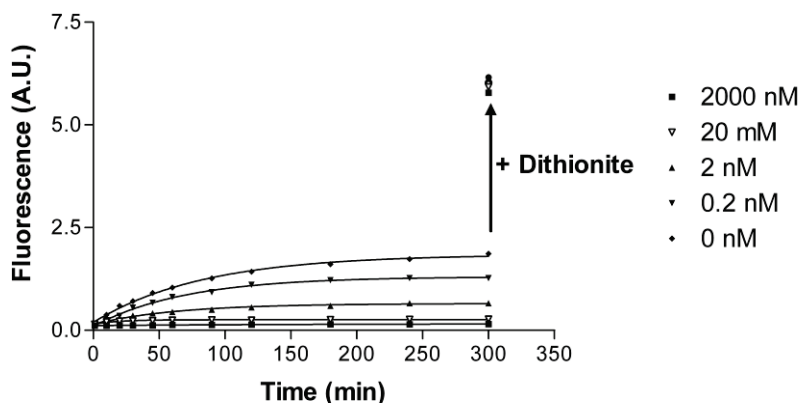


Fig. S7: Cleavage kinetics of **3** at 2 μ M by Human recombinant caspase-3 at 25 ng/mL in buffer with different concentration of caspase-3 inhibitor **5**, monitored by fluorescence intensity at 476 nm vs time. After 300 minutes, dithionite solution (1 mM, 1 min) was added to the reaction mixture to reveal unreacted probe

Cell internalization of **3**

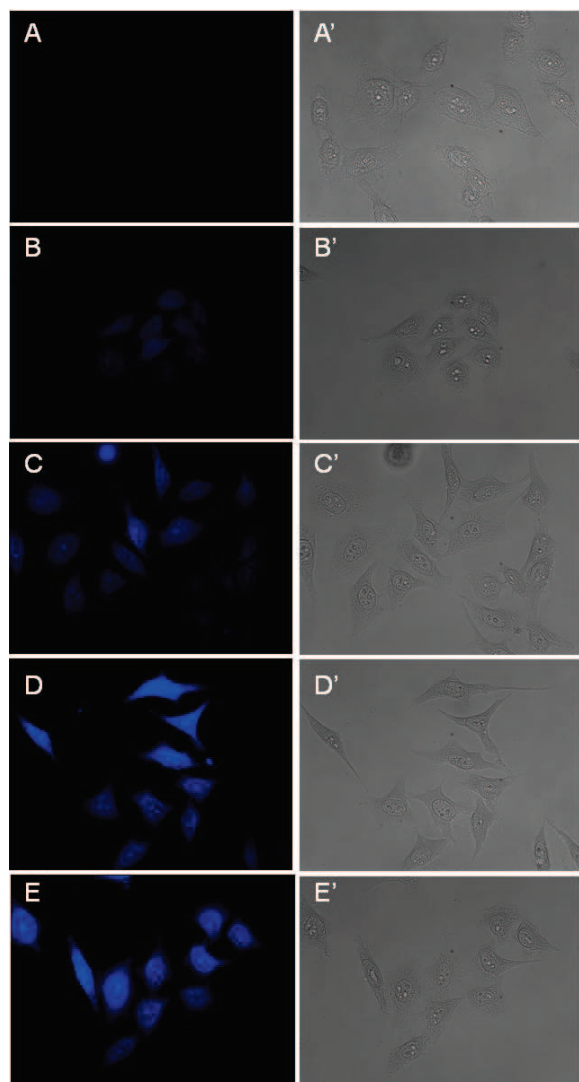


Fig. S8: Cell internalization of probe **3** as a function of incubation time. Cells were treated with 40 μ M of **3** for different times (15, 30, 60 and 120 min), washed and incubated with 10 mM of dithionite for 45 min. The fluorescence images (B, C, D and E 15, 30, 60 and 120 min respectively) were acquired and presented with the same instrumental settings and the fluorescence scale ranging from 7880 to 36010. B', C', D', and E' correspond to brightfield images of 15, 30, 60 and 120 min, respectively. A control experiment consisted of incubating HeLa cells with 10 mM of dithionite for 45 min (pictures A and A'). Image size was 219 \times 163 μ m.

ATP/luciferase assay for measurement of dithionite cytotoxicity

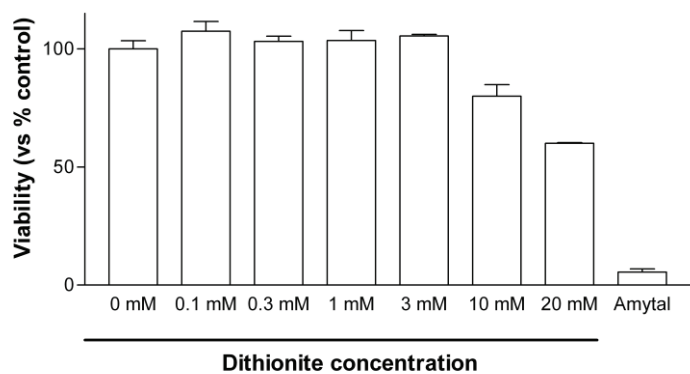
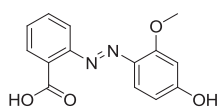


Fig. S9: ATP/luciferase assay on MCF-7 cells with different concentration of dithionite. Controls consist of cells without dithionite and cells+amytal.

Synthesis of CDQ

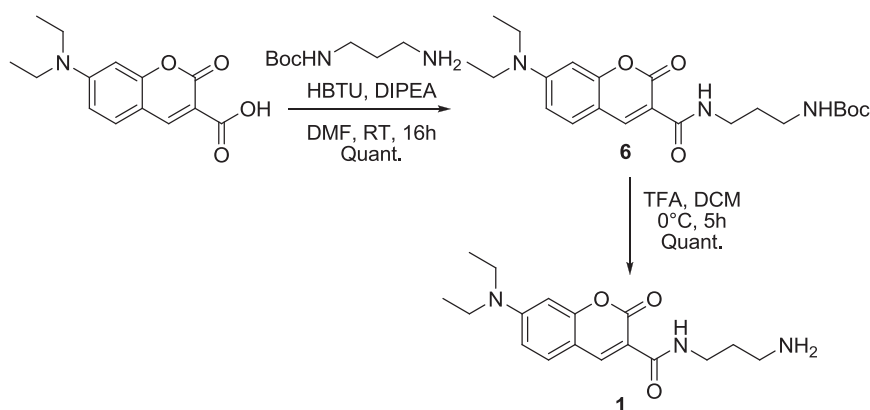
2-(4-hydroxy-2-methoxyphenylazo)benzoic acid **CDQ**



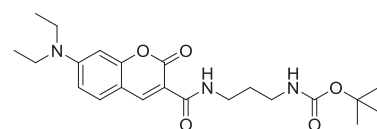
Compound **CDQ** was synthesized in two steps according to a previous described method.¹¹

Rf: 0.05 (dichloromethane/MeOH 95:5); decomposition at 218 °C; ¹H NMR (400 MHz, dms o - d_6) δ 7.84 (dd, J = 1.6, 7.7 Hz, 1H), 7.66-7.68 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.49-7.45 (m, 1H), 6.55 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 2.2, 8.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, dms o - d_6) δ 168.1, 158.6, 150.2, 134.3, 132.3, 129.9, 128.6, 127.5, 123.8, 116.6, 110.6, 100.6, 55.9; IR (neat) : 3445, 3155, 1738, 1631, 1584, 1489, 1440, 1325, 995 cm^{-1} ; ESI-MS 273.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calcd 287.0954 for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$, found 287.1034.

Synthesis of 1



Tert-butyl 3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propylcarbamate **6**

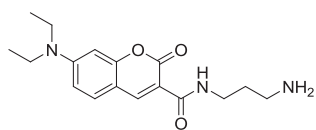


To a stirred solution of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (100 mg, 0.38 mmol) in DMF (3.8 mL), were added successively, DIPEA (200 μL , 1.15 mmol) and *tert*-butyl 3-aminopropylcarbamate (73 mg, 0.42 mmol). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath then HBTU (160 mg, 0.42 mmol) was added. Stirring was continued for 16 hours while the mixture was warmed up to room temperature. The reaction mixture was poured into a solution of 1M HCl solution (40 mL) and extracted two times by EtOAc (2*50 mL). The organics layers were washed successively with two times water (100 mL) and brine (100 mL) then dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduce pressure. Silica gel chromatography (DCM/MeOH 100% to 95/5) gave the compound **6** (159 mg, quant.) as a yellow powder.

Rf : 0.87 (DCM/MeOH 9:1); m.p. 118°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 8.82 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.30 (m, 1H), 3.48-3.44 (m, 2H), 3.43-3.36 (m, 4H), 3.12 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.17 (d, J = 7.2 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 163.7, 162.7, 157.6, 156.1, 152.6, 148.1, 131.1, 110.0, 108.3, 96.5, 78.8, 45.1, 37.4, 36.5, 30.2, 28.4, 12.4; IR (neat) : 3334, 1694, 1615, 1507, 1229, 1132 cm^{-1} ; ESI-MS: 418 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 440 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd 417.2263 for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$, found 417.2268.

¹¹ Leriche, G.; Budin, G.; Brino, L.; Wagner, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 4360-4364.

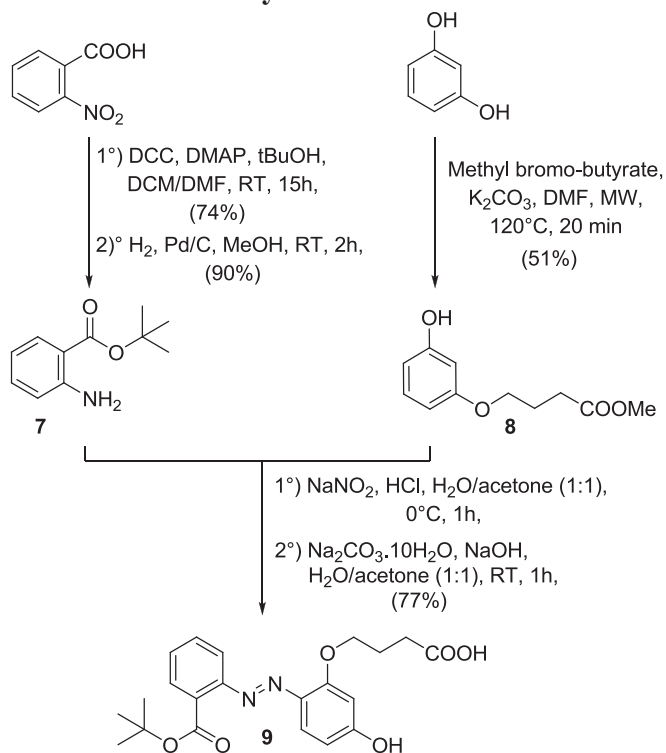
N-(3-aminopropyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide **1**



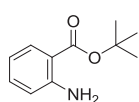
Compound **6** (125 mg, 0.30 mmol) was dissolved in DCM (3.6 ml). TFA (1.2 mL) was added at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 5 hours then concentrated. The residue was diluted with a saturated solution of NaHCO₃ (3 mL) and extracted three times with EtOAc (2*6 mL). Organics layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduce pressure giving product **1** (131 mg, quant.) as a yellow powder.

Rf : 0.21 (DCM/MeOH 9:1); m.p. 170-173°C; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.61 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 2.5, 9.1 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.55-3.50 (m, 6H), 3.00 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) δ 166.4, 164.0, 159.3, 154.8, 149.5, 132.7, 111.7, 109.7, 109.5, 97.3, 46.0, 38.3, 37.1, 29.0, 12.7; IR (neat) : 3081, 1677, 1616, 1537, 1508, 1351, 1132 cm⁻¹; ESI-MS 318 [M+H]⁺. HRMS calcd 317.1739 for C₁₇H₂₃N₃O₃, found 317.1745.

Synthesis of **2**



Tert-butyl 2-nitrobenzoate **7**



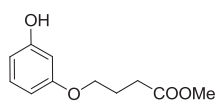
This compound was synthesized in two steps according to the described procedure.¹² The literature NMR data for this compound also matched those obtained for compound **7**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 7.84 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.29-7.25 (m,

¹² Drewe, W. C.; Nanjunda, R.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7751-7767.

1H), 6.69-6.45 (m, 2H), 5.62 (br, 2H), 1.62 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 167.6, 150.0, 133.5, 131.4, 116.8, 116.3, 112.8, 80.7, 28.3.

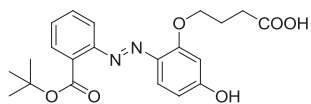
Methyl 4-(3-hydroxyphenoxy)butanoate **8**



Resorcinol (2.03 g, 14.80 mmol) was dissolved in acetonitrile (18 mL). K₂CO₃ (2.04 g, 14.80 mmol) and methyl 4-bromobutanoate (0.54 g, 27.61 mmol) were added. The mixture was heated under micro-waves at 120 °C for 20 minutes. After cooling, 1M HCl solution (200 mL) was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc (3*100 mL). Combined organic layers were then washed with water (200 mL), brine (200 mL) and dried over Na₂SO₄. Silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 1:0 to 7:3) gave the compound **8** (0.31 g, 51%) as colorless oil.

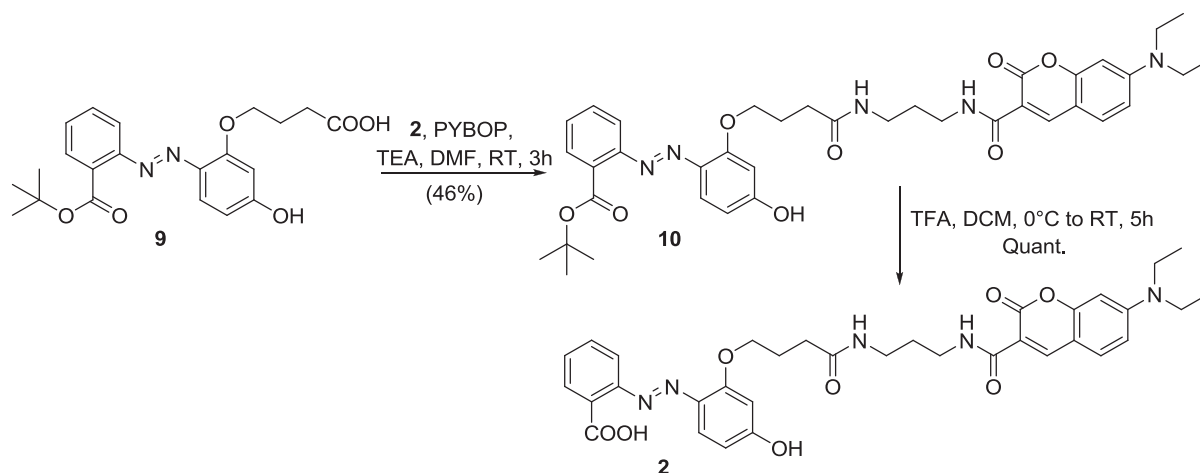
Rf: 0.55 (cyclohexane/EtOAc 5:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.46-6.36 (m, 3H), 3.95 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.11-2.03 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 173.1, 160.8, 156.5, 130.7, 107.5, 107.1, 102.1, 68.1, 51.9, 29.9, 24.3; IR (neat) : 3391, 1710, 1593, 1144 cm⁻¹; GC-MS : 210.

4-(2-(2-(tert-butoxycarbonyl)phenylazo)-5-hydroxyphenoxy)butanoic acid **9**

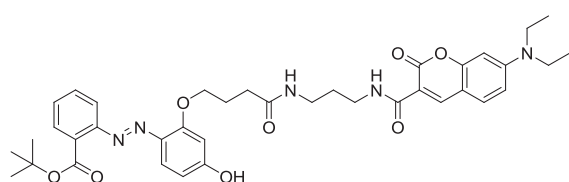


Compound **7** (1.34 g, 6.9 mmol) was dissolved in a solution of acetone/water (1:1) (31.0 mL). The mixture was cooled to 0° and concentrated HCl (3.5 mL) was added. After a few minutes sodium nitrite (0.56 g, 8.1 mmol) dissolved in water (7.0 mL) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 hour at 0°C. In the same time, were solubilized compound **8** (1.25 g, 5.95 mmol), Na₂CO₃·10H₂O (4.00 g, 13.9 mmol) and NaOH (0.95 g, 23.8 mmol) in a solution of acetone/water (1:1) (31 mL). The first solution was added dropwise at the second at 0°C. After the addition was completed, the mixture was allowed to reach room temperature and stirred for an additional hour. Reaction mixture was acidified with 1M HCl (50 mL) and then extracted with DCM (3*50 mL). Organic phases were dried over Na₂SO₄, concentrated and purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 1:0 to 9:1). Compound **9** was obtained as an orange/red solid (2.16 g, 77%).

Rf: 0.28 (DCM/MeOH 95:5); m.p. 181°C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65-7.58 (m, 2H), 7.52-7.46 (m, 3H), 6.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.3 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.99 (m, 2H), 1.44 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 178.4, 165.9, 161.3, 153.7, 151.4, 133.3, 127.8, 126.8, 125.0, 122.9, 116.9, 116.2, 107.8, 102.4, 81.7, 68.1. IR (neat) : 3225, 1713, 1684, 1619, 1488, 1367, 1321, 1276, 1237 cm⁻¹; ESI-MS: 401 [M+H]⁺. HRMS 400.1634 calcd for C₂₁H₂₄N₂O₆, found 400.1646.



tert-butyl-2-(2-(4-(3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propyl amino)-4-oxobutoxy)-4-hydroxyphenylazo)benzoate **10**

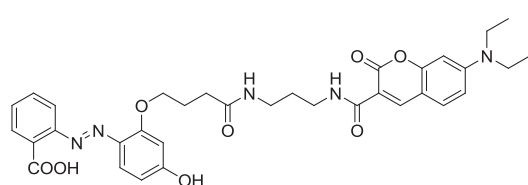


Compound **1** (247 mg, 0.59 mmol) was dissolved in DMF (6.0 mL) and TEA (205 μ L, 1.47 mmol), compound **9** (196 mg, 0.49 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and PyBOP (307 mg, 0.59 mmol) was added. The solution was allowed to reach room temperature

and stirred for 3 hours. 1M HCl (50 mL) was added to the reaction mixture and was extracted with EtOAc (3*50 mL). The organic layers were washed successively with 1M HCl (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL) and dried over Na_2SO_4 . The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 95:5) to yield **10** as an orange solid (157 mg, 46%).

Rf: 0.42 (DCM/MeOH 95:5); m.p. 83-87°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 13.75 (s, 1H), 8.87 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.92 (dd, $J = 5.2, 8.3$ Hz, 2H), 7.50 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J = 2.5, 9.0$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.32 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.26 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.44-3.39 (m, 6H), 3.23 (dt, $J = 5.5, 6.1$ Hz, 2H), 2.41-2.39 (m, 4H), 1.71-1.65 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.21 (t, $J = 7.00$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ 187.1, 171.8, 166.9, 164.4, 162.9, 159.5, 157.9, 152.9, 148.3, 145.2, 139.8, 134.2, 131.4, 131.3, 130.7, 125.5, 122.7, 115.9, 115.5, 110.3, 109.9, 108.5, 106.1, 96.7, 82.5, 69.5, 45.3, 36.5, 36.1, 33.1, 29.9, 28.5, 24.2, 12.6; IR (neat) : 2975, 1698, 1618, 1582, 1533, 1509, 1437, 1417, 1135 cm^{-1} ; ESI-MS: 700 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 722 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS 699.3268 calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_8$, found 699.3289.

2-((2-(4-(3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propylamino)-4-oxobutoxy)-4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoic acid **2**

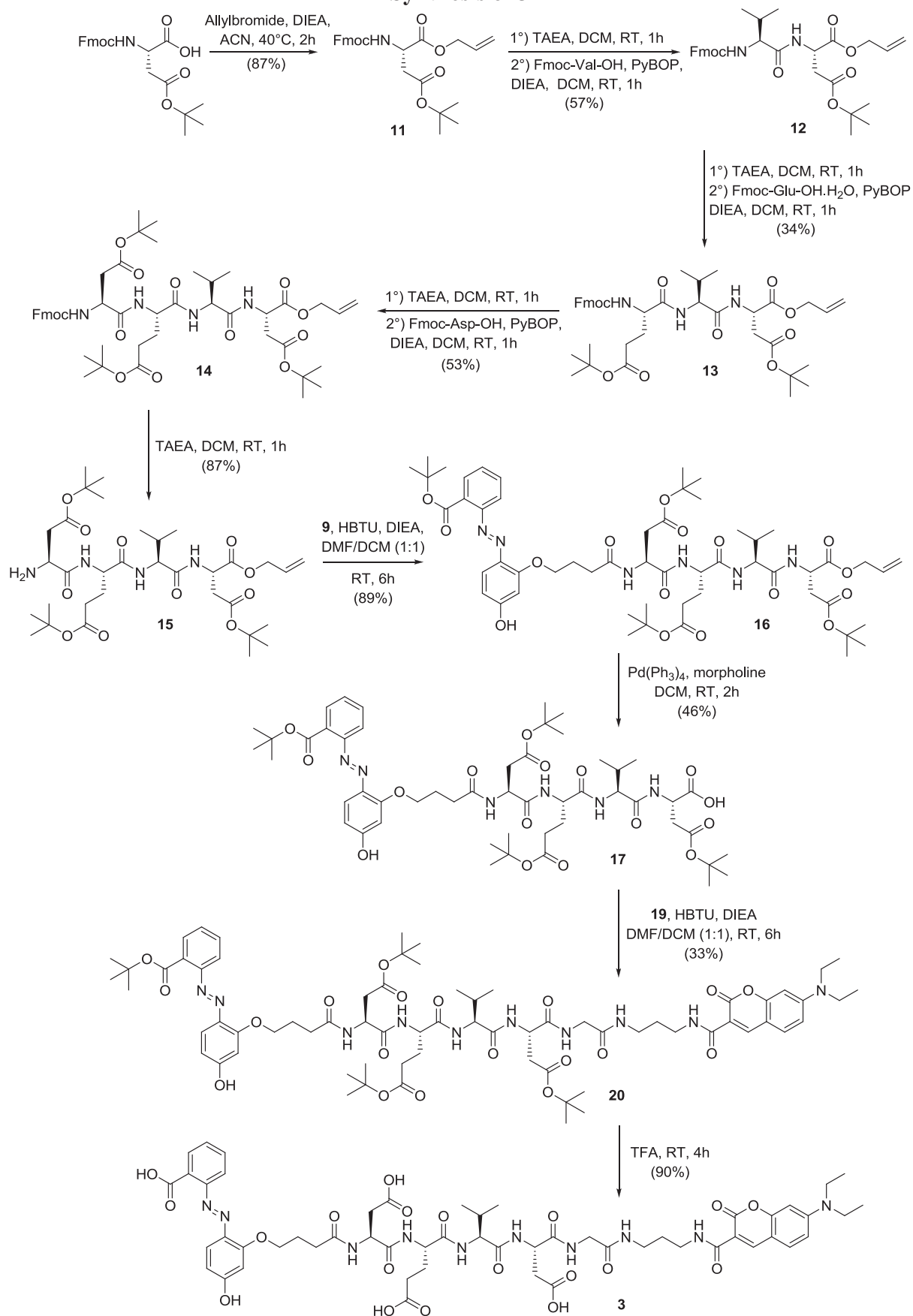


10 (66 mg, 0.1 mmol) was dissolved in DCM (1.2 mL), cooled to 0°C in an ice bath and TFA (0.6 mL) was added. The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 16 hours. The

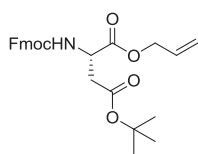
reaction was monitored by TLC. The TFA was removed under reduce pressure and coevaporated with toluene. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound **2** as a red solid (59 mg, quant.).

m.p. 126°C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.68 (t, d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.89 (t, d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.67-7.57 (m, 3H), 7.52-7.46 (m, 3H), 6.79 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 6.6 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.56 (br, 1H), 6.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.29 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.09 (dt, *J* = 5.5, 6.7 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.07-1.99 (m, 2H), 1.65-1.68 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.03 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.6, 168.2, 162.2, 161.6, 158.3, 157.2, 152.4, 147.6, 131.9, 131.5, 129.5, 117.3, 110.1, 109.5, 107.6, 95.9, 68.3, 44.3, 36.7, 36.2, 31.6, 29.4, 24.7, 12.3; IR (neat) : 3324, 2973, 1698, 1618, 1509, 1233 cm⁻¹; ESI-MS: 644 [M+H]⁺ and 667 [M+Na]⁺. HRMS 643.2642 calcd for C₃₄H₃₇N₅O₈, found 643.2654.

Synthesis of 3



Fmoc-Asp(OtBu)-OAll **11**



This compound was synthesized according to the described procedure.¹³ Fmoc-Asp-OH (3.0 g, 7.4 mmol) was added to a mixture of acetonitrile (15.0 mL) and allyl bromide (17.6 mL). DIEA (2.7 mL, 15.5 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 4 hours at 40 °C. Ethyl acetate (200 mL) was added, and organic layer was washed with aq half-saturated KHSO₄ (100 mL), half-saturated NaHCO₃ (100 mL), brine (100 mL) and dried over Na₂SO₄. Silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc 9:1 to 1:1) gave the compound **11** (3.0 g, 91%) as yellow oil.

Rf : 0.62 (Cyclohexane/EtOAc 7:3); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60-7.57 (m, 2H), 7.38 (dd, *J* = 6.9, 7.5 Hz, 2H), 7.31-7.27 (m, 2H), 5.94-5.80 (m, 2H), 5.32 (dd, *J* = 1.2, 17.1 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 1.2, 10.6 Hz, 1H), 4.70-4.60 (m, 3H), 4.41 (dd, *J* = 7.4, 10.0 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J* = 7.4, 10.0 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.96 (dd, *J* = 4.7, 17.0 Hz, 1H), 2.77 (dd, *J* = 4.7, 17.0 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 170.6, 170.0, 156.0, 143.9, 143.8, 141.3, 131.5, 127.7, 127.1, 125.2, 125.1, 120.0, 118.8, 81.9, 67.3, 66.3, 50.7, 47.2, 37.8, 28.1.

General procedure for peptide synthesis in solution

The deprotection and coupling conditions for peptide synthesis were used as previously described with slight modifications.¹⁴ Fmoc-AA₁-R (1.0 mmol) was dissolved in dichloromethane (4.5 mL), TAEA (4.5 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. After conversion has been verified by TLC, EtOAc (15 mL) was added and organic layer was washed with brine (10 mL) and extracted three times with phosphate buffer (Na₂HPO₄ NaH₂PO₄ pH 5.5) (10 mL). The aqueous fractions were discarded and the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrate to dryness. Resulting reaction crude was directly engaged in peptide coupling without further purification. H₂N-AA₁-R was dissolved in DCM (3.6 mL) and Fmoc-AA₂-OH (1.1 mmol) was added to the solution. After DIEA addition (1.5 mmol), PyBOP (1.1 mmol) was directly added to the reaction mixture. After the solution was stirred for 1 hour at room temperature, 1M HCl solution (5 mL) was added and reaction mixture was extracted with DCM (2*10 mL). Organic layers were combined and washed with sat NaHCO₃ solution (20 mL), brine (20 mL) and dried over Na₂SO₄. Crude was purified by silica gel chromatography to give pure Fmoc-AA₂-AA₁-R.

Fmoc-Val-Asp(OtBu)-OAll **12**

This compound was synthesized using **11** (3.01 mmol) and Fmoc-Val-OH (3.31 mmol), following the general procedure for peptide synthesis. The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (1:0 to 1:1) to give **12** (2.1 g, 57%) as a white powder.

Rf : 0.37 (Cyclohexane/EtOAc 7:3); m.p. 134-136°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.91-5.81 (m, 1H), 5.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.31-5.20 (m, 2H), 4.87-4.83 (m, 1H), 4.67-4.56 (m, 2H), 4.42-4.30 (m, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 5.5, 8.5 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 4.1, 17.0 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 4.1, 17.0 Hz, 1H), 2.18-2.10 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 0.98 (dd, *J* = 7.0, 15.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 171.0, 170.4,

¹³ Hamzavi, R.; Dolle, F.; Tavitian, B.; Otto Dahl O.; Nielsen, P. E. *Bioconjugate Chem* **2003**, 5, 941-954.

¹⁴ Peterson, Q. P.; Goode, D. R.; West, D. C.; Botham, R. C.; Hergenrother, P. J. *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 294-302.

156.5, 144.1, 144.0, 141.5, 131.6, 127.9, 127.3, 125.3, 120.2, 119.1, 82.2, 67.3, 66.5, 60.3, 48.8, 47.4, 37.4, 31.8, 28.2, 19.2, 17.9; IR (neat) : 3293, 2964, 1724, 1649, 1535 cm^{-1} ; ESI-MS 573 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS 550.2679 calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$, found 550.2696.

Fmoc-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-OAll **13**

This compound was synthesized using **12** (3.83 mmol) and Fmoc-Glu(OtBu)-OH.H₂O (4.21 mmol), following the general procedure for peptide synthesis. The crude was purified by chromatography on silica gel using DCM/EtOAc (1:0 to 8:2) to give **13** (0.95 g, 34%) as a white powder.

Rf : 0.42 (DCM/EtOAc 8:2); m.p. 182°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.74 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.39-7.36 (m, 2H), 7.30-7.27 (m, 2H), 6.99 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.90-5.76 (m, 2H), 5.31-5.26 (m, 1H), 5.22-5.20 (m, 1H), 4.84-4.82 (m, 1H), 4.66-4.55 (m, 2H), 4.40-4.18 (m, 5H), 2.95 (dd, J = 4.3, 17.0 Hz, 1H), 2.70 (dd, J = 4.1, 17.0 Hz, 1H), 2.48-2.32 (m, 2H), 2.22-2.05 (m, 2H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 0.95 (dd, J = 6.4, 9.5 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 173.3, 171.5, 170.6, 170.4, 156.5, 144.1, 144.0, 141.5, 131.7, 127.9, 127.3, 125.3, 120.2, 119.1, 82.2, 81.4, 67.4, 66.5, 58.7, 54.7, 48.8, 47.4, 37.4, 32.1, 31.4, 28.5, 28.3, 28.2, 19.3, 17.9; IR (neat) : 3291, 1729, 1641, 1536, 1150 cm^{-1} ; ESI-MS 758 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS 735.3731 calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{10}$, found 735.3751.

Fmoc-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-OAll **14**

This compound was synthesized using **13** (1.29 mmol) and Fmoc-Asp(OtBu)-OH (1.42 mmol), following the general procedure for peptide synthesis. The crude was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/EtOAc (1:0 to 7:3) to give **14** (0.62 g, 53%) as a white powder.

Rf : 0.20 (DCM/EtOAc 8:2); m.p. 166°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.73 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.59-7.6 (m, 2H), 7.37 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.89-5.80 (m, 1H), 5.29-5.25 (m, 1H), 5.21-5.18 (m, 1H), 4.84-4.80 (m, 1H), 4.65-4.19 (m, 8H), 2.94-2.88 (m, 2H), 2.74-2.62 (m, 2H), 2.48-2.31 (m, 2H), 2.23-1.94 (m, 3H), 1.43-1.40 (m, 27H), 0.93 (dd, J = 6.4, 8.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 173.7, 171.1, 170.8, 170.5, 170.3, 156.3, 144.0, 143.9, 141.5, 131.7, 127.9, 127.3, 125.3, 120.2, 119.0, 82.1, 82.0, 81.3, 67.6, 66.4, 58.8, 51.7, 48.9, 47.3, 37.7, 37.4, 32.0, 30.9, 28.3, 28.2, 27.4, 19.4, 18.0; IR (neat) : 3274, 1727, 1633, 1533, 1366, 1147 cm^{-1} ; ESI-MS 929 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd 906.4626 for $\text{C}_{48}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_{13}$, found 906.4646.

H₂N-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-OAll **15**

14 (543 mg, 0.6 mmol) was dissolved in dichloromethane (15 mL), piperidine (15 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. After conversion has been verified by TLC, EtOAc (50 mL) was added and organic layer was washed with 1M HCl solution (2*50 mL), sat. NaHCO₃ solution (50 mL), brine (50 mL) and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel using DCM/EtOAc (1:1) and then DCM/MeOH (95:5) to give **15** (358 mg, 87%) as a white powder.

Rf : 0.44 (DCM/MeOH 95:5); m.p. 117°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.90-5.80 (m, 1H), 5.30-5.26 (m, 1H), 5.22-5.19 (m, 1H), 4.81 (td, J = 4.5, 8.4 Hz, 1H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.42-4.37 (m, 1H),

4.27-4.24 (m, 1H), 3.64 (dd, $J = 3.9, 8.0$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 4.4, 16.7$ Hz, 1H), 2.80-2.67 (m, 2H), 2.56 (dd, $J = 7.9, 16.7$ Hz, 1H), 2.43-2.29 (m, 2H), 2.20-2.07 (m, 2H), 1.97-1.88 (m, 1H), 1.42-1.39 (m, 27H), 0.93 (dd, $J = 7.0, 7.5$ Hz, 6H); (100 MHz, CDCl_3-d_1) δ 173.9, 172.8, 171.2, 171.0, 170.5, 170.3, 170.2, 131.52, 118.9, 81.9, 81.3, 80.9, 66.2, 58.5, 52.8, 52.1, 48.6, 40.3, 37.2, 31.9, 31.0, 27.6, 19.1, 17.7; IR (neat) : 3272, 1725, 1627, 1540, 1366, 1147 cm^{-1} ; ESI-MS 685 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 707 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd 684.3945 for $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{11}$, found 684.3949.

CDQ(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-OAll **16**

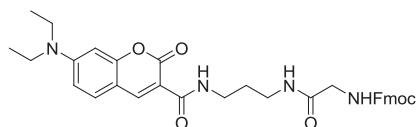
15 (325 mg, 0.48 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/DMF (1:1) (4.0 mL) and DIEA (124 μL , 0.71 mmol), compound **9** (209 mg, 0.52 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and HBTU (195 mg, 0.52 mmol) was added. The solution was allowed to reach room temperature and stirred for 6 hours. At the mixture was added 1N HCl (50 mL) and it was extracted with EtOAc (3*50 mL). The organic layers were washed successively with 1M HCl solution (2*50 mL), sat. NaHCO_3 solution (50 mL), brine (50 mL) and dried over Na_2SO_4 . The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 1:1 to 0:1) to yield **16** as an orange solid (450 mg, 89%).

Rf : 0.27 (DCM/EtOAc 3:7); m.p. $124-128^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 13.76 (s, 1H), 7.93 (t, $J = 9.4, 16.7$ Hz, 2H), 7.56-7.50 (m, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 7.10-7.04 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.32 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.88-5.81 (m, 1H), 5.29-5.26 (m, 1H), 5.20-5.18 (m, 1H), 4.83-4.79 (m, 1H), 4.70-4.67 (m, 1H), 4.63-4.55 (m, 2H), 4.33-4.24 (m, 4H), 2.87 (dd, $J = 5.0, 16.8$ Hz, 2H), 2.72 (dd, $J = 5.2, 16.8$ Hz, 1H), 2.72 (dd, $J = 6.0, 16.8$ Hz, 1H), 2.46-2.33 (m, 4H), 2.17-2.03 (m, 2H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.58 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 18H), 0.91 (dd, $J = 6.8, 9.7$ Hz, 6H); (100 MHz, CDCl_3-d_1) δ 187.1, 173.7, 172.0, 171.4, 171.1, 171.0, 170.6, 170.2, 166.9, 159.6, 145.1, 140.0, 134.3, 131.8, 131.4, 130.6, 125.4, 122.9, 118.9, 115.9, 115.6, 106.2, 82.4, 82.2, 82.0, 81.3, 69.3, 66.4, 58.8, 53.6, 50.0, 49.0, 37.5, 37.1, 32.4, 32.0, 30.9, 28.4, 28.3, 28.2, 27.7, 23.8, 19.4, 18.2; IR (neat) : 3275, 1728, 1630, 1493, 1366, 1149 cm^{-1} ; ESI-MS 1067 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS 1066.5474 calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{16}$, found 1066.5498.

CDQ(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-OH **17**

To a stirred solution of **16** (95 mg, 0.09 mmol) in degassed DCM (9 mL) were added morpholine (24 μL , 0.27 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (11 mg, 0.01 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. After completion of the reaction, the mixture was diluted with water (10 mL), extracted with DCM and dried over Na_2SO_4 . Product presence was confirmed by LC-MS and crude reaction was directly engaged in the next step.

Fmoc-Gly-DEAC **18**



To a stirred solution of **1** (231 mg, 0.55 mmol) in DMF (3.7 mL), were added successively, DIEA (144 μL , 0.83 mmol) and Fmoc-Gly-OH (148 mg, 0.5 mmol). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath then HBTU (210 mg, 0.55 mmol) was added. Stirring was continued for 16 hours while the mixture was warmed up to room temperature. The reaction mixture was poured into a solution of 1M HCl solution (20 mL) and extracted two times by EtOAc (2*50 mL). The organics layers were washed successively with two times water (2*50

mL) and brine (50 mL) then dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduce pressure. Silica gel chromatography (DCM/MeOH 1:0 to 97:3) gave the compound **18** (200 mg, 61%) as a yellow powder.

Rf : 0.27 (DCM/MeOH 95:5); m.p. 150°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 8.89 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.34-7.21 (m, 6H), 6.53 (dd, *J* = 2.5, 9.0 Hz, 1H), 6.4 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.95 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.19 (t, *J* = 7.2, 1H), 3.93 (d, *J* = 5.5, 1H), 3.49-3.45 (m, 2H), 3.39-3.30 (6H), 1.77-1.71 (m, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 169.2, 164.1, 157.7, 156.7, 152.7, 148.3, 144.0, 141.3, 131.3, 127.7, 127.1, 125.3, 120.0, 110.1, 109.8, 108.4, 96.6, 67.2, 47.3, 45.2, 44.7, 38.7, 36.7, 12.5; IR (neat) : 3324, 2973, 2931, 1698, 1645, 1580, 1502, 1416, 1349, 1230 cm⁻¹; ESI-MS 597 [M+H]⁺ and 619 [M+Na]⁺. HRMS 596.2635 calcd for C₃₄H₃₆N₄O₆, found 596.2632.

*H*₂N-Gly-DEAC **19**

To a stirred solution of **18** (121 mg, 0.20 mmol) in DCM (5 mL) was added piperidine (0.5 mL) and reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. After completion of the reaction, the mixture was diluted with water (10 mL), extracted with DCM (20 mL) and dried over Na₂SO₄. Product presence was confirmed by LC-MS and crude reaction was directly used for peptide coupling.

CDQ(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Asp(OtBu)-Gly-DEAC **20**

Crude reaction mixture of **17** (94 mg, 0.09 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/DMF (1:1) (4.0 mL) and DIEA (41 μL, 0.23 mmol), compound **19** (76 mg, 0.20 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and HBTU (38 mg, 0.1 mmol) was added. The solution was allowed to reach room temperature and stirred for 16 hours. 1M HCl (50 mL) was added to reaction mixture and it was extracted with EtOAc (3*50 mL). The organic layers were washed successively with 1M HCl solution (2*50 mL), brine (50 mL) and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 97:3 to 95:5) to yield **20** as an orange solid (43 mg, 33% yield for two steps).

Rf : 0.39 (DCM/MeOH 95:5); m.p. 178°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 13.72 (s, 1H), 8.84 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.93-7.88 (m, 3H), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.55-7.41 (m, 5H), 7.23-7.22 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 2.5, 9.0 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.28 (dd, *J* = 1.8, 9.6 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.72-4.65 (m, 2H), 4.27-4.18 (m, 3H), 4.10-4.00 (m, 2H), 3.78 (dd, *J* = 5.8, 16.8 Hz, 1H), 3.44-3.38 (m, 5H), 3.35-3.27 (m, 2H), 3.19-3.13 (m, 1H), 2.85-2.74 (m, 4H), 2.56-2.31 (m, 6H), 2.16-1.91 (m, 3H), 1.79-1.70 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 1.36 (s, 9H), 1.33 (s, 9H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 187.1, 174.1, 172.7, 172.5, 172.4, 171.7, 171.5, 171.1, 170.9, 169.6, 166.9, 163.6, 162.8, 159.7, 157.8, 152.8, 148.3, 145.0, 140.0, 134.4, 131.5, 131.3, 130.5, 125.3, 123.0, 115.8, 115.6, 110.2, 110.1, 108.6, 106.0, 96.7, 82.4, 82.2, 81.7, 81.4, 69.3, 60.9, 54.9, 51.0, 50.2, 45.3, 43.7, 37.3, 37.1, 36.9, 36.7, 32.3, 32.1, 29.7, 29.5, 28.5, 28.3, 28.2, 27.0, 23.9, 19.5, 19.2, 12.7; IR (neat) : 3290, 2974, 1731, 1697, 1630, 1510, 1152, 1136 cm⁻¹; ESI-MS 1381 [M-H]⁻. HRMS calcd 1382.7009 for C₇₀H₉₈N₁₀O₁₉, found 1382.7015.

CDQ-Asp(OH)-Glu(OH)-Val-Asp(OH)-Gly-DEAC **3**

20 (20 mg, 0.014 mmol) was dissolved in TFA (0.4 mL) and reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hours. After completion of the reaction, crude was purified by preparative HPLC without further work-up and gave **3** (14 mg, 90%) as an orange solid.

¹H NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ 9.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 9.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 9.55 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.34-9.29 (m, 2H), 9.05 (s, 1H), 8.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.45-8.42 (m, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.61-7.59 (m, 3H), 7.54-7.51 (m, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 2.1, 9.1 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 2.1, 9.1 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.41 Hz, 1H), 5.58-5.45 (m, 1H), 5.17-5.13 (m, 2H), 4.82 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 5.8, 16.8 Hz, 1H), 4.33-4.26 (m, 3H), 3.7 (td, *J* = 6.1, 7.4 Hz, 2H), 3.63-3.56 (m, 4H), 3.42 (dd, *J* = 7.3, 16.5 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 7.3, 16.5 Hz, 1H), 3.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.00-2.86 (m, 2H), 2.80-2.66 (m, 3H), 2.58-2.43 (m, 4H), 1.95 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.08 (dd, *J* = 6.8, 8.9 Hz, 6H), 1.01 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ 175.20, 173.7, 173.6, 172.9, 172.8, 172.6, 172.3, 171.6, 170.2, 169.3, 162.9, 162.1, 158.6, 157.3, 152.1, 147.7, 132.0, 131.1, 130.9, 115.4, 110.1, 109.6, 108.0, 103.9, 95.9, 68.4, 59.9, 54.0, 51.0, 50.9, 44.2, 43.3, 36.7, 36.5, 36.4, 36.3, 32.0, 30.8, 30.1, 29.5, 27.2, 24.4, 18.9, 18.5, 11.7; ESI-MS 1157 [M-H]⁻. HRMS 1158.4505 calcd for C₅₄H₆₆N₁₀O₁₉, found 1158.4485.

III.6. Travaux préliminaires pour l'optimisation du système de quencheur chimiquement désactivable

Lors de l'étude précédente, un quencheur chimiquement désactivable a été conçu et utilisé pour révéler la présence de sondes pro-fluorescentes de type FRET non-activées.⁷³ La désactivation chimique de ce quencheur Azo par le dithionite a été démontrée en solution et en cellules vivantes. Bien que très efficace, le système développé a révélé deux limitations majeures :

- la gamme spectrale du quencheur Azo, permettant uniquement l'extinction de fluorophores émettant entre 400 et 500 nm.
- l'utilisation de dithionite de sodium comme agent chimique de désactivation. En solution, l'oxydation de ce réactif ne permet pas d'utiliser une concentration inférieure à 1 mM. En cellules vivantes, cet agent réducteur peut être toxique selon les conditions utilisées et sa diffusion à travers les membranes cellulaires est limitée.

Pour dépasser ces inconvénients et généraliser le concept de quencheur chimiquement désactivable, des travaux préliminaires ont été effectués pour rechercher :

- des quencheurs sensibles au dithionite pour l'ensemble de la gamme spectrale des fluorophores.
- des agents chimiques biocompatibles capables de désactiver un quencheur Azo.

III.6.1. Recherche de quencheurs chimiquement désactivables et absorbant à hautes longueurs d'ondes

Pour généraliser le concept de quencheur chimiquement désactivable à l'ensemble de la gamme des fluorophores, nous nous sommes intéressés à rechercher des composés Azo absorbants à hautes longueurs d'ondes et sensibles au dithionite.

Lorsque ce projet a été réalisé, les composés de type BHQ (Black Hole Quencher) étaient les seules structures Azo publiées comme quencheurs absorbants au-delà de 600 nm.⁹⁸ En réalité, le nom général de BHQ fait référence à trois quencheurs permettant de désactiver des fluorophores compris entre 480 et 730 nm (Figure 31). Les BHQ-1 et 2 sont des structures basées sur des motifs di-Azo similaires. Leurs différences d'absorption est dépendante de la substitution des noyaux aromatiques (Figure 31B). Le BHQ-3 est, quant à lui, un composé Azo simple dont l'un des cycles aromatiques est un dérivé de phénazine. Cette structure lui

confère d'excellentes propriétés d'extinction entre 620 et 730 nm. Si les trois composés BHQ sont décrits comme d'excellents quencheurs, il n'existe que très peu d'information à propos de leurs sensibilités vis-à-vis de milieux réducteurs. En 2010, Nagano *et al.* ont cependant démontré que le BHQ-3 pouvait être réduit *in-vivo* par un milieu hypoxique.¹⁰³

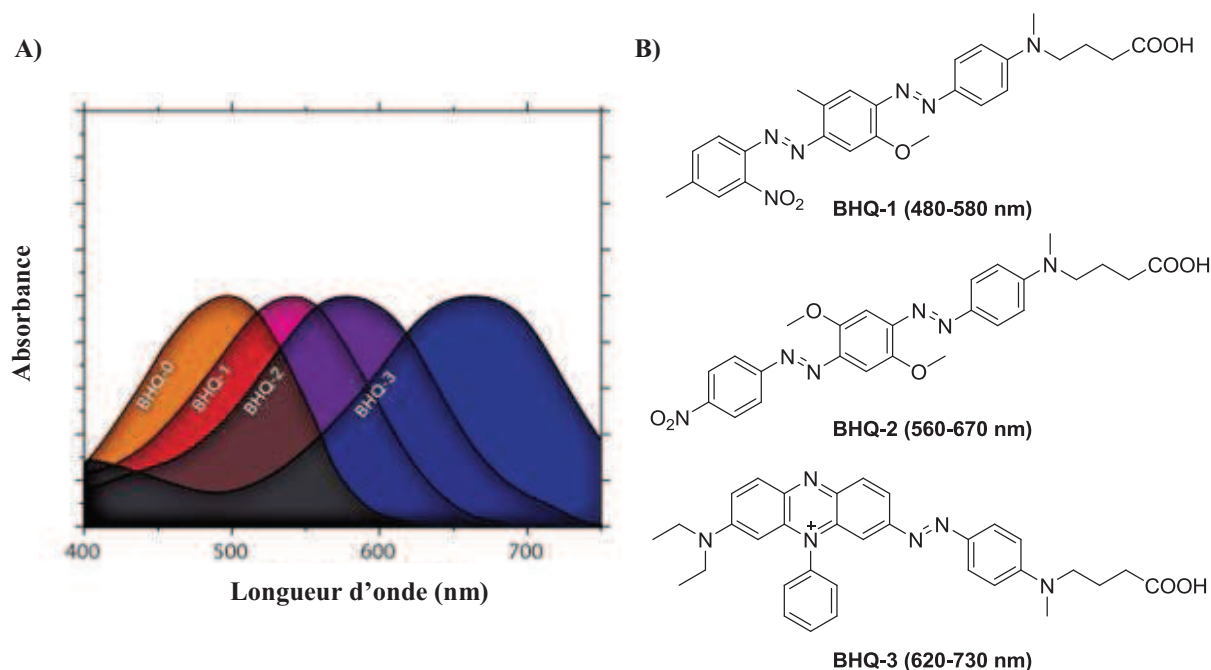


Figure 31 : A) Spectres d'absorption des différents quencheurs de type BHQ (image tirée de <http://www.biosearchtech.com>); B) Structures chimiques des BHQ-1, 2 et 3.

Dans un premier temps, les réactivités des trois quencheurs BHQ-1, -2 et -3 vis-à-vis du dithionite ont été mesurées par spectrophotométrie UV-Visible. Chaque composé a été utilisé à une concentration 50 μM dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,4). Pour ces expériences, une concentration en dithionite de 6 mM a été utilisée. Les cinétiques de réaction ont été enregistrées à 509, 585 et 660 nm respectivement pour les BHQ-1, -2 et -3 (Figure 32).

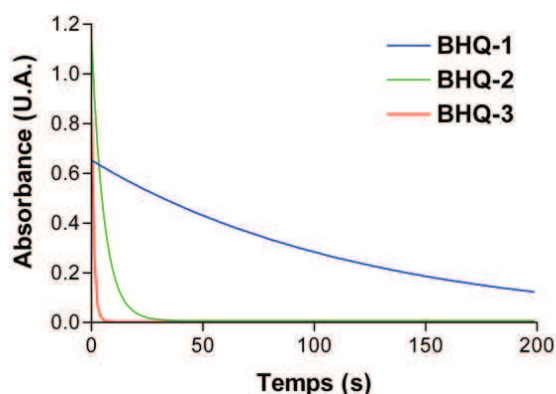


Figure 32 : Cinétiques de réduction de quencheurs BHQ (50 μM) par du dithionite (6 mM). Enregistrées à 509 nm (BHQ-1), 585 nm (BHQ-2), 660 nm (BHQ-3).

En présence de 6 mM de dithionite, une réduction quasi-instantanée a été observée pour le BHQ-3 ($t_{1/2} < 1$ s) (Figure 32). En revanche, des temps de demi-vie plus long de 83 et 5 secondes ont été mesurés respectivement pour les BHQ-1 et 2. Cette forte sensibilité du BHQ-3 pour des milieux réducteurs a donc confirmé les résultats obtenus par Nagano et *al.*¹⁰³

Compte tenu des cinétiques de désactivation observées pour le composé **23** ($t_{1/2} < 1$ s), le dérivé BHQ-3 nous est apparu comme un excellent candidat pour une désactivation chimique par le dithionite. Cependant, la stabilité de ce composé en milieu cellulaire normoxique reste à démontrer.

Précédemment, une importante différence de cinétique a été observée entre la désactivation chimique de **24** en solution ($[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4]$ 1 mM, 20 s) et en cellules vivantes ($[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4]$ 10 mM, 45 min) (voir section III.5.). Aux vues des cinétiques observées en solution pour les composés BHQ-1 et -2, leurs réductions *in-cellulo* ne peuvent pas être envisagées. Des concentrations trop importantes en dithionite seraient nécessaires. Une autre stratégie pourrait consister à modifier chimiquement la structure de ces composés pour les rendre plus réactifs envers le dithionite. Par exemple, un noyau aromatique de type *O*-alkyl résorcinol pourrait être utilisé à la place du cycle dialkyl aniline. Comme cela a été montré avec les composés **17** et **Dabcyl**, cette modification devrait augmenter les cinétiques de réduction par le dithionite sans modifier fortement le spectre d'absorption de ces composés (voir section III.4.1.). Ces travaux sont actuellement en cours au laboratoire.

Dans une approche différente d'optimisation du système de quencheur chimiquement désactivable, une méthode de criblage a été développée pour l'identification de réactifs chimiques capables de désactiver des quencheurs Azo.

III.6.2. Recherche de réactifs biocompatibles pour la désactivation de quencheur Azo

Pour permettre une meilleure désactivation chimique des quencheurs Azo en cellules vivantes et de façon biocompatible, il est nécessaire de trouver des réactifs permettant de jouer sur : la cinétique de désactivation, et/ou la concentration d'agent chimique, et/ou le temps d'incubation. Comparé au dithionite, un nouveau réactif de désactivation doit ainsi posséder une des caractéristiques suivantes :

- être plus réactif.
- être plus stable.
- être moins cytotoxique.
- posséder une meilleure perméabilité membranaire.

Dans la littérature, aucune étude ne compare la réactivité de différents agents chimiques vis-à-vis de la réduction du motif Azo. Pourtant, la réduction de ce type de structure est au cœur d'une problématique pour le retraitement des déchets de l'industrie des colorants. Cependant, la voie privilégiée est une élimination par des méthodes biochimiques.¹⁰⁴

A partir du composé fluorescent **23**, une méthode de criblage a donc été développée pour identifier des réactifs capables de désactiver les propriétés d'extinction du quencheur de cette sonde. En fonction des cinétiques de désactivation observées, ces réactifs seront utilisés de manière différente :

- si sa vitesse de désactivation est plus rapide que celle du dithionite, alors ce réactif sera directement testé sur cellules vivantes.
- si sa vitesse de désactivation est plus lente que celle du dithionite, alors sa stabilité et sa cytotoxicité seront mesurées. Nous pourrions ainsi envisager l'utilisation de concentrations importantes et/ou de temps d'incubation longs pour compenser le manque de réactivité.

III.6.2.1. Présentation de la méthode de criblage

Pour identifier rapidement des réactifs (R_x) capables de désactiver chimiquement des quencheurs Azo, une méthode de criblage a été développée en plaques 96 puits. Celle-ci a consisté au suivi cinétique, par mesure de la fluorescence, de la désactivation du quencheur de **23**. Le dithionite de sodium a été désigné comme réactif de référence pour une désactivation totale. La réactivité de chaque agent chimique a été exprimée en pourcentage de désactivation par rapport au signal du dithionite (Figure 33). La stabilité chimique du

fluorophore **DEAC** vis-à-vis de chaque réactif (Rx) a également été vérifiée. Ainsi, chaque réactif a nécessité quatre expériences réalisées en parallèles (Figure 33) :

- **A** : Le composé fluorophore-quencheur **23** dans un tampon phosphate pour confirmer la stabilité du composé dans le tampon.
- **B** : Le composé fluorophore-quencheur **23** et le réactif R_x dans un tampon phosphate pour mesurer la désactivation du quencheur.
- **C** : Le composé **19** dans un tampon phosphate pour confirmer la stabilité du fluorophore dans le tampon.
- **D** : Le fluorophore **19** et le réactif R_x dans un tampon phosphate pour vérifier la stabilité chimique du fluorophore vis-à-vis du réactif.

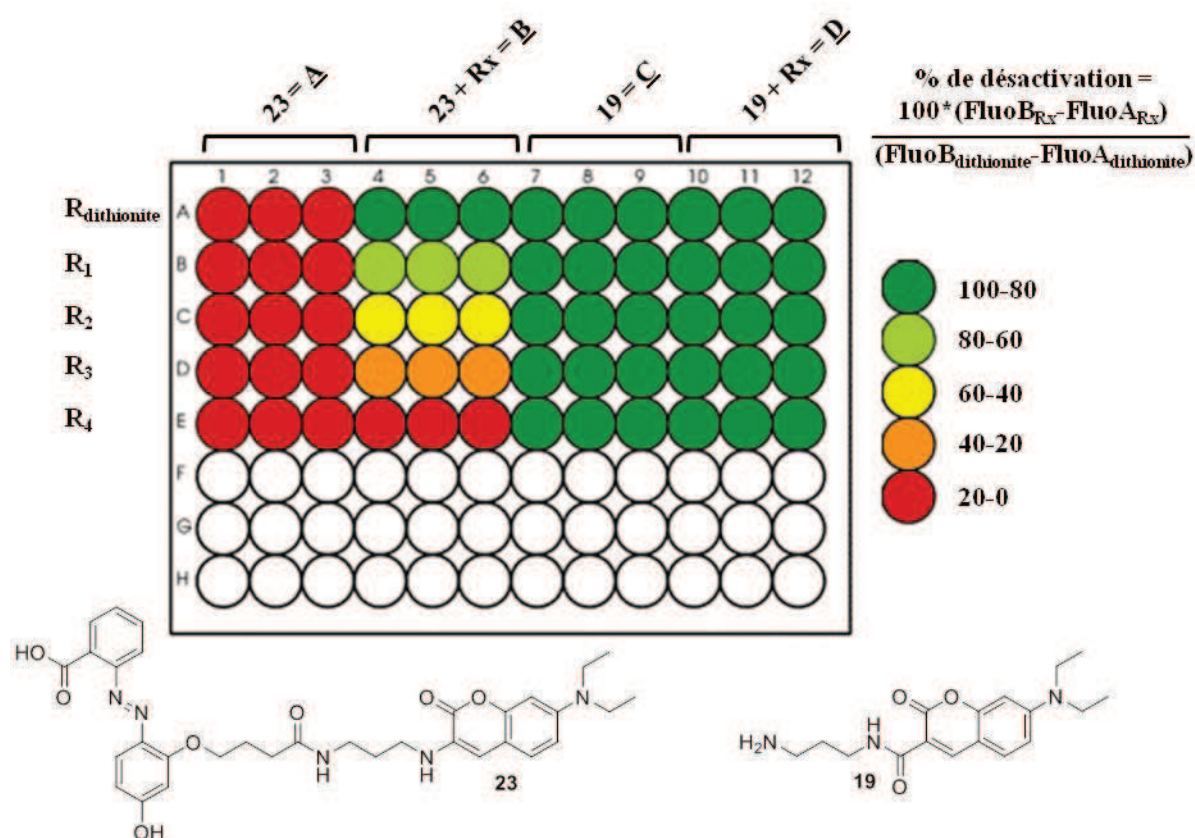


Figure 33 : Représentation schématique des conditions utilisées pour le criblage d'agents chimiques permettant la désactivation de quencheurs Azo.

Chaque condition a été répétée trois fois pour le calcul d'une valeur moyenne. Afin d'obtenir un signal suffisant pour une quantification, les composés **19** et **23** ont été utilisés à 5 μM .

III.6.2.2. Choix des réactifs et résultats

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés au criblage d'un large éventail d'agents réducteurs (Figure 5, entrées 1-34), connus ou non pour la réduction de fonctions Azo. Les composés ainsi testés se divisent en plusieurs catégories :

- Des sulfites utilisés pour la réduction de composés Azo, azoxy, nitro et hydrazine.^{105,106}
- Des composés organophosphorés comme des phosphites ou des phosphines respectivement connus pour les réductions de groupements nitro aromatiques¹⁰⁷ ou d'azoture avec la réaction de Staudinger.¹⁰⁸
- Des acides sulfoniques comme l'acide sulfonique de formamidine, capable de réduire du fer en conditions biocompatibles.¹⁰⁹
- Des dérivés d'hydrazine utilisés pour les réductions de cétones en alcanes dans la réaction de Wolff-Kishner¹¹⁰ ou la réduction d'Azo.¹¹¹
- Des réducteurs doux utilisés en biologie comme le TCEP,¹¹² le dithiothréitol¹¹³ ou le glutathion¹¹⁴ pour réduire des ponts disulfures. Mais également de l'ascorbate de sodium ou du citrate de sodium respectivement utilisés dans des réactions de "click-chemistry" au cuivre¹¹⁵ et la réduction de nanoparticules d'or.¹¹⁶
- Des agents de réduction biochimiques comme le NADH et le NADPH.¹¹⁷
- Des sucres réducteurs dont le glucose capable de réduire des groupements nitro en composés Azo¹¹⁸ ou azoxy.¹¹⁹
- Des borohydrures ou des complexes de borane utilisés pour réduire de multiples fonctions en chimie organique.¹²⁰
- Des sels de métaux comme du chlorure d'étain¹²¹ ou du sulfate ferreux¹²² connus pour réduire des fonctions nitro.
- Des composés organiques donneurs d'électrons comme le tétrathiofulvalène, capable de réduire de l'oxygène.¹²³

Pour leurs capacités à former des composés azoxy ou à cliver certains dérivés Azo,¹²⁴ des réactifs d'oxydation ont également été criblés comme des peroxydes, des sels métalliques, et des dérivés nitroso (Figure 5, entrées 35-40).

	Entrée	Réactifs (R _x)	% de désactivation
Réducteur	1	Dithionite	100
	2	Bisulfite de sodium en solution dans l'eau	49
	3	Bisulfite de sodium (en mélange avec du métabisulfite de sodium)	58
	4	Métabisulfite de sodium	61
	5	Sulfite de sodium	67
	6	Thiosulfate de sodium	0
	7	Phosphite de sodium	1
	8	Hypophosphite de sodium	3
	9	Phosphite de diéthyle	0
	10	Phosphite de triéthyle	0
	11	Triphenylphosphine	0
	12	Acide sulfinique de formamidine	34
	13	Acide L-cystéinesulfinique	0
	14	Acide benzènesulfinique	1
	15	Acide hydroxymethanesulfinique	4
	16	Acide methanesulfinique	3
	17	Thiosemicarbazide	1
	18	Hydrazine	1
	19	Carbohydrazine	0
	20	TCEP	14
	21	Dithiothréitol	1
	22	Glutathion	0
	23	Citrate de sodium	0
	24	Ascorbate de sodium + Sulfate de cuivre	0
	25	Ascorbate de sodium	0
	26	NaDH	0
	27	NaDPH	0
	28	Glucose	0
	29	Cyanoborohydrure de sodium	0
	30	Borohydrure de sodium	1
	31	Borane triméthylamine	1
	32	Chlorure d'étain	5
	33	Sulfate ferreux	3
	34	Tetrathiafulvalene	0
Oxydant	35	Sélénite de sodium	0
	36	Hypochlorite de sodium	0
	37	Sel de Fremy	1
	38	Periodate de sodium	1
	39	Persulfate d'ammonium	0
	40	Nitrite de sodium	0

Tableau 5 : Résultats du criblage de réactifs pour la désactivation du quencheur Azo de 23. A une concentration de 10 mM, chaque réactif a été incubé avec 23 (5 µM) pendant 1h.

Ne disposant pas de données de cytotoxicité pour l'ensemble des réactifs, tous ont été testés à une concentration de 10 mM dans un milieu tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) pendant 1 heure. Pour les réactifs organiques non solubles dans l'eau, 5% de méthanol ont été ajoutés au milieu réactionnel.

Parmi les réducteurs criblés, six d'entre eux ont permis la désactivation de plus de 10% du quencheur de **23** après 1 heure de réaction (Tableau 5, entrées 2-5, 12, 20). En revanche, les oxydants n'ont eu aucun effet sur la désactivation du quencheur de **23** (Tableau 5, entrées 35-40). Parmi les différents groupes de réducteurs choisis, les composés de type sulfites ont démontré les meilleurs résultats avec, par exemple, 67% de désactivation pour le sulfite de sodium (entrées 2-5). Basé sur un motif d'acide sulfinique comme le dithionite, l'acide sulfinique de formamidine a permis la désactivation de 34% du quencheur (entrée 12). En revanche, la substitution du groupement acétamidine par des groupements alkyl, hydroxyle ou aryle n'a pas permis d'augmenter cette réactivité (entrées 13-16). A l'exception du TCEP, les organophosphorés (entrées 7-11, 20) n'ont pas démontré d'activité, tout comme l'hydrazine et ses dérivés (entrées 17-19). Ce criblage a également pu confirmer l'orthogonalité du motif Azo vis-à-vis de réducteurs de pont disulfures (entrées 21-22) et de réducteurs biochimiques (26-27). Enfin, l'absence de réactivité observée pour les borohydrures peut être expliquée par une compétition entre la réaction de réduction leur hydrolyse (entrées 29-30).

Ce criblage n'a pas permis d'identifier des composés plus réactifs que le dithionite vis-à-vis de la désactivation du quencheur. En revanche, les six réducteurs identifiés peuvent offrir une alternative au dithionite si ces derniers se révèlent plus stables en solution et/ou moins cytotoxiques. Pour compenser leur manque de réactivité, ces composés devraient être incubés plus longtemps mais à plus faibles concentrations afin d'éviter une cytotoxicité. C'est pourquoi ils ont été testés à 2 mM pendant 1 heure. Pour évaluer la stabilité de ces réactifs vis-à-vis de l'oxydation en solution, des mesures à différents temps (t +15, 30, 60, 120, 180, 240, 1080 min) ont été réalisées à partir d'une même solution préparée à t +0. Comme précédemment, la réactivité de chaque agent chimique a été exprimée en pourcentage de désactivation par rapport au signal obtenu avec une solution fraîchement préparée de dithionite (Figure 34).

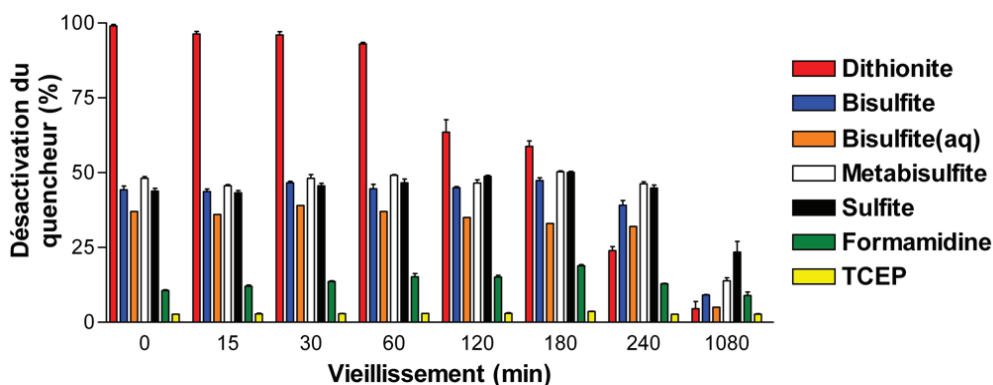


Figure 34 : Etude du vieillissement de solutions de réducteurs (2 mM) pour la désactivation du quencheur de 23 (5 μ M).

A $t + 0$, les solutions préparées à des concentrations de 2 mM en agent réducteur ont révélé des désactivations du quencheur comprises entre 40 et 50% pour les sulfites (Figure 34, $t + 0$). Comparée aux valeurs obtenues à 10 mM (Tableau 5), une diminution de la concentration d'un facteur 5 n'a donc pas radicalement changé les cinétiques de réaction. En revanche, pour l'acide sulfinique de formamidine et le TCEP, une plus faible concentration a respectivement abaissé le taux de désactivation à 12% et 2%. Les différentes solutions de réducteurs se sont révélées stables pendant les 30 minutes suivant leurs préparations. Après 60 minutes de vieillissement, le dithionite a été le premier composé à démontrer une baisse de réactivité avec 93% de désactivation du quencheur (Figure 34, $t + 60$). Puis, cette baisse s'est fortement accentuée au cours du temps, probablement du fait de l'hydrolyse oxydative du dithionite en bisulfite et thiosulfate, tous deux moins réactifs (Figure 34, $t + 120, 180, 240$).¹²⁵ Pour les autres réducteurs, les réactivités mesurées 4 heures après la préparation des solutions se sont révélées très proches de celles mesurées avec des solutions fraîches (Figure 34, $t + 0, 240$). Malgré de bonnes stabilités à des temps courts, aucune solution ne s'est révélée suffisamment stable pour être réactive 18 heures après sa préparation (Figure 34, $t + 1080$). Un maximum de 13% de désactivation a seulement été obtenu avec le métabisulfite de sodium.

Après avoir démontré la bonne stabilité des sulfites en solutions à 2 mM, leurs réactivités à 0,5 mM ont été étudiées (Figure 35).

A faible concentration, une importante chute de réactivité a été observée (Figure 35). Le dithionite n'a permis qu'une désactivation partielle du quencheur alors qu'aucune réactivité n'a été observée pour les autres réducteurs (Figure 35, $t + 0$). Au cours du temps, la stabilité du dithionite s'est également révélée plus faible (Figure 35, $t + 0, 15, 30, 60$).

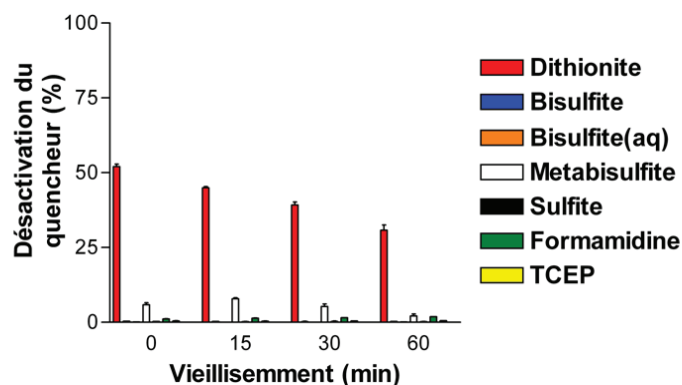


Figure 35 : Etude du vieillissement de solutions de réducteurs (0,5 mM) pour la désactivation du quencheur de 23 (5 μ M).

III.6.2.3. Test de cytotoxicité

Pour mesurer la cytotoxicité des différents réactifs identifiés, ces derniers ont été incubés avec des cellules de type HaCaT à une concentration de 10 mM pendant 1 heure. Puis, les cellules ont été lavées et mise en culture pendant 24 heures. A la fin de cette période, un test MTT a permis de mesurer le nombre de cellules vivantes. Pour chaque réactif, un pourcentage de viabilité a été exprimé par rapport à des cellules incubées sans agent chimique (Figure 36).

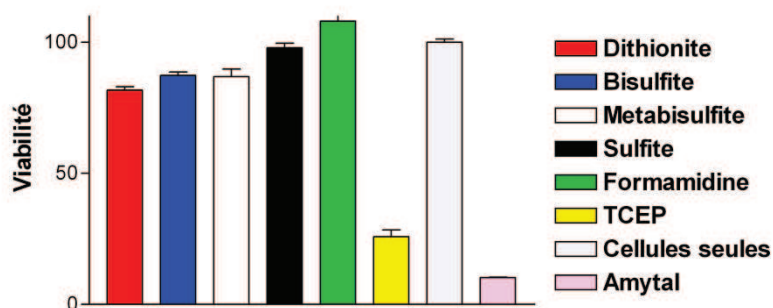


Figure 36 : Mesure de la cytotoxicité des réducteurs à l'aide d'un test MTT. Chaque réactif a été testé à 10 mM pendant 1 heure sur des cellules HaCaT. Contrôle positif = cellules seules. Contrôle négatif = cellules + amytal.

Les résultats de cytotoxicité démontrent une mort cellulaire supérieure à 70% pour le TCEP alors que le taux de survie avec le dithionite de sodium est proche de 80% (Figure 36). Les bisulfite et métabisulfite de sodium ont, quant à eux, montré des résultats équivalents avec environ 87% de viabilité. A une concentration de 10 mM pendant 1 heure d'incubation, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le sulfite de sodium et l'acide sulfinique de formamidine. Pour ces deux réactifs, des viabilités quasi-totales ont été calculées. Aux vues des cinétiques d'activation en solution, il est peu probable que l'un de ces réactifs puisse permettre une désactivation totale d'un quencheur Azo en cellules vivantes. Même si le sulfite

de sodium a démontré une absence de toxicité, sa structure de type bi-anionique ne devrait pas permettre une meilleure diffusion membranaire que le dithionite.

III.6.3. Conclusion

La recherche de quencheurs Azo chimiquement désactivables par le dithionite et absorbant à hautes longueurs d'ondes a permis d'identifier le BHQ-3 comme une structure suffisamment réactive pour envisager son utilisation en cellules vivantes. En revanche, pour les BHQ-1 et -2, les cinétiques de réduction se sont révélées trop lentes pour envisager une réduction totale *in-cellulo*. Une étude est actuellement en cours afin de modifier ces structures et les rendre plus réactives vis-à-vis du dithionite.

Un criblage de réducteurs a permis l'identification de six réactifs capables de désactiver un quencheur de type Azo. A une concentration de 2 mM, ces réducteurs ont d'une part démontré une désactivation de 50% du quencheur en 1 heure, mais surtout une excellente stabilité pendant 4 heures en solution à pH 7,4. En revanche, comme pour le dithionite, l'utilisation de faibles concentrations n'a pas permis une bonne désactivation du quencheur. D'après les différents tests effectués, la valeur de 1 mM correspond à la quantité seuil à partir de laquelle une désactivation du quencheur Azo est possible. En-deçà, la quantité d'oxygène contenue dans le milieu aqueux semble directement oxyder l'ensemble des réactifs. Cela a été confirmé en comparant la réactivité de solutions préparées avec et sans dilution. Les tests de cytotoxicité réalisés sur l'ensemble des réducteurs sélectionnés ont notamment démontré une quasi-absence de toxicité pour le sulfite de sodium, dans les conditions d'incubations utilisées pour le dithionite (10 mM, 1h).

Pour une utilisation en cellules vivantes, les différents types de sulfite identifiés (bisulfite, sulfite et métabisulfite de sodium) ne devraient pas permettre une amélioration des conditions précédemment développées (section III.3.). En effet, comme le dithionite, ces structures anioniques possèdent une très faible diffusion à travers la membrane plasmique. Leurs stabilités en solution ne devraient donc pas suffire à compenser leurs manques de réactivité pour la réduction du motif Azo.

III.7. Conclusion

Cette étude a permis de suivre le clivage de groupements chimiques en cellules vivantes et en présence de stimuli biologique et chimique, dans le domaine de l'imagerie de fluorescence.

Dans ces travaux, le concept de désactivation chimique d'un quencheur a été démontré en solution et sur cellules vivantes. Dans un premier temps, un quencheur clivable basé sur une structure analogue au Dabcyl a été développé puis conjugué à un fluorophore de type DEAC. En solution, le traitement au dithionite d'une sonde de type FRET contenant un quencheur chimiquement désactivable a entraîné une réactivation totale de la fluorescence en 20 secondes avec 1 mM de dithionite. Puis, sur cellules vivantes, la désactivation du quencheur a été réalisée avec 10 mM de dithionite pendant 60 minutes. Ces résultats ont validé le concept de désactivation chimique d'un quencheur. Cependant, la première sonde de type FRET développée s'est révélée trop peu réactive vis-à-vis du dithionite de sodium pour une utilisation cellulaire fiable.

Une seconde génération de quencheur désactivable a été développée à partir d'un composé issu de l'étude de structure-réactivité Azo/dithionite précédemment réalisée. L'étude de la désactivation chimique du quencheur en solution a été réalisée, puis le couple fluorophore/quencheur sélectionné a été incorporé au sein d'une sonde pro-fluorescente utilisée pour la détection de Caspase-3. *In-vitro*, de la Caspase-3 humaine recombinante a permis l'activation de la fluorescence par le clivage d'une séquence peptidique spécifique de type DEVD. En fin de réaction, la désactivation du quencheur par voie chimique a permis de révéler un excès de sonde et ainsi mis en évidence un empoisonnement de l'enzyme par le produit de réaction. La désactivation chimique du quencheur a ensuite été vérifiée sur cellules Hela saines et apoptotiques dans lesquelles la Caspase-3 est activée. Un traitement au dithionite a confirmé la présence du composé dans les cellules saines et a ainsi prouvé la spécificité du peptide pour la Caspase-3.

Afin de généraliser le concept de quencheur chimiquement désactivable à l'ensemble de la gamme des fluorophores, la réduction par le dithionite de quencheurs de type BHQ-1, -2 et -3 a été réalisée. Le quencheur BHQ-3 s'est révélé suffisamment réactif vis-à-vis du dithionite pour envisager sa désactivation *in-cellulo*. Pour les composés BHQ-1 et -2, moins sensibles au dithionite, l'optimisation de leurs structures est envisagée afin d'augmenter leurs réactivités

vis-à-vis du réducteur. Nous envisageons donc de mettre en place une stratégie identique à celle développée précédemment pour l'optimisation de la structure Azo (voir section II.4.1.).

Pour permettre la désactivation de quencheurs moins réactifs, tout en conservant des conditions douces, une seconde stratégie consiste à utiliser des réactifs chimiques moins sensibles et moins toxiques que le dithionite. Pour cela, une méthode de criblage de réactifs a été développée. Cette stratégie a permis l'identification de cinq réducteurs capables de désactiver un quencheur Azo. Comparés au dithionite de sodium, les différents réactifs identifiés ont présenté de meilleures stabilités et des toxicités moins importantes. Cependant leurs réactivités ont été jugées trop faibles pour les utiliser en conditions cellulaires.

L'utilisation de quencheurs chimiquement désactivables offre de nouvelles perspectives pour la quantification rapide de bio-stimuli, en permettant de révéler une sonde pro-fluorescente désactivée dans le milieu intracellulaire. En effet, couplée à une détection par cytométrie de flux, la mesure de fluorescence intracellulaire devrait permettre de suivre la conversion d'une réaction de lyse par un système biologique, comme cela pu être réalisé *in-vitro*. Enfin, l'exemple présenté dans ces travaux a concerné la désactivation d'un quencheur par un agent chimique de réduction. Afin d'améliorer la bioorthogonalité du système, nous envisageons d'associer la désactivation d'un quencheur à des réactions bioorthogonales pro-fluorescente entre deux molécules organiques. Récemment, le groupe du professeur Weissleder a proposé un système de réactivation similaire, basé sur la cycloaddition d'une tétrazine et d'un trans-cyclooctène.¹²⁶

Dans ce deuxième chapitre, l'optimisation structurale d'un composé Azo a de nouveau rendu possible sa réduction en milieu biologique. En cellules vivantes, le système Azo/Dithionite a démontré des limitations dans son utilisation avec une mauvaise perméabilité membranaire et une certaine toxicité. Dans le but d'augmenter les cinétiques de désactivation de quencheurs Azo en cellules vivantes, tout en conservant le dithionite comme agent chimique, de nouvelles structures Azo plus réactives doivent être mises au point. Cependant, augmenter la réactivité chimique d'un composé peut également accroître sa labilité vis-à-vis de bio-stimuli. Un tel phénomène occasionnerait alors un clivage non-spécifique. Du fait de la complexité des organismes vivants, il est difficile d'anticiper la stabilité d'un composé vis-à-vis de l'ensemble des bio-stimuli. Dans ce sens, nous avons donc développé une méthode pour l'évaluation de la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs.

**Chapitre IV. Développement d'une méthode pour
l'évaluation de la labilité d'une liaison chimique en milieux
biologiques natifs : application aux liaisons pH-sensibles**

Ce quatrième chapitre a consisté au développement d'une méthodologie permettant de mesurer la labilité d'une liaison chimique en organismes vivants (cellulaire ou animal). Comme cela a été réalisé précédemment pour la caspase-3, la stratégie mise en place repose sur l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET.

Parmi les nombreuses structures chimiques utilisées en biologie ou présentes dans les biomolécules, certaines sont connues pour leur stabilité tandis que d'autres peuvent démontrer une labilité, plus ou moins forte, en présence de stimuli endogènes (bio-stimuli). Cette instabilité est à la base d'un grand nombre de mécanismes biologiques comme, par exemple, la formation ou la rupture de ponts disulfures pour l'organisation structurale des protéines. Dans le domaine biomédical, la labilité d'une liaison chimique vis-à-vis d'un bio-stimulus est également utilisée dans de nombreuses applications, comme, par exemple, des systèmes de libération contrôlée tels que les prodrogues ou la biodégradation de matériaux.¹²⁷

Dans ce contexte, lors de la conception d'outils moléculaires utilisés pour étudier ou interagir avec le vivant, il est indispensable de connaître au mieux la labilité des motifs chimiques utilisés vis-à-vis des différents bio-stimuli existants. Par exemple, dans un système prodrogue, un clivage mal contrôlé pourrait conduire à une libération prématurée du principe actif. L'avantage du concept de prodrogue serait ainsi perdu. Aux vues de l'extrême complexité du milieu vivant et de la difficulté à mettre en place des systèmes *in-vitro* pertinents, il est très difficile d'appréhender la labilité d'une fonction chimique dans un organisme vivant. A ce jour, l'évaluation basée sur une expérimentation en milieux natifs, bien que lourde et complexe, reste la méthode de choix. Pour cela, les techniques analytiques employées sont :

- la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide principalement utilisées pour quantifier des métabolites en fluides physiologiques.^{128,129}
- les différentes techniques d'imagerie avec l'utilisation de radio-isotopes (iode ou technétium),^{130,131} de fluorophores^{91,132} ou d'agents de contraste.¹³³
- le dosage en retour d'une activité enzymatique inhibée par un produit d'hydrolyse.^{134,135}

Quelle que soit la technique utilisée, la plupart des études sont basées sur une évaluation de la labilité d'une liaison chimique au cas par cas et dans des conditions particulières. Il n'est donc pas possible de croiser l'ensemble des données de la littérature associées à une structure chimique. En l'absence d'une méthodologie définie et normalisée, comme dans le

développement de médicaments, l'optimisation de la réactivité d'un groupement bio-sensible est délicate. Dans ce contexte, nous avons souhaité développer une méthode d'évaluation standardisée pour le développement de systèmes de libération contrôlée dans le domaine biomédical. L'objectif recherché est l'optimisation structurale d'un groupement labile de manière séquentielle et en allant vers une complexité croissante du milieu d'étude (de la solution à l'animal vivant) (Figure 37). Le canevas méthodologique développé doit ainsi permettre d'établir la lyse spécifique d'une structure chimique par un ensemble de bio-stimuli, en solution et en modèles cellulaire et animal. Dans le cas où la labilité observée n'est pas celle attendue, et ce quel que soit le stade de l'étude, une variation structurale peut alors être envisagée pour aboutir, au final, à un système de libération chimio-spécifique.

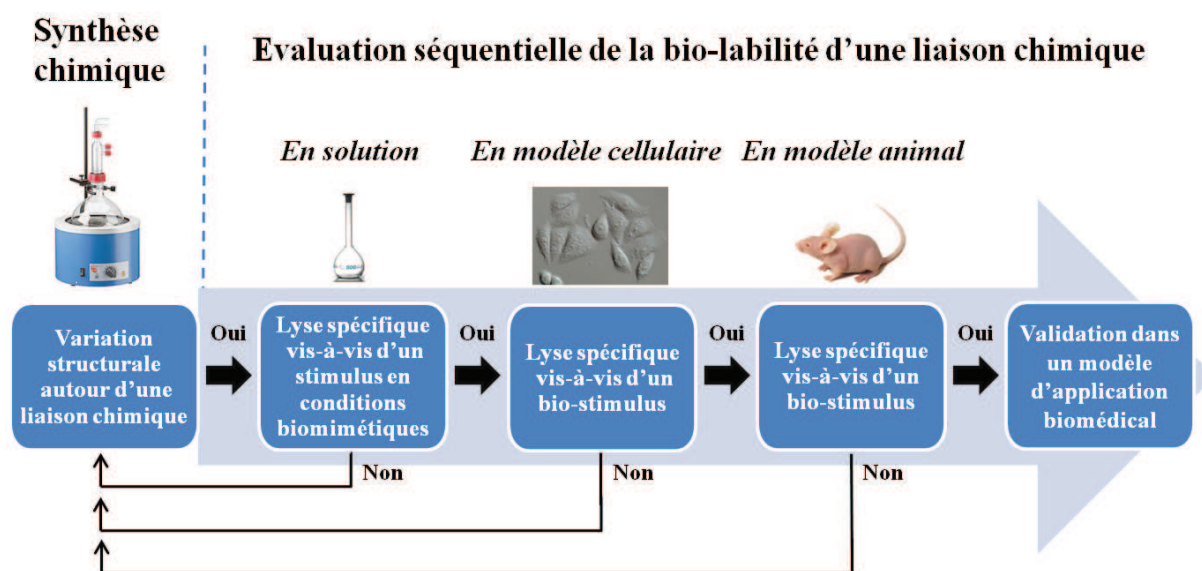


Figure 37 : Présentation d'une méthode séquentielle pour l'analyse de la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs.

Pour suivre la labilité de liaisons chimiques à des niveaux de complexité croissants, le choix de la méthode de suivi s'est porté sur l'utilisation de traceurs à base de sondes pro-fluorescentes de type FRET. Dans le but de mettre au point et de valider notre méthodologie d'évaluation, nous avons choisi d'étudier les labilités de liaisons chimiques pH-sensibles.

La présentation des systèmes de libération contrôlée par le pH de principe actif permettra de faire un état de l'art des différents groupements hydrolysables décrits. Dans le cadre d'un système modèle, nous nous attacherons à étudier plus particulièrement la stabilité d'un groupement spiro di-orthoester. Enfin, le système développé sera généralisé à l'étude comparée de différents groupements acido-labiles dont les utilisations ont été décrites dans des systèmes de libération contrôlée.

Dans le cadre de ces travaux, l'étude en milieux biologiques a été menée en collaboration avec :

- L'équipe de chimie génétique (UMR 7199) pour la culture cellulaire : Marc Nothisen.
- L'équipe de l'implication du microenvironnement sur l'angiogenèse et l'invasion tumorale (INSERM U682) pour l'imagerie du petit animal : Nadège Baumlin.

IV.1. Les groupements pH-sensibles pour la libération contrôlée de principes actifs

A ce jour, les liens pH-sensibles sont principalement utilisés pour libérer de façon contrôlée des principes actifs à partir de prodrugs à transporteurs ou de matériaux biodégradables.^{136,137} D'après la littérature, une libération spécifique au niveau des lysosomes et des tumeurs est permise par l'utilisation d'un gradient de pH.

IV.1.1. L'acidité lysosomale

Le phénomène d'endocytose correspond à la formation d'une vésicule à partir d'une invagination de la surface cellulaire. Selon le mécanisme utilisé, on distingue : l'endocytose en phase liquide, l'endocytose d'adsorption et l'endocytose à récepteur (Figure 38).

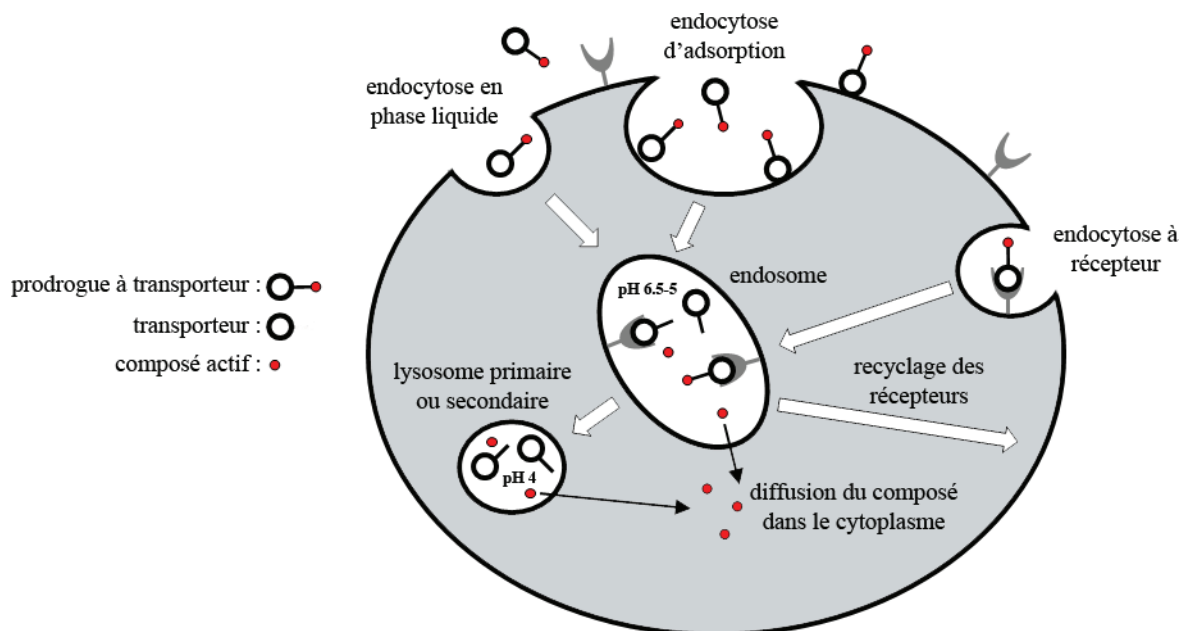


Figure 38 : Présentation du mécanisme d'endocytose par formation d'endosomes puis de lysosomes primaires et secondaires. Exemple de libération d'un composé actif à partir d'une prodrug à transporteur pH-sensible. Schéma reproduit selon Kratz *et al.* *ChemMedChem* 2008, 3, 20-53.

Lorsqu'un endosome est formé, il peut soit être transporté vers les organites de la cellule, comme l'appareil de Golgi, soit être rejeté dans le milieu extracellulaire, soit se transformer

en lysosomes primaires puis secondaires (Figure 38). Durant ce phénomène, le pH des vésicules formées est en diminution constante. Alors que le milieu extracellulaire se situe à un pH de 7,2-7,4, le pH des endosomes est compris entre 5,0 et 6,5 et celui des lysosomes proche de 4,0. De plus, les lysosomes contiennent une importante variété d'hydrolases qui peut conduire au clivage d'un grand nombre de structures. Quel que soit le type de cellules, il est donc possible d'utiliser ces vésicules pour hydrolyser spécifiquement une liaison pH-sensible dans le cytoplasme cellulaire. Pour une application dans la délivrance de médicaments, il est cependant nécessaire de coupler cette voie de libération à un système d'adressage spécifique pour cibler uniquement des cellules ou tissus malades. Ceci est le principe d'une prodrogue à transporteur dont un état de l'art récent a été réalisé par le groupe du professeur Couvreur.¹³⁷

IV.1.2. L'acidité tumorale

Dans une stratégie anticancéreuse, la suracidité d'une tumeur peut également être utilisée pour l'hydrolyse spécifique de composés pH-sensibles. En 1956, Otto Warburg a été le premier à présenter le métabolisme particulier des cellules cancéreuses avec la conversion de glucose en acide lactique *via* la fermentation de pyruvate en présence d'oxygène.¹³⁸ Depuis, de nombreuses études ont tenté de comprendre le métabolisme particulier des cellules cancéreuses en milieu normoxique et hypoxique.¹³⁹

La glycolyse aérobie est une des premières voies métaboliques observées chez les cellules cancéreuses. D'après la voie de métabolisation décrite par Warbrug, plus de 90% du pyruvate formé par glycolyse est converti en acide lactique. Il en résulte une concentration d'acide lactique anormalement haute dans le cytoplasme. Pour maintenir un pH intracellulaire normal, l'acide formé est alors excrété vers le milieu extracellulaire. Cependant, le débit sanguin d'une tumeur étant faible, cet acide tend à s'accumuler dans l'espace intratumoral plutôt qu'à être éliminé. Cela conduit à un pH-intratumoral anormalement bas par rapport à un tissu sain. Cette différence est de l'ordre de 0,5 à 1,5 unités de pH selon les tumeurs étudiées.^{140,141} Ce phénomène de suracidité est également un des facteurs responsables de l'invasion tumorale.¹⁴²

Dans les tumeurs solides, la concentration en oxygène ne dépasse pas 1 à 2%. On parle alors de milieu hypoxique. Cet état particulier de la cellule peut alors conduire à l'activation de plusieurs gènes influant sur la modification du métabolisme cellulaire. Par exemple, le gène du facteur induit par l'hypoxie 1 (HIF-1 ou Hypoxia-Inducible Factor 1) est activé dans 60% des métastases.¹⁴³ Ce facteur de transcription permet la surexpression des transporteurs

de glucose (GLUT1 et GLUT 3) (Figure 39). Il en résulte une meilleure conversion du glucose en pyruvate pour permettre aux cellules cancéreuses de survivre et proliférer dans un milieu faible en oxygène et en nutriments. Dans ce cas, le pyruvate n'est pas dirigé vers le cycle de Krebs (ou TCA pour TriCarboxylic Acid cycle) mais directement converti en acide lactique.

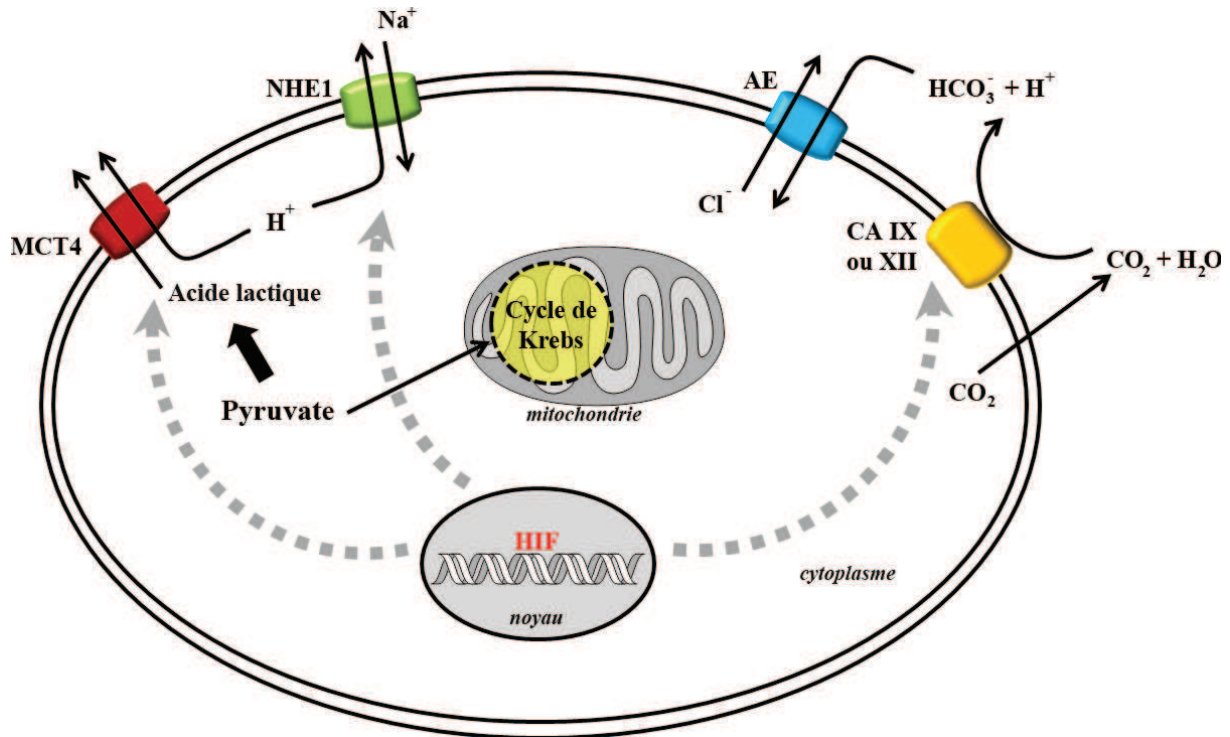


Figure 39 : Mécanisme d'acidification du milieu extracellulaire en conditions hypoxiques. Sous hypoxie, le facteur HIF est activé pour maintenir l'homéostasie de la cellule. Il permet de réguler l'expression de transporteurs de lactate (MCT), d'anhydrases carboniques IX ou XII (CA), et échangeurs de Na^+/H^+ (NHE). Des échangeurs d'anions (AE) permettent l'internalisation des ions hydrogencarbonates formés par les anhydrases carboniques. L'ensemble des échanges conduit à une diminution du pH extracellulaire. Schéma reproduit selon Tian *et al. Collo. Surf. B: Biointer.* 2011, sous presse.

Comme pour la métabolisation normoxique, l'acide formé s'accumule à l'extérieur des cellules et conduit à un pH-intratumoral acide. En conditions hypoxiques, le facteur de transcription HIF est activé pour maintenir le pH intracellulaire de la cellule. Cela conduit à réguler l'expression de protéines membranaires comme :

- des transporteurs de lactate (lactate MonoCarboxylate Transporters, MCT) pour augmenter l'excrétion de l'acide lactique.
- des anhydrases carboniques qui convertissent le dioxyde de carbone en ions hydrogencarbonate (CA IX ou XII).
- des échangeurs de Na^+/H^+ (NHE1) pour éliminer les protons du milieu intracellulaire.

L'acidité intra-tumorale étant un état pathologique, l'utilisation d'un motif hydrolysable en conditions acides peut suffire pour libérer sélectivement un composé dans l'environnement tumoral. Une revue de la littérature fait apparaître que pour une application en prodrogue, un adressage n'est donc pas toujours nécessaire.¹⁴⁴

IV.1.3. Les structures pH-sensibles

A partir des deux voies d'acidité précédemment présentées, de nombreux outils hydrolysables ont été mis au point pour la conception de prodrogues à transporteurs ou de matériaux biodégradables (Tableau 6).^{127,145}

Quel que soit le champ d'application, il existe une très grande variété de structures pH-sensibles dont la plupart sont formées à partir d'aldéhyde ou d'alcool. A ce jour, il n'existe pas d'étude permettant de guider le choix d'un lien pH-sensible en fonction de son application finale. Dans le domaine des biomatériaux, différents motifs hydrolysables peuvent être incorporés au sein de copolymères biocompatibles. Pour cela, des monomères de type cétal, acétal et orthoester sont utilisés (Tableau 6).^{146,147}

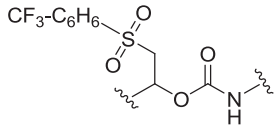
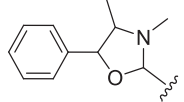
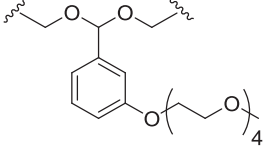
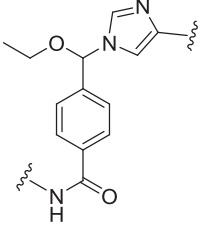
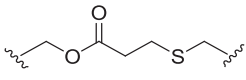
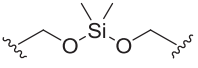
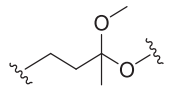
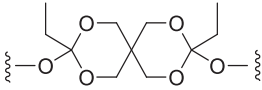
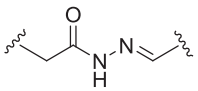
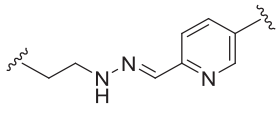
Entrée	Structures	Champ d'application	Hydrolyse en solution	Hydrolyse <i>in-cellulo</i> ou <i>in vitro</i>	Réf.
1		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 7,4 ≈ 14 h	rat	148
2		prodrogue	$t_{1/2}$ pH 6-8 < 1min	human	149,150
3		biomatériaux	$t_{1/2}$ pH 5,0 ≈ 3 jours	-	146
4		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,0 ≈ 55 h	human ovarian carcinoma line 2008	151,152
5		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,5 ≈ 5 h	HuH-7 cells	153,154
6		biomatériaux	$t_{1/2}$ pH 5,0 ≈ 2 h	HeLa cells	155
7		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,0 < 1 min	-	156
8		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,5 < 20 min	mice	157,158
9		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,5 < 2 min	human	159-161
10		vectorisation	$t_{1/2}$ pH 5,0 < 10 min	mice	162

Tableau 6 : Groupements pH-sensibles et leurs conditions d'hydrolyse et d'utilisation.

Pour le développement de prodrogues à transporteur, les structures les plus utilisées par l'industrie pharmaceutique sont incontestablement de type hydrazone et acylhydrazone.^{159,163} Ces composés possèdent non seulement une importante labilité en milieu acide, mais également la capacité d'être facilement accessible par bio-conjugaison.¹⁶⁴ A partir de ces structures, de nombreux composés cytotoxiques ont ainsi été conjugués à des transporteurs macromoléculaires pour des stratégies anticancéreuses ciblées.¹⁶⁵ Par exemple, le dérivé

INNO-206 (CytRx corporation) est une prodrogue de doxorubicine basée sur un lien hydrazone pH-sensible (Figure 40A). Ce composé est actuellement en phase clinique II pour le traitement de cancer du pancréas.¹⁶⁶ Malgré cette approche prodrogue, les effets secondaires d'agents anticancéreux ne peuvent pas toujours être éliminés. En 2010, la seule prodrogue à transporteur pH-sensible approuvée par la FDA (U.S. Food and Drug Administration) a été retirée du marché américain pour sa toxicité.¹⁶⁷ Ce composé du nom de Mylotarg (Pfizer corporation) est un conjugué anticorps/calicheamicine lié par deux groupements bio-labiles acylhydrazone et ponts disulfures (Figure 40B).

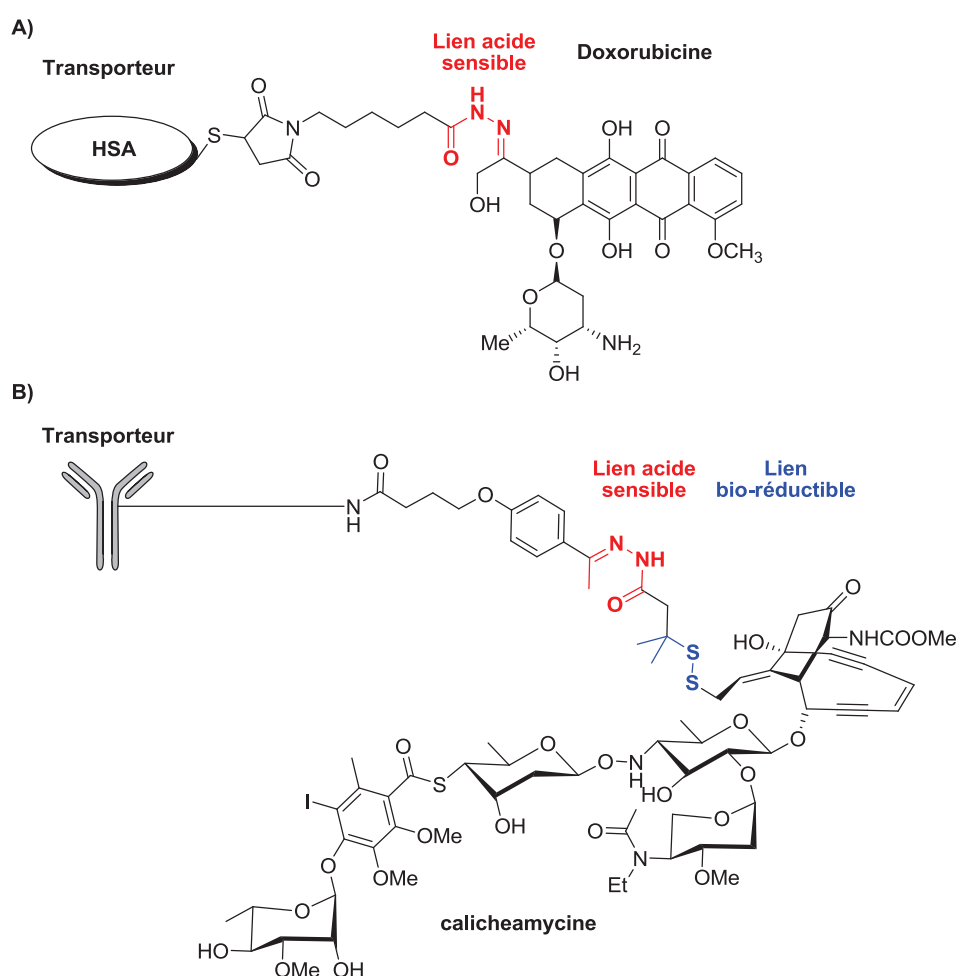


Figure 40 : Structure des prodrogues à transporteurs pH-sensibles INNO-206 (CytRx corporation) (A) et Mylotarg (Pfizer corporation) (B).

Il n'existe pas de méthodologie établie pour développer une liaison acido-labile. Néanmoins des données cinétiques sont généralement disponibles dans la littérature pour chaque groupement hydrolysable utilisé. La plupart du temps, les composés sont caractérisés en solution et à l'aide de temps de demi-vie mesurés aux pH 5-5,5 et 7,4. Ces deux pH sont généralement utilisés comme des modèles du pH sanguin (pH 7,4) et de l'acidité lysosomale

(pH 5-5,5). A partir de ces deux paramètres, il est donc possible d'évaluer la cinétique et la sélectivité de l'hydrolyse en milieu acide d'un composé. Cependant, cette méthodologie ne prend pas en compte la complexité du milieu vivant et ne permet pas d'envisager la labilité globale d'une structure chimique vis-à-vis de l'ensemble des bio-stimuli.

Dans le domaine du développement de médicaments, l'une des premières étapes consiste à réaliser une étude de structure-activité pour identifier une tête de série. Pour la mise au point de systèmes de libération pH-sensibles, cette étape de structure-réactivité n'est pas systématique. Lorsqu'elle est accomplie, elle se limite souvent à une étude en solution dans différents milieux tamponnés et une analyse par HPLC-UV.¹⁶¹ Pour éviter la synthèse longue et fastidieuse de différents analogues structuraux, ce type d'étude peut également être effectué à partir de petites molécules utilisées comme modèles et étudiées par RMN. Cette méthodologie a notamment été utilisée par Kong et *al.* pour l'optimisation structurale de composés *N*-éthoxybenzylimidazole.¹⁶² Malheureusement, cette stratégie peut conduire à une mauvaise évaluation, du fait de ne pas prendre en compte l'ensemble des caractéristiques d'un composé final comme la taille, la solubilité ou les charges électroniques. Ce type de problème a déjà été reporté dans la littérature et notamment pour le développement de polymères biodégradables. Par exemple, dans une étude réalisée par le groupe du professeur Fréchet, un monomère pH-sensible et son polymère correspondant ont démontré d'importantes différences d'hydrolyse.^{146,168} A pH 5, le monomère a présenté un temps de demi-vie de 1,6 minutes, tandis que pour le polymère, un temps de demi-vie de 43,2 minutes a été mesuré.

Afin de répondre à ces limitations, nous avons souhaité standardiser une méthode d'évaluation pour le développement de systèmes de libération contrôlée. Cette démarche rationnelle doit ainsi permettre d'évaluer finement la labilité de groupements acido-labiles vis-à-vis de la gamme étroite d'acidités physiologiques (comprise entre pH 5 et 7). Le but de cette méthode est de pouvoir mesurer l'hydrolyse d'une liaison chimique de manière séquentielle et en allant vers une complexité croissante. Le choix de la méthode de suivi s'est donc porté sur l'utilisation de traceurs à base de sondes pro-fluorescentes.

IV.2. Les sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité de composés pH-sensibles

Dans la littérature, il existe un nombre important de sondes pro-fluorescentes et pH-sensibles utilisées comme indicateur de pH intracellulaire.¹⁶⁹ L'ensemble de ces composés sont généralement des pro-fluorophores dont les profils d'émission sont pH-dépendants. Leur fluorescence peut par exemple être modulée par protonation/déprotonation d'un groupement amine et un transfert d'électrons photoinduit (Photoinduced Electron Transfer).⁶³ L'activation de la fluorescence n'étant pas liée à la rupture d'une liaison, ce type de fluorophore n'a pas pu être utilisé dans ce projet. Lors des travaux précédents, une sonde pro-fluorescente de type FRET a été utilisée pour la détection d'une activité enzymatique (voir section III.5.). Nous avons donc souhaité réutiliser ce type système pour mesurer l'hydrolyse d'un groupement acido-labile. Cette étude s'est ainsi dirigée vers le développement de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles.

IV.2.1. Le concept de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles

Une sonde pro-fluorescente de type FRET et pH-sensible est composée d'un fluorophore lié de manière covalente à un quencheur, par l'intermédiaire d'une liaison pH-labile (Figure 41). A un pH donné, l'hydrolyse de cette liaison conduit à la séparation du couple fluorophore/quencheur et à l'apparition de fluorescence. La vitesse d'hydrolyse du composé peut alors être directement mesurée à partir d'une augmentation de l'intensité du signal fluorescent. Pour cette application, les propriétés spectrales du couple fluorophore/quencheur doivent impérativement être pH-indépendantes pour ne pas conduire à mauvaise interprétation des résultats. Par exemple, si l'absorption du quencheur est modulée par le pH, cela peut aboutir à une modification du recouvrement spectral entre l'émission du fluorophore et l'absorption du quencheur. Il peut en résulter une activation du signal fluorescent et donc un résultat faux-positif. Dans le cas où l'émission du fluorophore est désactivée par un pH acide avec une hydrolyse simultanée du groupement pH-labile, c'est un résultat faux-négatif qui peut être obtenu.

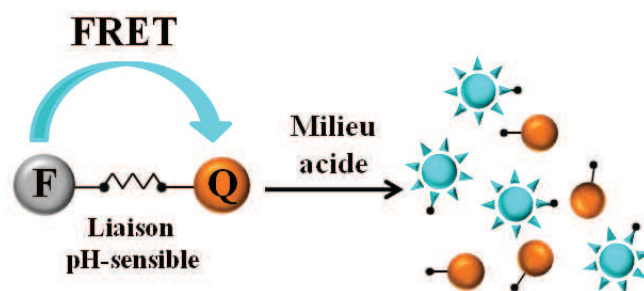


Figure 41 : Principe général des sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles.

L'évaluation de la labilité d'un groupement pH-sensible par l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET est très peu décrite. Dans une étude publiée en 2008, Yang *et al.* ont tenté de mesurer l'hydrolyse d'un motif acylhydrazone en cellules KB.⁹¹ La sonde pro-fluorescente utilisée a alors été couplée à de l'acide folique afin de réaliser un adressage pour les endosomes à récepteur d'acide folique. Le composé activable était alors basé sur l'extinction d'un fluorophore BODIPY FL par le Dabcyl relié par un groupement acylhydrazone. En solution, la sonde utilisée a démontré une activation pH-dépendante avec des temps de demi-vie de 4,6 et 75 heures respectivement à des pH 5 et 6. Cependant, en cellules vivantes, aucune activation de la fluorescence n'a été observée, indiquant une stabilité du motif pH-sensible. Les auteurs ont alors mesuré le pH des endosomes à l'aide de fluorescéine. Les résultats ont démontré une acidité comprise entre pH 6,6 et 6,8. Yang *et al.* ont donc conclu que l'acidité des endosomes n'a pas été suffisante pour hydrolyser le groupement acylhydrazone utilisé.

Les résultats de cette étude sont en accord avec notre analyse selon laquelle il est difficile d'anticiper la labilité d'une liaison chimique dans un organisme vivant. Cependant, cet article n'a pas démontré la possibilité d'évaluer la labilité d'une liaison acido-labile par l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET. Pour valider notre méthodologie, notre premier objectif a donc consisté à concevoir une sonde pro-fluorescente de type FRET et acido-labile en conditions physiologiques, c'est-à-dire vis-à-vis des acidités lysosomale et tumorale.

IV.2.2. Sélection d'un couple fluorophore/quencheur pour le développement de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles

En imagerie de fluorescence *in-vivo*, les fluorophores utilisés doivent être suffisamment brillants pour être visualisés de manière non-invasive et émettre à des longueurs d'onde supérieures à 550 nm pour s'affranchir des phénomènes d'autofluorescence des milieux biologiques. Afin de rechercher un couple fluorophore/quencheur adapté à la méthodologie

envisagée, le fluorophore carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) et le quencheur BHQ-2 (Black Hole Quencher) ont été synthétisés. Dans un second temps, leurs propriétés spectrales ont été étudiées à différents pH. Enfin, l'efficacité d'extinction du couple TAMRA/BHQ-2 a également été mesurée à différents pH à partir d'un conjugué TAMRA/BHQ-2 synthétisé.

IV.2.2.1. Etude des propriétés spectrales de la carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) en fonction du pH

La carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) est un fluorophore utilisé pour de nombreuses applications en chimie-biologie, comme le marquage de protéines ou d'ADN.¹⁷⁰ Ce composé est généralement utilisé sous forme d'un mélange d'isomères 5-TAMRA et 6-TAMRA dont les propriétés spectrales sont similaires. Excité à 545 nm, ce composé réémet une fluorescence à 580 nm. Ce dérivé de xanthène peut être facilement obtenu par réaction entre du 3-diméthylaminophénol et de l'anhydride trimellitique.¹⁷¹ La bioconjugaison de TAMRA est classiquement réalisée par couplage entre un acide carboxylique de la TAMRA et un second partenaire aminé. Pour mesurer l'influence du pH sur la fluorescence de TAMRA, un dérivé amide **26** a été synthétisé à partir du composé 5-TAMRA. L'isomère pur de rhodamine utilisé a été préparé au laboratoire à l'échelle de plusieurs grammes par Michel Mosser, selon la méthode décrite par Shmanai.¹⁷²

La synthèse du composé **TAMRA-Alcyne** a été réalisée par couplage entre **25** et la propargylamine (Figure 42A). L'utilisation de PyBOP comme agent de couplage et une purification par HPLC préparative ont permis l'obtention du composé désiré avec un rendement de 80%. La fluorescence du composé **26** a ensuite été mesurée à différents pH compris entre 1 et 8 (Figure 42B). Deux systèmes tampons ont été utilisés : HCl/KCl (100 mM) pour les pH 1 et 2, acide citrique/Na₂HPO₄ (100 mM) pour les pH 3 à 8. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaques à fluorescence et de filtres d'excitation à 550/8 nm et d'émission à 580/10 nm (Figure 42B).

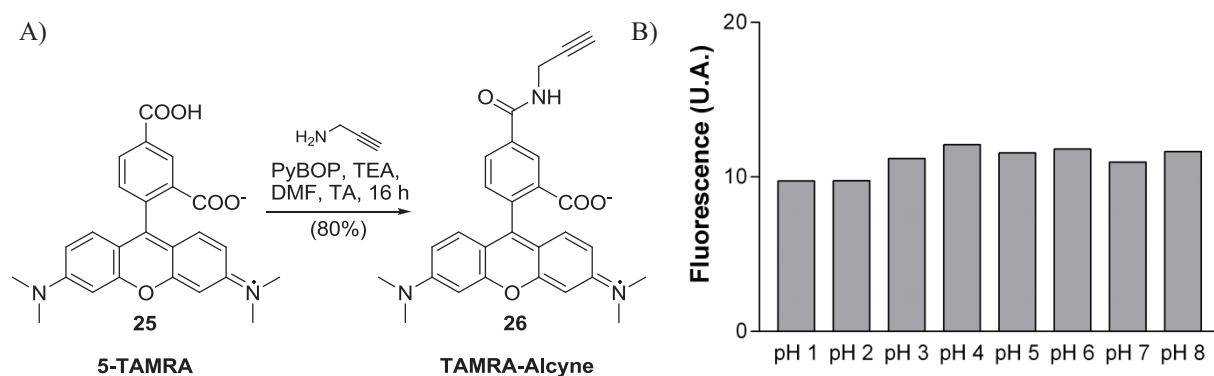


Figure 42 : A) Voie de synthèse du composé TAMRA-Alcyne ; B) Influence du pH sur la fluorescence de TAMRA-Alcyne (5 μ M), pH 1-2 tampons HCl/KCl (100 mM) et pH 3-8 tampons acide citrique/ Na_2HPO_4 (100 mM) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Dans des milieux tamponnés dont les pH sont compris entre 3 et 8, le dérivé de TAMRA a émit une fluorescence stable avec une variation maximale de 4,5 % (Figure 42B). En revanche aux pH 1 et 2, une baisse de plus de 10% a été observée par rapport aux mesures effectuées entre pH 3 et 8. D'après la littérature, l'acidité physiologique maximale de cellules se situent au niveau des lysosomes et autour des pH 4 et 5.^{137,173} L'extinction d'une partie de la fluorescence à pH <2, ne limite donc pas l'utilisation de ce fluorophore pour notre application.

IV.2.2.2. Etude d'un quencheur Azo BHQ-2 (Black Hole Quencher)

Le quencheur BHQ-2 a été synthétisé afin de vérifier si son absorption était pH-dépendante. Ce composé peut être obtenu en une seule étape par couplage diazoïque entre le produit commercial **29** appelé "Fast Black K salt" et un dérivé de diakylaniline.⁹⁸

Dans un premier temps, le composé **27** a été obtenu en deux étapes avec 57% de rendement global comme décrit dans la littérature (Figure 43).¹⁷⁴ La réaction entre le sel de diazonium **29** et la diakylaniline **28** n'a pas abouti au produit désiré dans les conditions brevetées par Biosearch Technologies.⁹⁸ En revanche, l'utilisation de la procédure décrite par Sarcinelli a permis d'obtenir le composé BHQ-2 avec 39% de rendement après purification sur gel de silice.¹⁷⁵

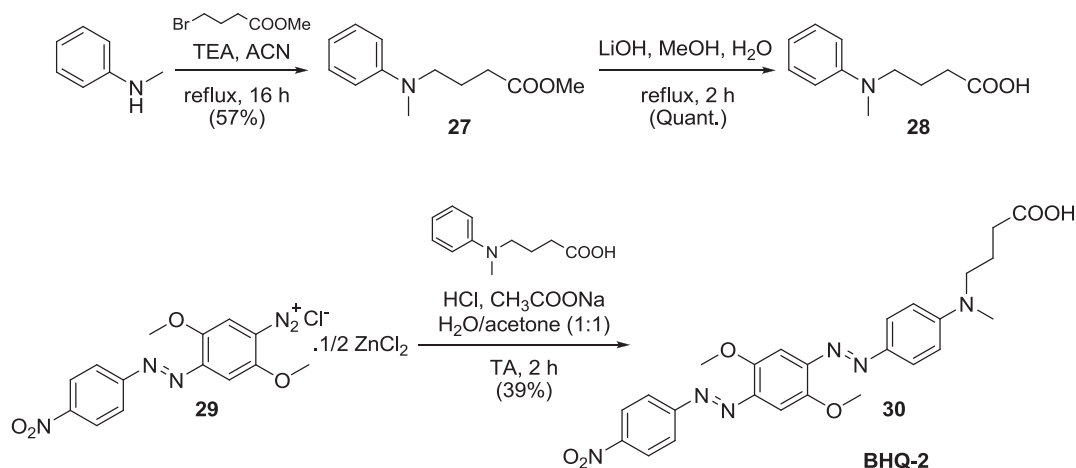


Figure 43 : Voie de synthèse du BHQ-2.

L'absorption de solutions de BHQ-2 à différents pH, compris entre 1 et 8, a été mesurée à 579 nm (Figure 44). Les mesures effectuées se sont révélées stables entre les pH 2 et 8. A pH 1, une forte augmentation de l'absorption a été constatée. Comme pour le fluorophore TAMRA, ce phénomène ne devrait pas nous gêner dans notre application.

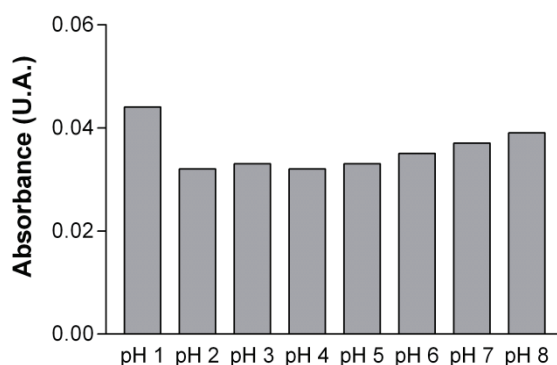


Figure 44 : Influence du pH sur l'absorption à 579 nm du BHQ-2 (1 μ M) ; pH 1-2 tampons HCl/KCl (100 mM) et pH 3-8 tampons acide citrique/ Na_2HPO_4 (100 mM).

Dans le but d'étudier l'influence du pH sur l'extinction de la TAMRA par le BHQ-2, un conjugué non hydrolysable a été mis au point.

IV.2.3. Synthèse et étude d'un conjugué TAMRA/BHQ-2

Les liaisons amides sont connues pour leurs bonnes stabilités chimiques en milieux biologiques, à l'exception de certaines séquences d'acide aminés reconnues par des protéases. Ce type de motif a donc été utilisé pour conjuguer la TAMRA et le BHQ-2 et ainsi former une sonde pro-fluorescente non-hydrolysable et utilisable comme contrôle.

IV.2.3.1. Synthèse d'un conjugué TAMRA/BHQ-2

Les deux molécules TAMRA et BHQ-2 possèdent toutes deux un acide carboxylique. Leur couplage a donc été envisagé à partir d'un espaceur diamine. L'espaceur choisi est un groupement éthylène glycol afin de compenser le manque de solubilité du BHQ-2 dans l'eau. La synthèse du composé **34** mono protégé a ainsi été réalisée en quatre étapes selon une méthode décrite dans la littérature (Figure 45).¹⁷⁶ Dans un premier temps, l'amine du 2-(2-aminoéthoxy)éthanol a été protégée par un groupement *tert-butyl*-carbamate, puis le composé formé a réagi avec du chlorure de méthanesulfonyle pour former l'ester de mésylate correspondant **32**. La substitution du mésylate par un azoture a mené au composé **33** avec un rendement global de 87% pour les trois premières étapes. La réduction de cet azoture par de la triphénylphosphine, dans les conditions de Staudinger, a permis la formation du dérivé **34** avec 33% de rendement. Ce faible rendement s'explique par la perte d'une partie du produit attendu lors du traitement de la réaction.

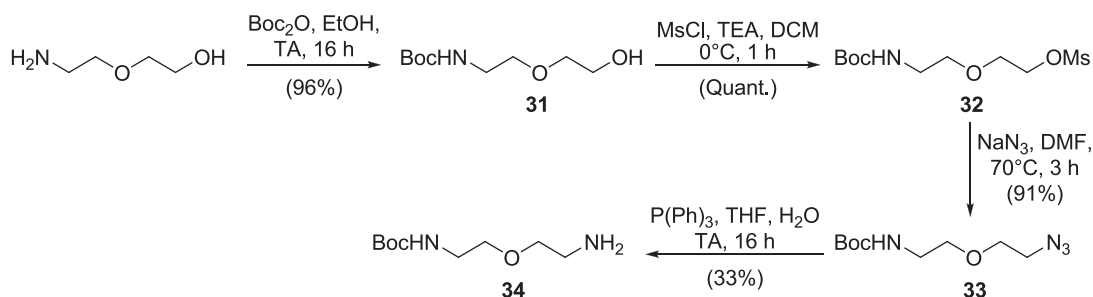


Figure 45 : Voie de synthèse de l'espaceur **34**.

Le couplage entre l'espaceur **34** et le **BHQ-2** a été activé par HBTU et réalisé dans un mélange de DCM et de DMF pour solubiliser le dérivé acide carboxylique (Figure 46). Un traitement acide du composé **35** a permis la déprotection du groupement Boc tandis que le brut réactionnel obtenu a directement été engagé dans un couplage avec la **TAMRA**. Cette séquence réactionnelle a ainsi abouti à la formation du composé **37** avec 35% de rendement sur les deux dernières étapes.

Pour faciliter l'identification des composés synthétisés par leurs fonctions caractéristiques (**fct**), la nomenclature suivante a été établie pour l'ensemble du manuscrit :

- **TAMRA-fct** ou **(BHQ-2)-fct** pour les fluorophore ou quencheur modifiés au niveau de leurs acides carboxyliques. Exemple : Après couplage avec la propargylamine, les composés **TAMRA-Alcyne** ou **(BHQ-2)-Alcyne** sont obtenus.

- **TAMRA-fct-(BHQ-2)** correspond à un conjugué TAMRA/BHQ-2 *via* une liaison chimique identifiée. Dans le cas du composé **37**, le produit obtenu a donc été appelé **TAMRA-Amide-(BHQ-2)**.

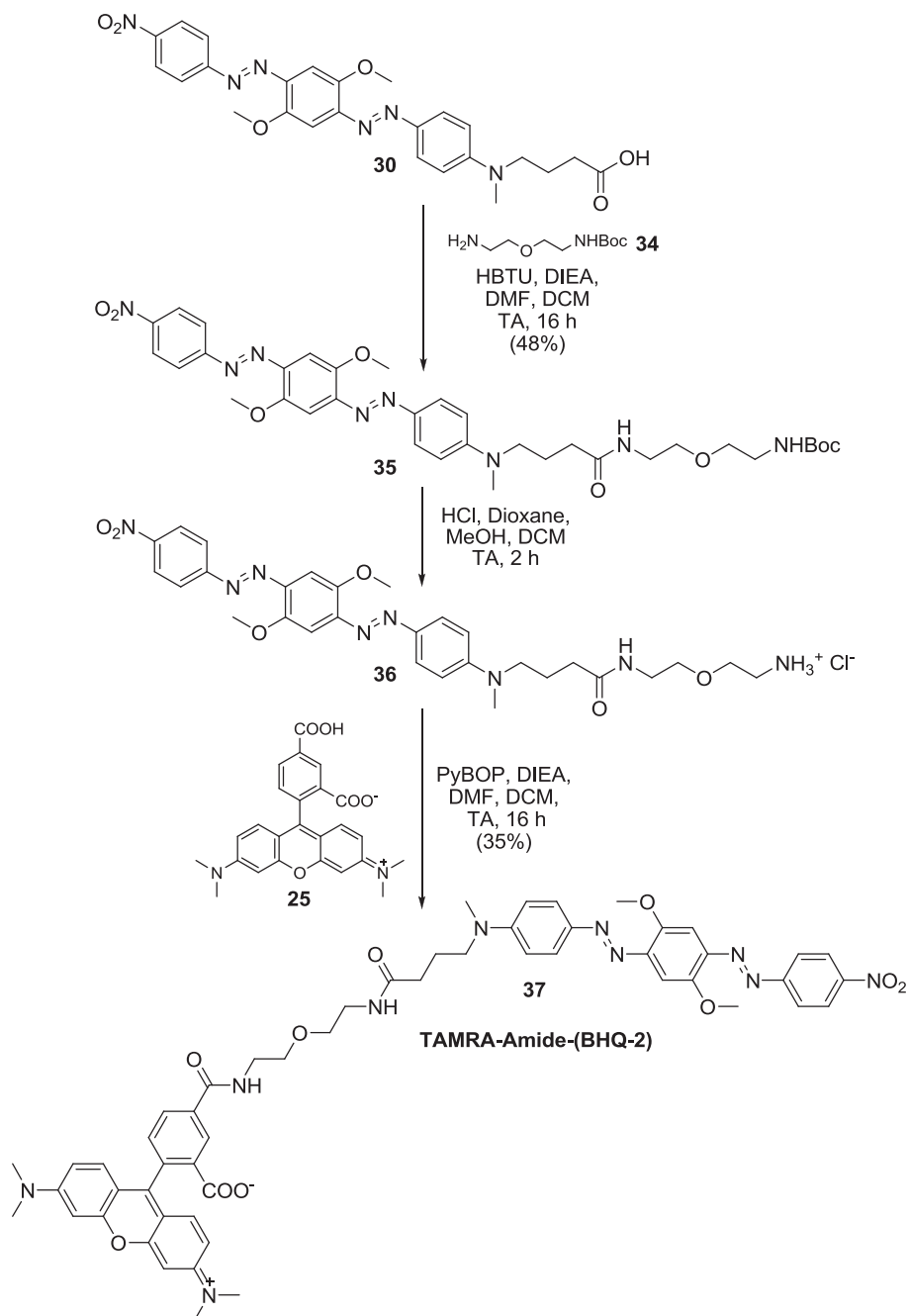


Figure 46 : Voie de synthèse de la sonde TAMRA-Amide-(BHQ-2).

IV.2.3.2. Etude des propriétés spectroscopiques de TAMRA-Amide-BHQ-2

Le composé **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** a été étudié par fluorescence pour non seulement mesurer l'efficacité d'extinction du quencheur, mais aussi pour vérifier sa stabilité en milieu

acide et au cours du temps. Ces mesures ont été réalisées dans les conditions couramment utilisées pour évaluer la stabilité de liens pH sensibles, c'est-à-dire à pH 5,5 et 7,4 (voir section IV.1.3.). Pour ces expériences, le dérivé **TAMRA-Alcyne** a été choisi comme contrôle-positif. Utilisé à la même concentration que **TAMRA-Amide-(BHQ-2)**, ce fluorophore doit permettre de mesurer la fluorescence correspondant à une extinction nulle.

Les composés **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Alcyne** ont été mis en solution à 0,5 μM dans les systèmes tampons suivants : $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 5,5, 100 mM) et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4, 100 mM). Chaque solution a été préparée en triplicat avec 10% de DMSO comme co-solvant. Puis, les mesures de fluorescence ont été réalisées comme précédemment (section IV.2.2.1).

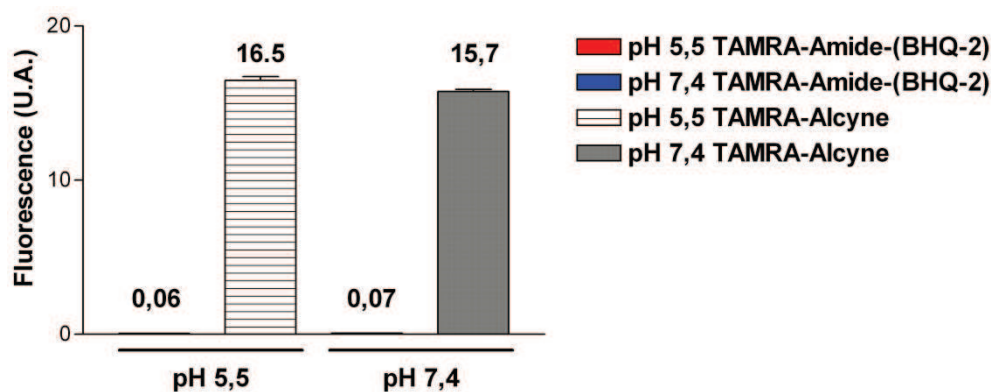


Figure 47 : Mesures de l'extinction de **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** aux pH 5,5 et 7,4 ; Les composés **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Alcyne** ont été utilisées à 0,5 μM dans des tampons $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 5,5, 100 mM) et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4, 100 mM) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Aux pH 5,5 et 7,4, la fluorescence du composé **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** correspond à 0,04% de la fluorescence mesurée pour **TAMRA-Alcyne**. L'efficacité d'extinction du quencheur est donc supérieure à 99% et non-pH dépendante. Cette tendance a alors été étudiée au cours du temps afin d'évaluer la stabilité des groupements amides utilisés.

Des solutions de **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Alcyne** aux pH 5,5 et 7,4 ont été préparées comme précédemment. Puis, des cinétiques ont été enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence. Une mesure, précédée de 5 secondes d'agitation, a été réalisée toutes les trois minutes pendant 15 heures. Les résultats obtenus sont rassemblés sous la forme de graphes présentant la variation de la fluorescence en fonction du temps pour chaque produit (Figure 48).

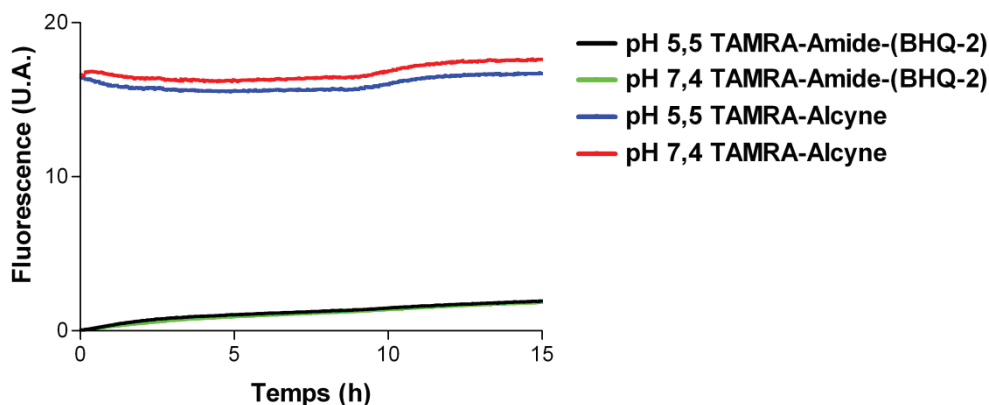


Figure 48 : Suivi de stabilité des composés TAMRA-Amide-(BHQ-2) et TAMRA-Alcyne à 0,5 µM dans deux tampons différents : $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 5,5, 100 mM) et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4, 100 mM) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Quel que soit le pH, la fluorescence de TAMRA-Alcyne s'est révélée stable au cours du temps (Figure 48). Pour le composé TAMRA-Amide-(BHQ-2), une légère augmentation de la fluorescence a été observée. Cette sonde a révélé une extinction de 91% de la fluorescence après 15 heures de réaction et indépendamment du pH. Cependant, il est peu probable que ce composé ait été hydrolysé dans les milieux aqueux testés. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce phénomène soit dû à des problèmes de solvation ou de lyse de la partie BHQ-2 au cours du temps.

Ces résultats confirment l'importance d'utiliser des molécules-contrôles et en particulier pour l'étude de liaisons chimiques peu labiles. Pour la suite de ce travail, si de faibles niveaux d'activation sont observés, alors ils devront être directement comparés au profil cinétique du contrôle non-hydrolysable TAMRA-Amide-(BHQ-2). Cela permettra de confirmer une labilité chimique de la structure étudiée.

IV.2.4. Conclusion

L'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET a été choisie pour évaluer la labilité d'une liaison chimique. Pour concevoir ces outils activables, l'association du fluorophore TAMRA et du quencheur BHQ-2 a été validée après la synthèse et l'étude des propriétés spectroscopiques d'un composé TAMRA-Amide-(BHQ-2). Pour évaluer la labilité d'une liaison chimique quelconque à partir d'un tel système, il est donc nécessaire d'incorporer cette liaison au cœur d'un conjugué TAMRA/BHQ-2. Une fois ce composé formé, son hydrolyse pourrait alors être mesurée en suivant l'apparition d'un signal fluorescent.

IV.3. Validation de la méthode d'évaluation séquentielle pour l'étude d'un groupement spiro di-orthoester

D'après l'étude bibliographique précédemment réalisée (section IV.1.3.), le groupement spiro di-orthoester doit posséder une labilité suffisante pour subir une hydrolyse en présence d'acidités physiologiques (pH 5-6).^{157,158} Avant d'envisager la synthèse d'un composé pro-fluorescent basé sur cette structure, nous avons souhaité étudier son hydrolyse à partir d'une molécule-modèle simple et détectable par HPLC-UV. Si une hydrolyse acido-spécifique est confirmée, alors cette structure sera incorporée au cœur d'une sonde pro-fluorescente de type TAMRA/BHQ-2. Puis ce composé activable devra permettre de valider l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET dans l'évaluation de la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs.

IV.3.1. Etude de l'hydrolyse d'un composé-modèle spiro di-orthoester

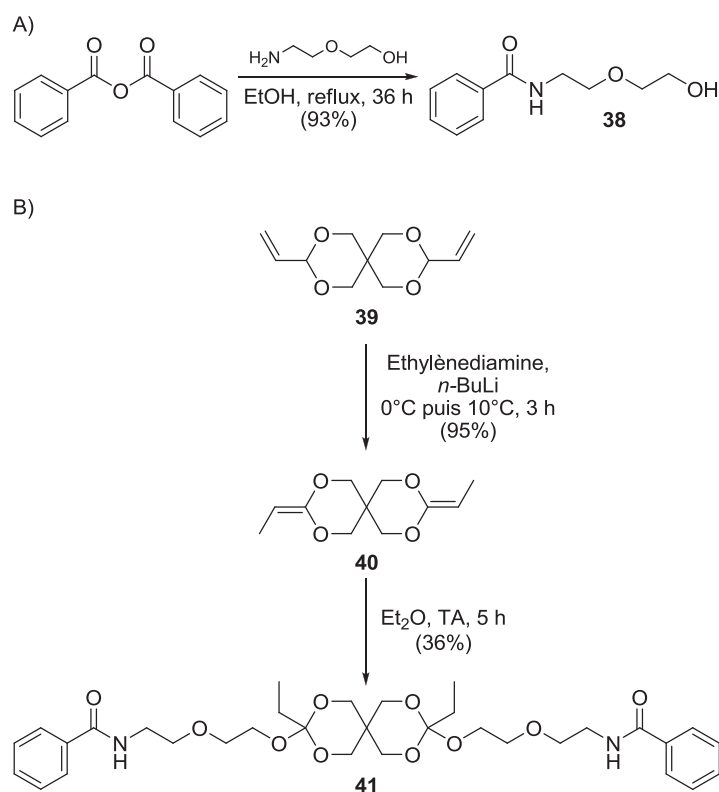
Depuis l'introduction des polymères biodégradables, l'utilisation de motifs di-orthoester hydrolysables s'est largement développée.¹⁴⁷ Par la suite, ce type de structure a également été utilisé comme lien clivable pour d'autres d'applications.^{157,158} Par exemple, Srinivasachar et *al.* ont proposé l'utilisation d'une structure spiro di-orthoester pour l'association réversible de protéines.¹⁷⁷ Pour le composé utilisé, les auteurs ont rapporté un temps de demi-vie de 1 heure à un pH de 6,4. En s'inspirant des travaux de Srinivasachar et *al.*, nous avons mis au point une structure spiro di-orthoester détectable par HPLC-UV. Puis, la labilité de ce composé-modèle a été étudiée à différents pH par HPLC.

IV.3.1.1. Synthèse d'un composé-modèle spiro di-orthoester

Dans un premier temps, un espaceur éthylène glycol détectable par UV a été synthétisé comme décrit par Zamecka-Krakowiak.¹⁷⁸ Un couplage entre l'anhydride benzoïque et le 2-(2-aminoéthoxy)éthanol a permis la formation du composé **38** avec 93% de rendement (Figure 49A).

Selon la voie réactionnelle proposée par Ng *et al.*, le di-acétal de cétène **40** a été préparé à partir du diène **39** et une réaction de migration de double liaison.¹⁷⁹ Puis une seconde étape a permis la formation du spiro di-orthoester **41** après réaction de l'alcool **38** sur les cétènes de **40**. Pour identifier la formation du produit **41**, les bruts réactionnels ont été analysés par RMN

du proton dans le DMSO- d_6 ou l'acétonitrile- d_3 . En revanche ce composé s'est montré instable dans le chloroforme deutéré. Du fait du motif éthylène glycol, ce composé n'a pas pu être purifié par précipitation comme d'autres analogues décrits dans la littérature. Dans le but d'appliquer cette méthodologie à la synthèse de sondes pro-fluorescentes et pH-sensibles, une purification par distillation sous vide n'a pas été tentée. Pour purifier ce composé, nous nous sommes donc tournés vers l'HPLC-préparative. Les premières conditions, testées en milieux neutres, ont consisté en l'utilisation d'une colonne de type Sunfire-C18 (Waters) et un mélange Eau (pH 7)/ACN comme éluant. Malgré l'utilisation de temps d'analyse courts (<10 minutes), aucune des méthodes développées n'a permis de purifier le composé **41** sans hydrolyse partielle. Pour tester des conditions basiques, une autre technologie de colonne C-18 du nom X-Bridge (Waters) a été utilisée. La phase aqueuse choisie a alors été une solution tampon de formiate d'ammonium (NH_4HCO_2) 10 mM à pH 8,5. Un premier essai de purification rapide (< 10 minutes) a démontré une parfaite stabilité du composé **41** dans ces conditions. Pour anticiper la purification de mélanges complexes, un gradient long de 40 minutes a été testé. Dans ces conditions, la purification s'est avérée être un succès.



L'utilisation de conditions aqueuses basiques (pH 8,5) s'est révélée doublement importante. En effet, elles évitent l'hydrolyse du composé **41** non seulement pendant la

purification, mais aussi, pendant l'élimination des solvants au lyophilisateur (-110°C). Avec la méthode développée, le spiro di-orthoester **41** a alors été obtenu avec 36% de rendement sur la dernière étape (Figure 49B).

IV.3.1.2. Etude de l'hydrolyse par HPLC d'un composé-modèle spiro di-orthoester

Comme précédemment, la labilité du composé **41** a été suivie aux pH 7,4 et 5,5 (section IV.2.3.2.). Pour cette étude, les cinétiques d'hydrolyse ont été enregistrées par HPLC analytique (éluant NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5). Immédiatement après la mise en solution du composé **41**, le milieu réactionnel a été analysé. Sachant que le temps de rétention du composé **41** est d'environ 10 minutes, la première mesure (t₁) a été réalisée 10 minutes après l'injection. Pour la suite de l'expérience, le milieu est analysé toutes les 20 minutes pendant 6 heures.

Pour chaque temps t_x, la quantité de produit non hydrolysé a été mesurée par le calcul d'aire sous le pic. A partir de l'aire mesurée à t₁, le pourcentage de produit hydrolysé a été calculé à l'aide de la formule suivante : %_{hydrolyse} = 100*(A_{t1}-A_{tx})/ A_{t1}. Pour chaque pH, le tracé de la variation du %_{hydrolyse} en fonction du temps a permis de représenter graphiquement la stabilité du spiro di-orthoester **41** (Figure 50). Les régressions non linéaires correspondantes ont alors été calculées à l'aide du logiciel graphprism. L'équation de chaque courbe a également rendu possible le calcul de temps de demi-vie (t_{1/2}). Afin de caractériser la sélectivité de l'hydrolyse pour un pH donné, le ratio (t_{1/2})_{pH7,4}/(t_{1/2})_{pH5,5} a été calculé. Plus ce ratio est haut, meilleure et la sélectivité.

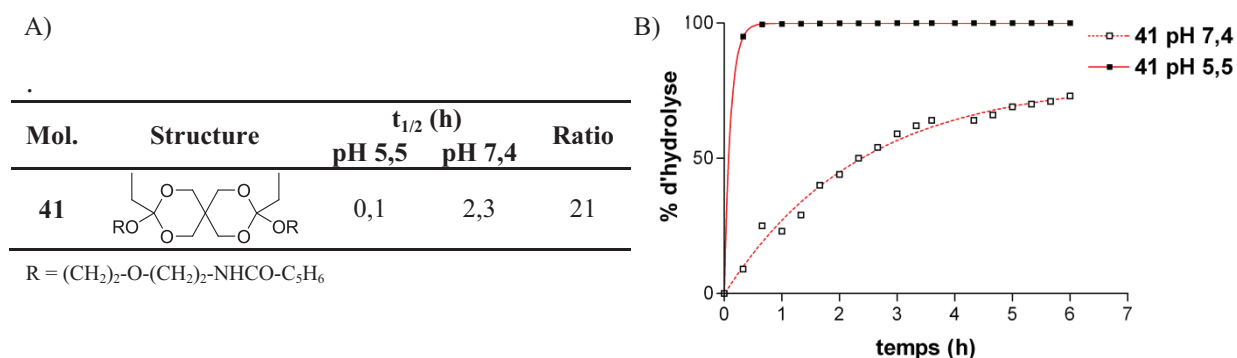


Figure 50 : Hydrolyse du spiro di-orthoester **41** : A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse aux pH 7,4 et 5,5.

En 40 minutes, une dégradation totale du composé **41** a été observée à pH 5,5 alors que seulement 25% d'hydrolyse ont été mesurés à pH 7,4 (Figure 50). Des temps de demi-vie de 0,1 et 2,3 heures ont été respectivement calculés aux pH 5,5 et 7,4. Les valeurs mesurées sont

donc du même ordre de grandeur que celle publiées dans littérature (<20 min au pH 5,5; 1 h à pH 6,4).^{157,158,177} D'après le ratio calculé entre les deux temps de demi-vie mesurés, l'hydrolyse acide du groupement spiro di-orthoester est donc apparue comme sélective. Ceci est certainement lié à son mécanisme d'hydrolyse initié par la protonation d'un oxygène endo ou exo-cyclique.¹⁸⁰

IV.3.1.3. Conclusion

Cette étude a d'abord permis de mettre en place des conditions de purification pour des composés extrêmement sensibles à pH faiblement acide. D'après l'étude cinétique préliminaire réalisée sur le motif spiro di-orthoester, cette structure possède une labilité adéquate pour notre étude. En effet, ce dernier a démontré une hydrolyse rapide et totale à pH 5,5 tandis qu'à pH 7,4, une stabilité a été observée pour des temps courts. Cette différence permet d'envisager son hydrolyse en présence d'acidités physiologiques (pH 5-7). Dans cette étude, la technique analytique utilisée a permis le calcul de temps demi-vie. Mais avec une mesure toutes les 20 minutes, l'HPLC analytique ne semble pas adaptée à la mesure de cinétiques rapides. La méthode mise au point ne devrait pas permettre d'étudier des composés plus sensibles que **41**.

Pour poursuivre notre étude et pouvoir mesurer la labilité du groupement spiro di-orthoester en milieux biologiques, ce motif a été associé aux fluorophore TAMRA et quencheur BHQ-2 pour former une sonde pro-fluorescente de type FRET et pH-sensible.

IV.3.2. Synthèse de la sonde pro-fluorescente **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**

Pour incorporer le motif spiro di-orthoester au cœur d'une sonde FRET de type TAMRA/BHQ-2, la stratégie de synthèse envisagée a consisté en la préparation d'un lien pH-sensible dérivatisable de part et d'autre par le quencheur et le fluorophore. Cette méthodologie vise à mettre au point une voie de synthèse généralisable à d'autres liaisons acido-labiles. Selon la structure du composé pH-sensible, deux stratégies de dérivatisation peuvent être envisagées (Figure 51) :

- si ce dernier possède les mêmes fonctions réactives de part et d'autre de la liaison hydrolysable, alors c'est un composé homofonctionnel. Sa double fonctionnalisation est réalisée par une réaction monotope (Figure 51A). Théoriquement, cette stratégie

peut aboutir à un mélange de 3 produits en quantité équimolaire mais elle est plus rapide.

- si ce dernier possède deux fonctions orthogonales de chaque côté du motif hydrolysable, alors on parle de lien hétérofonctionnel. Sa fonctionnalisation peut donc être réalisée à partir de deux réactions chimiques successives (Figure 51B). Cette voie est plus longue mais elle limite la formation de produits secondaires.

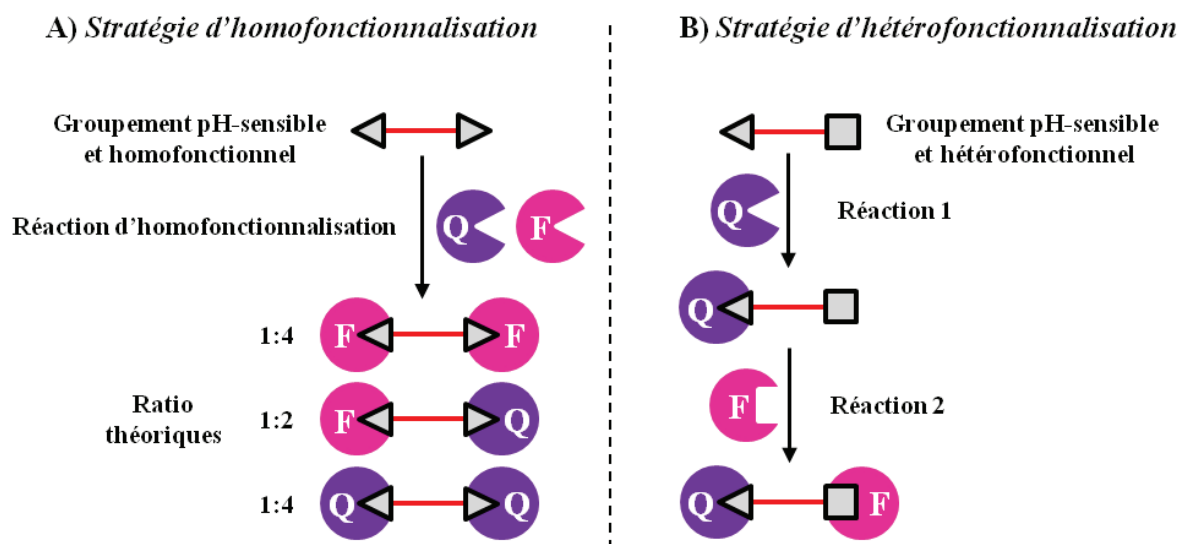


Figure 51 : Présentation des stratégies de fonctionnalisation de liens pH-sensibles par un quencheur (Q) et un fluorophore (F).

Dans une approche classique de synthèse organique, la stratégie d'hétérofonctionnalisation est souvent privilégiée. En limitant la formation de produits secondaires par le contrôle de la réactivité chimique, cette approche permet d'améliorer les rendements, mais aussi, de faciliter les étapes de purification. Comme nous avons vu précédemment avec la molécule **41**, la synthèse et la purification de composés pH-sensibles peut s'avérer excessivement délicate et contraignante. Il est ainsi préférable de limiter le nombre d'étape réactionnelle. Pour la synthèse du composé pro-fluorescent spiro di-orthoester, une stratégie d'homofonctionnalisation a ainsi été préférée avec une purification par HPLC préparative pour éliminer les produits secondaires formés.

L'étape clé de la synthèse est donc la double fonctionnalisation du groupement spiro di-orthoester par le BHQ-2 et la TAMRA. Afin d'éviter l'hydrolyse du produit attendu, cette réaction doit être réalisée en conditions douces. Notre choix s'est ainsi porté sur la formation de groupements thioéthers par réaction d'addition de Michael entre un thiol et un maléimide (Figure 52). L'introduction d'un groupement thiol sur les composés TAMRA et BHQ-2 peut être effectuée à partir de leurs fonctions acides carboxyloxyliques respectives. La formation d'un

spiro di-orthoester bis-maléimide **42** peut être réalisé par réaction d'addition de *N*-hydroxyéthylmaléimide sur un dérivé di-acétal de cétène **43** comme décrit par Srinivasachar *et al.*¹⁷⁷

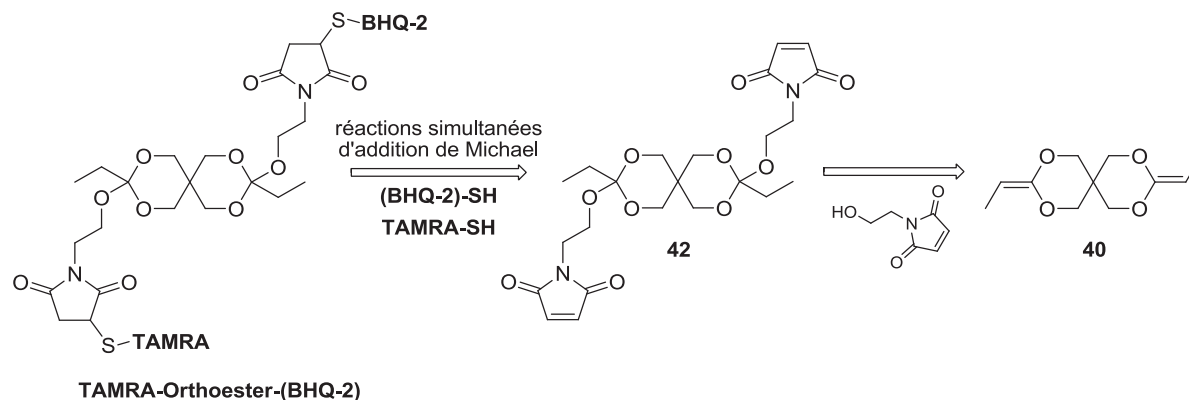


Figure 52 : Retrosynthèse envisagée pour la formation de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2).

La synthèse de *N*-hydroxyéthylmaléimide a débuté par la réaction de Diels-Alder entre un furane et l'anhydride maléique pour former l'adduit **43** avec 71% de rendement (Figure 53A). Puis, l'insertion d'éthanolamine au composé **43** a abouti au maléimide protégé **44**. Enfin, un chauffage thermique et une réaction de rétro Diels-Alder ont permis l'obtention de **45** avec 89% de rendement après sublimation. Le spiro di-orthoester bis-maléimide **42** attendu a été obtenu par la double addition de l'alcool **45** sur le composé di-acétal de cétène **40** (Figure 53B).¹⁷⁷

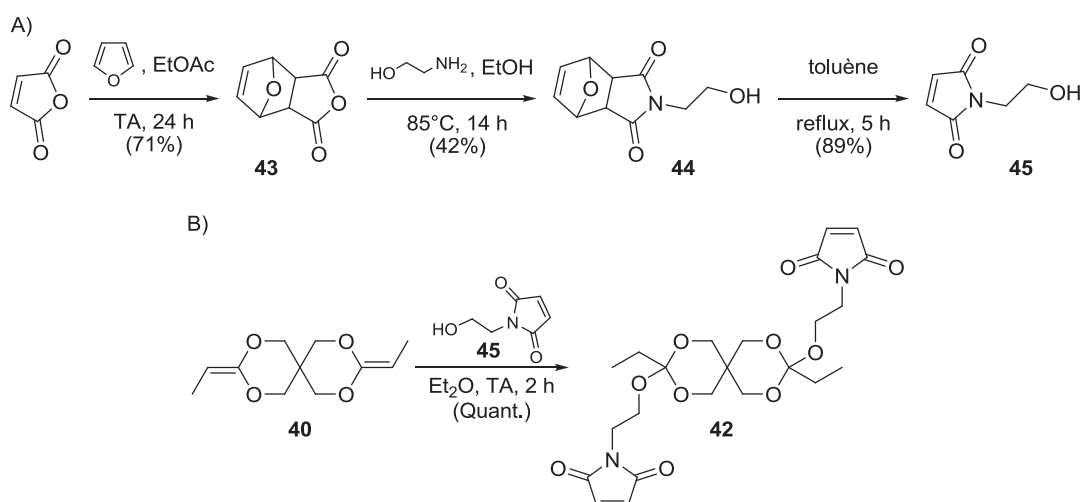


Figure 53 : Voies de synthèse des composés **43** (A) et **42** (B).

Parallèlement, des dérivés thiols de BHQ-2 et TAMRA ont été préparés par couplage avec de la cystamine plutôt que de la cysteamine afin de limiter les réactions secondaires et la

formation de thioester. En fin de couplage, une réduction des ponts disulfures au DTT a alors permis la déprotection des groupements thiols. Cette séquence de couplage/déprotection a conduit aux composés attendus **TAMRA-SH** et **(BHQ-2)-SH** avec des rendements respectifs de 75 et 59% (Figure 54). Pour le quencheur, le temps de réduction des ponts disulfures par le DTT a été réduit à 10 min. Des temps plus long ont démontré une dégradation du BHQ-2, probablement par la réduction d'un des deux motifs Azo.

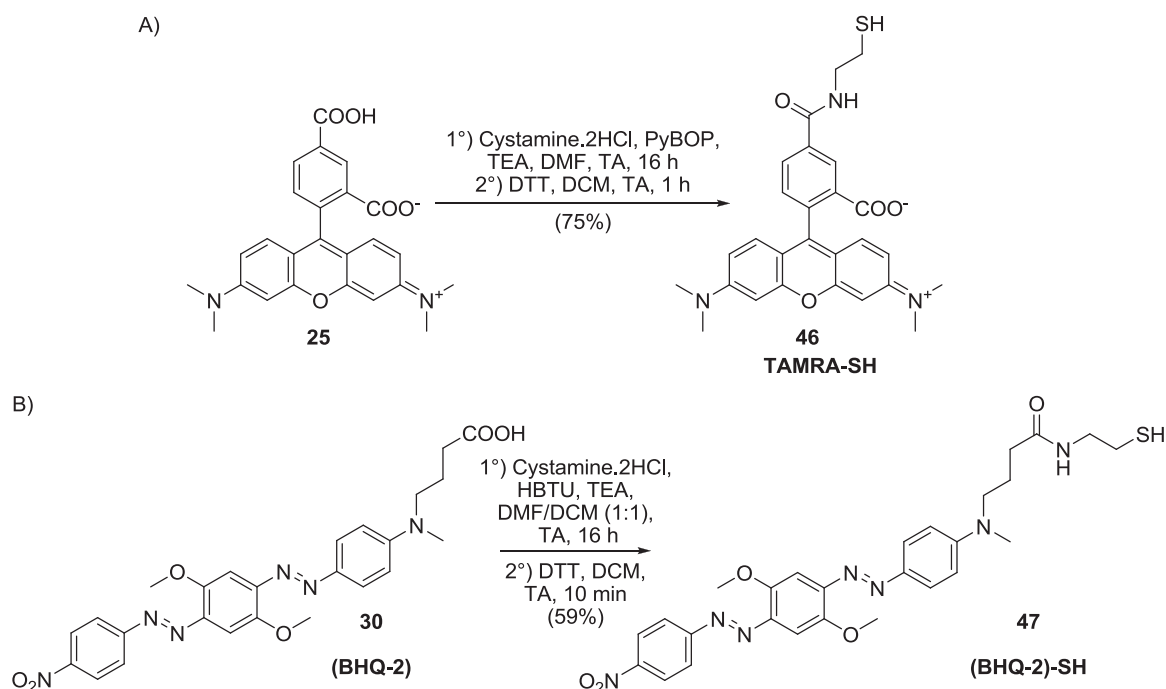


Figure 54 : Voies de synthèses des composés **TAMRA-SH** et **(BHQ-2)-SH**.

Finalement, le conjugué fluorophore/quencheur **48** a pu être produit par l'addition simultanée des thiols **(BHQ-2)-SH** et **TAMRA-SH** sur les groupements bis-maléimides de **42** (Figure 55). Après une conversion totale des produits de départ utilisés en quantités équimolaires, et une purification par HPLC préparative en conditions basiques ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5), la sonde pro-fluorescente **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été obtenue avec 20% de rendement. Le faible rendement obtenu est proche de celui théoriquement attendu pour cette réaction d'homofonctionnalisation ($\approx 33\%$). Dans cette réaction, il est possible que la formation des composés bis-TAMRA et bis-BHQ-2 ait été favorisée par des effets de solvants. Ces deux produits secondaires ont été identifiés mais leurs proportions n'ont pas été évaluées.

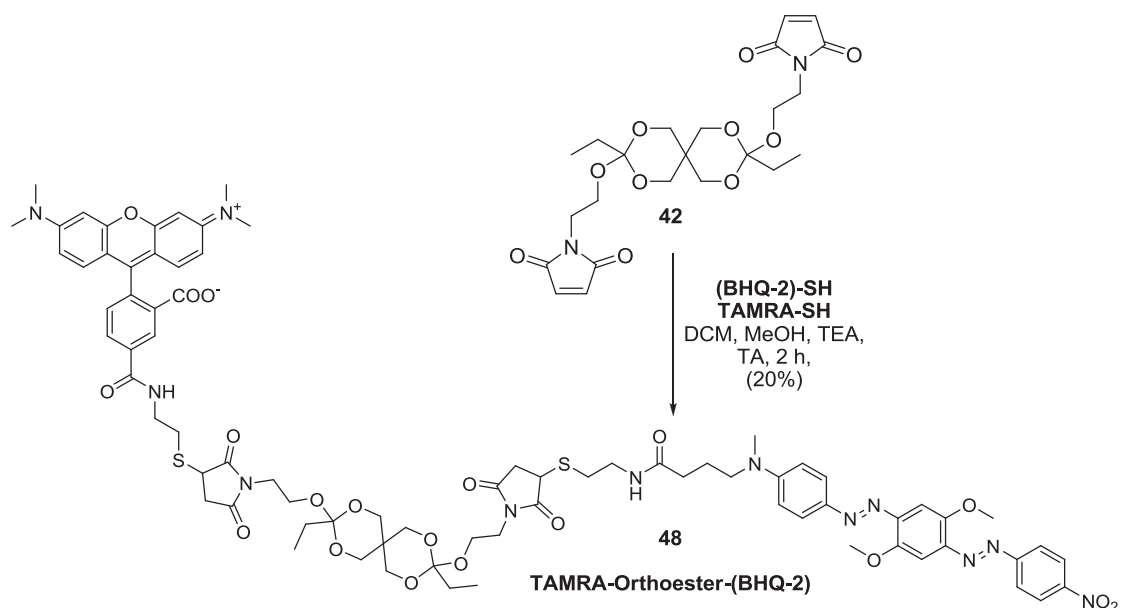


Figure 55 : Formation de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2).

Les réactions d'addition de Michael entre des thiols et des maléimides ont permis la formation du composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** tout en introduisant une nouvelle fonction chimique potentiellement hydrolysable. Dans le but d'étudier la labilité de cette liaison thioéther formée, un nouveau composé contrôle non-hydrolysable a été synthétisé. Associé à la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**, ce composé devra permettre de valider si l'activation de la fluorescence est bien due à l'hydrolyse spécifique du motif spiro di-orthoester, et non pas, d'une autre partie de la molécule.

IV.3.3. Synthèse de la sonde pro-fluorescente TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)

Pour utiliser le composé TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) comme contrôle non-hydrolysable de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2), leurs structures doivent être rigoureusement similaires. Nous avons donc envisagé la synthèse de cette sonde en remplaçant le motif acido-labile par un espaceur éthylène glycol inerte. Comme précédemment, une stratégie d'homofonctionnalisation a été envisagée pour dériver un espaceur bis-maléimide *via* deux réactions simultanées d'addition de Michael entre des thiols et des maléimides.

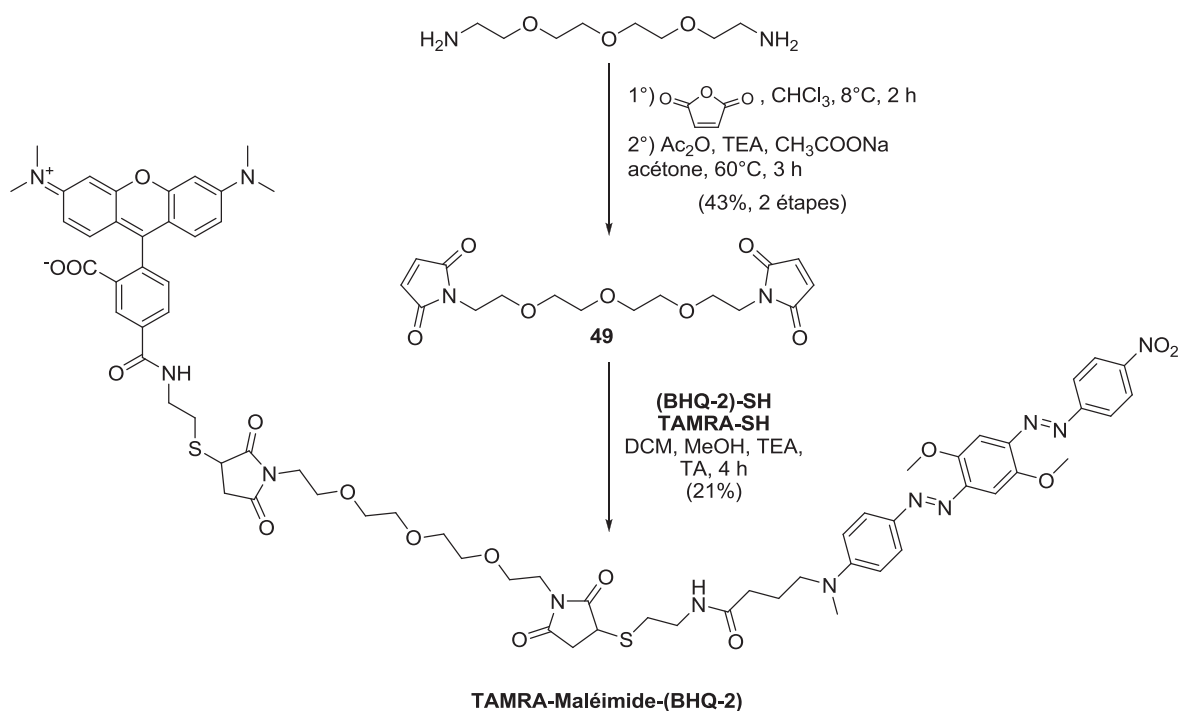


Figure 56 : Voie de synthèse de TAMRA-Maléimide-(BHQ-2).

Dans un premier temps, un espaceur triéthylène glycol et bis-maléimide a été préparé en deux étapes, comme décrit par Stites *et al.*¹⁸¹ La réaction de deux équivalents d'anhydride maléique sur un espaceur diamine a permis l'obtention d'un double acide amique. Traité par de l'anhydride acétique, cet intermédiaire est alors converti en un anhydride mixte qui se cyclise en milieu basique et forme le composé 49 attendu. Dans les conditions identiques à l'obtention de 48, les réactions simultanées de 49, (BHQ-2)-SH et TAMRA-SH ont conduit à la formation du thioéther TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) avec 21% de rendement. Contrairement à la sonde TAMRA-Orthoester-(BHQ-2), des conditions acides (ACN/H₂O, +0,05% de TFA) ont été employées pour la purification par HPLC préparative de TAMRA-Maléimide-(BHQ-2).

IV.3.4. Etude en solution de l'hydrolyse de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)

Les stabilités des composés TAMRA-maléimide-(BHQ-2) et TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) à différents pH ont été étudiées en solution afin de valider l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité d'une liaison chimique en conditions biomimétiques. Par comparaison avec la molécule modèle **41**, cette étude devrait également permettre de mesurer l'effet des groupements TAMRA et BHQ-2 sur les cinétiques d'hydrolyse.

IV.3.4.1. Validation de la méthode d'évaluation

Comme réalisé précédemment avec le composé-contrôle non-hydrolysable Amide (section IV.2.3.2.), la labilité des composés TAMRA-maléimide-(BHQ-2) et TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) a été enregistrée en solution aux pH 5,5 et 7,4 (Figure 57). Pour cette étude, un troisième milieu a été ajouté. C'est une solution diluée d'acide chlorhydrique (1 M) dont le pH est inférieur à 1. Ce milieu doit être utilisé comme contrôle-positif pour activer rapidement les composés labiles (Figure 57).

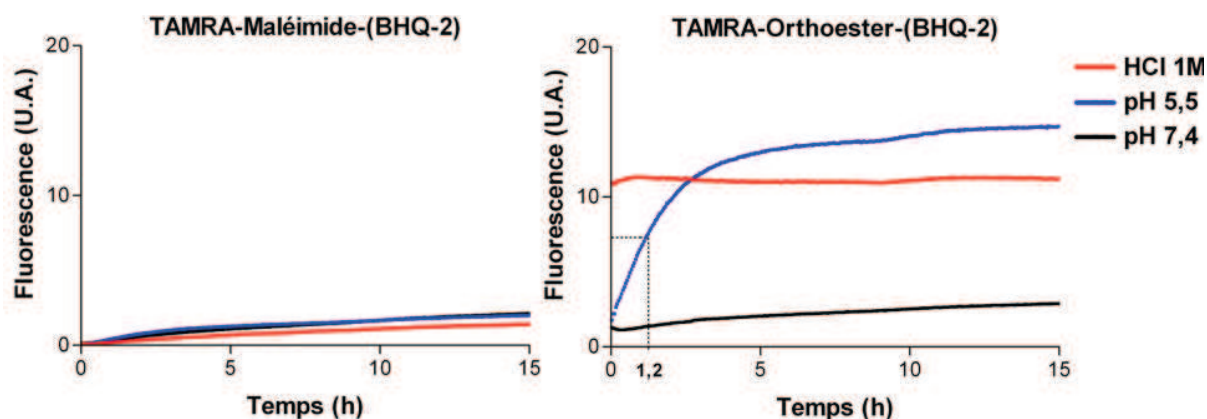


Figure 57 : Mesures de labilité des sondes TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) (0,5 μ M) dans une solution diluée d'acide chlorhydrique (1 M, pH<1) et en milieux tamponnés ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 5,5 et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4 ; 100 mM) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Le composé TAMRA-Maléimide-(BHQ-2), a montré une légère augmentation de la fluorescence au cours du temps et quel que soit le pH (Figure 57). Néanmoins, les profils cinétiques observés sont similaires à ceux enregistrés pour la molécule-contrôle non-hydrolysable TAMRA-Amide-(BHQ-2) (Figure 48). Dans les conditions testées, la liaison thioéther de l'adduit thiol/maléimide n'a donc pas subi d'hydrolyse particulière.

Une réactivation totale de la fluorescence de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été observée, de manière quasi-instantanée à un pH inférieur à 1 (Figure 57). A pH 5,5, l'activation du composé pro-fluorescent s'est faite plus lentement, jusqu'à atteindre un plateau après 5 heures. Un temps de demi-vie de 1,2 heures a pu être calculé dans ce milieu. Selon le pH (<1 ou 5,5), nous avons noté que l'intensité maximale atteinte pour une réactivation totale est différente. Ceci s'explique par le fait qu'une partie de la fluorescence de la rhodamine est éteinte à un pH très acide (Figure 42, section IV.3.3.2.). Enfin à pH 7,4, la cinétique enregistrée s'est avérée lente. Pour ce pH, l'extrapolation de la courbe observée a permis l'estimation d'un temps de demi-vie supérieur à 40 heures.

Le composé **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** s'est révélé stable, tandis qu'une hydrolyse pH-dépendante de la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été constatée. Cela indique que l'activation de la fluorescence du composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** dépend uniquement de la labilité du motif spiro di-orthoester. Ce résultat a validé l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité d'une liaison chimique en solution.

Basé sur le même groupement hydrolysable spiro di-orthoester, les labilités des composés **41** et **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** ont été comparées à pH 5,5. Pour l'hydrolyse du composé **41** étudié par HPLC, un temps de demi-vie de 0,1 heure a été calculé. Avec la molécule pro-fluorescente, ce même paramètre est de 1,2 heures. La labilité du groupement pH-sensible est donc 12 fois moins importante après incorporation dans la sonde FRET. Les molécules de BHQ-2 et de TAMRA exercent un effet direct sur la labilité de la liaison acido-labile en modifiant son environnement local. Dans la littérature, ce même type de phénomène a également été observé, notamment pour la conception de polymères biodégradables (voir section IV.1.3.).¹⁴⁶ Ces résultats soulignent ainsi la pertinence de la méthode développée avec utilisation de sonde pro-fluorescente de type FRET comme modèle de système de délivrance.

Pour caractériser plus finement la labilité du groupement spiro do-orthoester en milieux acides, une seconde étude a consisté à mesurer l'hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** pour chaque unité de pH comprise entre pH 3 et 7.

IV.3.4.2. Etude fine de la labilité du groupement spiro di-orthoester aux pH acides

Les cinétiques d'hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** ont été enregistrées comme précédemment. Les différents milieux d'étude, aux pH 3, 4, 5, 6 et 7, ont été préparés à partir d'un système tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (100 mM) (Figure 58).

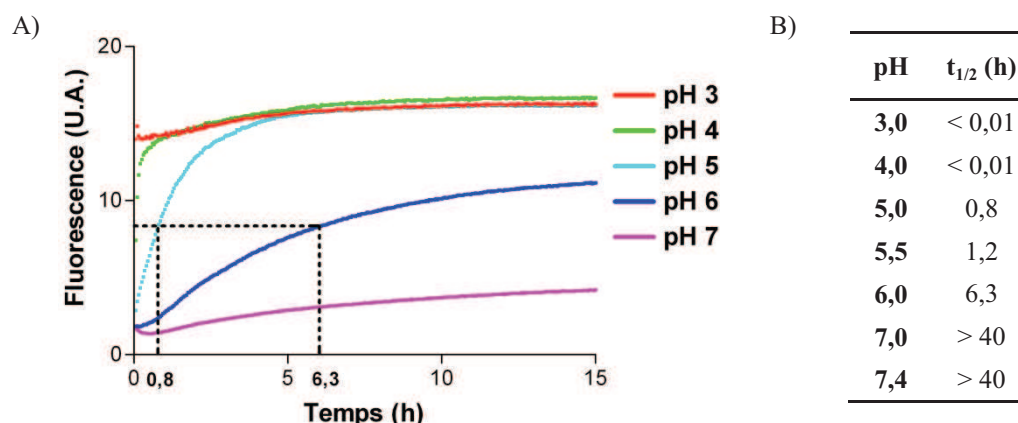


Figure 58 : A) Cinétiques d'hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** (0,5 μM) à différents pH ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM ; pH (3-7)) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence; B) Tableau récapitulatif des temps de demi-vie calculés à chaque pH.

En deçà de pH 3, la sonde pro-fluorescente **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été totalement et instantanément activée tandis qu'à pH 4, ce même résultat a été obtenu en 1 heure (Figure 58A). Dans ces deux milieux, le temps de demi-vie n'a pu être calculé. A pH 5, une activation totale de la fluorescence a été constatée après 4,5 heures. Dans cette solution, l'hydrolyse du groupement acido-labile est caractérisée par un temps de demi-vie de 0,8 heures (Figure 58B). Aux pH 6 et 7, l'acidité des solutions utilisées n'a pas provoqué l'hydrolyse totale du composé pro-fluorescent **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**. Néanmoins à pH 6, un temps de demi-vie de 6,3 heure été mesuré. Comme précédemment, l'extrapolation de la cinétique observée à pH 7 a permis d'estimer un temps de demi-vie supérieur à 40 heures.

Par rapport aux temps de demi-vie calculé à pH 5,5 (Figure 58B) :

- Une augmentation de l'acidité de 0,5 unité de pH permet de diminuer le temps de demi-vie d'un facteur 1,5.
- Une diminution de l'acidité de 0,5 unité de pH conduit à augmenter le temps de demi-vie d'un facteur 5,2.

Le système de sonde pro-fluorescente mis au point permet donc d'évaluer la labilité d'une liaison chimique vis-à-vis de faibles variations de pH et notamment dans la gamme d'acidité physiologique recherchée (pH 5-7) (voir section IV.1.).

IV.3.4.3. Conclusion

Cette étude, menée en solution dans des conditions biomimétiques, a permis de corréler l'activation de la sonde pro-fluorescente **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** à l'hydrolyse du motif spiro di-orthoester. Ce résultat a ainsi validé l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité d'une liaison chimique en solution. Les données cinétiques enregistrées ont notamment démontré une hydrolyse sélective du motif pH-sensible en milieu acide et dans une gamme de pH comprise entre 3 et 6. Au delà, le motif spiro di-orthoester est relativement stable. Ce groupement semble donc parfaitement adapté pour une hydrolyse spécifique dans les conditions d'acidité lysosomale et tumorale. Après cette étude en solution, la complexité du milieu d'évaluation a alors été poussée jusqu'au niveau cellulaire afin d'étudier l'hydrolyse lysosomale de la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**.

IV.3.5. Etude de l'hydrolyse en cellules vivantes de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**

Les composés **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** ont été incubés en présence de cellules vivantes afin d'évaluer l'hydrolyse du motif spiro di-orthoester sous l'action de bio-stimuli. Parmi les différents types cellulaires existants, les hépatocytes sont connus pour leurs fortes activités métaboliques. Avec ce type cellulaire, les sondes pro-fluorescentes devraient être soumises à un nombre important de bio-stimuli. Des cellules hépatiques de souris de type BNL CL.2 ont été choisies pour l'ensemble de l'étude. L'activation de la fluorescence par hydrolyse intracellulaire a été suivie en microscopie confocale à balayage laser.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec :

- l'équipe de chimie génétique (UMR 7199) qui a effectué la culture cellulaire, tandis que la microscopie a été réalisée de façon conjointe.
- l'équipe de chimiogénomique et pharmacogénomique (UMR7175) qui a réalisé les lectures en cytométrie de flux.

IV.3.5.1. Suivi d'hydrolyse par microscopie de fluorescence

Dans le cadre d'expériences préliminaires, le composé **TAMRA-Alcyne** a été incubé en présence d'hépatocytes BNL CL.2 à 10 μ M pendant 2 h. L'imagerie de ces cellules a révélé une absence de fluorescence malgré l'utilisation d'un temps d'incubation long et d'une concentration importante en fluorophore (résultats non présentés). Soit le fluorophore a été

rapidement excrété, soit les cellules utilisées se sont montrées imperméables au dérivé **TAMRA-Alcayne**. La mise au point des conditions d'incubations a donc été directement effectuée avec le composé activable **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**. L'influence de la concentration sur l'activation de la sonde pro-fluorescente a été étudiée. Puis, l'hydrolyse des composés **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** a été suivie afin d'évaluer la spécificité de l'hydrolyse du motif spiro di-orthoester en conditions cellulaires.

Typiquement, le protocole suivi a consisté à incuber pendant 1h30 les cellules vivantes en présence **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** à des concentrations comprises entre 0,25 et 5 μM . Après une étape de lavage pour éliminer l'excès de sonde, un second marquage a été réalisé avec le réactif de Hoechst (5 $\mu\text{g/mL}$, 30 min). Ce fluorophore bleu a été utilisé pour localiser les noyaux cellulaires et faire la mise au point en imagerie. Une dernière étape de lavage a été effectuée puis les cellules ont été observées en microscopie confocale (Figure 59).

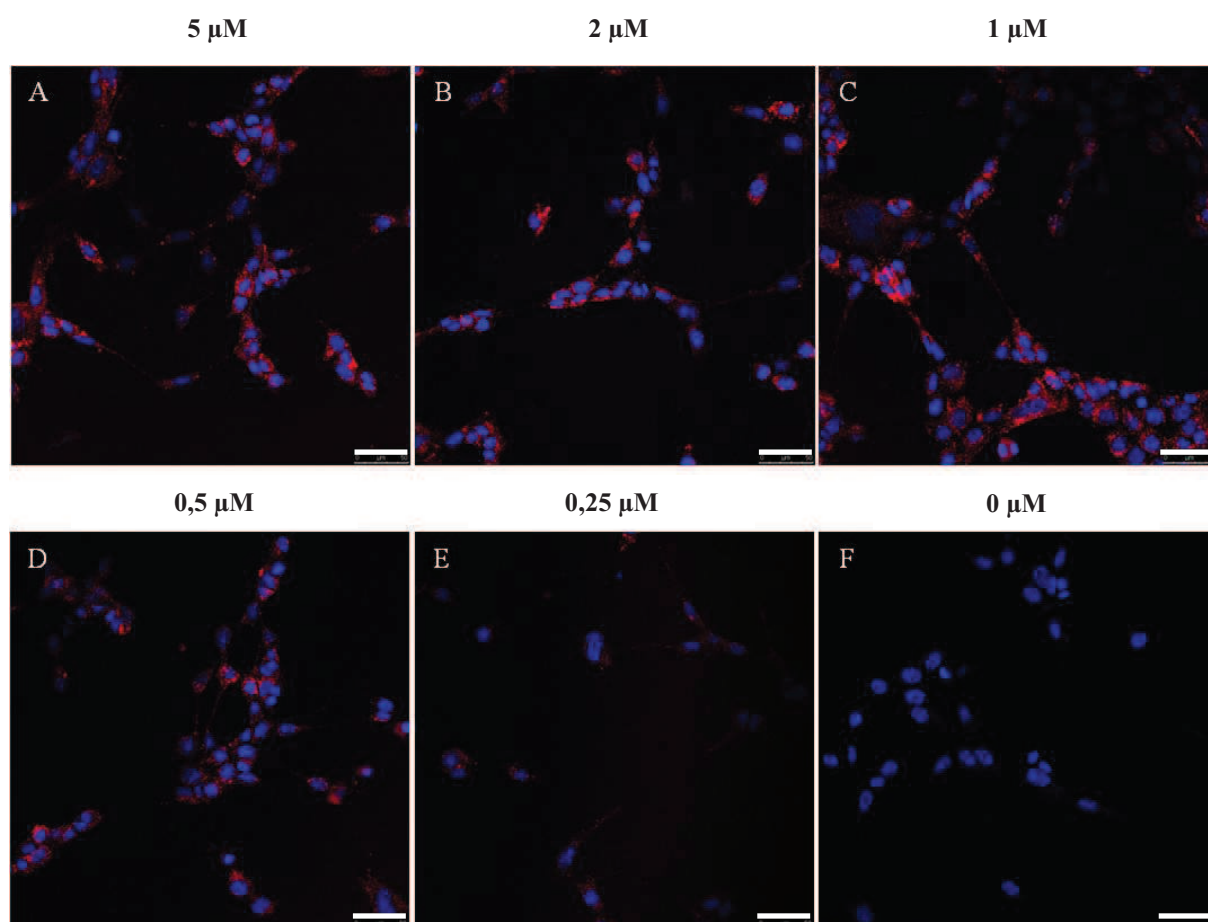


Figure 59 : Effet de la concentration de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) sur le marquage de cellules BNL CL.2. Présentation d'images fusionnées. Canal rouge : TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) (0,25 à 5 μM , 1h30), canal bleu : marquage de Hoechst (5 $\mu\text{g/mL}$, 30 min). La barre d'échelle correspond à 50 μm .

Aux concentrations comprises entre 1 et 5 μM , un signal fluorescent intracellulaire a été détecté (Figure 59, images A-C). En revanche, à partir de 0,5 μM , une baisse d'intensité a été observée jusqu'à atteindre un marquage quasi-nul à 0,25 μM (Figure 59, images D et E). Pour les cellules non traitées, aucune autofluorescence n'a été constatée (Figure 59, image F). Le signal observé pour les cellules traitées est donc bien dû à une hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**. Il est à noter qu'aucune toxicité du produit n'a été observée pendant le temps d'expérience pour l'ensemble des concentrations. Parmi les conditions testées, la concentration de 1 μM pendant 1h30 d'incubation a été choisie pour le reste de cette étude. Ces conditions devraient permettre de suivre l'activation de composés moins labiles que l'orthoester.

L'apparition de fluorescence dans les cellules traitées par le composé pro-fluorescent **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a confirmé l'hydrolyse intracellulaire de ce composé. Pour corréler l'activation du signal fluorescent à l'hydrolyse sélective du motif spiro di-orthoester, les composés **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et le contrôle non-hydrolysable **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** ont été simultanément étudiés. Ces molécules ont été incubées en présence de cellules vivantes, dans les conditions précédemment mises au point (Figure 60).

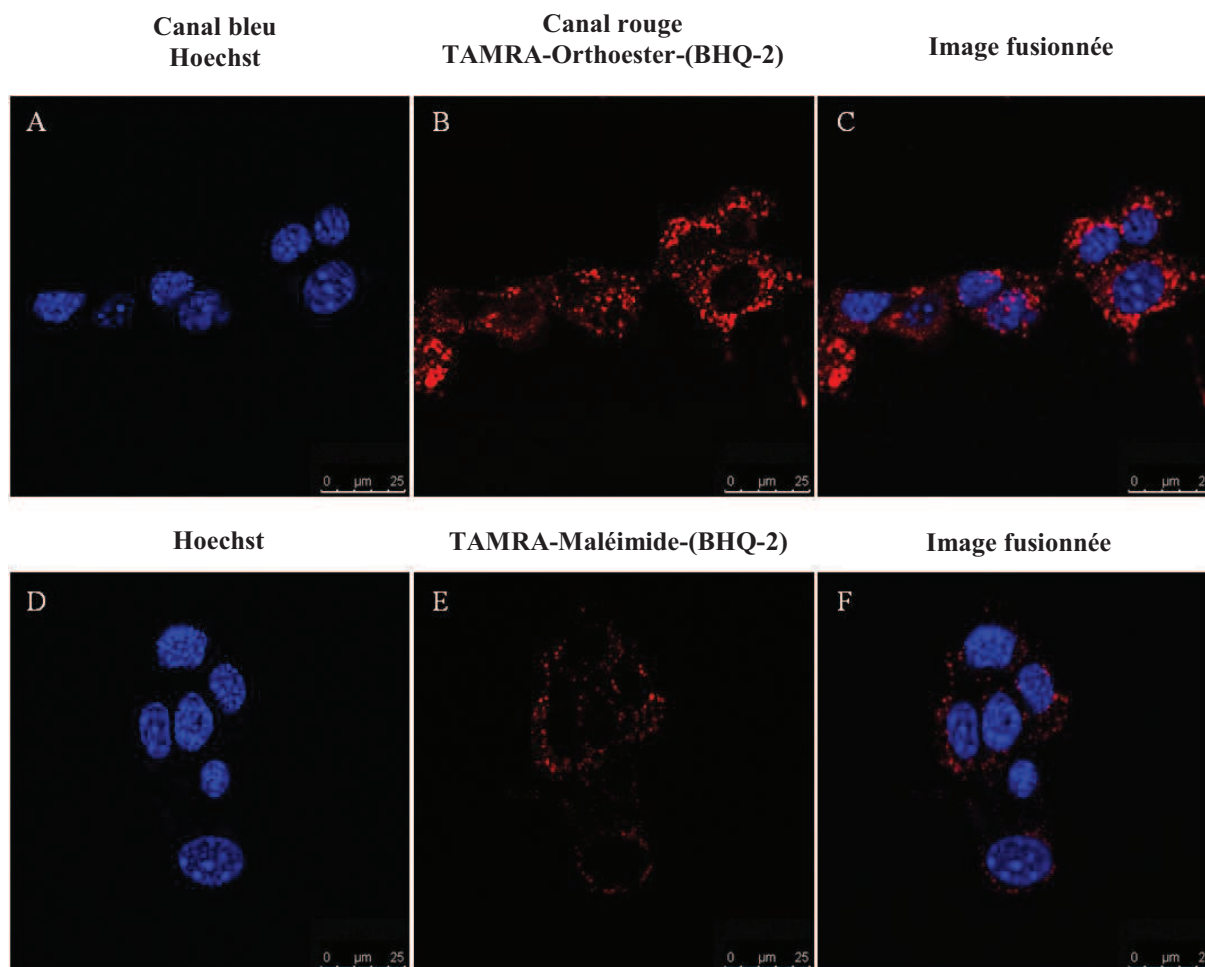


Figure 60 : Différences d'activation, en cellules BNL CL.2, entre TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) et TAMRA-Maléimide-(BHQ-2). Images A et D canal bleu : marquage de Hoechst (5 µg/mL, 30 min) ; Images B et E canal rouge : sonde activable (1 µM, 1h30) ; Images C et F : images fusionnées. La barre d'échelle correspond à 25 µm.

Les deux sondes utilisées ont démontré une fluorescence intracellulaire (Figure 60, images B et E). Cependant, les niveaux d'intensité ont grandement différenciés selon les composés. Avec le groupement orthoester, un signal fluorescent très intense a été détecté (Figure 60, image B), tandis que pour le dérivé maléimide, cette intensité a été beaucoup plus faible (Figure 60, image E). D'autres expériences réalisées dans les mêmes conditions et avec le contrôle non-hydrolysable TAMRA-Amide-(BHQ-2) ont démontré une absence totale de signal (voir section IV.4.4.1.). Le faible signal observé pour le dérivé maléimide semble donc associé à une hydrolyse de la liaison thioéther. La réaction entre un thiol et un maléimide est à la base de nombreux systèmes de bioconjugaison de protéines ou d'anticorps. Pourtant, à notre connaissance, la labilité d'un adduit thiol/maléimide n'a jamais été reportée en conditions cellulaires.

Bien que le composé **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** se soit révélé faiblement labile, l'expérience réalisée a confirmé l'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** par l'hydrolyse sélective du groupement spiro di-orthoester. Si cette hydrolyse est acido-catalysée, alors elle devrait s'effectuer dans les organelles acides des cellules. Les premières observations réalisées vont dans ce sens puisque le signal fluorescent a été détecté dans des zones très localisées et proches du noyau. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience de co-marquage des lysosomes a été envisagée avec un fluorophore BODIPY commercial appelé Lysotracker® green DND-26. Ce marqueur consiste en l'association d'une base faible et d'un fluorophore émettant dans le vert. Après son passage membranaire et une protonation, ce dernier s'accumule sélectivement dans les organelles acides des cellules.¹⁸²

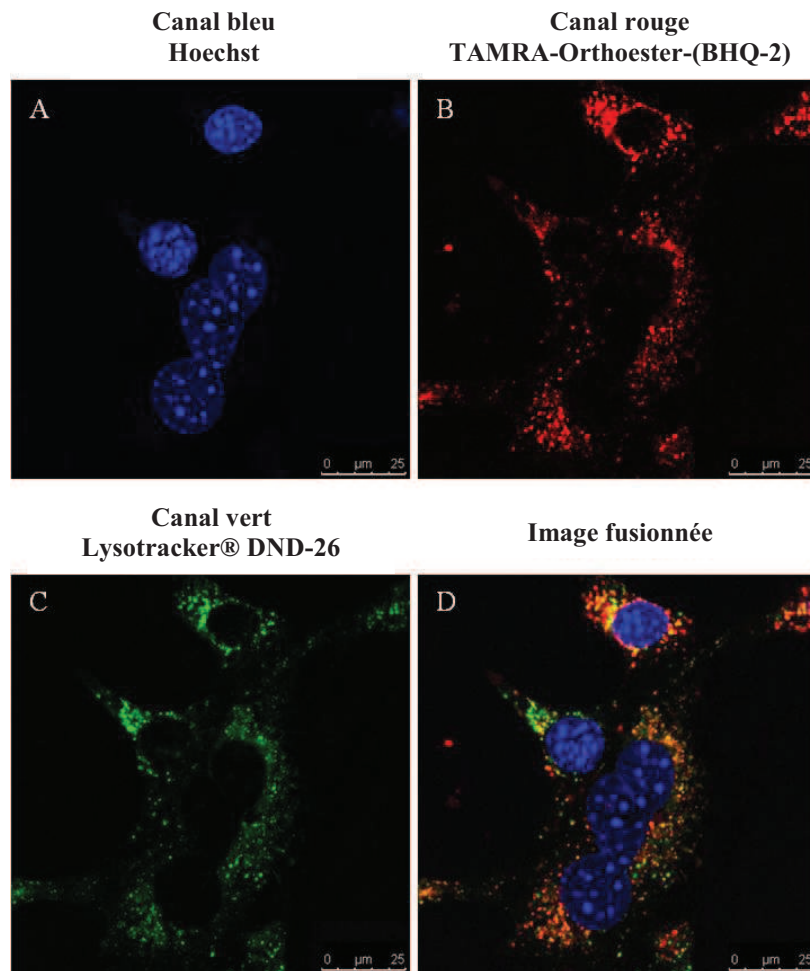


Figure 61 : Co-marquage de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) et Lysotracker® DND-26 en cellules BNL CL.2. Image A canal bleu : marquage de Hoechst (5 µg/mL, 30 min) ; Image B canal rouge : TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) (1 µM, 1h30) ; Image C canal vert Lysotracker® DND-26 (75 nM, 30 min) ; Image D : image fusionnée. La barre d'échelle correspond à 25 µm.

Des cellules ont été incubées en présence de la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** à 1 µM pendant 1h30. Après une séquence de lavage, un marquage simultané des noyaux et des

organelles acides a été réalisé pendant 30 minutes, avec respectivement le réactif de Hoechst (5 µg/mL) et du LysoTracker® DND-26 (75 nM). Après une dernière étape de lavage, les cellules ont été observées en microscopie confocale. Les images obtenues en fluorescence rouge (TAMRA) et verte (LysoTracker®) ont alors été superposées pour mettre en évidence une importante co-localisation (couleur orange) des deux fluorophores utilisés (Figure 61, image D). Ces résultats ont ainsi permis de confirmer un marquage spécifique des lysosomes par l'hydrolyse acido-catalysée de la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**.

Si la microscopie peut permettre la localisation d'une hydrolyse à l'échelle cellulaire, il n'est pas toujours évident de quantifier finement le signal détecté. Pourtant, dans notre étude, la quantification est essentielle pour optimiser la labilité d'une liaison chimique à partir d'une étude de structure-réactivité. De plus, le matériel d'imagerie dont nous disposons n'est pas adapté pour des expériences à haut débit. Dans le cadre de la méthodologie mise en place, la notion de criblage est indispensable car elle doit permettre l'étude d'une liaison chimique vis-à-vis d'un nombre important de conditions cellulaires. Pour contourner ces limitations, nous avons souhaité étudier l'hydrolyse des sondes pro-fluorescentes par cytométrie de flux.

IV.3.5.2. Suivi d'hydrolyse par cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique permettant de caractériser une suspension cellulaire et/ou particulaire mono-disperse. Son principe repose sur la mesure de la diffraction lorsqu'une particule passe à travers un laser. Appliquée à des suspensions cellulaires, une détection par diffusion permet de caractériser des paramètres physiques comme la taille et la granulosité des cellules. Ces données peuvent ainsi permettre le tri d'une population cellulaire hétérogène en sous-populations homogènes. Lorsqu'un détecteur de fluorescence est associé au système de cytométrie, il devient alors possible de quantifier précisément la fluorescence intracellulaire de chaque cellule analysée. C'est pourquoi, la technique de cytofluorométrie de flux a été choisie pour le suivi et la quantification de l'hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** en cellules BNL CL.2.

Dans des conditions normales d'utilisation, le microscope confocale et le cytofluoromètre de flux utilisés offrent des niveaux de sensibilité équivalents. Les conditions d'incubation utilisées en microscopie ont donc été transposées à cette étude, à l'exception du marquage nucléaire (non nécessaire). Les deux composés **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** ont alors été incubés en présence de cellules vivantes à 1 µM et pendant

différents temps (20, 40, 60, 90, 120 et 180 minutes). Après une étape de lavage, les cellules adhérentes ont été traitées par de la trypsine (5 min) afin d'obtenir une suspension cellulaire pour chaque condition testée. Puis, une analyse en cytométrie de flux des échantillons a conduit à la quantification de la fluorescence intracellulaire de 500 cellules par suspension. La valeur moyenne calculée pour chaque condition a été reportée sous forme de graphe représentant la variation de la fluorescence intracellulaire en fonction du temps d'incubation (Figure 62).

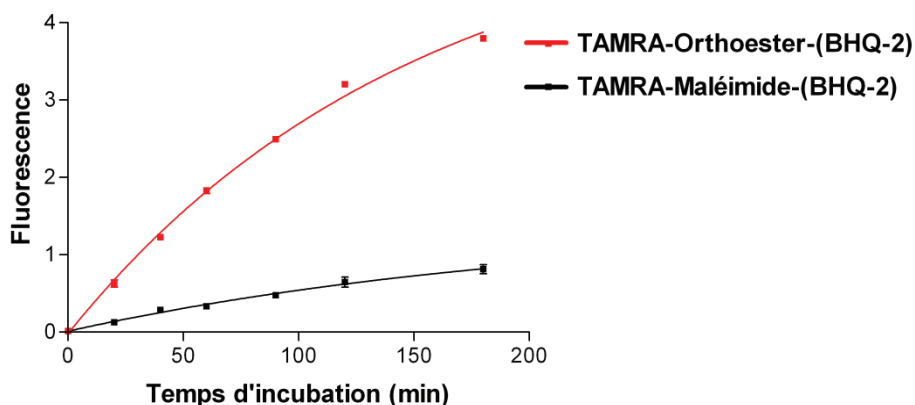


Figure 62 : Influence du temps d'incubation sur l'activation des sondes TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) et TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) (1 μ M) en cellules BNL CL.2 ; Mesures effectuées par cytométrie de flux (500 cellules/échantillon).

Les résultats ont démontré une forte dépendance entre le temps d'incubation et la quantité de signal activée (Figure 62). Quel que soit le composé, plus le temps est long, meilleur est le signal. Après 3 heures d'incubation, le composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a révélé un signal fluorescent quatre fois plus intense que le composé **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)**. Il existe donc un effet d'accumulation du fluorophore après l'hydrolyse des deux sondes FRET. Les cinétiques enregistrées ont également confirmé les observations réalisées précédemment en microscopie : une faible labilité de la liaison thioéther du composé-contrôle et l'hydrolyse spécifique du groupement spiro di-orthoester.

Pour apporter une preuve supplémentaire à l'hydrolyse acido-catalysée et intracellulaire de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**, nous avons envisagé de moduler l'acidité des lysosomes de cellules BNL CL.2. D'après la littérature, ce phénomène peut être induit en incubant des cellules vivantes en présence de bases faibles comme la chloroquine.¹⁸³ En effet, l'accumulation de ce composé au sein des lysosomes conduit à la formation de sa base conjuguée par protonation, et ainsi à une diminution de l'acidité. Une étude réalisée par Tietz

et al. a notamment démontré que l'administration *in-vivo* de chloroquine peut induire une modification du pH intracellulaire d'hépatocytes de rat (environ 2 unités de pH en 1 heure).¹⁸³

L'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a alors été suivie en cellules BNL CL.2 saines ou prétraitées à la chloroquine (200 μ M, 2h). Comme précédemment, le composé pro-fluorescent a été incubé à 1 μ M et pendant différents temps. Pour les cellules prétraitées, cette incubation s'est également réalisée en présence de chloroquine (200 μ M). Les suspensions cellulaires ont ensuite été préparées et analysées comme lors de l'expérience précédente (Figure 63).

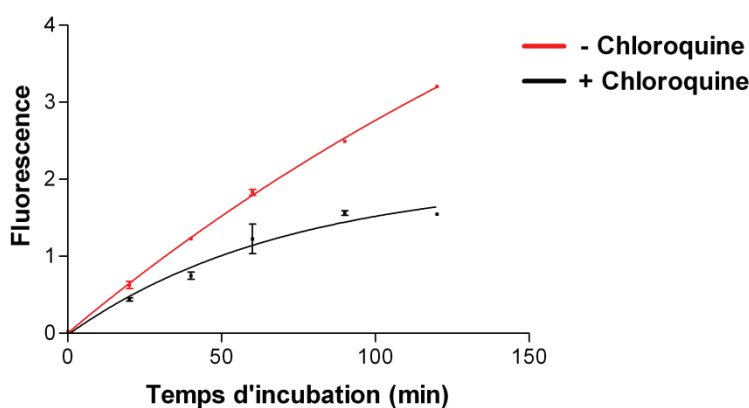


Figure 63 : Effet de la chloroquine sur l'activation de la sonde pro-fluorescente TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) (1 μ M) en cellules BNL CL.2 ; (+ Chloroquine) = cellules prétraitées avec chloroquine (200 μ M, 2h) et ajout de chloroquine (200 μ M) pendant l'incubation de TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) ; (- Chloroquine) = cellules BNL CL.2 non-traitées ; Mesures effectuées par cytométrie de flux (500 cellules/échantillon).

D'après les mesures enregistrées, le traitement à la chloroquine a permis de modifier les cinétiques d'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** (Figure 63). Si, à des temps courts d'incubation, l'influence de la chloroquine est faible, à partir de 90 minutes d'incubation, une nette différence est observée entre les cellules saines et traitées. Au temps 120 minutes, la chloroquine a permis de diminuer d'un facteur deux, l'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et par conséquent l'hydrolyse du groupement spiro di-orthoester.

Comme en solution, ces premiers résultats ont démontré la dépendance existante entre un pH acide et la labilité de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**. Dans le cadre d'une prochaine étude, les profils d'hydrolyse observés par cytométrie de flux devront être associés à une valeur de pH acide, comme observés en solution. Pour cela, de nouvelles expériences sont nécessaires afin de mesurer le pH lysosomal des cellules utilisées à l'aide d'un pro-fluorophore pH-sensible et ratiométrique. Pour cette expérience, l'utilisation de la sonde commerciale

pHrodo™ Red Dextran est envisagée.¹⁸⁴ Lorsque cette étude aura été réalisée, nous devrions être en mesure de conclure s'il est possible d'anticiper la labilité acido-catalysée et intracellulaire d'un composé à partir de ses cinétiques d'hydrolyse réalisées en solution biomimétiques. Dans une approche inverse, il sera peut-être possible de mesurer un pH d'activation intracellulaire à partir de cinétiques enregistrées en solution.

IV.3.5.3. Conclusion

L'ensemble des études menées *in-cellulo* a confirmé l'activation intracellulaire de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** par l'hydrolyse lysosomale du groupement spiro di-orthoester. De plus, la labilité de ce motif pH-sensible a pu être directement liée à l'acidité des lysosomes. En présence de chloroquine, connue pour augmenter le pH des lysosomes, l'hydrolyse du groupement spiro di-orthoester a pu être ralentie d'un facteur deux. De nouvelles études sont actuellement en cours pour corrélérer les profils d'hydrolyse intracellulaire observés à des valeurs de pH acides. L'imagerie et la cytométrie de flux par fluorescence ont également révélé une faible activation de la sonde **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** en conditions cellulaires. Pourtant, ce composé ne s'est pas révélé acide-sensible lors de l'étude en solution. Cela semble donc indiquer que l'adduit thiol/maléimide possède également une labilité cellulaire pouvant être induite par les mécanismes de dégradation des lysosomes.

Comme présenté en introduction, un groupement pH-sensible utilisé en prodrogue peut être libéré selon deux voies d'acidité : lysosomale et/ou tumorale (voir section IV.1). Après avoir validé l'hydrolyse d'un groupement spiro di-orthoester par la voie lysosomale, la labilité du composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été suivie en présence d'acidité tumorale (voir section IV.1.2).

IV.3.6. Etude de l'hydrolyse en animal et en milieu tumoral de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**

Dans la littérature, l'utilisation de polymères basés sur le motif spiro di-orthoester a déjà été décrite pour la libération contrôlée *in-vivo* d'anticancéreux comme la 5-fluorouracile.^{185,186} Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude spécifique à propos de l'hydrolyse acido-catalysée d'un motif orthoester dans un environnement intra-tumoral acide.

Dans le cadre de cette étude, le choix du modèle tumoral s'est dirigé vers la recherche de tumeurs non seulement acides, mais aussi pouvant être des cibles biomédicales, comme des glioblastomes.¹⁸⁷ Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de gliomes de rat C6. Cette lignée présente notamment des caractéristiques de tumeur très invasive, très infiltrante, très angiogénique, et donc tous les signes histologiques du glioblastome humain.¹⁸⁸ Pour évaluer la labilité du groupement spiro di-orthoester dans un milieu tumoral, le modèle animal utilisé a ainsi consisté en des souris nues, porteuses de gliomes de rat C6 implantés en sous-cutané.

Dans cette étude, l'ensemble du travail expérimental a été réalisé par l'équipe de l'implication du microenvironnement sur l'angiogenèse et l'invasion tumorale (INSERM U682).

IV.3.6.1. Validation de la méthode d'évaluation

Pour valider *in-vivo* la méthode d'évaluation développée à partir de sondes pro-fluorescentes, notre étude s'est basée sur la comparaison des cinétiques d'activation des composés **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** en souris nues porteuses de gliomes de rat C6. De plus, le dérivé **TAMRA-Alcyne** a été utilisé comme contrôle-positif pour évaluer la distribution, l'élimination et la métabolisation du fluorophore. Si toutes les sondes sont utilisées à la même concentration, ce composé-contrôle doit permettre d'évaluer le niveau maximum de fluorescence à détecter si le composé pro-fluorescent acido-labile est totalement hydrolysé.

Une solution de chaque composé (**TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**, **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Alcyne**) a été préparée à une concentration de 1 mM dans du tampon PBS. L'expérience a été menée sur trois souris porteuses de tumeurs. Chaque souris a reçu par injection intraveineuse 100 μ L d'une des solutions. Des images de fluorescence de chaque souris ont alors été enregistrées trois fois : à l'administration des composés, puis après 30 et 40 minutes. Pendant les phases d'injection et d'acquisition d'images, les animaux ont été anesthésiés par voie gazeuse (isoflurane) (Figure 64).

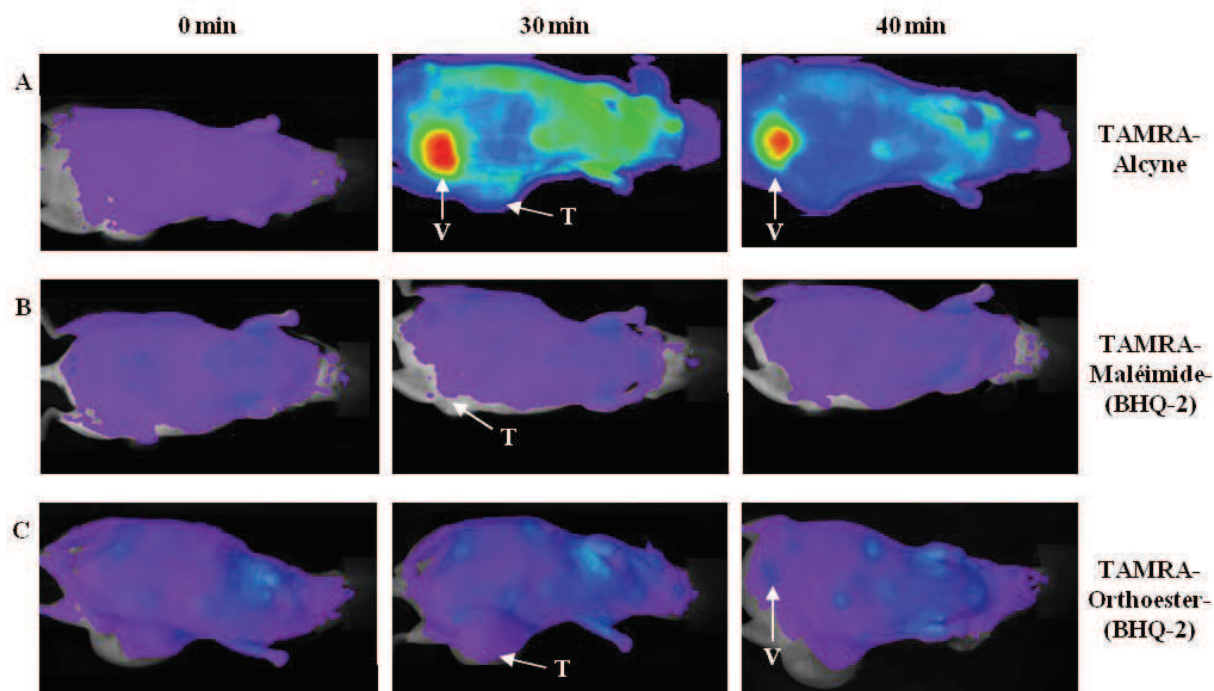


Figure 64 : Suivi cinétique d'activation des sondes pro-fluorescentes en souris nues. Images enregistrées à 0, 30 et 40 minutes après administration des composés par injection intraveineuse (1 mM) ; Présentation de vues ventrales : A) TAMRA-Alcyne, B) TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et C) TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) ; T = Tumeur, V = Vessie.

Trente minutes après l'administration, le composé **TAMRA-Alcyne** a été détecté dans l'animal entier et plus particulièrement dans la vessie (Figure 64A). Au bout de 40 minutes, le niveau général de fluorescence décroît : le fluorophore ne s'accumule pas. De plus, son excrétion est rapide.

In-vivo, le composé non-hydrolysable **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** n'a pas démontré de signal fluorescent (Figure 64B). En revanche, la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a laissé apparaître un très faible marquage fluorescent au niveau de la partie supérieure de l'animal ainsi que dans la vessie (Figure 64C). Les niveaux de fluorescence observés n'ont cependant pas permis de confirmer l'hydrolyse spécifique du groupement pH-sensible.

Le composé contrôle-positif ayant montré une élimination rapide du fluorophore (entre 30 et 40 minutes), les suivis cinétiques ont été stoppés après 40 minutes afin de visualiser la fluorescence intrinsèque de chaque organe (Figure 65).

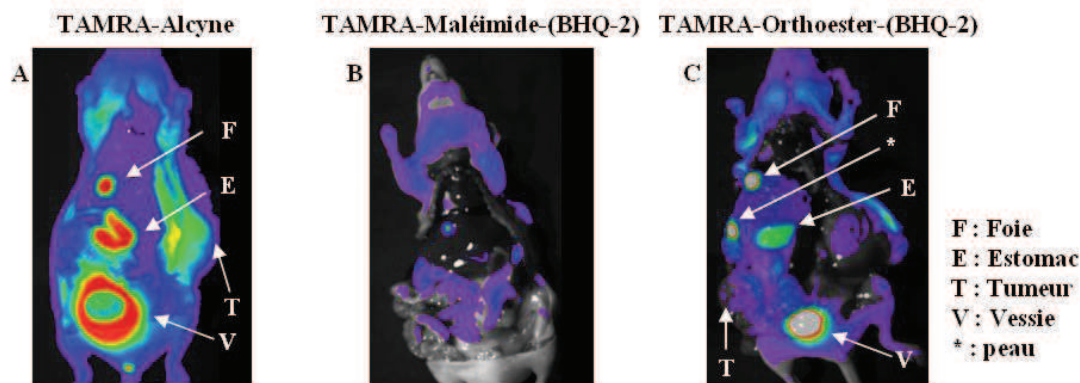


Figure 65 : Vues ventrales et ex-vivo de souris, 40 minutes après administration des composés A) TAMRA-Alcyne, B) TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et C) TAMRA-Orthoester-(BHQ-2).

Après sacrifice, l'abdomen de chaque animal a été ouvert, puis des vues ventrales ont été réalisées afin de permettre une détection plus sensible, tout en conservant le sang ayant circulé dans les organes. Dans ces conditions, le fluorophore **TAMRA-Alcyne** a principalement été détecté dans l'estomac et au niveau des organes d'excrétion comme le foie et la vessie (Figure 65A). Toutefois, un bruit de fond important a été observé. Ce phénomène a ainsi confirmé la circulation des produits administrés dans l'animal entier.

Pour la sonde **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)**, une absence de fluorescence a confirmé la stabilité du conjugué thiol/maléimide pour l'ensemble de l'animal (Figure 65B). Ceci a également permis de valider *in-vivo* la stabilité du quencheur BHQ-2. Enfin, comme pour le fluorophore seul, le composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a révélé un signal fluorescent localisé aux niveaux de la vessie, du foie et de l'estomac (Figure 65C). Cette activation du composé pro-fluorescent confirme l'hydrolyse du motif spiro di-orthoester.

Pour étudier la fluorescence associée à chaque organe et sans fluide physiologique, les différents organes ont été disséqués puis imagés (Figure 66).

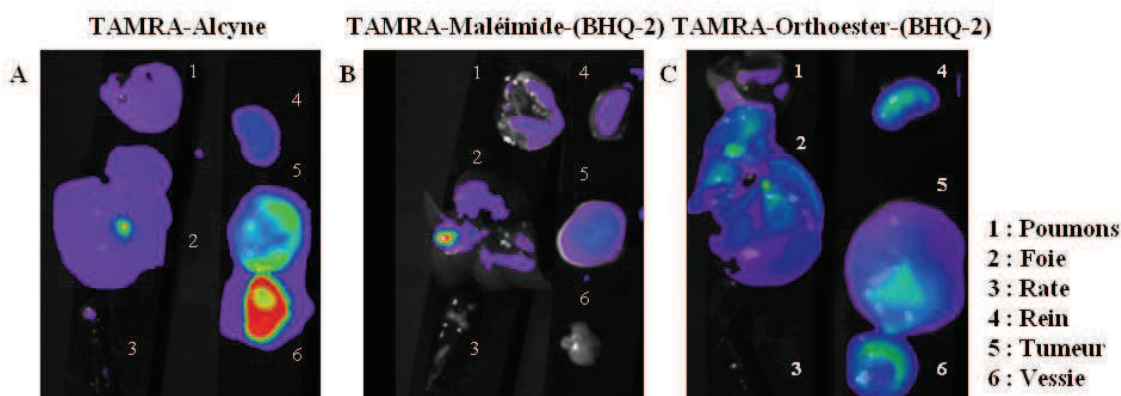


Figure 66 : Vues *ex-vivo* d'organes disséqués associés aux composés A) TAMRA-Alcyne, B) TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et C) TAMRA-Orthoester-(BHQ-2).

Dans le rein, la vessie et la tumeur, la fluorescence du dérivé **TAMRA-Alcyne** a été observée à différents niveaux d'intensité (Figure 66A). En observant un signal fluorescent intra-tumoral, la vascularisation de la tumeur est confirmée. Le composé **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** a uniquement révélé un très faible signal au niveau de la tumeur (Figure 66B). Avec la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**, une même intensité de signal a été observée dans le rein, la vessie, le foie et la tumeur (Figure 66C). Comparé au fluorophore **TAMRA-Alcyne**, le composé pH-sensible a laissé apparaître un niveau d'activation intra-tumoral plus faible. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses ont été émises :

- 1) le composé activable n'est pas présent dans la tumeur.
- 2) la cinétique d'hydrolyse du groupement acido-labile est trop lente par rapport au temps d'incubation utilisé (40 min).
- 3) le système de détection n'est pas assez sensible pour observer une activation micro-localisée.

Pour vérifier la présence de composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** non-activé dans la tumeur, cette dernière a été broyée puis incubée dans une solution d'acide chlorhydrique diluée (pH <1) (Figure 67).

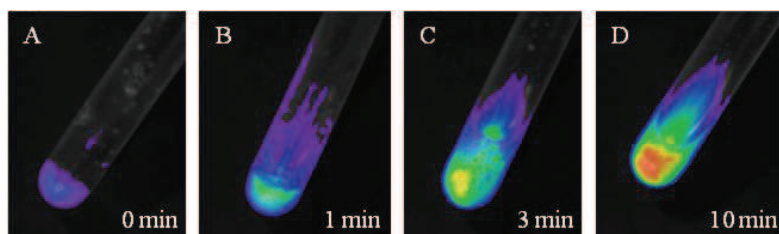


Figure 67 : Suivi cinétique d'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** dans un broyat de tumeur de gliome C6 acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique diluée (1 M).

Dans une solution acide, le broyat de gliome a démontré une augmentation du signal fluorescent au cours du temps, jusqu'à atteindre une intensité maximale après 10 minutes (Figure 67). Ce résultat a donc confirmé la présence de la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** dans la tumeur et infirmé la première hypothèse émise.

Pour expliquer si le faible niveau d'activation intra-tumoral est dû à une cinétique d'hydrolyse lente, une nouvelle expérience a été réalisée avec des temps de circulation plus importants. Trois acquisitions de fluorescence ont été réalisées : à l'administration des composés, puis après 2 et 6 heures. De plus, les composés ont été administrés par injection intra-tumorale afin d'augmenter la concentration et ainsi maximiser le signal (Figure 68).

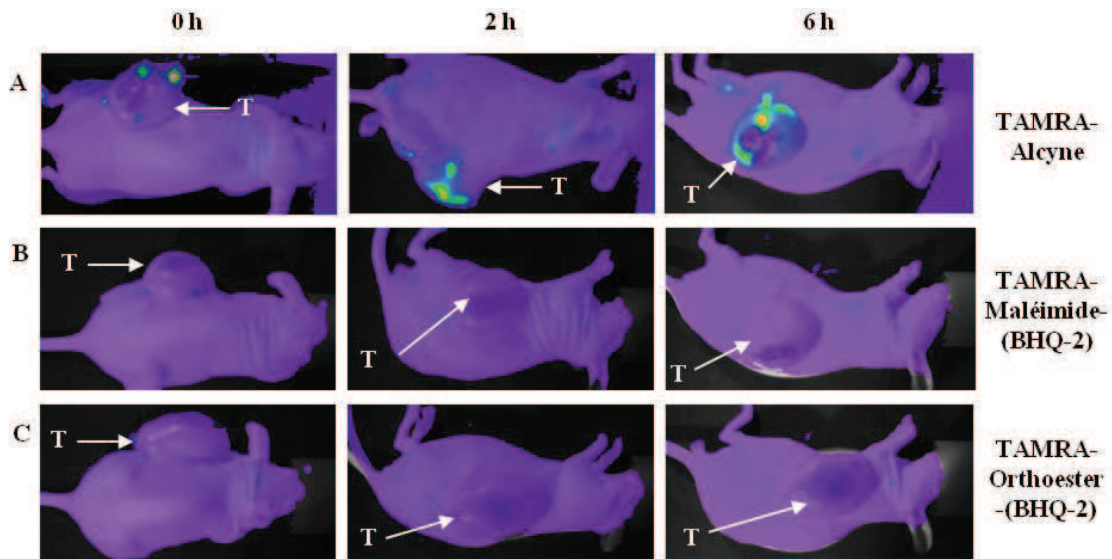


Figure 68 : Suivi cinétique d'activation des sondes pro-fluorescentes dans des gliomes C6 de rat implantés en sous-cutanés chez des souris nues. Images enregistrées à 0, 2 et 6 heures après administration des composés par injection intra-tumorale (1 mM) ; Présentation de vues dorsales ou latérales : A) TAMRA-Alcyne, B) TAMRA-Maléimide-(BHQ-2), C) TAMRA-Orthoester-(BHQ-2) ; T = Tumeur.

Le contrôle positif a confirmé la présence intra-tumorale du fluorophore pendant les 6 heures d'expériences (Figure 68A). En revanche, malgré une injection localisée, aucune fluorescence n'a été observée pour les composés TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et TAMRA-Orthoester-(BHQ-2).

Si l'hydrolyse du groupement pH-sensible est faible, il est possible que la fluorescence libérée ne soit pas détectable *in-vivo* à travers la peau et les tissus. Les animaux ont alors été sacrifiés puis les tumeurs disséquées afin de mesurer la fluorescence intrinsèque de chaque composé (Figure 69).

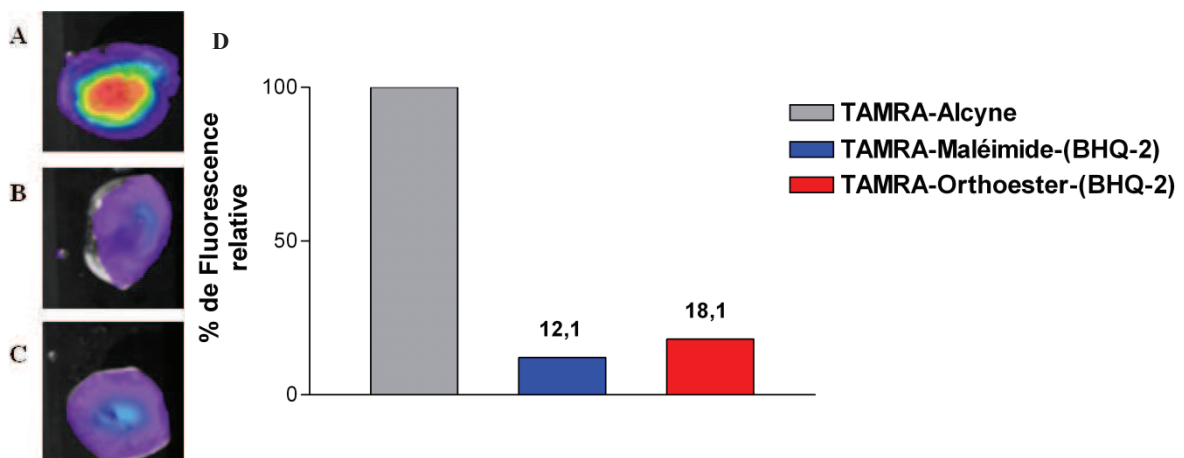


Figure 69 : Etude de l'activation des sondes pro-fluorescentes en tumeurs de type gliome de rat C6 ; Images A-C : images fluorescentes *ex-vivo* des tumeurs associées aux animaux A, B et C, 6 heures après administration des composés A) TAMRA-Alcyne, B) TAMRA-Maléimide-(BHQ-2) et C) TAMRA-Orthoester-(BHQ-2); D) Fluorescence mesurée dans chaque tumeur (A-C) exprimée en pourcentage relatif par rapport au contrôle positif TAMRA-Alcyne.

La tumeur associée au contrôle-positif a présenté un signal fluorescent important 6 heures après administration (Figure 69A). Par rapport à l'expérience précédente, l'injection intra-tumorale a significativement augmenté la quantité de fluorophore (Figure 66A). Ainsi, les conditions utilisées sont compatibles avec le suivi d'une activation lente du composé pro-fluorescent et pH-sensible. Néanmoins, un signal faible a été enregistré pour la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** (Figure 69B). L'acidité de la tumeur n'est donc peut-être pas suffisante pour permettre l'hydrolyse du motif pH-sensible spiro di-orthoester. Cela a été confirmé avec le composé non-hydrolysable maléimide (Figure 69C) pour lequel un niveau de fluorescence similaire a été observé.

Nous avons corrélé ces observations qualitatives à la quantification de la fluorescence intra-tumorale, exprimée en pourcentage relatif par rapport au signal du contrôle-positif. Dans ces conditions, le **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** présente un signal 1,5 fois plus important que le composé non-hydrolysable. Cela reste trop faible pour être clairement détectable comparé au dérivé **TAMRA-Alcyne**.

Comme précédemment, un traitement acide de la tumeur associée au composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a confirmé la présence de composé non-activé, 6 heures après son administration par injection intra-tumorale (résultats non présentés). Le faible niveau d'activation peut être dû :

- à une activation localisée non-détectable.
- à une acidité intra-tumorale insuffisante pour permettre l'hydrolyse du spiro di-orthoester

Des expériences complémentaires pourraient être menées sur des coupes histologiques de tumeurs pour détecter si les faibles niveaux d'activation sont associés à des microenvironnements acides. Dans une approche plus large, le système développé pourrait être étendu à l'étude d'autres tumeurs.

IV.3.6.2. Conclusion

Ces premiers résultats ont permis de mettre en place un protocole d'évaluation *in-vivo* à partir de 9 souris. La labilité du groupement spiro di-orthoester a pu être associée à des voies de métabolisation, avec une activation importante et localisée dans les organes d'excrétion. Le concept d'activation *in-vivo* de sondes de type FRET et pH-sensibles a donc été validé. Cependant, une activation par hydrolyse intra-tumorale n'a pas pu être clairement démontrée.

Pour la suite de cette étude, nous envisageons d'analyser les tumeurs à l'échelle microscopique avec l'utilisation de coupes histologiques. Avec cette technique, nous pourrions observer si l'hydrolyse du groupement acido-labile se situe dans des microenvironnements acides comme des zones nécrotiques. De plus, l'utilisation de modèles tumoraux différents est envisagée.

IV.3.7. Conclusion

La synthèse et l'étude d'un composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** ont permis de valider la pertinence de l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET pour évaluer la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs. L'hydrolyse du groupement spiro di-orthoester a ainsi été évaluée de manière séquentielle.

Lors d'une étude préliminaire, des conditions spécifiques ont été développées pour la synthèse d'un composé-modèle spiro di-orthoester extrêmement sensible au pH acide. Puis, l'hydrolyse de cette molécule a été suivie par HPLC afin de déterminer son profil de réactivité aux pH 5,5 et 7,4. Les résultats obtenus ont alors validé une hydrolyse acido-spécifique. Le groupement spiro di-orthoester a donc été incorporé au cœur d'une sonde pro-fluorescente de type TAMRA /BHQ-2.

Une étude réalisée en solution biomimétique a permis de caractériser l'hydrolyse de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** vis-à-vis de faibles variations de pH (Figure 70). Les résultats observés ont notamment souligné l'influence directe des groupements BHQ-2 et TAMRA sur la labilité du motif pH-sensible utilisé.

Puis, l'activation de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** a été suivie en cellules BNL CL.2. Une visualisation par microscopie confocale a permis de co-localiser l'hydrolyse du composé pro-fluorescent avec des organelles acides comme des lysosomes (Figure 70). La quantification des niveaux d'hydrolyse, par cytométrie de flux, a confirmé une différence de labilité de la structure spiro di-orthoester vis-à-vis de variations de pH. Ce travail devrait être complété en corrélant les cinétiques d'hydrolyse aux différentes valeurs de pH intracellulaires. Le système de sonde pro-fluorescente utilisé a également révélé une faible biolabilité d'une liaison thioéther formée par la conjugaison d'un thiol et d'un maléimide. Ce résultat non attendu soulève des questions quant au choix de cette réaction de bioconjugaison pour la mise au point d'outils destinés à interagir avec le vivant.

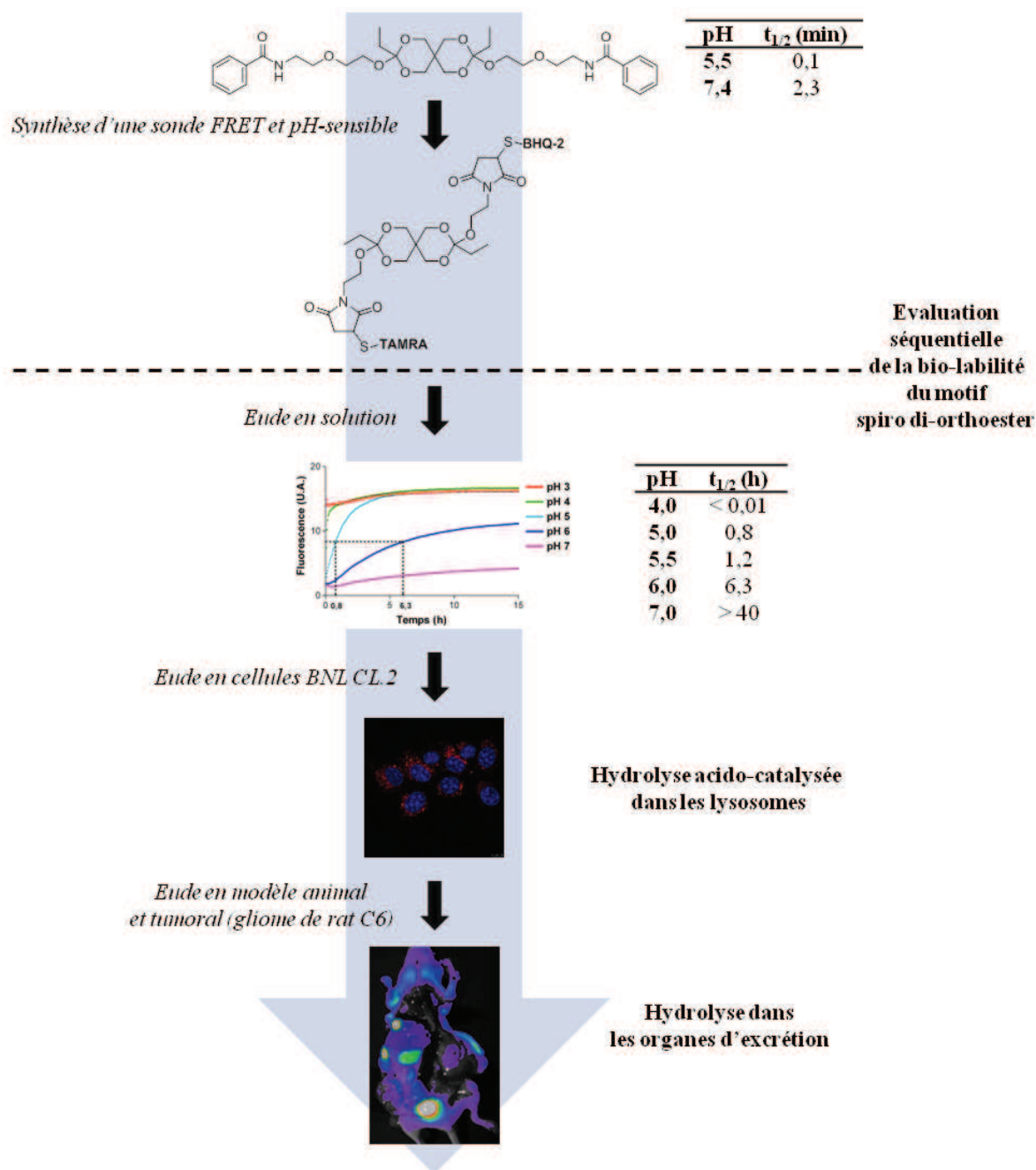


Figure 70 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour l'évaluation de la labilité du motif spiro di-orthoester en conditions biologiques natives.

Enfin, dans un modèle animal vivant et porteur de gliome de rat C6, la labilité du motif pH-sensible étudié n'a pu être associée à une voie d'acidité pathologique intra-tumorale, mais à une voie de métabolisation (Figure 70). A ce stade, les données ne permettent pas de conclure si le faible niveau de fluorescence intra-tumoral est dû à un manque de labilité du composé vis-à-vis des bio-stimuli intra-tumoraux ou à une micro-localisation. Pour répondre à ces hypothèses, de nouvelles expériences sont envisagées avec l'étude de nouveaux modèles

tumoraux et l'utilisation de coupes histologiques tumorales pour permettre une détection plus fine.

Les résultats obtenus pour l'étude de la labilité d'une structure spiro di-orthoester ont validé chaque étape du processus d'évaluation. Nous avons donc souhaité généraliser la méthodologie développée à l'évaluation comparative de différentes structures pH-sensibles.

IV.4. Généralisation de la méthode à l'évaluation comparative de la bio-labilité de motifs pH-sensibles

Afin de généraliser la méthode d'évaluation séquentielle développée nous devons disposer de données permettant la sélection de fonctions représentatives de différentes acido-labilités. Comparés au groupement spiro di-orthoester déjà étudié, des profils cinétiques spécifiques ont été recherchés, avec :

- des composés hydrolysables en milieux acides faibles (pH 5,5) et stables en conditions physiologiques (pH 7,4).
- des composés hydrolysables quel que soit le pH.
- des composés stables dans les conditions d'acidités physiologiques (pH 4-7).

L'analyse de la littérature a montré qu'il n'existait pas d'étude comparative permettant la sélection de fonctions chimiques bio-labiles. Les travaux existants se concentrent plutôt sur l'emploi d'un composé dans un environnement donné (voir section IV.1.3., Tableau 6). Suivant le protocole établi pour l'analyse du spiro di-orthoester **41**, une étude de structure-réactivité sera réalisée par HPLC, pour identifier des structures chimiques associées aux profils d'hydrolyse recherchés. Puis, les motifs sélectionnés seront incorporés au cœur de sondes pro-fluorescentes de type FRET. Enfin, leurs labilités en milieux biologiques seront mesurées.

IV.4.1. Sélection et synthèse de motifs acido-sensibles pour le développement de sondes pro-fluorescentes pH-sensibles

Dans le but d'étudier un représentant de chaque famille de groupements bio-hydrolysables précédemment présentés (voir section IV.1.3., Tableau 6), nous avons synthétisé, pour chacun, une molécule modèle détectable par UV. Puis, les labilités de ces composés ont été

suivies par HPLC dans deux milieux (pH 5,5 et 7,4) et caractérisées par des temps de demi-vie. Ces résultats ont ainsi permis de classer les structures selon leur vitesse et leur sélectivité d'hydrolyse en conditions acides.

Formation d'hétérocycles à partir de dérivés de benzaldéhyde :

D'après les travaux de Bundgaard *et al.*, des dérivés hétérocycliques formés à partir de benzaldéhyde peuvent être utilisés comme prodrogue pH-sensibles.^{149,150} Pour obtenir des hétérocycles de labilités différentes, un ensemble de composés a donc été synthétisé en faisant varier la nature des hétéroatomes ou la taille du cycle (Figure 71).

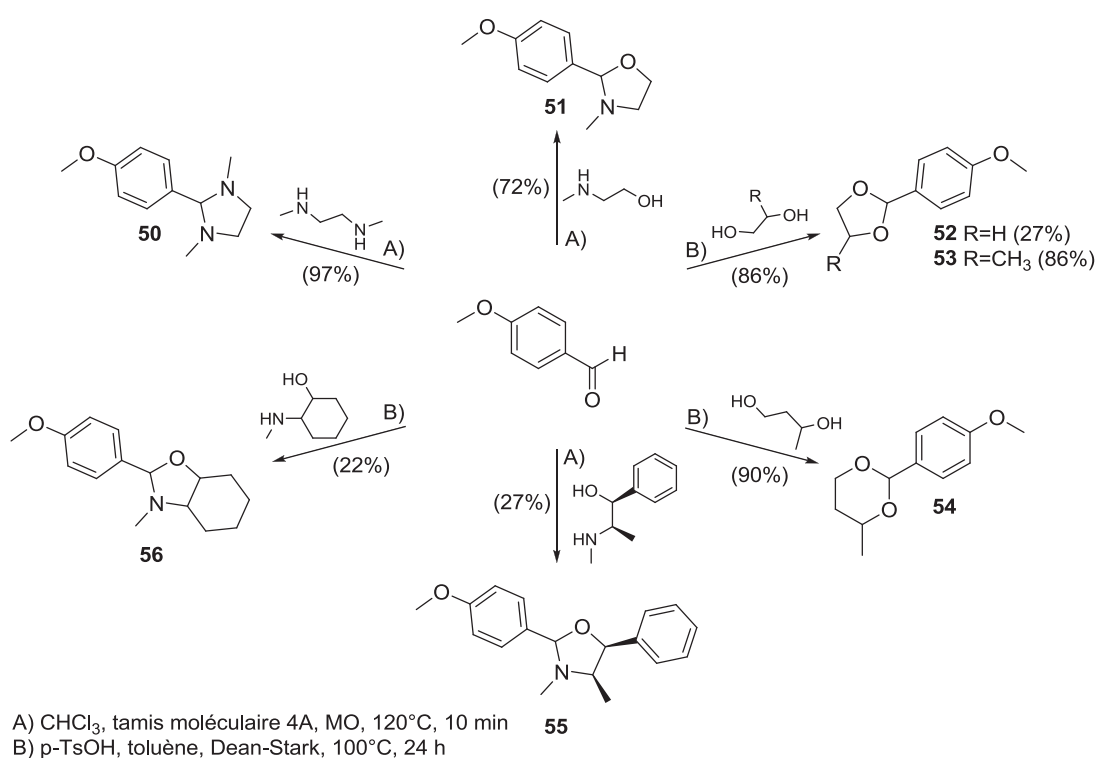
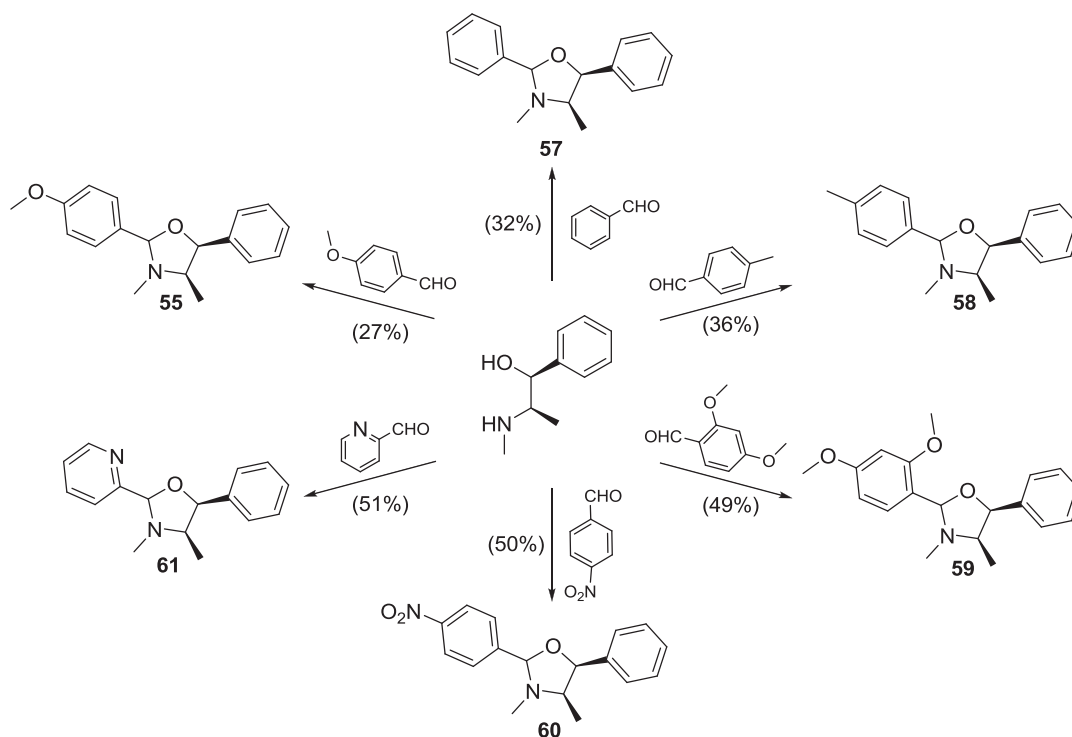


Figure 71 : Voies de synthèses d'hétérocycles formés à partir de *p*-anisaldéhyde.

Les synthèses des différents hétérocycles ont été réalisées par condensation de *p*-anisaldéhyde sur des dérivés 1-2 diamine, 1-2 diol, 1-3 diol et β -amino alcools. Ces cycles peuvent être formés par l'addition d'un nucléophile sur un aldéhyde en milieu acide, suivie d'une cyclisation après l'élimination d'une molécule d'eau. Les composés **50** à **56** ont été obtenus à partir de deux types de conditions réactionnelles (Figure 71). Les formations des dérivés imidazolidine (**50**) et oxazolidines (**51**, **55-56**) ont tout d'abord été réalisées aux micro-ondes et en présence de tamis moléculaire, comme agent déshydratant, selon les conditions décrites par Holzgrabe.¹⁸⁹ Les importantes différences de rendement observées

peuvent être expliquées par la variation des méthodes de purification selon les composés. Les dérivés **50** et **51** ont été purifiés par distillation sous pression réduite, tandis que les composés **55** et **56** l'ont été par HPLC préparative ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5). L'utilisation d'un milieu aqueux comme éluant, même basique, a conduit à une hydrolyse partielle des composés **55** et **56**. Les formations des dérivés dioxolanes **52-53** et dioxane **54** ont été réalisées dans les conditions classiques d'acétalisation avec un chauffage thermique, un catalyseur de type acide *para*-toluènesulfonique et un azéotrope pour déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation de l'acétal.¹⁹⁰ Les composés **52**, **53** et **54** ont été respectivement obtenus avec des rendements de 27, 86 et 90%.

Quel que soit le substrat, cette cyclisation a conduit à la formation d'un centre asymétrique en position C₂ et de deux diastéréoisomères. Cependant, pour la suite de cette étude, chaque produit obtenu sera utilisé sous la forme de mélange.



Conditions : CHCl_3 , tamis moléculaire 4A, MO, 120°C, 10 min

Figure 72 : Voies de synthèse d'oxazolidines à partir de différents aldéhydes aromatiques.

Afin d'étudier l'influence électronique des substituants du benzaldéhyde sur l'hydrolyse d'oxazolidines, les composés **57** à **61** ont été synthétisés à partir de (-) (1R-2S) éphédrine dans les conditions précédemment décrites (Figure 72). Selon les aldéhydes utilisés, les rendements obtenus sont compris entre 27 et 50%. Il est à noter que tous ces composés ont été purifiés par HPLC préparative ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5).

Synthèse de dérivés d'*o*-anisaldéhyde :

Les dérivés de type dialkyl acétal de benzaldéhyde sont principalement utilisés comme groupement hydrolysable dans le domaine des biomatériaux.¹⁴⁶ Cependant, une nouvelle génération d'acétal non-cyclique de type *N*-éthoxybenzylimidazole a été récemment développée pour des systèmes de prodrogues.^{151,152} Le composé **63** a ainsi été synthétisé suivant la méthode décrite (Figure 73). En présence de triéthylorthoformiate et d'une catalyse à l'acide chlorhydrique, le diméthyl acétal d'*o*-anisaldéhyde **62** a été obtenu avec 72% de rendement. Dans une seconde étape, une substitution d'un des groupements éthoxy par de l'imidazole, en présence d'acide *para*-toluènesulfonique, a conduit à la formation de **63** avec 45% de rendement.

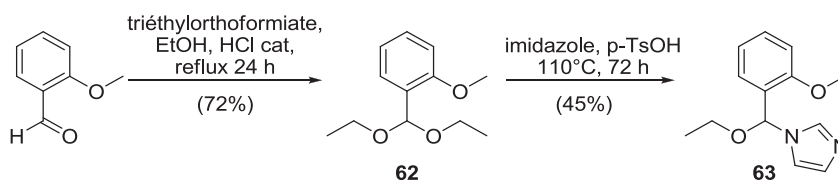


Figure 73 : Voie de synthèse du composé **63** de type *N*-éthoxybenzylimidazole.

Synthèse de composés bicycliques :

A partir des travaux de Wang sur les *N*-éthoxybenzylimidazole, nous avons envisagé la synthèse de nouvelles structures oxazolidines à partir d'un dérivé de type 4(5)-(hydroxyméthyl)imidazole. Pour cela, le composé **67** a été préparé en quatre étapes à partir d'imidazole et suivant des conditions développées par d'Esch (Figure 74).¹⁹¹ Une première étape a permis l'obtention de 4(5)-(iodo)imidazole **64** avec 51% de rendement. Puis le composé **64** a été traité par du chlorure de trityle en milieu basique pour protéger l'amine du noyau imidazole avec 39% de rendement après recristallisation. Une réaction de transmétallation entre le composé **65** et le bromure d'éthylmagnésium a conduit à la formation du réactif de Grignard correspondant, puis la réaction de ce composé avec du *p*-anisaldéhyde a permis l'obtention de l'alcool **66** avec 68% de rendement sur ces deux étapes. Enfin, l'imidazole a été déprotégée par un traitement acide et le produit **67** a été obtenu avec 73% de rendement.

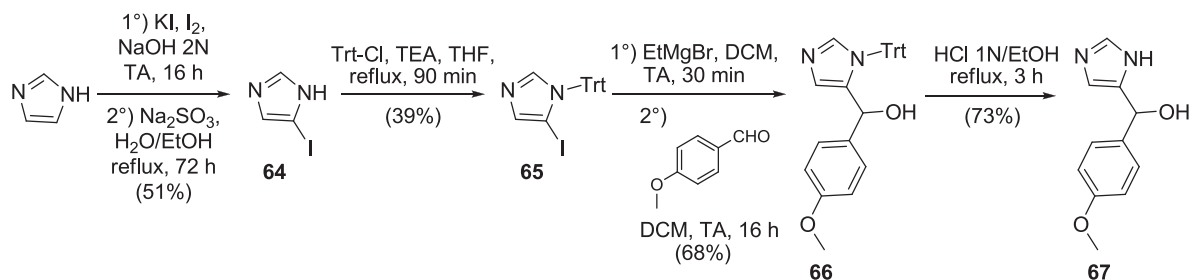


Figure 74 : Voie de synthèse du composé 67.

Des premiers essais de formation de l'oxazolidine **68** ont été réalisés avec du *p*-anisaldéhyde, sous micro-ondes et sans catalyseur (Figure 75). Quels que soient les temps de réaction utilisés, 10 minutes ou 2 heures, aucune trace du produit attendu n'a été détectée par RMN. Dans des conditions de chauffage thermique et avec de l'acide *para*-toluènesulfonique comme catalyseur, le produit **68** n'a pas été obtenu. La cyclisation de **67** a également été tentée avec du *p*-nitrobenzaldéhyde afin de ne pas stabiliser le carbocation de l'état de transition et ainsi favoriser la formation de l'acétal. Parmi les conditions testées, aucune n'a mené à **69**. Pour confirmer l'absence de gêne stérique du dérivé benzaldéhyde, l'amino alcool **67** a été traité avec de l'orthoformiate d'éthyle. Quelles que soient les conditions choisies, aucun produit formé n'a été observé. Dans la littérature, la cyclisation de 4(5)-(hydroxyéthyl)imidazole est pourtant décrite avec de l'orthoformiate d'éthyle pour former des cycles à six chaînons.¹⁹² Dans notre cas, la formation d'un cycle contraint à cinq chaînons est peut être limitée par la rigidité du système 4(5)-(hydroxyméthyl)imidazole de la molécule de départ **67**. Une mauvaise orientation du doublet de l'azote pourrait également être la cause de l'absence de réactivité de **67**.

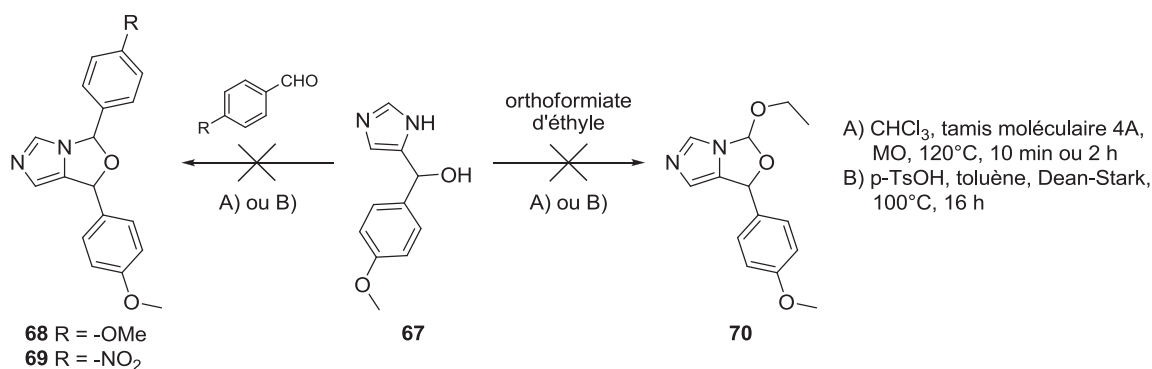


Figure 75: Tentatives de cyclisation de **67** par formation d'acétal.

Formation de dérivé de carbazate, d'oxime, d'imines, d'hydrazone et d'acylhydrazones :

Les composés formés à partir d'une double liaison carbone-azote sont les structures hydrolysables les plus utilisées dans les systèmes de prodrogues.¹⁷³ Pour comparer la labilité des différentes structures formées par la condensation d'amine et d'aldéhyde, des composés oxime, imines, acylhydrazone et dérivé de carbazate ont été synthétisés. L'ensemble de ces molécules ont alors été obtenues par la condensation d'amines primaires avec du *p*-anisaldéhyde et dans les conditions décrites de la littérature (Figure 76).

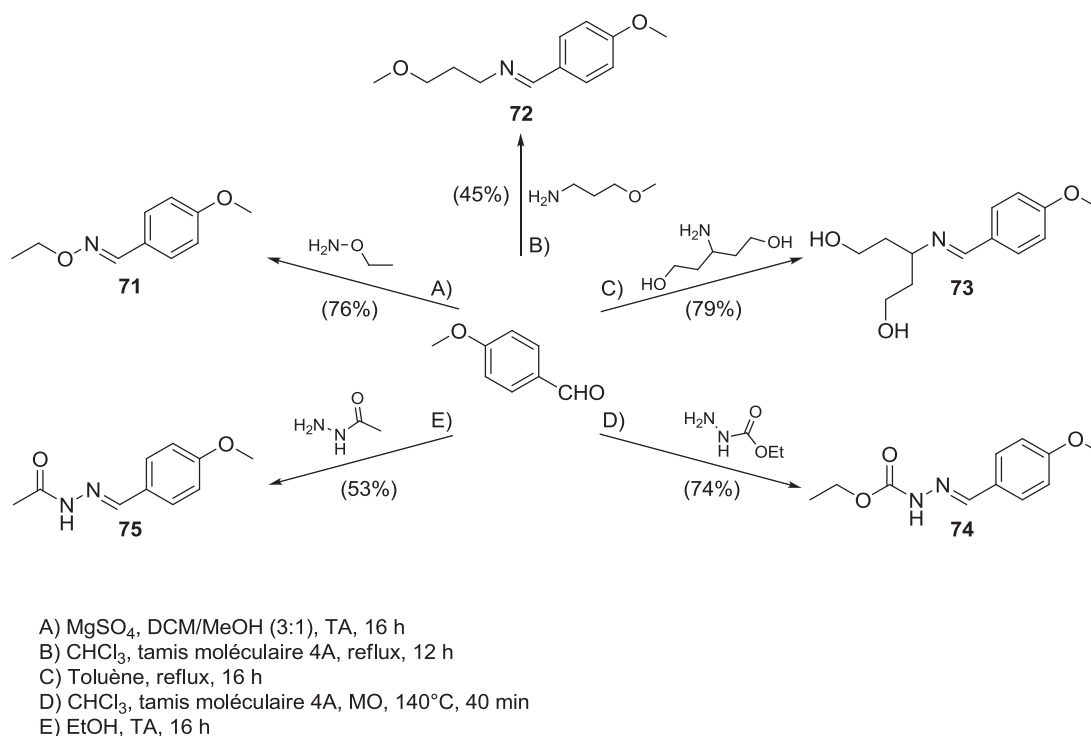


Figure 76 : Formation de dérivé de carbazate, d'oxime, d'imines et d'acylhydrazone.

Lors de la purification des composés imines **72-73** et acylhydrazone **75**, une hydrolyse partielle de ces composés a été observée. Pour augmenter la stabilité de ces dérivés à pH neutre ou basique, différents aldéhydes ont été utilisés (Figure 77). Un composé acylhydrazone **76** a également été synthétisé à partir d'hydrocinnamaldéhyde. Puis, un analogue de **72** a été obtenu avec de la 2-pyridinecarboxaldéhyde. D'après les travaux d'Ernst, la protonation du groupement pyridine en milieu acide doit permettre d'activer électriquement l'hydrolyse du motif imine et ainsi conduire à un clivage acide-spécifique.¹⁶² Enfin, une hydrazone **78** a également été formée à partir de 2-hydrazinopyridine et de butanal.

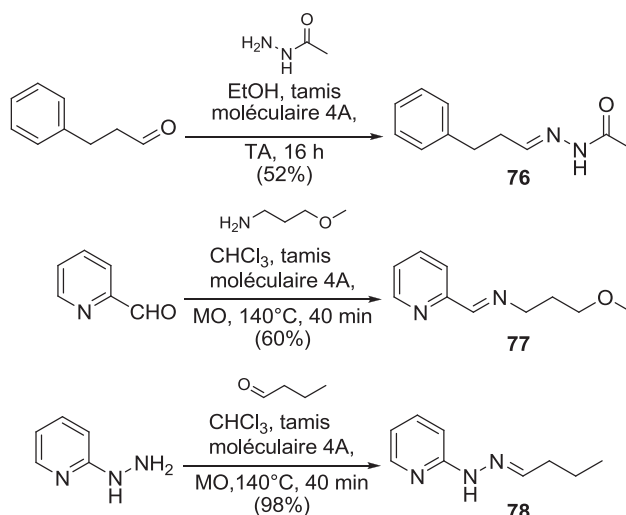


Figure 77 : Voies de synthèses des composés 76-78.

Synthèse de dérivés de siloxane :

Utilisés comme groupement protecteur en synthèse organique, les éthers de silyles sont également employés comme monomère hydrolysable dans des polymères biodégradables.^{155,193} Pour étudier la labilité de ces structures, des composés symétriques de siloxanes ont été synthétisés par réaction entre un alcool aliphatique **38** et des dérivés de dichlorosilane (Figure 78). Dans un premier temps, deux dichlorodialkylsilanes ont été utilisés afin de former les siloxanes correspondants **79** et **80**. Le suivi des réactions a permis de confirmer la formation des produits attendus mais leurs purifications se sont révélées impossibles. Quelle que soit la méthode utilisée, HPLC préparative ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5) ou chromatographie flash sur alumine basique, une hydrolyse totale des produits **79** et **80** a été observée. Pour augmenter la stabilité de la liaison silicium-oxygène, des groupements stériquement encombrés ont été utilisés.²⁸ L'alcool **38** a ainsi été mis en réaction avec du dichlorodiphénylsilane pour former le composé **81**. La stabilité de ce dernier s'est avérée suffisante pour être purifié par HPLC préparative ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5) et obtenu avec 73% de rendement.

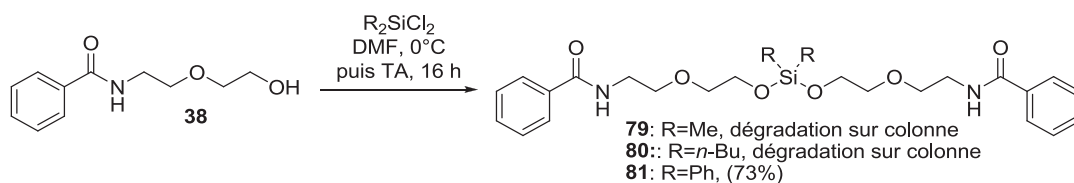


Figure 78 : Voies de synthèses de dérivés de siloxane.

Synthèse d'acétonide non-cyclique :

Dans la délivrance de principe actif, les dérivés de type acétonide peuvent être utilisés comme monomère au sein de copolymères biodégradables,¹⁴⁶ ou alors, comme espaceur hydrolysable dans des systèmes prodogues.¹⁵⁶ Pour en synthétiser un analogue détectable par UV, la réaction entre l'alcool **38** et le 2,2-diméthoxypropane a été réalisée dans les conditions précédemment utilisées pour la formation d'acétal cyclique de type dioxolane. Malgré une conversion quasi-complète, le composé **82** a été obtenu avec un rendement de seulement 7% du fait de son hydrolyse au cours de la purification (Figure 82).

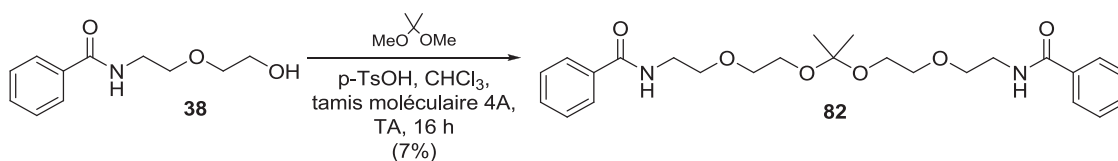


Figure 79 : Voie de synthèse d'un acétal d'acétone non-cyclique.

Synthèse d'un dérivé de β -thiopropionate :

En 2004, le groupe de Hubbell a démontré que des groupements esters de type 3-sulfanylpropionyl ou 4-sulfanylbutyryl pouvaient être utilisés pour la vectorisation d'oligodésoxynucléotide.¹⁹⁴ Un dérivé β -thiopropionate **83** a été synthétisé afin de mesurer sa cinétique d'hydrolyse (Figure 80). L'addition de Michael d'éthanethiol sur l'acrylate de benzyle a ainsi permis la formation du composé **83** avec 55% de rendement.

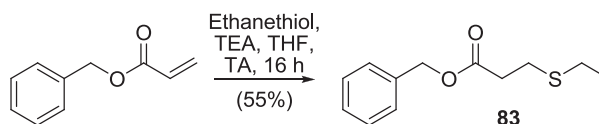


Figure 80 : Voie de synthèse d'un dérivé de β -thiopropionate.

IV.4.2. Etude comparative des motifs acido-sensibles aux pH 5,5 et 7,4

Les cinétiques d'hydrolyse des composés synthétisés ont été mesurées aux pH 5,5 et 7,4, par HPLC et dans les conditions précédemment mises au point pour l'étude du composé-modèle spiro di-orthoester **41** (section IV.3.1.2.). A titre de rappel, la molécule **41** a présenté des temps de demi-vie de 0,1 et 2,3 heures, respectivement aux pH 5,5 et 7,4. Lorsque les composés étudiés se sont révélés totalement hydrolysés dès la première analyse, au temps t_1 , un temps de demi-vie inférieur à 0,01 heures a été attribué. Dans ces cas, nous n'avons pas pu déterminer si les produits ont été hydrolysés dans les 10 secondes précédant l'analyse (pH 5,5

ou 7,4) ou pendant l'analyse elle-même (pH 8,5). Ce sont les limitations de la méthode d'analyse.

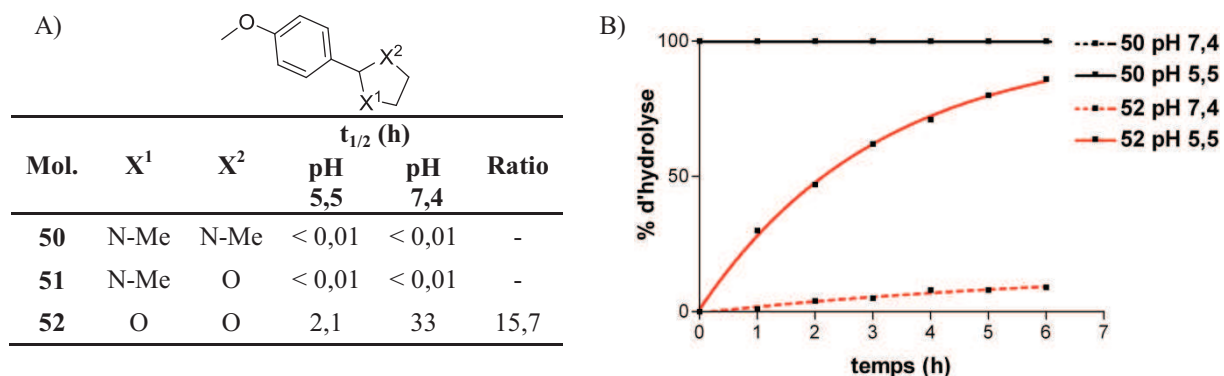


Figure 81 : Influence des hétéroatomes sur l'hydrolyse hétérocycles à cinq chaînons : A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse du composé 50 et 52 aux pH 7,4 et 5,5.

Dans un premiers temps, trois hétérocycles à cinq chaînons ont été étudiés pour mesurer l'influence de la nature des hétéroatomes sur la stabilité de ces structures cycliques en milieux aqueux. Au temps t₁, les composés imidazolidine **50** et oxazolidine **51** ont démontré une hydrolyse totale quel que soit le pH (Figure 81A). Le dérivé dioxolane **52** s'est quant à lui avéré suffisamment stable pour le suivi de son hydrolyse aux pH 5,5 et 7,4 (Figure 81B). A pH acide, ce dernier a démontré 50% d'hydrolyse en deux heures environ, tout en restant stable à pH 7,4. L'extrapolation de la courbe enregistrée à pH 7,4 a permis le calcul d'un temps de demi-vie de 33 heures. A partir de cette structure dioxolane, nous avons étudié les effets d'un encombrement et d'une augmentation de la taille du cycle sur la labilité de ce type d'hétérocycle (Figure 82).

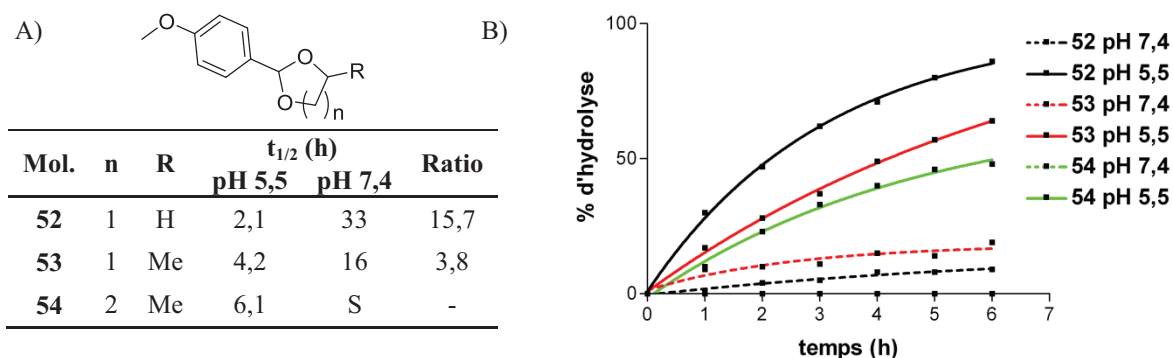


Figure 82: Effets d'un encombrement et d'une augmentation de la taille du cycle sur l'hydrolyse d'hétérocycles dioxane et dioxolanes : A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse des composés 52-54 aux pH 7,4 et 5,5 ; S = Produit stable pendant le temps d'expérience.

Avec le composé **53** l'ajout d'un groupement méthyle au niveau de l'un des carbones du cycle dioxolane a permis un ralentissement de l'hydrolyse par rapport à **52**, avec un temps de

demi-vie de 4,2 heures à pH 5,5 (Figure 82). En revanche, à pH 7,4, le temps de demi-vie est divisé par 2. Avec le composé **54**, de type 1,3-dioxane, un effet de la taille du cycle sur la stabilité a été observé. Parmi les trois structures cycliques formées à partir de diol, le composé **54** est le plus stable, quel que soit le pH. Nous pouvons noter qu'à pH 7,4, aucune formation de *p*-anisaldéhyde n'a été observée pendant les 6 heures de suivi cinétique. Ce résultat est contraire à ceux observés par Harper avec des dérivés 1,3-dioxane de cyclohexanecarboxaldéhyde.¹⁹⁵ Dans cette étude, l'auteur a démontré qu'un cycle 1,3-dioxane est moins stable qu'un cycle 1,3-dioxolane.

Les modifications structurales réalisées ont abouti au composé **54** hautement sélectif vis-à-vis d'une hydrolyse acide. Logiquement, l'augmentation de la stabilité à pH 7,4 a conduit à une diminution de la labilité à pH acide. Dans le but d'identifier des composés présentant un meilleur différentiel d'hydrolyse, nous avons cherché à stabiliser un motif oxazolidine fortement acido-labile (Figure 83).

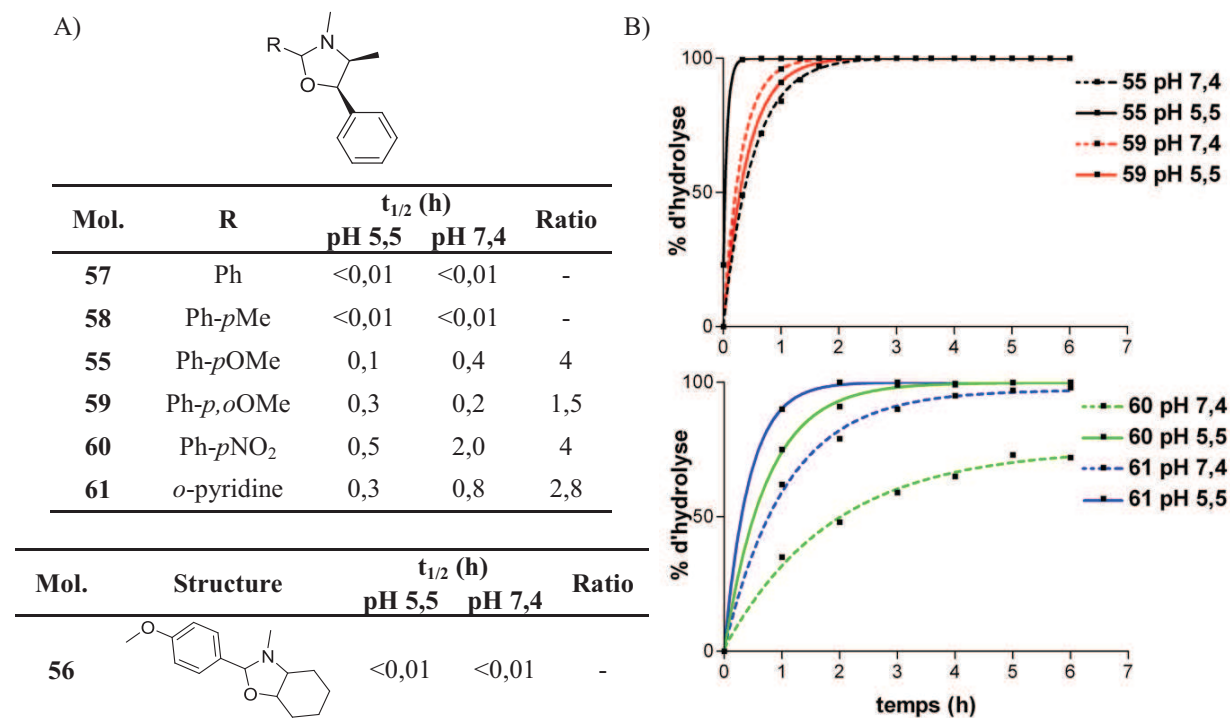


Figure 83: Effet des substituants du benzaldéhyde sur la labilité d'oxazolidines : A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse des composés **55** et **57-61** aux pH 7,4 et 5,5.

Lors de l'étude des composés oxazolidines, les dérivés **57** et **58** ont démontré une hydrolyse totale à t_1 quel que soit le pH (Figure 83A). Parmi les autres composés, le dérivé **55** s'est révélé le plus rapide pour une hydrolyse à pH acide, avec une conversion totale en *p*-anisaldéhyde en moins de 20 minutes. Notons qu'à t_1 , ce même composé présentait 20% de clivage à pH 5,5, tout en restant stable à pH 7,4. Étonnamment, l'ajout d'un second

groupement électro-donneur de type méthoxy n'a pas augmenté la cinétique d'hydrolyse en milieu acide. Pour le composé **59**, les calculs des temps de demi-vie ont abouti à des résultats similaires pour les deux pH (Figure 83A). Comme attendu, la substitution du benzaldéhyde par un groupement électro-attracteur de type nitro a ralenti les cinétiques d'hydrolyse pour l'oxazolidine **60**. Un effet similaire a également été observé avec le dérivé de pyridine **61** qui se trouve sous forme de pyridinium en milieu acide.

D'après la littérature, la stabilité d'une oxazolidine est très fortement influencée par l'encombrement stérique des substituants de l'hétérocycle.¹⁵⁰ Pour le vérifier, l'hydrolyse du composé **56** formé à partir de 2-méthylamino-cyclohexanol a été suivie. Cette molécule s'est révélée totalement instable dès les premières mesures. Contrairement au motif éphédrine, l'encombrement stérique du cyclohexane ne suffit donc pas à stabiliser le composé.

En ce qui concerne la sélectivité pour une hydrolyse acide, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les composés **55** et **60** qui sont pourtant électroniquement différents avec respectivement des substituants aromatiques électro-donneur et électro-attracteur. Cependant, les hydrolyses des oxazolidines étudiées ne se sont pas révélées acido-spécifiques, comparé aux résultats déjà observés pour les composés spiro di-orthoester ou dioxane. Pour tenter d'améliorer cette sélectivité sans diminuer les vitesses d'hydrolyse à pH 5,5, une série d'acétals de benzaldéhyde non-cycliques a été étudiée (Figure 84).

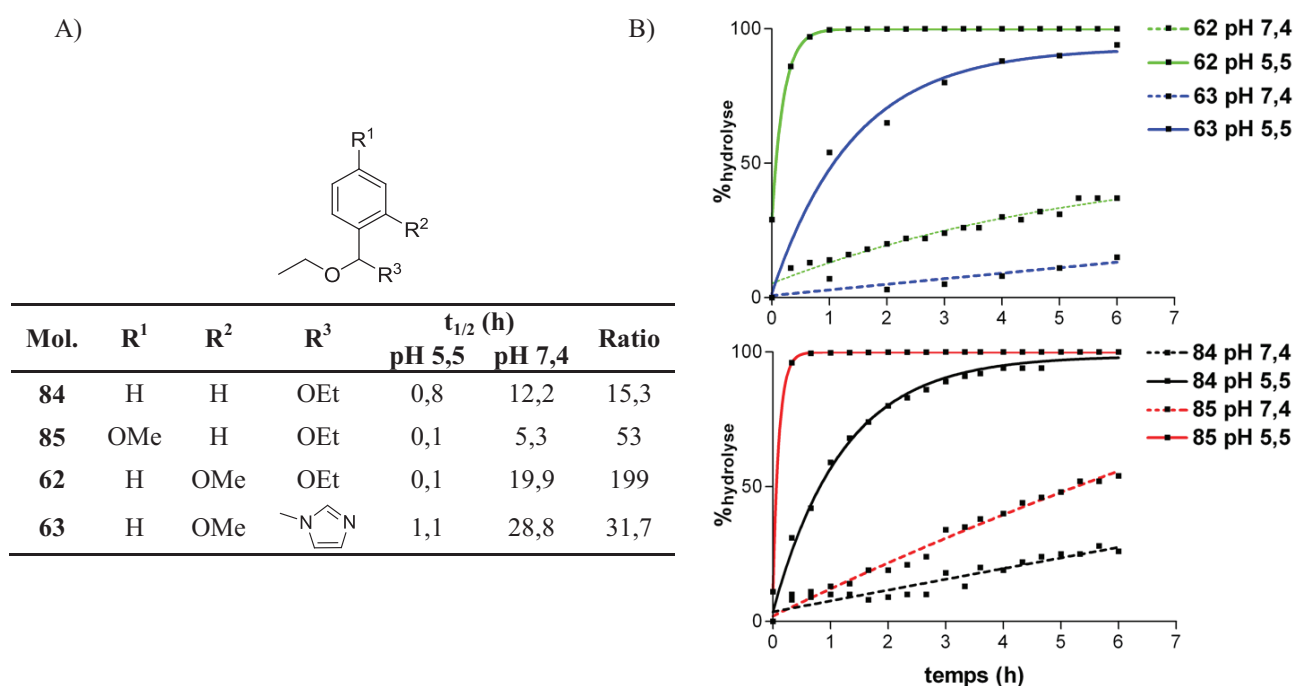


Figure 84 : Hydrolyse d'acétals non cycliques de benzaldéhyde : A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse des composés 84-85 et 62-63 aux pH 7,4 et 5,5.

Dans les conditions utilisées, le diéthyl acétal de benzaldéhyde **84** a présenté des temps de demi-vie de 0,8 et 12,2 heures, respectivement aux pH 5,5 et 7,4 (Figure 84). Avec la présence de groupements électro-donneurs de type méthoxy sur la structure aromatique, une nette accélération des cinétiques d'hydrolyse a été observée à pH 5,5 pour les dérivés **85** et **62**. Dans le même temps, ces deux composés ont montré d'excellentes stabilités à pH 7,4. Pour le dérivé d'*o*-anisaldéhyde **62**, un ratio de 199 a été calculé entre les temps demi-vie calculés aux deux pH. L'hydrolyse de cette structure est donc apparue comme extrêmement acido-spécifique.

Le composé *N*-éthoxybenzylimidazole **63** a démontré une cinétique d'hydrolyse plus lente que son analogue diéthylacétal **62** (Figure 84). En revanche sa stabilité à pH 7,4 s'est avérée être meilleure, comme décrit par Yang.¹⁵¹ Cette sélectivité peut s'expliquer par le mécanisme d'hydrolyse de cette structure qui est initié par la protonation de l'un des azotes du noyau imidazole.

Après avoir étudié différentes structures acido-labiles basées sur la rupture d'une liaison carbone-oxygène, nous nous sommes intéressés à l'hydrolyse de liaisons carbone-azote sur laquelle est basée de nombreux systèmes de libération pH-sensibles (Figure 85).

Mol.	R	$t_{1/2}$ (h)		Mol.	Structure	$t_{1/2}$ (h)	
		pH 5,5	pH 7,4			pH 5,5	pH 7,4
71	OEt	S	S	76		<0,01	<0,01
72	(CH ₂) ₃ -OMe	<0,01	<0,01	77		<0,01	<0,01
73	CH(CH ₂ -OH) ₂	<0,01	<0,01	78		S	S
74	NH-COOEt	S	S				
75	NH-CO-Me	<0,01	<0,01				

Figure 85 : Résultats de l'hydrolyse de dérivés de carbazate, d'imines, d'oxime, d'hydrazones et d'acylhydrazones ; S = Produit stable pendant le temps d'expérience.

L'hydrolyse de l'ensemble des produits formés par la condensation d'amines et de dérivés carbonyles a donné lieu à des résultats hétérogènes. L'oxime **71**, le dérivé de carbazate **74** et la pyridine hydrazone **78** se sont montrés stables tout au long du suivi cinétique et quel que soit le pH (Figure 85). En revanche, les imines **72-73**, **77** et les acylhydrazones **75-76** ont été totalement hydrolysées à t_1 pour les deux pH testés. L'utilisation de deux types d'aldéhydes (aliphatique ou aromatique) n'a pas permis d'observer une différence de stabilité entre les composés acylhydrazones **75** et **76**. Dans les cas des imines, la présence d'une pyridine n'a

pas suffit à rendre le composé **77** plus stable que **72**.¹⁶² Tous les composés formés par une liaison C=N se sont montrés soit stables, soit totalement instables, et ce quel que soit le pH. La méthode analytique utilisée n'est donc pas adaptée à l'étude de ce type de composés.

La dernière série d'expérience a consisté en l'étude des groupements siloxanes, acétal d'acétone et β -thiopropionate, éther de tétrahydropyranyle et carbamate (Figure 86).

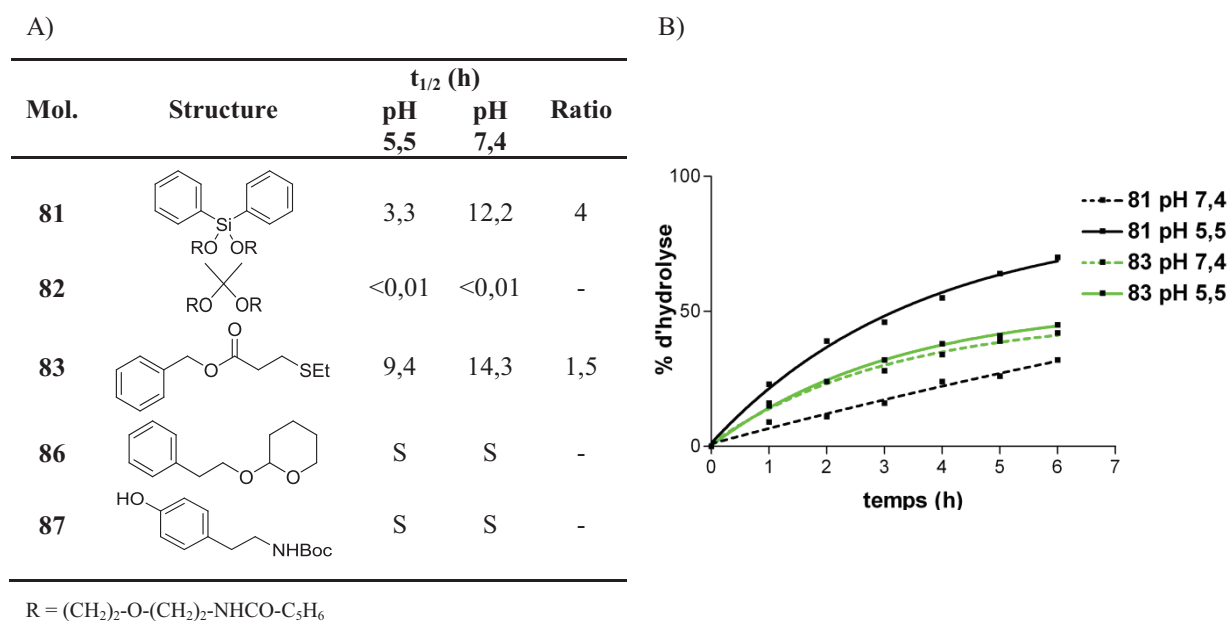


Figure 86 : Hydrolyse de composés siloxane, acétal d'acétone, β -thiopropionate, éther de tétrahydropyranyle et carbamate: A) Tableau récapitulatif des résultats ; B) Cinétiques d'hydrolyse des composés **81** et **83** aux pH 7,4 et 5,5 ; S = Produit stable pendant le temps d'expérience.

Pour le composé **81**, un rapport de quatre a été calculé entre les temps de demi-vie aux pH 5,5 et 7,4 (Figure 86). La sélectivité du motif siloxane pour une hydrolyse en conditions acides est confirmée, mais faible. Basé sur un squelette similaire, le dérivé d'acétone **82** s'est trouvé totalement hydrolysé dès les premiers temps d'analyse t_1 . L'hydrolyse acido-catalysée du β -thiopropionate **83** s'est révélée lente et peu sélective vis-à-vis du pH, avec un temps de demi-vie de 9,4 heures à pH 5,5. Enfin, pour évaluer la stabilité de groupements protecteurs acido-labiles utilisés en synthèse organique, les molécules **86** et **87**, respectivement de type éther de tétrahydropyranyle et carbamate, ont été étudiées. Les suivis cinétiques des deux structures ont démontré leurs parfaites stabilités aux deux pH utilisés.

IV.4.3. Evaluation comparative des motifs acido-labiles étudiés et conclusion

L'évaluation de motifs pH-sensibles vis-à-vis de milieux aqueux (pH 5,5 et 7,4) a permis de mettre en évidence l'influence prépondérante de la structure des composés sur leurs sensibilités aux variations de pH. Ce phénomène a notamment été illustré avec l'étude de différentes oxazolidines. A partir des cinétiques d'hydrolyse mesurées, l'ensemble des structures étudiées ont été classées en différentes catégories (Tableau 7). Cette classification s'est faite selon deux critères :

- la cinétique d'hydrolyse en milieu acide. Une cinétique a été qualifiée de rapide lorsque le temps de demi-vie calculé à pH 5,5 était inférieur à 1 heure.
- La sélectivité d'hydrolyse en milieu acide. Une hydrolyse a été qualifiée de sélective si le ratio $t_{1/2} \text{pH } 7,4 / t_{1/2} \text{pH } 5,5$ était supérieur à 2.

hydrolysable	Hydrolyse rapide ($t_{1/2} \text{pH } 5,5 < 1h$)	Hydrolyse acide sélective <i>ratio</i> >2	spiro di-orthoester oxazolidine dialkyl acétal d' <i>o</i> -anisaldéhyde
		Hydrolyse non-acide sélective <i>ratio</i> <2	imidazolidine acétal d'acétone hydrazone de benzaldéhyde acylhydrazone imine
	Hydrolyse lente ($t_{1/2} \text{pH } 5,5 > 1h$)	Hydrolyse acide sélective <i>ratio</i> >2	1,3-dioxane 1,3-dioxolane <i>N</i> -éthoxybenzylimidazole siloxane
		Hydrolyse non-acide sélective <i>ratio</i> <2	β -thiopropionate
non-hydrolysable			oxime pyridine hydrazone dérivé de carbazate éther de tétrahydropyranyle carbamate

Tableau 7 : Classification des structures pH-sensibles étudiées en fonction des labilités mesurées aux pH 5,5 et 7,4 ; avec $\text{ratio} = t_{1/2} \text{pH } 7,4 / t_{1/2} \text{pH } 5,5$.

Alors que l'ensemble de ces structures sont utilisées comme groupements pH-sensibles pour le développement de systèmes de libération contrôlée, les cinétiques enregistrées ont laissé apparaître une gamme de labilité étendue (Tableau 7). Par exemple, les dérivés imines ou acylhydrazone se sont révélés tellement sensibles qu'aucune cinétique n'a pu être

enregistrée dans les conditions analytiques utilisées. A l'inverse, l'hydrolyse en milieu acide d'un β -thiopropionate s'est montrée lente et peu sélective vis-à-vis du pH. Ces résultats confortent ainsi l'idée de mesurer une labilité en milieu biologique natif plutôt qu'en solution afin de prendre en compte l'ensemble des bio-stimuli.

A l'aide de la classification établie (Tableau 7), quatre groupements ont été choisis pour être incorporés au sein de sondes pro-fluorescentes de type FRET et étudiés en milieux biologiques :

- un groupement acylhydrazone dont la cinétique d'hydrolyse en milieu acide est rapide et peu sélective du pH ($t_{1/2}$ pH 5,5 et pH 7,4 <0,01 h).
- un dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde ayant démontré une cinétique d'hydrolyse similaire au groupement spiro di-orthoester à pH acide mais avec une meilleure sélectivité ($t_{1/2}$ pH 5,5 = 0,01 h et pH 7,4 = 19,9 h).
- un éther de tétrahydropyranyle (THP) et un carbamate, tous deux non-hydrolysable aux pH acides physiologiques. Ces deux groupements ont été choisis afin d'étudier leur bioorthogonalité.

IV.4.4. Synthèse de sondes pro-fluorescentes

Précédemment, une stratégie d'homofonctionnalisation a permis la formation du composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** par deux réactions simultanées d'addition de Michael entre des thiols et des maléimides. Les conditions utilisées ont abouti au produit désiré mais avec un rendement de seulement 20% causé par la présence de sous-produits de réaction. Cette stratégie peut être adaptée à la fonctionnalisation de groupements symétriques. En revanche, dans le cas où le motif pH-sensible à dériver est asymétrique, le nombre de produit formé est trop important pour obtenir un composé pur.

Afin de mettre au point une voie de synthèse efficace et généralisable à l'ensemble des groupements étudiés (acylhydrazone, dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde, THP et carbamate), une stratégie d'hétérofonctionnalisation a donc été envisagée. Cette dernière consiste en la préparation d'une molécule composée d'un groupement pH-sensible et de deux fonctions réactives orthogonales (voir section IV.3.2., Figure 51). La dérivatisation de ce composé peut alors être réalisée par deux réactions successives aboutissant à la formation du conjugué final TAMRA/BHQ-2.

Pour éviter l'utilisation de conjugué thiol/maléimide, labiles en milieux biologiques, la première séquence réactionnelle envisagée a été une double fonctionnalisation par réactions de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre et de métathèse. Dans cette stratégie, il est préférable de réaliser la réaction de cycloaddition de Huisgen puis la métathèse, car une fois formé, le groupement triazole présente l'avantage de ne pas être réactif vis-à-vis des conditions de métathèse alors qu'un propargyle peut être sujet à des couplages ène-yne. La synthèse d'un composé **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** a été alors choisie pour développer des conditions réactionnelles permettant une hétérofonctionnalisation d'un groupement pH-sensible par du BHQ-2 et du TAMRA.

IV.4.4.1. Synthèse de **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)**

Le composé **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** pourrait être obtenu à partir du carbamate bifonctionnel **88** modifié par **(BHQ-2)-N₃** via une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre et **TAMRA-Alcène** via une réaction de métathèse (Figure 87). La synthèse du composé **88** a alors été envisagée en trois étapes à partir de 5-hexèn-2-one : une réaction de Grignard pour former un alcool tertiaire, suivi de la formation d'un carbonate activé, puis une étape de couplage avec la propargylamine.

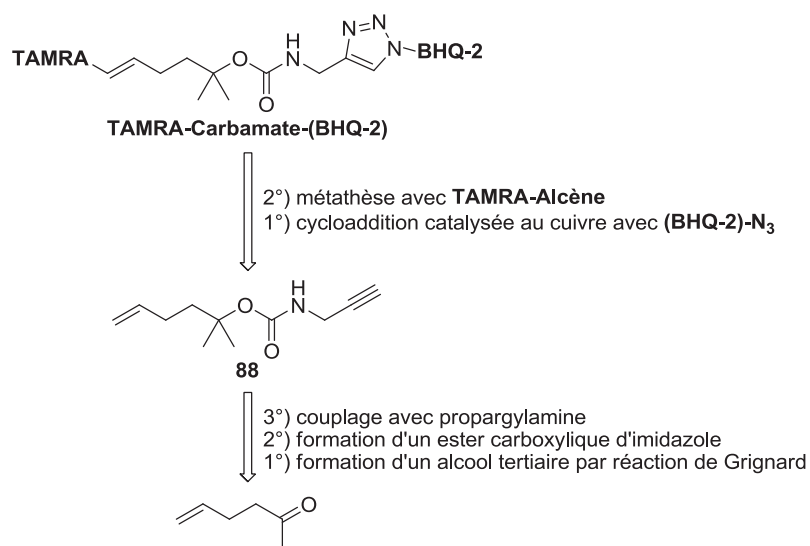


Figure 87 : Retrosynthèse envisagée pour la formation de **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)**.

L'alcool tertiaire **89** a été préparé par la réaction de bromure de méthyle magnésium et de 5-hexèn-2-one (Figure 88). L'alcool obtenu a ensuite été traité aux micro-ondes, en présence de 1,1'-carbonyldiimidazole, pour former l'ester carboxylique d'imidazole **90** avec un bon rendement de 87% après précipitation. Il est à noter que dans les mêmes conditions

réactionnelles, une purification par chromatographie sur gel de silice a abouti à une dégradation partielle du composé et 20% de rendement. Le composé **90** obtenu a ensuite été traité par du triflate de méthyle, puis l'ajout de propargylamine au milieu réactionnel a formé le carbamate **88** avec 79% de rendement après purification sur alumine basique. Dans cette réaction, c'est la méthylation de l'imidazole par du triflate de méthyle qui permet de réaliser la réaction en augmentant le caractère nucléofuge du groupement partant.¹⁹⁶

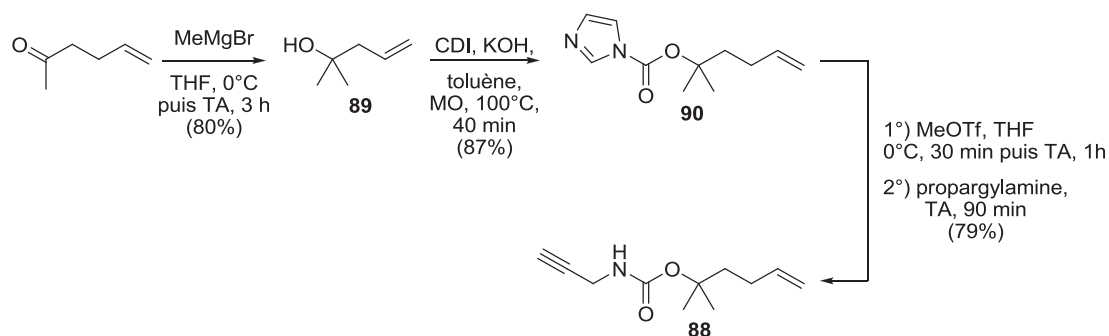


Figure 88 : Voie de synthèse du composé **88**.

Pour permettre une première fonctionnalisation de **88** par cycloaddition catalysée au cuivre, un dérivé (**BHQ-2**)-N₃ a été préparé (Figure 89). Un traitement acide de l'espaceur **33** précédemment synthétisé a permis l'obtention quantitative du composé aminé **91**. Puis, sa réaction avec du **BHQ-2**, dans les conditions de couplage précédemment développées (section IV.2.3.1), a abouti à la formation du quencheur (**BHQ-2**)-N₃ avec 81% de rendement. Ce produit a été directement couplé au propargyle **88** lors d'une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre. Pour cette réaction, l'utilisation de THF comme co-solvant est essentielle pour la solubilité du dérivé **BHQ-2**. Le triazole **93** est alors obtenu avec un rendement de 74%.

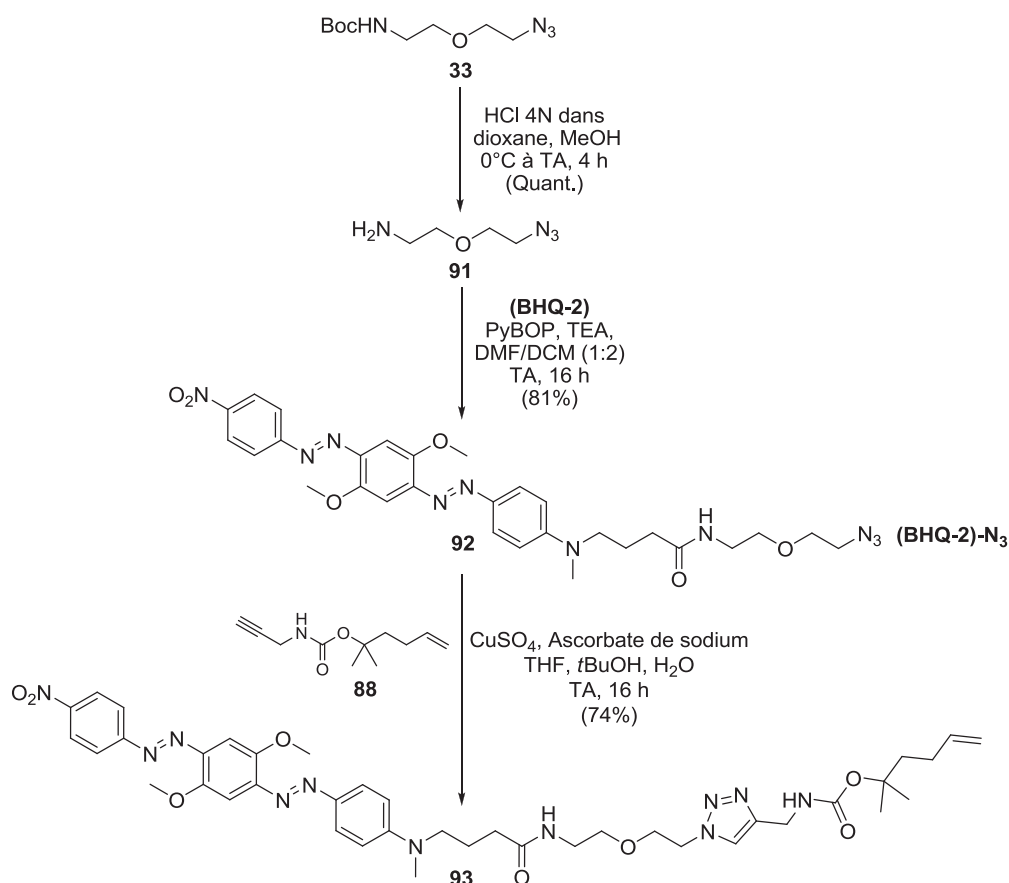


Figure 89 : Voie de synthèse du composé 93.

Pour fonctionnaliser l'alcène **93** par métathèse, un dérivé **TAMRA-Alcène** a été préparé par couplage entre l'allylamine et la **TAMRA** (Figure 90). Un couplage activé au PyBOP et une purification par HPLC préparative ont conduit à **94** avec 81% de rendement.

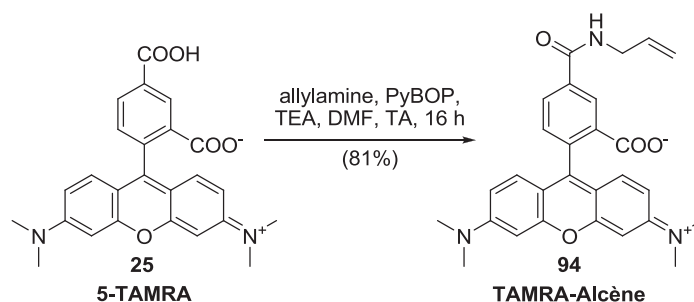


Figure 90 : Voie de synthèse du composé TAMRA-Alcène.

La formation du composé **95** par métathèse s'est avérée délicate. En effet, dans les conditions classiques de la littérature, aucune formation de produit n'a été observée (Figure 91, entrée 1). Différentes conditions ont été testées avec un chauffage thermique ou aux micro-ondes et l'utilisation de catalyseurs de type Grubbs II ou Grubbs Hoveyda II (Figure 91, entrées 2-5). Selon les cas, la présence de sous-produits ou une dégradation de **94** ont été observées. Pour vérifier la réactivité du composé **93**, ce dernier a été engagé dans une réaction

de métathèse avec de l'acide acrylique. Un chauffage aux micro-ondes et une catalyse au Grubbs II ont permis l'obtention du dérivé acide **96** avec 69% de rendement.

Il est à noter que toutes ces réactions ont été suivies qualitativement par plaques CCM. Dans toutes les conditions testées, la formation de sous-produits de **93** a été observée par CCM, mais aucun n'a été caractérisé et identifié.

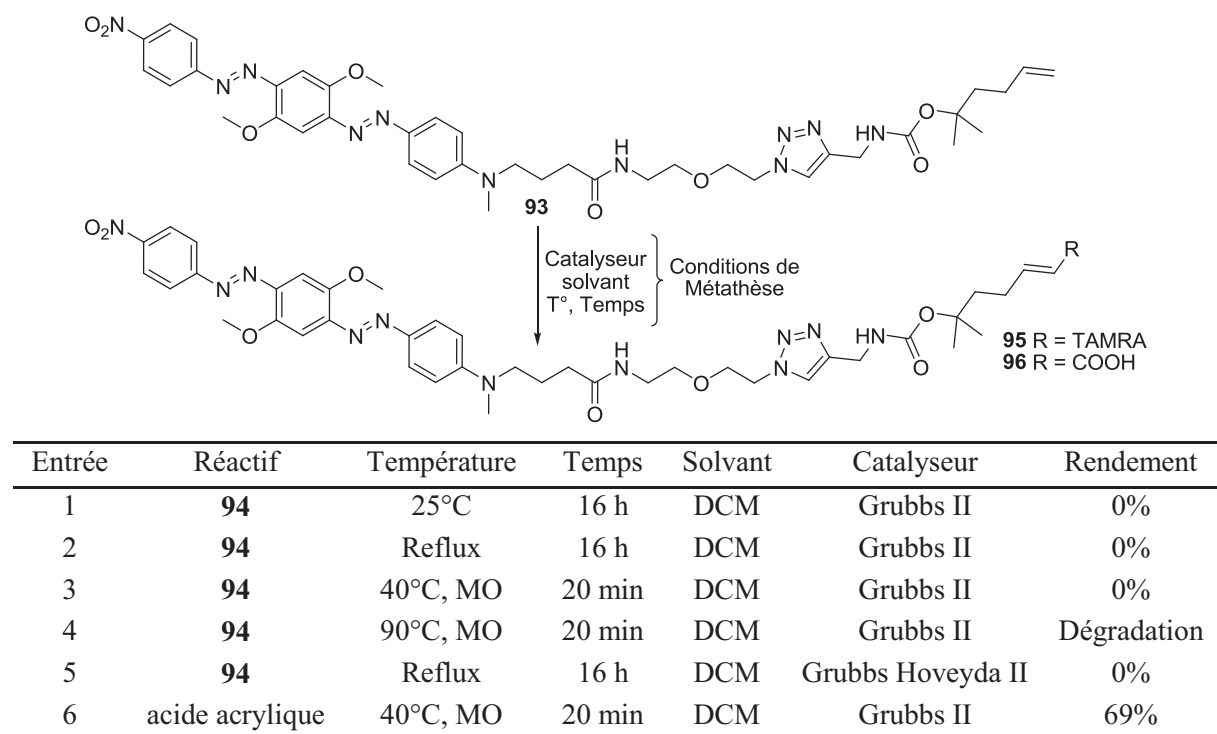


Figure 91 : Recherche de conditions pour la formation de **95** par métathèse.

Le composé **96** a alors été choisi pour terminer la synthèse de la sonde carbamate par couplage avec un dérivé **TAMRA-NH₂**. Une séquence de couplage peptidique/déprotection a ainsi permis la formation du fluorophore modifié **98** avec 82% de rendement sur l'ensemble des deux étapes (Figure 92A). Puis, la réaction de ce composé avec l'acide carboxylique de **96** activé par HBTU, a abouti au produit attendu **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** avec 46% de rendement (Figure 92B). Ce produit a été purifié en conditions basiques et par HPLC préparative (NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5).

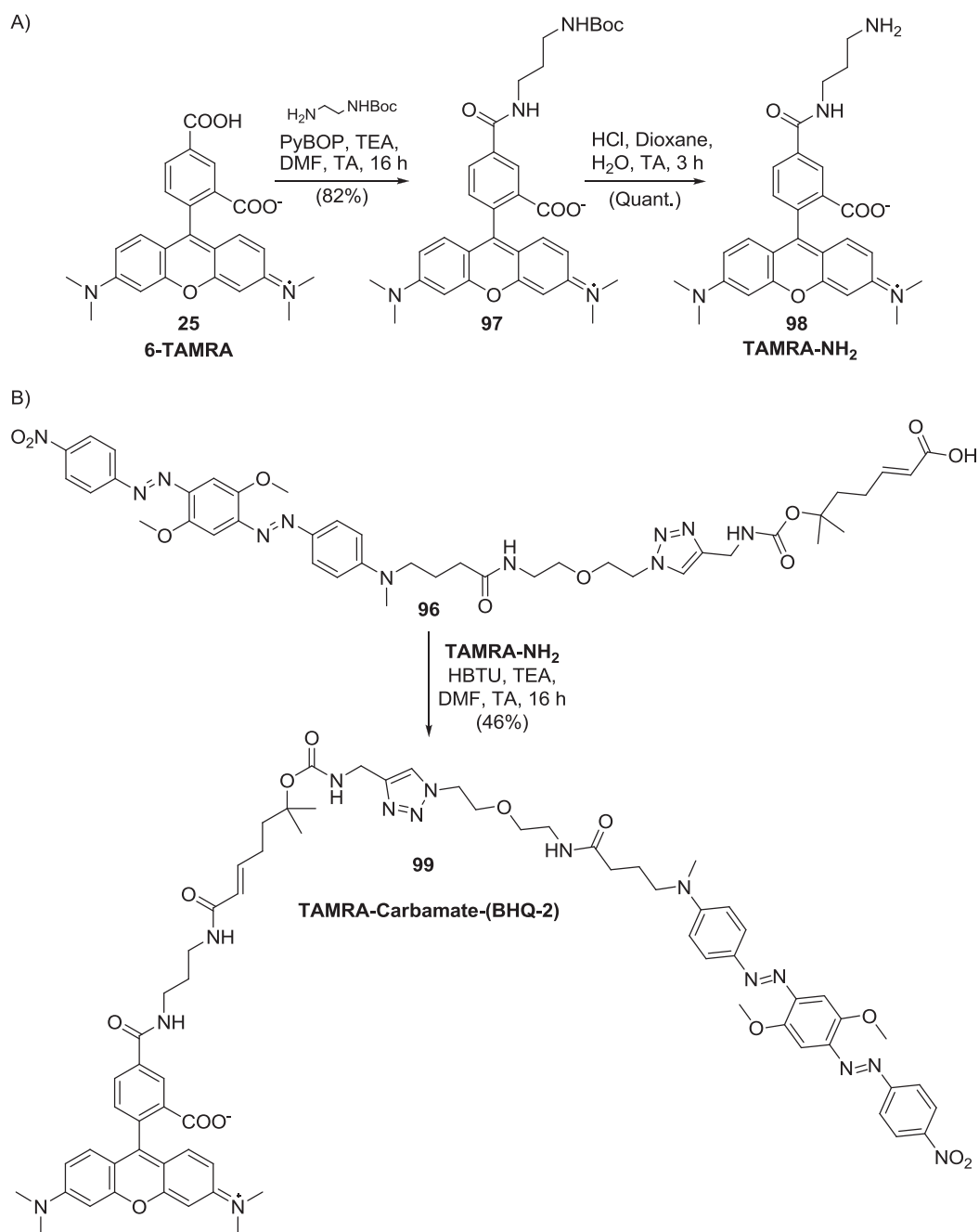


Figure 92 : Formation de TAMRA-NH₂ (A) et TAMRA-Carbamate-(BHQ-2) (B).

La voie de synthèse développée a validé les conditions de couplage du quencheur BHQ-2 par cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre. En revanche, la fonctionnalisation d'un dérivé de BHQ-2 par le fluorophore s'est avérée impossible *via* une réaction de métathèse. Une nouvelle stratégie d'hétérofonctionnalisation a alors été envisagée avec la séquence suivante : cycloaddition catalysée au cuivre, puis réaction d'addition de Michael entre un thiol et un groupement maléimide. Cette voie réactionnelle a été appliquée à la synthèse d'un dérivé pro-fluorescent basé sur une liaison THP.

IV.4.4.2. Synthèse de TAMRA-THP-(BHQ-2)

La formation d'un dérivé TAMRA-THP-(BHQ-2) peut être réalisée à partir des composés (BHQ-2)-N₃ et TAMRA-SH précédemment synthétisés (Figure 93). Pour ce faire, l'éther de tétrahydropyranyle **100** doit être obtenu, avec de part et d'autre, une fonction alcyne et maléimide. Le groupement maléimide peut être introduit par addition de *N*-hydroxyéthylmaléimide sur un dérivé dihydro-2H-pyran **101** qui lui-même serait formé en trois étapes à partir d'une réaction de *O*-alkylation de 3,4-dihydro-2H-pyran-2-méthanol.

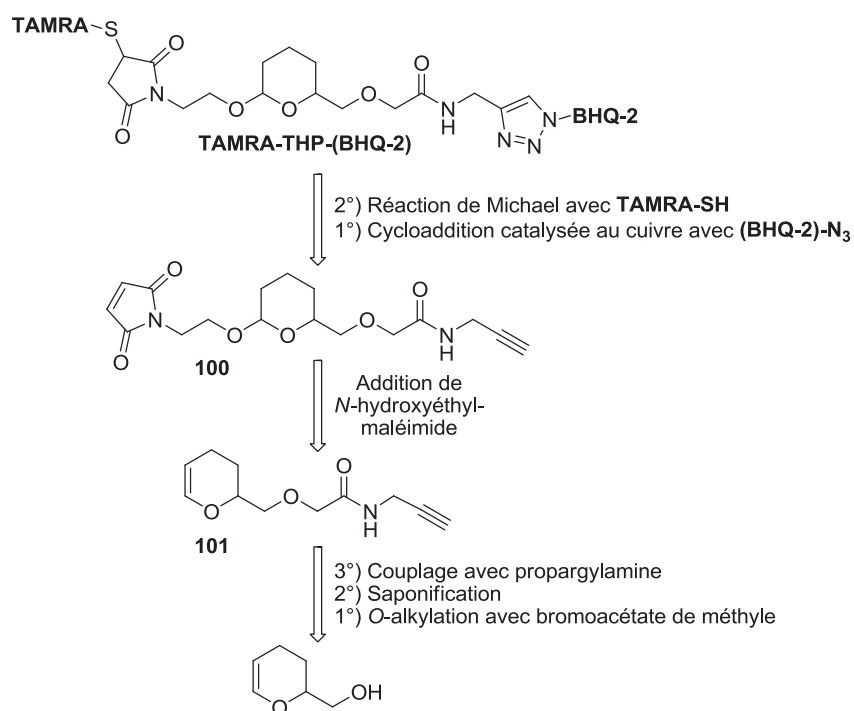


Figure 93 : Retrosynthèse envisagée pour la formation de TAMRA-THP-(BHQ-2).

La modification du 3,4-dihydro-2H-pyran-2-méthanol a abouti au composé **101** en trois étapes (Figure 94). La déprotonation de l'alcool de départ par l'hydrure de sodium, puis sa réaction avec du bromoacétate de méthyle a conduit au composé **102** avec 77% de rendement. La saponification de l'ester méthylique de **102** par de l'hydroxyde de lithium, puis le couplage de l'acide formé **103** avec de la propargylamine a permis la formation du dihydropyran **101** correspondant avec 71% de rendement. En présence d'une quantité catalytique d'acide paratoluènesulfonique, la réaction du dihydropyran **101** et de l'alcool **45** a conduit à la formation de l'éther de tétrahydropyranyle **100**, dérivatisable à la fois par un azoture et un thiol (Figure 94).

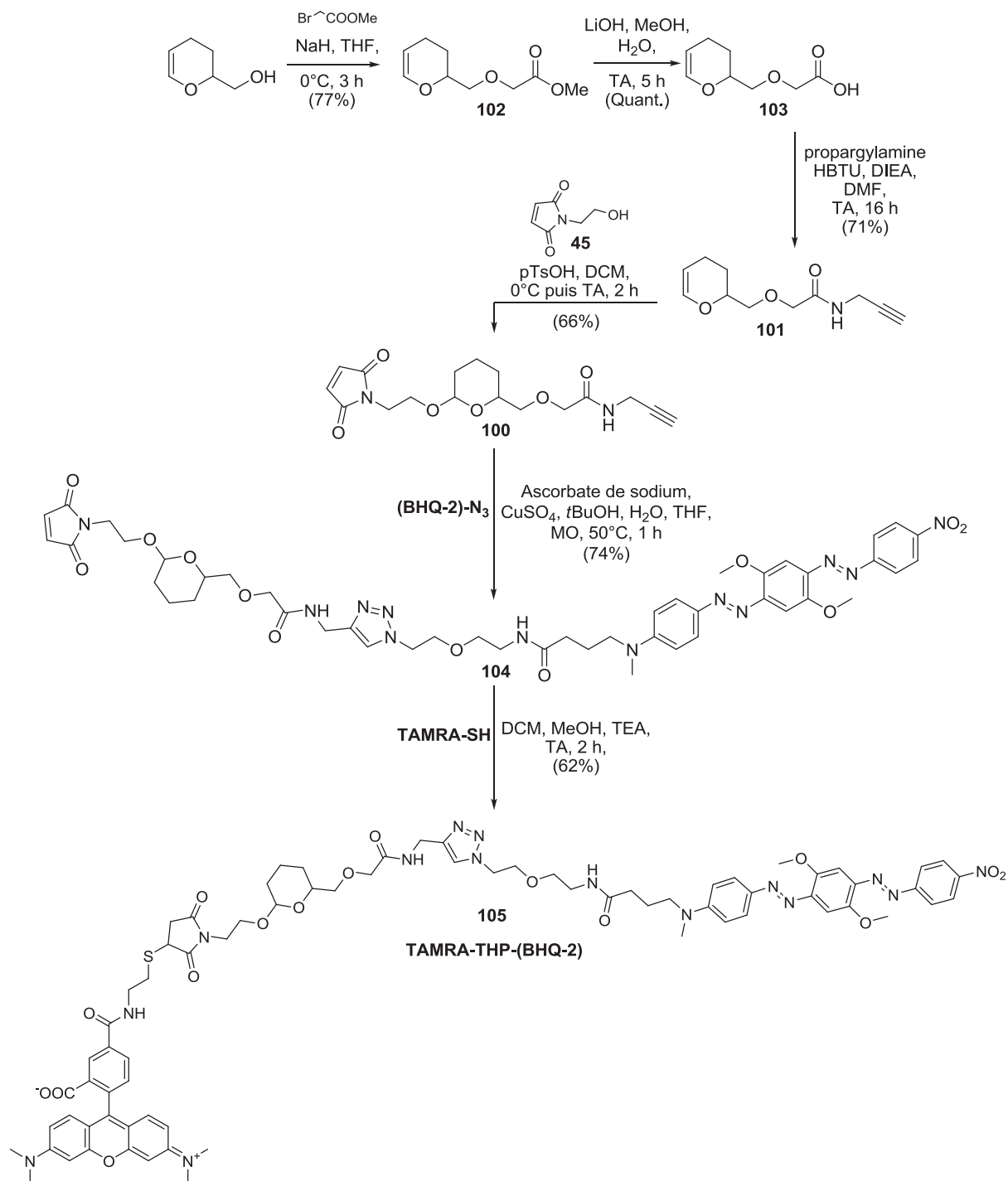


Figure 94 : Voie de synthèse de TAMRA-THP-(BHQ-2).

Les conditions précédemment utilisées pour la synthèse du carbamate **93**, par cycloaddition catalysée au cuivre, n'ont pas permis d'obtenir le triazole **104**. En revanche, l'activation de cette même réaction par chauffage aux micro-ondes a abouti au composé **104** avec 74% de rendement. Enfin l'addition de Michael de TAMRA-SH sur le dérivé maléimide **104** a conduit à la formation du conjugué TAMRA-THP-(BHQ-2) avec 62% de rendement sur

cette dernière étape. Ce produit a été purifié en conditions basiques et par HPLC préparative (NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5).

La méthodologie de synthèse utilisée pour **TAMRA-THP-(BHQ-2)** a ensuite été appliquée à la synthèse d'une sonde activable possédant un groupement acylhydrazone acido-labile.

IV.4.4.3. Synthèse de **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)**

Le composé **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** pourrait être obtenu à partir de l'acylhydrazone **104** modifié par **(BHQ-2)-N₃** via une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre, et **TAMRA-SH** via une addition de Michael (Figure 95). Le composé bifonctionnel **104** peut lui être obtenu par condensation de dérivés acylhydrazine/alcyne **105** et aldéhyde/maléimide **106**. La synthèse de **105** est envisagée en deux étapes, avec la *N*-alkylation de la propargylamine par du bromoacétate de méthyle, puis la conversion de l'ester méthylique en acylhydrazine. L'aldéhyde **106** peut être formé en deux étapes à partir de *N*-méthoxycarbonyl maléimide, comme reporté dans la littérature avec la condensation de 3-aminopropanol puis une oxydation de Dess-Martin.¹⁹⁷

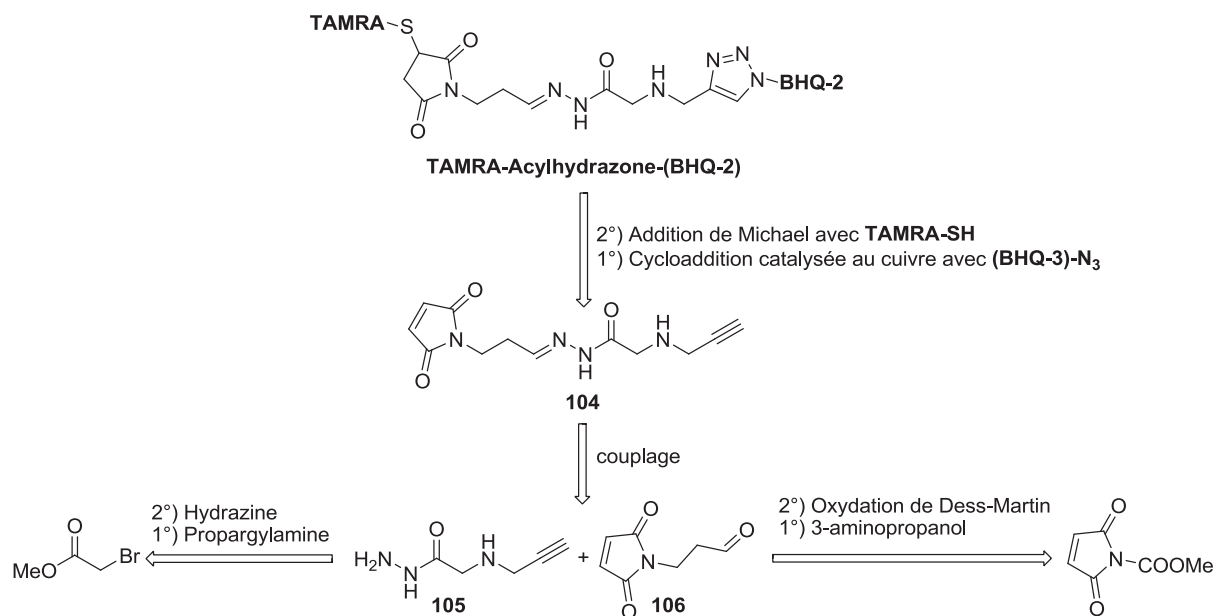


Figure 95 : Retrosynthèse envisagée pour la formation de **TAMRA-THP-(BHQ-2)**.

La synthèse du composé **105** a débuté par la *N*-alkylation de propargylamine par du bromoacétate de méthyle (Figure 96). L'ester méthylique de **107** a ensuite été substitué par de l'hydrazine pour permettre la formation de l'acylhydrazone **105** avec 78% de rendement

global sur les deux étapes. Pour l'obtention de l'aldéhyde **106**, le *N*-méthoxycarbone maléimide a été condensé avec le 3-aminopropanol en milieu basique suivant la procédure décrite par Keller *et al.* (Figure 96).¹⁹⁸ Le maléimide **108** a alors été obtenu avec un rendement moyen de 35%. Enfin l'oxydation de l'alcool **108** en aldéhyde a été réalisée avec le périodinate de Dess-Martin. Après purification sur gel de silice, le composé **106** a été isolé avec un rendement de 40%. Cependant, cette molécule s'est révélée particulièrement instable du fait de sa polymérisation, comme décrit par Sun *et al.*¹⁹⁷ Après purification, le composé **106** a alors été directement engagé dans une réaction de condensation avec l'acylhydrazine **105** précédemment formé (Figure 96). Lors de l'analyse du brut réactionnel par RMN, le produit **104** a été identifié en mélange avec d'autres sous-produits. Malheureusement, aucune technique de purification n'a permis d'isoler ce composé acylhydrazone. Cette molécule s'est trouvée instable sur alumine basique, en solvants chlorés et dans les conditions de purification par HPLC préparative (NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5).

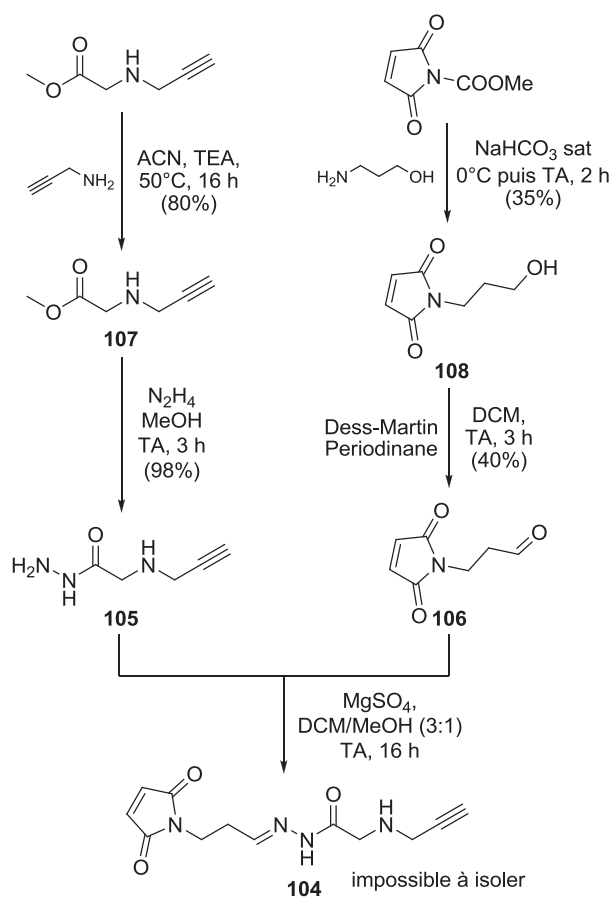


Figure 96 : Voie de synthèse de **104**.

Lors de la synthèse du composé TAMRA-Orthoester-(BHQ-2), une diminution de la labilité du groupement pH-sensible a été observée une fois ce dernier conjugué aux

fluorophore et quencheur. Pour obtenir le composé **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** en stabilisant le motif pH-sensible, une nouvelle stratégie a consisté à former directement le groupement pH-sensible à partir de deux dérivés aldéhyde et acylhydrazine respectivement fonctionnalisés par les composés TAMRA et BHQ-2.

Pour dériver le fluorophore TAMRA par un aldéhyde, un dérivé dioxolane aminé **110** a été formé en deux étapes (Figure 97A). Dans un premier temps, la substitution nucléophile du 2-(2-bromoéthyl)-1,3-dioxolane par un azoture a formé le composé **109** avec 64% de rendement après distillation. Pour cette réaction, le bromure de tétrabutylammonium a été utilisé comme agent de transfert de phase. La seconde étape a consisté en la réduction de l'azoture de **110** par la triphénylphosphine, dans les conditions de Staudinger, pour former l'amine **110** avec 21% de rendement. Couplée à la TAMRA, cette amine a permis la formation du composé **111**. Enfin, une déprotection de l'aldéhyde par hydrolyse acide du dioxolane et une purification par HPLC préparative ont conduit à la formation du fluorophore **112** (Figure 97B).

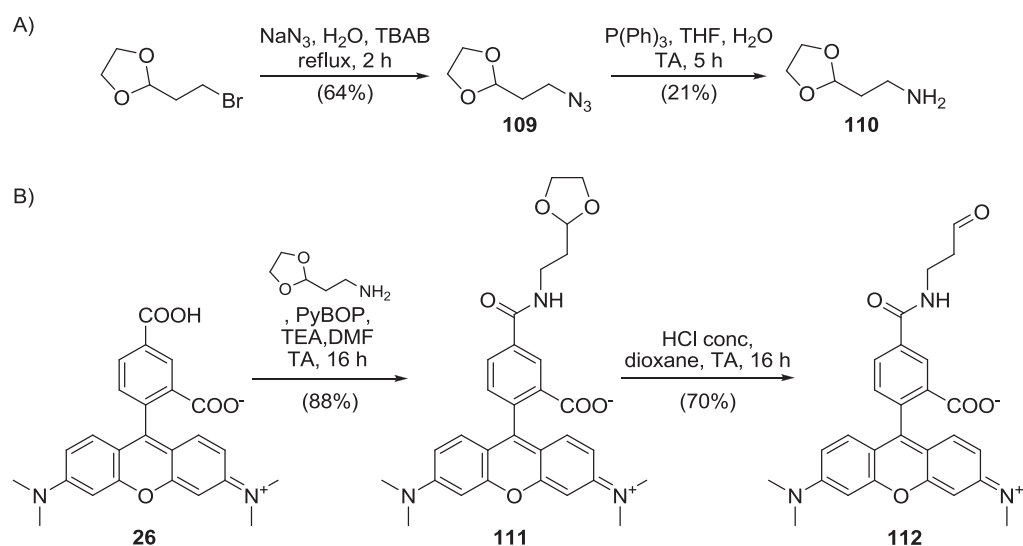


Figure 97 : Voie de synthèse du composé **112**.

Pour préparer un dérivé acylhydrazine du quencheur, un couplage entre du BHQ-2 et l'hydrazine mono-protégée par un Boc a conduit au dérivé **113** (Figure 98). Puis, la déprotection de ce composé par un traitement acide a permis l'obtention du produit **114** avec 80% de rendement sur l'ensemble de la séquence réactionnelle.

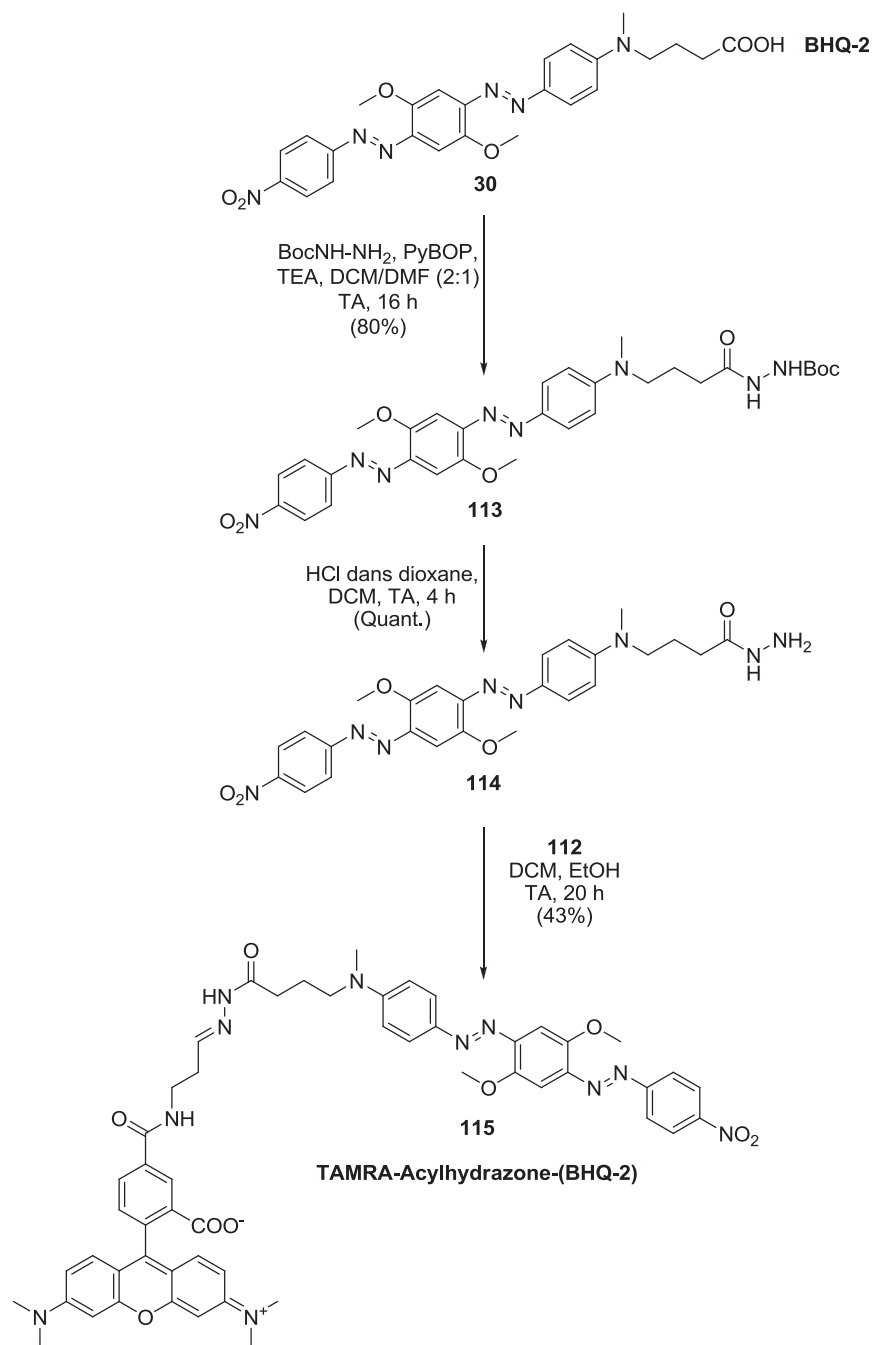


Figure 98: Voie de synthèse de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2).

Dans un mélange de dichlorométhane et d'éthanol, la condensation du composé hydrazine 114 et l'aldéhyde 112 a conduit à la formation du composé pH-sensible TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2), isolé avec 43% de rendement après purification par HPLC préparative en conditions basiques (NH₄HCO₂/ACN, pH 8,5). D'après la RMN du proton effectuée, l'hydrazone formé est présent sous forme de deux isomères Z/E en proportions 57:43 non-attribuées.

IV.4.4.4. Synthèse de TAMRA-Acétal-(BHQ-2)

La double fonctionnalisation de composés dialkyl acétal de benzaldéhyde, par réaction de cycloaddition catalysée au cuivre, a déjà été reportée dans la littérature.¹⁹⁹ Nous avons donc choisi de nous inspirer de ces travaux pour former une sonde pro-fluorescente basée sur le motif dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde. Pour cela, un bis-azoture d'acétal de benzaldéhyde **116** doit être formé en deux étapes (Figure 99).

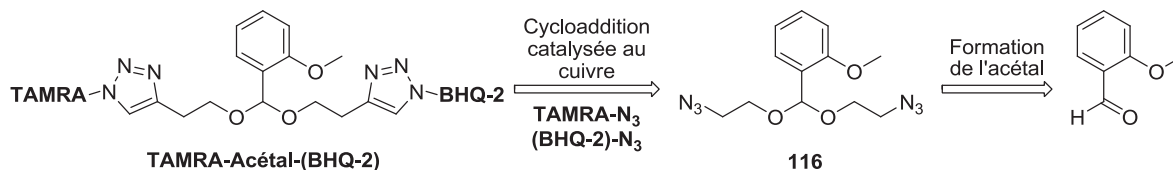


Figure 99 : Retrosynthèse envisagée pour la formation de TAMRA-Acétal-(BHQ-2).

Une réaction d'acétalisation de l'*o*-anisaldéhyde par de la chloroéthanolamine a abouti au composé **117** (Figure 100A). Puis, une réaction de substitution nucléophile des atomes de chlore de **117** par des groupements azotures a conduit à la formation de **116** avec un faible rendement de 26%. En vue d'une dérivatisation de **117**, un dérivé (BHQ-2)-Alcyne a également été préparé par couplage avec la propargylamine, dans les conditions précédemment utilisées (Figure 100B).

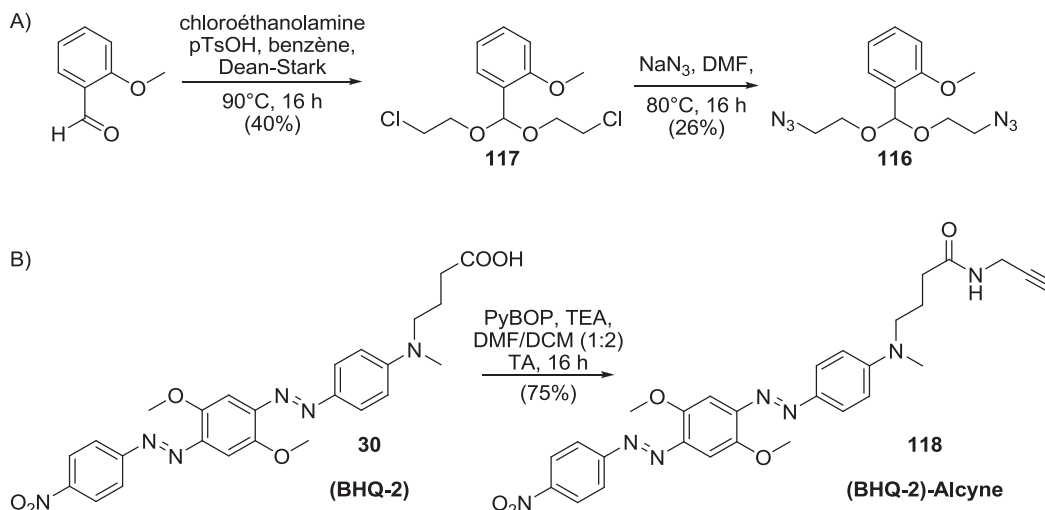


Figure 100 : Voies de synthèses des composés **116** et (BHQ-2)-Alcyne.

Avec les dérivés alcynes de fluorophore et de quencheur, l'acétal **116** a été fonctionnalisé par deux réactions monotopes de cycloaddition catalysée au cuivre (Figure 101). Deux composés majoritaires ont été isolés par HPLC préparative ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{ACN}$, pH 8,5) : le

composé **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** et un composé **TAMRA-Acétal-TAMRA** avec des rendements respectifs de 10 et 72%. Cette sélectivité non attendue a pu provenir d'une mauvaise homogénéité du milieu réactionnel favorisant ainsi la formation du produit bis-TAMRA dans l'eau.

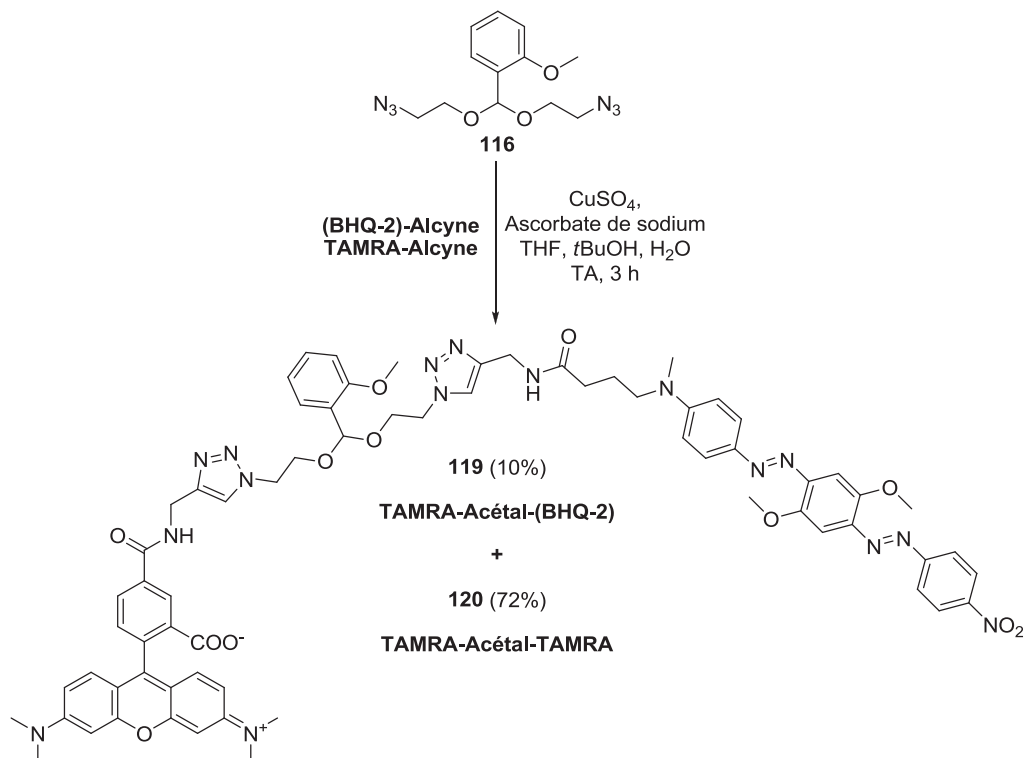


Figure 101 : Double réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre pour la formation de TAMRA-Acétal-(BHQ-2).

IV.4.5. Evaluation comparative en solution de la bio-labilité de motifs pH-sensibles

L'ensemble des sondes pro-fluorescentes synthétisées ont été étudiées en solution afin de déterminer un profil de labilité pour chaque structure acido-labile utilisée. Les stabilités des produits ont ainsi été suivies à différents pH, mais également en milieux oxydants, et en présence de nucléophiles pour certains.

IV.4.5.1. Labilité en milieux acides

La labilité des composés pro-fluorescents **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)**, **TAMRA-THP-(BHQ-2)**, **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** et **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)**, a été enregistrée aux pH 5,5 et 7,4 et dans une solution diluée d'acide chlorhydrique (1 M, pH <1). Les conditions de mesure sont identiques à celles développées pour le suivi cinétique du composé **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** (section IV.3.4.). Les composés **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Alcyne** ont été respectivement utilisés comme contrôle non-hydrolysable et positif (Figure 102).

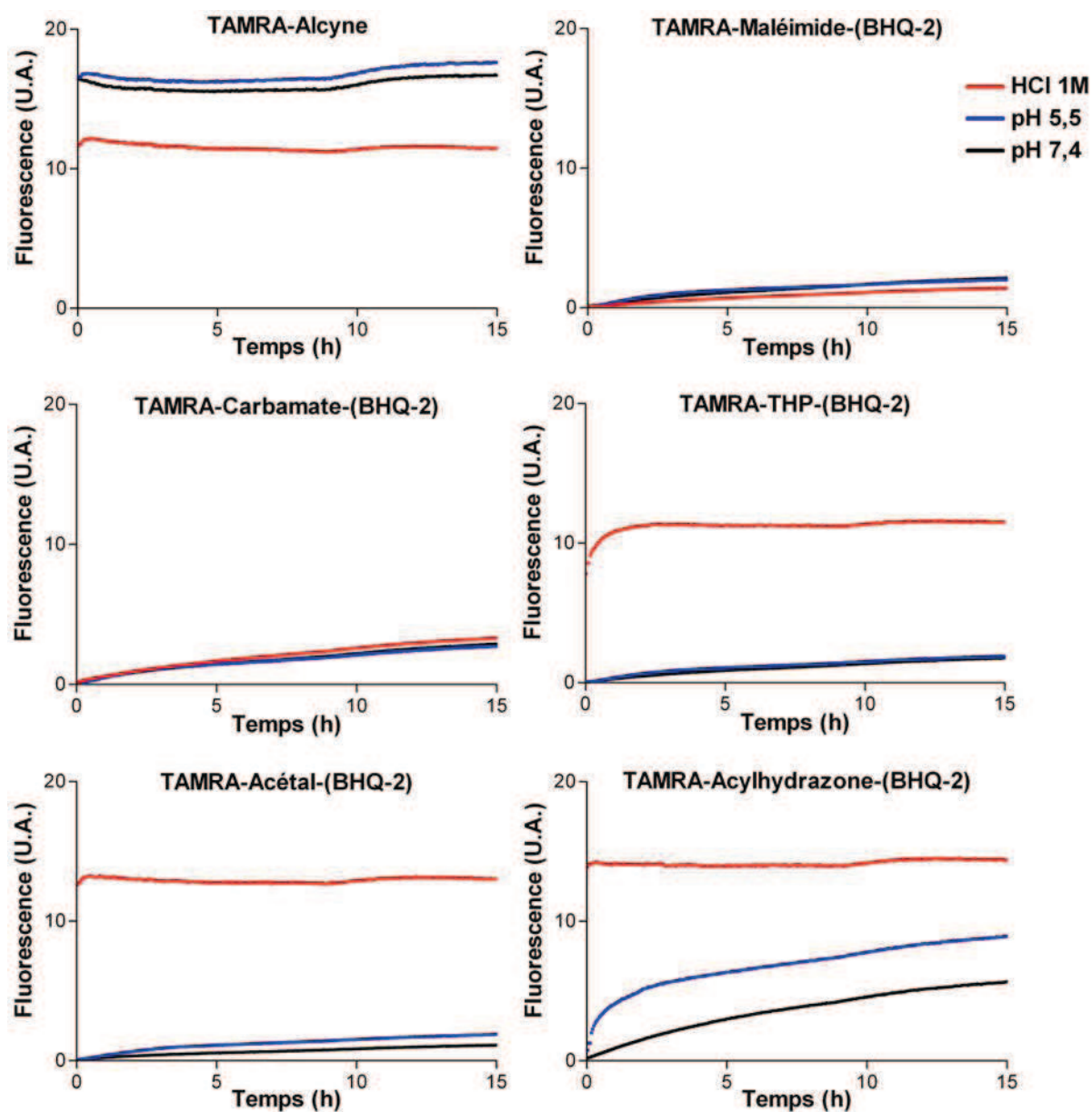


Figure 102 : Mesures de labilité des sondes TAMRA-Alcyne, TAMRA-Maléimide-(BHQ-2), TAMRA-Carbamate-(BHQ-2), TAMRA-THP-(BHQ-2), TAMRA-Acétal-(BHQ-2) et TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) (0,5 μ M) dans une solution diluée d'acide chlorhydrique (1 M, pH <1) et en milieux tamponnés ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 5,5 et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4 ; 100 mM). Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Pour les dérivés pH-sensibles, les cinétiques observées ont montré d'importantes différences de labilité (Figure 102). A pH <1, la réactivation de la fluorescence a révélée une hydrolyse totale et quasi-instantanée des motifs acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde, tandis que celle du THP a nécessité deux heures. Dans le même temps, le dérivé carbamate n'a démontré qu'une activation partielle de sa fluorescence à pH <1, avec un pourcentage d'hydrolyse de 29% après 15 heures de réaction. Néanmoins, ce composé a démontré un clivage total en 5 minutes dans le dichlorométhane et en présence de 10% d'acide trifluoroacétique.

En milieu faiblement acide (pH 5,5), le dérivé de THP s'est trouvé totalement stable tandis que la sonde **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** a dévoilé un faible taux d'hydrolyse ($\approx 10\%$ en 15 heures) (Figure 102). Cependant, le motif dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde n'a pas été hydrolysé à pH 7,4. Avec le composé **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)**, l'activité d'hydrolyse en milieu faiblement acide s'est révélée plus marquante. Après 15 heures de réaction, des pourcentages d'hydrolyse de 50 et 31% ont été respectivement calculés aux pH 5,5 et 7,4.

Comme pour le composé spiro di-orthoester, l'incorporation des motifs pH-sensibles au cœur des sondes pro-fluorescentes a fortement ralenti les cinétiques d'hydrolyse par rapport aux composés modèles étudiés en HPLC. En revanche, cela ne semble pas avoir affecté la sélectivité d'hydrolyse acido-catalysée. Même faible, l'hydrolyse de **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** s'est révélée sélective vis-à-vis d'un pH acide, comme cela a été précédemment observé avec la molécule diéthyl acétal d'*o*-anisaldéhyde **62**. Avec le composé pro-fluorescent **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)**, un manque de sélectivité entre les pH 5,5 et 7,4 a de nouveau été observé (Figure 85, section IV.4.1.2).

Pour chaque composé ayant montré une labilité à pH inférieur à 1, une étude de labilité plus fine a été réalisée pour chaque unité de pH comprise entre 3 et 7 (Figure 103). Les conditions utilisées sont identiques à celles mises en place pour le suivi cinétique de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** aux pH compris entre 3 et 7 (voir section IV.3.4.2.).

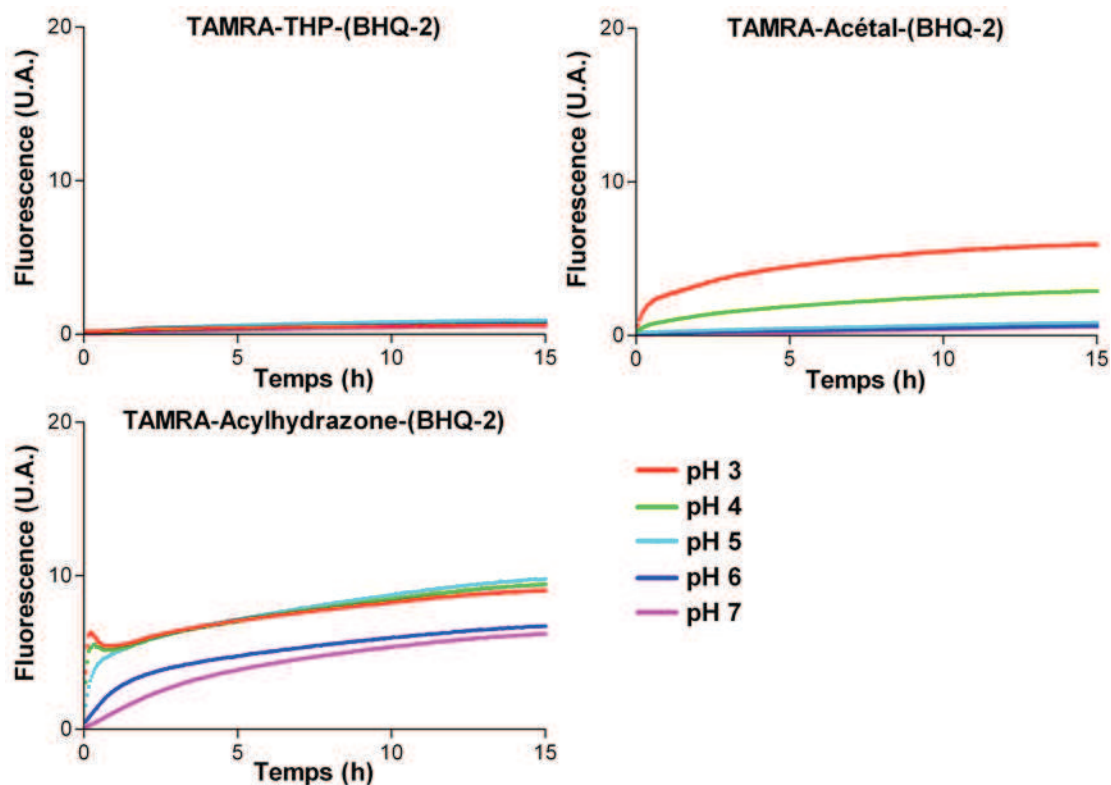


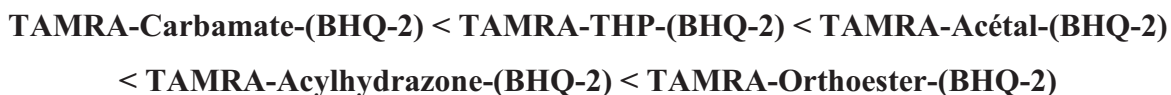
Figure 103 : Cinétique d'hydrolyse des composés TAMRA-THP-(BHQ-2), TAMRA-Acétal-(BHQ-2), TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) (0,5 μ M) à différents pH ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM ; pH (3-7)) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Pour le composé THP, aucune hydrolyse n'a été enregistrée pour l'ensemble des pH utilisés (Figure 103). Le dérivé dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde a uniquement montré une hydrolyse aux pH 3 et 4. Après 15 heures de réaction, des pourcentages d'hydrolyse de 34 et 16% ont été respectivement calculés aux pH 3 et 4. Comparé à l'intensité mesurée à pH 7, le signal est respectivement augmenté d'un facteur 12 et 6. Pour une différence d'une unité de pH, l'hydrolyse diffère donc d'un facteur deux. Ainsi, malgré des cinétiques lentes, ce composé TAMRA-Acétal-(BHQ-2) a confirmé l'excellente sélectivité de l'hydrolyse acide d'un motif dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde.

Avec le groupement acylhydrazone, les résultats obtenus ont à nouveau prouvé que l'hydrolyse n'est pas vraiment pH-dépendante. Deux profils cinétiques ont été mis en évidence : un premier, pour les pH 3, 4 et 5, et un second aux pH 6 et 7. Il est à noter que la sélectivité d'hydrolyse acide de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) est maximum pour des temps faibles inférieur à 1 heure (Figure 103).

Ces résultats confirment ceux obtenus avec la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**, à savoir que les groupements BHQ-2 et TAMRA diminuent la labilité du motif pH-sensible incorporé (voir section IV.3.4.1.). Il y a des variations selon les structures. Par exemple, bien que le spiro di-orthoester **41** et le dialkyl acétal de d'*o*-anisaldéhyde **62** présentent les mêmes temps de demi-vie à pH 5,5 (0,1 heure), les deux sondes pro-fluorescentes associées ont des profils très différents : une hydrolyse totale en 5 heures pour **TAMRA-Orthoester-BHQ-2** contre 10% d'hydrolyse après 15 heures pour **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)**. Précédemment, le composé-modèle acylhydrazone **76** s'est montré totalement instable aux pH 5,5 et 7,4. Pourtant la sonde **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** a montré un temps de demi-vie de 15 heures à pH 5,5. Ce composé est donc plus stable que **TAMRA-Orthoester-BHQ-2** bien que l'inverse ait été observé à partir des structures modèles. D'une manière générale, le seul paramètre qui ne semble pas changer entre une molécule-modèle et une sonde pro-fluorescente, c'est la spécificité de l'hydrolyse pour le pH.

L'objectif de cette étude était de développer une série de composé présentant un important différentiel de labilité. Les résultats observés vont dans ce sens. Il est ainsi possible de classer les différents composés activables selon une échelle d'acido-labilité croissante :



Afin d'étudier s'il est possible d'étendre notre méthodologie de caractérisation à d'autres stimuli, nous avons étudié la labilité de **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** vis-à-vis de différents milieux oxydants.

IV.4.5.2. Labilité en milieux oxydants

Les acétals sont fréquemment utilisés pour protéger des dérivés carbonylés. De nombreuses techniques ont été développées pour leur déprotection.²⁰⁰ L'hydrolyse acide est historiquement la méthode la plus utilisée, mais pour des produits sensibles, des techniques plus douces ont été mises au point comme l'utilisation de CAN,²⁰¹ de thiourée²⁰² ou d'un mélange SmCl₃/TMSCl.²⁰³ En milieu oxydant, les acétal de benzaldéhyde peuvent également subir un clivage partiel pour former des éthers de benzyle.²⁰⁰

En organisme vivant, la détection par fluorescence d'espèces réactives à l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) peut être utilisée pour différencier un état sain d'un état

pathologique.^{204,205} Ces ROS sont naturellement présent dans les cellules comme sous-produits de métabolisme de l'oxygène et ont un rôle important dans la signalisation cellulaire et l'homéostasie. Cependant, sous l'effet d'un stress environnemental, la concentration cellulaire de ROS peut atteindre un niveau anormal et induire des dommages cellulaires. Ce phénomène est connu sous le nom de stress oxydant et est induit par des espèces chimiques comme du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion hypochlorite (ClO^-) ou des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyle (HO^{\cdot}). En solution, certains de ces réactifs sont également utilisés comme système-modèle afin d'évaluer la réactivité de sondes pro-fluorescentes.^{206,207}

Cette étude a donc consisté en la mesure de la labilité de **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** vis-à-vis de différents oxydants comme : le periodate de sodium ($NaIO_4$), l'hypochlorite de sodium ($NaOCl$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le persulfate d'ammonium et l'hydrogénopersulfate de potassium.

Comme nous l'avons précédemment fait pour le pH (voir section IV.2.2.1), la stabilité du fluorophore **TAMRA-Alcyne** ($0,5 \mu M$) a été étudiée dans les différents milieux oxydants sélectionnés (Figure 104). Chaque réactif a été préparé à 10 mM dans un tampon (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 100 mM ; pH 7,4). Les cinétiques ont été suivies comme précédemment (IV. 4.3.2.).

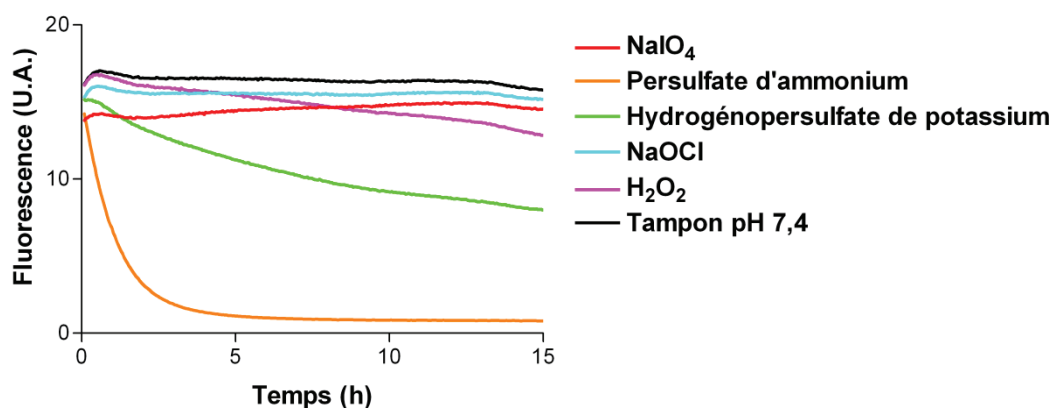


Figure 104: Mesure de la labilité de TAMRA-Alcyne ($0,5 \mu M$) vis-à-vis de différents milieux oxydants (10 mM) ; Mesure réalisées en milieux tamponnés (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 100 mM ; pH 7,4) et enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Les mesures ont montré, d'une part, une forte extinction de la fluorescence en présence de persulfates, et d'autre part, une stabilité en présence de periodate de sodium, d'ions hypochlorites et dans une moindre mesure, de peroxyde d'hydrogène (Figure 104). L'extinction de dérivés de rhodamine par réactions d'oxydation a déjà été décrite suivant différentes voies comme l'oxydation d'amine tertiaire en oxyde d'amine²⁰⁸ et la désalkylation

d'amine tertiaire.²⁰⁹ Les résultats obtenus ne sont donc pas surprenants, mais ils limitent l'utilisation de milieux oxydants doux pour mesurer la réactivité de **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)**.

La labilité du composé pro-fluorescent Acétal a donc été uniquement étudiée en présence de periodate de sodium, d'hypochlorite de sodium et de peroxyde d'hydrogène (Figure 105). Pour cette expériences, le dérivé maléimide a été utilisé comme un composé-contrôle afin d'étudier la stabilité du quencheur BHQ-2 dans les conditions testées. Le protocole suivi est identique à celui précédemment développé pour **TAMRA-Alcyne**.

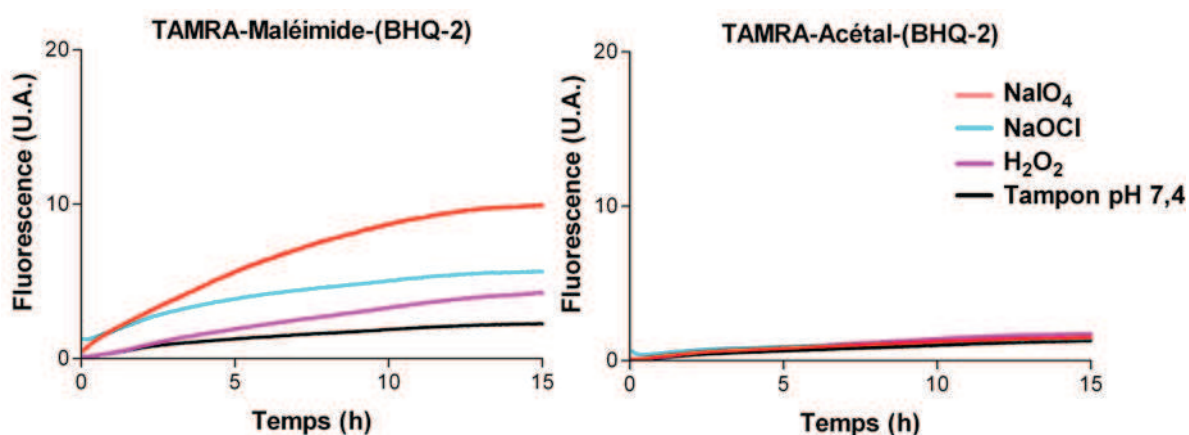


Figure 105 : Mesures de la labilité des structures **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** et **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** (0,5 μ M) vis-à-vis de différents milieux oxydants (10 mM) ; Mesure réalisées en milieux tamponnés ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM ; pH 7,4) et enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

En présence d'agents oxydants, le dérivé **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** n'a pas démontré de réactivité comme attendu (Figure 105). En revanche, le produit **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)**, utilisé comme contrôle, s'est révélé sensible vis-à-vis des trois réactifs utilisés. Ce composé a montré plus de 50% d'activation après 15 heures de réaction en présence de periodate de sodium. Cette réactivité inattendue ne peut être due qu'à un clivage oxydant de l'adduit maléimide/thiol puisque le composé **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** s'est révalé stable. La liaison thioéther peut avoir été oxydée en sulfone qui, dans un second temps, a subi une hydrolyse basique. Dans la littérature, de telles réactions ont déjà été décrites sur des protéines contenant des dérivés de méthionines.²¹⁰

Cette réactivité est peut être la cause du signal fluorescent observé lors de l'étude **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** en cellules BNL CL.2. La présence de conditions oxydantes ou d'oxydoréductase dans les mitochondries pourraient alors expliquer ce phénomène. Pour confirmer cette hypothèse, deux expériences consisteraient à :

- incuber la sonde maléimide en présence de mitochondries isolées et issues de foie humain.
- réaliser un marquage cellulaire des mitochondries avec un fluorophore comme le MitoTracker®Green.

Face aux résultats surprenants observés en milieux oxydants, nous avons poursuivi l'étude de la réactivité des sondes pro-fluorescentes vis-à-vis d'autres conditions chimiques. Nous avons notamment étudié la réactivité du composé **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** envers différents nucléophiles.

IV.4.5.3. Labilité en milieux nucléophiles

Les composés acylhydrazones sont connus pour leurs capacités à réaliser des réactions de transamination par échange d'amines nucléophiles comme des anilines.²¹¹ Ce type de clivage par formation d'une nouvelle liaison a par exemple été reporté en protéomique chimique pour le développement de sondes d'enrichissement clivables (section II.2.1.).^{44,45} Cette réaction d'échange est catalysée à pH acide et sa vitesse peut être contrôlée en jouant sur le pH.²¹² A l'échelle cellulaire, de nombreuses amines primaires peuvent être impliquées dans ce type de réaction, comme l'extrémité *N*-terminale d'une protéine ou les chaînes latérales de lysines. Afin d'étudier l'influence de fonctions amines sur la labilité du motif acylhydrazone, le composé activable **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** a été testé en présence de différents acides aminés (10 mM) et à pH acide et basique (Figure 106).

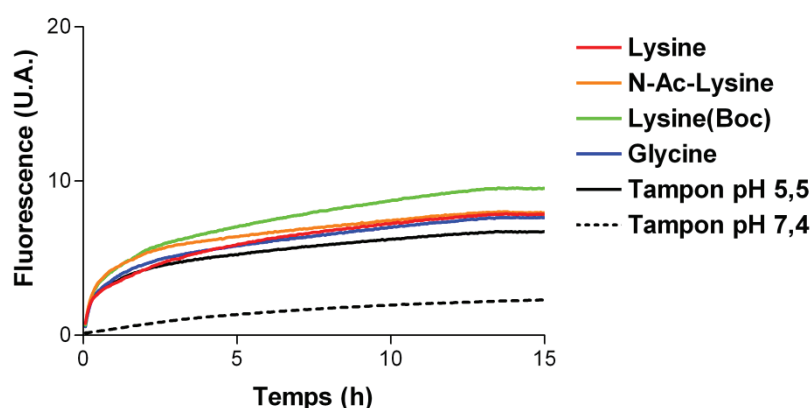


Figure 106 : Mesures de labilité de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) (0,5 μ M) vis-à-vis de différents acides aminés (10 mM) ; Chaque acide aminé a été testé en milieux tamponnés ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM ; pH 5,5) ; Mesures enregistrées en lecteur de plaques à fluorescence.

Cette étude a débuté par les mesures de stabilité de **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** en milieu acide, en présence de lysine libre, ou protégée sur les chaînes latérales, ou principales

(Figure 106). Les résultats ont démontré une faible augmentation des cinétiques d'activation en présence d'amines par rapport au tampon seul. Une activation plus forte a été obtenue avec un dérivé lysine dont la chaîne latérale est protégée par un Boc. Aux pH 5,5 et 7,4, les groupements amines des chaînes principales et latérales sont majoritairement sous forme d'ammonium, donc moins réactives vis-à-vis de réaction de transimination. En revanche, comme le pKa de l'amine située en α de l'acide carboxylique est plus faible, sa concentration en base conjuguée est plus importante (Figure 107). Les résultats observés peuvent ainsi s'expliquer par les différences de pKa entre les fonctions amines utilisées.

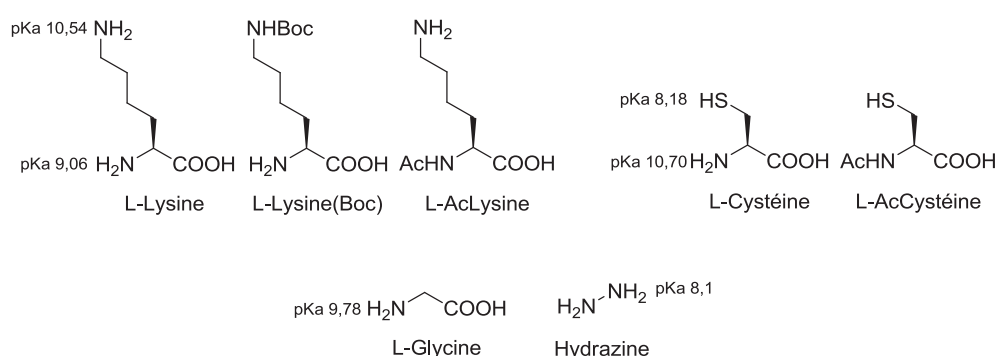


Figure 107 : Composés testés pour des réactions de transimination avec la sonde TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2).

Dans un second temps, la réactivité de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) vis-à-vis de dérivés de cystéine a permis d'étudier l'influence d'un groupement thiol sur la cinétique de réaction de transimination (Figure 108).

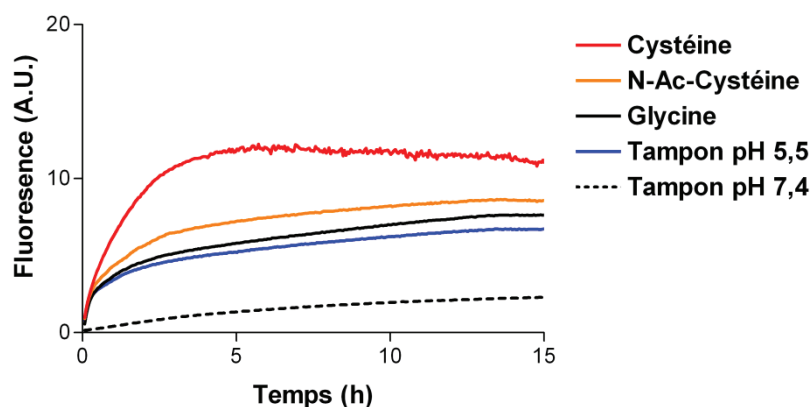


Figure 108 : Mesure de labilité de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) (0,5 μ M) vis-à-vis de différents acides aminés (10 mM) ; Chaque acide aminé a été testé en milieux tamponnés ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM ; pH 5,5) ; Mesures enregistrées sur lecteur de plaques.

La cystéine a permis une forte activation de la réaction de transimination. A l'aide de cet acide aminé, un clivage total a été observé en 4 heures (Figure 108). Les dérivés N-AcCystéine et glycine ont montré des cinétiques d'activation similaires. Aux vues des pKa

des amines de cystéine et de glycine, les résultats observés devraient être inverses. Cela veut donc dire que le groupement thiol doit intervenir dans le mécanisme de clivage. Dans la littérature, la réaction d'un thiol sur un hydrazone a déjà été décrite avec la formation d'un dérivé thioaminal qui peut s'hydrolyser pour libérer : un aldéhyde, un thiol et une acylhydrazine.²¹³

Une dernière étude a consisté à réaliser une catalyse de la réaction de transimination par une amine exogène comme l'hydrazine fortement soluble en milieux aqueux (Figure 109).

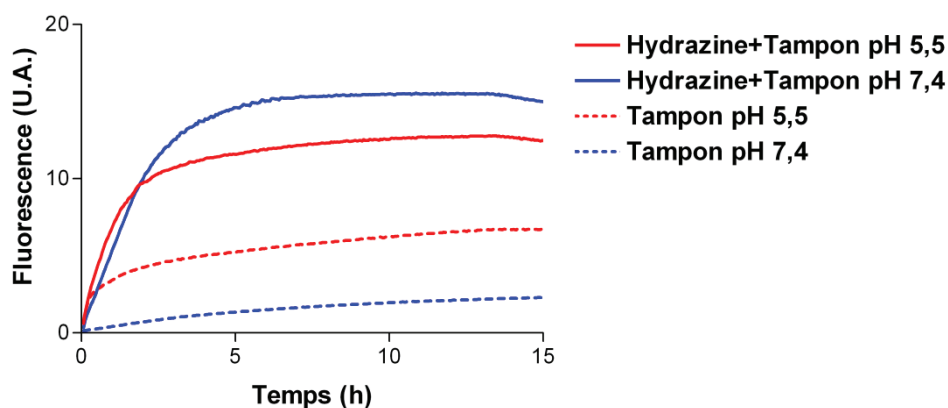


Figure 109 : Mesures de labilité de TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2) (0,5 μ M) vis-à-vis d'hydrazine (10 mM) ; Les réactions ont été réalisées dans deux milieux tamponnés ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 5,5 et $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4 ; 100 mM) ; Mesures enregistrées sur lecteur de plaques.

Aux pH 5,5 et 7,4 les cinétiques d'activation, en présence d'hydrazine, se sont révélées quasi-identiques pendant les deux premières heures (Figure 109). En revanche, les intensités mesurées après équilibre ont permis de démontrer une meilleure activation à pH 7,4. Cette différence doit être due à une variation de l'équilibre des concentrations amine libre/ammonium selon le pH. A un pH basique proche de la valeur de pKa de l'hydrazine, la quantité d'hydrazine libre a ainsi permis une meilleure catalyse de la réaction de clivage.

IV.4.5.4. Conclusion

Les labilités de différents groupements chimiques (maléimide, carbamate, THP, dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde et acylhydrazone) vis-à-vis de bio-stimuli ont été mesurées en solution et à l'aide des sondes pro-fluorescentes précédemment synthétisées.

En milieux acides, différents profils de labilité ont été observés. L'hydrolyse du composé acylhydrazone s'est révélée peu dépendante du pH comme cela a été observé lors des mesures réalisées par HPLC. En revanche, l'hydrolyse du composé dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde

s'est révélée spécifique pour les pH 3 et 4. Le composé carbamate s'est montré stable vis-à-vis de l'ensemble des conditions utilisées tandis que le dérivé de THP a uniquement démontré une hydrolyse à pH <1. Cette différence de labilité entre les deux composés est en accord avec les conditions utilisées pour éliminer ce type de groupements protecteurs en synthèse organique.²⁰⁰

La méthode d'évaluation, basée sur l'utilisation de composés pro-fluorescents, a clairement mis en évidence la réactivité de la structure acylhydrazone vis-à-vis de nucléophiles endogènes (acides aminés) et exogènes (l'hydrazine). Cette réactivité possible est donc à considérer pour des études en organismes vivants.

Alors que les adduits thiol/maléimide sont réputés stables et largement utilisés pour la bio-conjugaison de protéines ou d'anticorps, la méthodologie développée a permis de révéler une labilité en conditions oxydantes fortes. Cette réactivité est peut être la cause du faible signal fluorescent observé lors de l'étude de **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** en cellules BNL CL.2. De nouvelles expériences devraient être menées afin de localiser précisément l'activation cellulaire de ce composé.

Précédemment, les motifs acido-sensibles ont été choisis pour permettre un différentiel de labilité important. Ce phénomène s'est retrouvé à travers l'étude menée en solution. Pour augmenter le niveau de complexité du milieu, tous les composés pro-fluorescents ont été étudiés sur cellules et plus particulièrement dans les conditions d'acidité lysosomale révélée par la sonde **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)**.

IV.4.6. Evaluation comparative en cellules vivantes de la bio-labilité de motifs pH-sensibles

Les composés pro-fluorescents basés sur les motifs pH-sensibles, carbamate, THP, dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde et acylhydrazone ont été étudiés en cellules vivantes de type BNL CL.2, dans les conditions mises au point pour l'étude de **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** (section IV.3.5.). Dans cette expérience, les sondes **TAMRA-Orthoester-(BHQ-2)** et **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** ont été respectivement utilisées comme contrôle-positif et contrôle non-hydrolysable (Figure 110).

IV.4.6.1. Résultats

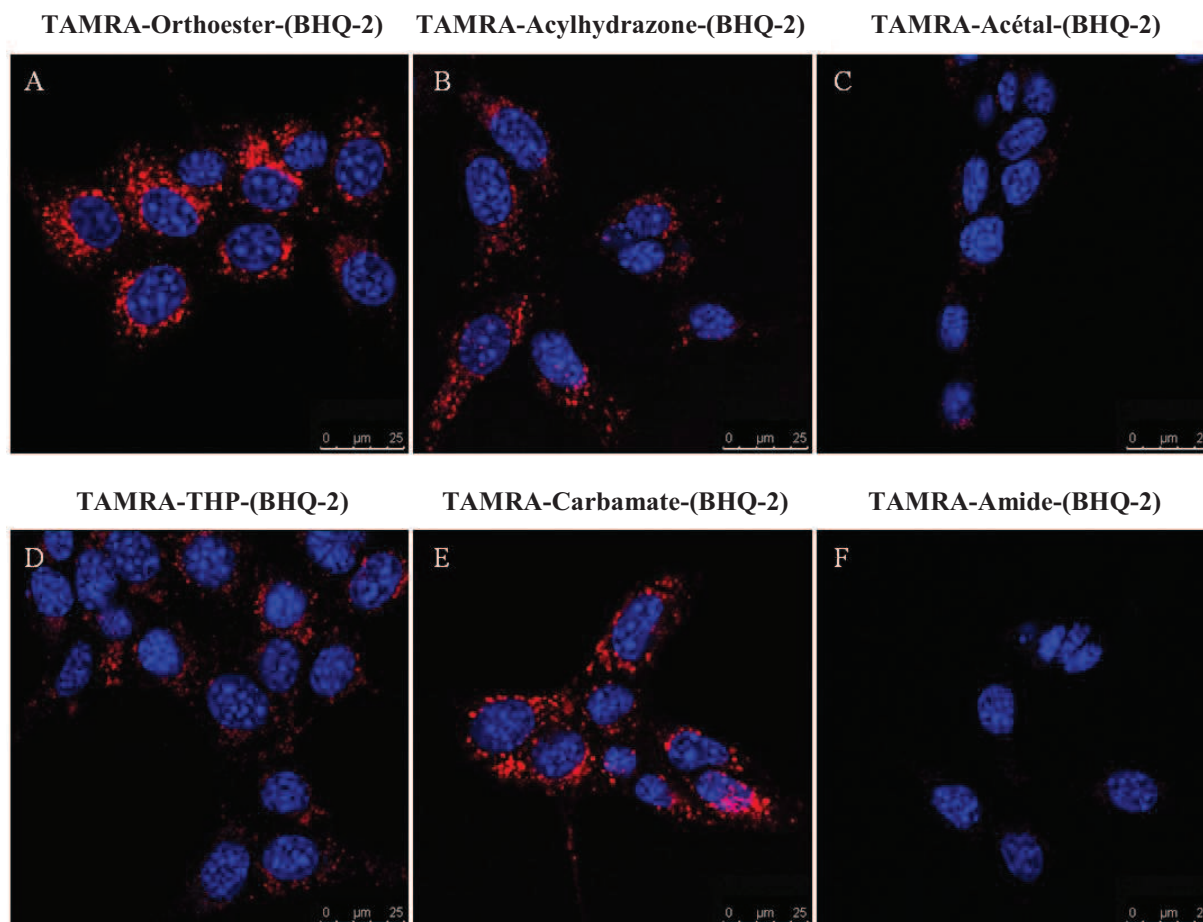


Figure 110 : Mesures de labilité des sondes activables TAMRA-Orthoester-(BHQ-2), TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2), TAMRA-Acétal-(BHQ-2), TAMRA-THP-(BHQ-2), TAMRA-Carbamate-(BHQ-2) et TAMRA-Amide-(BHQ-2) ; Présentation d'images fusionnées : canal rouge : sonde activable (1 μ M, 1h30), canal bleu : marquage de Hoechst (5 μ g/mL, 30 min) ; La barre d'échelle correspond à 25 μ m.

Comme lors de l'étude en solution, les structures étudiées ont démontré d'importantes différences de labilité (Figure 110). Comparé au dérivé spiro di-orthoester, le composé acylhydrazone avec un signal fluorescent moins important s'est donc montré plus stable (Figure 110, images A et B). La sonde TAMRA-Actétal-(BHQ-2) n'a pas montré de labilité particulière avec une fluorescence quasi nulle (Figure 110, image C). Pour les trois composés pH-sensibles spiro di-orthoester, acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde, les observations réalisées *in-cellulo* concordent avec les mesures réalisées en solution et à pH 5,5.

Le composé basé sur le motif THP a libéré un signal fluorescent proche de celui du composé acylhydrazone (Figure 110, image D). Pourtant, ce dérivé a été précédemment caractérisé comme non-hydrolysable aux pH acides physiologiques. D'après les résultats précédemment obtenus pour le composé TAMRA-Maléimide-(BHQ-2), il semblerait que le

l'activation de la sonde THP soit associée à l'adduit thiol/maléimide plutôt qu'au groupement éther de tétrahydropyranyle.

Contre toute attente, les composés orthoester et carbamate ont été activés de manières similaires, tant en terme d'intensité que de localisation (Figure 110, images A et E). Compte tenu du comportement de **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** en solution, le clivage lysosomal ne peut pas avoir été provoqué par une bio-acidité. Une voie enzymatique est plus probable. En effet, les lysosomes sont connus pour contenir de très nombreuses enzymes comme des protéases, des estérases et des lipases.¹⁷³

Enfin, contrairement au composé maléimide, la sonde **TAMRA-Amide-(BHQ-2)** s'est révélée totalement stable dans le milieu cellulaire car, dans les conditions d'imagerie utilisées, une absence totale de fluorescence a été observée (Figure 110, image F).

IV.4.6.2. Conclusion

Pour les trois composés acido-labiles spiro di-orthoester, acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde, les observations réalisées *in-cellulo* sont en accord avec les mesures réalisées en solution à pH 5,5. Le système d'évaluation utilisé permet donc d'identifier des différences de bio-labilité acide à un niveau cellulaire.

L'utilisation des sondes pro-fluorescentes a également permis d'observer des labilités non-associées à une bio-acidité. Par exemple, la sonde THP, formée par un adduit thiol/maléimide, a révélé la même sensibilité aux conditions cellulaires que la sonde **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)**. Le dérivé de carbamate, non-hydrolysable en solution, a démontré un niveau d'activation similaire au motif pH-sensible spiro di-orthoester. N'étant pas associé à une bio-acidité, une labilité enzymatique pourrait être envisagée. Pour le vérifier, l'étude de l'influence d'inhibiteurs de carboxylhydrolase sur l'activation de **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** est actuellement en cours au laboratoire.

Dans le but de quantifier les différents niveaux de labilité intracellulaire, des suivis cinétiques d'activation sont envisagés par cytométrie de flux. Cette technique devrait également permettre de cribler rapidement différents inhibiteurs de carboxylhydrolase pour tenter d'identifier les causes de la labilité du groupement carbamate.

IV.4.7. Conclusion

Une étude de structure-réactivité a été réalisée en HPLC afin de caractériser l'hydrolyse de différentes de groupements pH-sensibles. L'évaluation de composés-modèles vis-à-vis de milieux aqueux (pH 5,5 et 7,4) a permis de mettre en évidence l'influence prépondérante de la structure des composés sur leur sensibilité aux variations de pH. Ce phénomène a notamment été illustré avec l'étude de différentes oxazolidines fortement sensibles à l'hydrolyse. A partir des cinétiques d'hydrolyse mesurées, l'ensemble des structures étudiées ont été classées selon deux paramètres : leur cinétique d'hydrolyse et leur sélectivité d'hydrolyse pour un pH acide. A l'aide de la classification établie, quatre groupements ont été choisis pour être incorporés au sein de sondes pro-fluorescentes de type FRET en vue d'études en solution et en milieux biologiques natifs. Les quatre structures sélectionnées sont : un acylhydrazone (instable à pH 5,5 et 7,4), un dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde (très sélectif vis-vis de l'hydrolyse acide) et deux composés éther de tétrahydropyranyle et carbamate (stables aux pH 5,5 et 7,4).

Une importante différence de cinétique d'hydrolyse a été observée entre les composés pro-fluorescents et leurs molécules-modèles étudiées en HPLC. Cet effet a notamment permis de stabiliser une structure acylhydrazone dont le composé-modèle s'est montré particulièrement sensible à l'hydrolyse. Néanmoins, cet effet ne semble pas identique pour toutes les molécules. Par exemple, le groupement acylhydrazone a été plus stabilisé que le spiro di-orthoester. D'une manière générale, le seul paramètre qui ne semble pas être modifié par la structure fluorophore/quencheur est la spécificité de l'hydrolyse pour le pH. Ce phénomène a notamment été montré avec le composé dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde.

L'étude des sondes pro-fluorescentes a permis de mesurer différents types de labilité en solutions. Les composés spiro di-orthoester, acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde ont montré d'importants niveaux de sensibilité vis-à-vis de bio-acidité. Le dérivé acylhydrazone s'est également révélé sensible pour des nucléophiles endogènes et exogènes. Deux composés, carbamate et THP, se sont quant à eux montrés stables dans toutes les conditions testées. En revanche, le composé-contrôle non-hydrolysable basé sur un adduit thiol/maléimide a démontré une instabilité en milieu oxydant. Cette réactivité non-attendue pourrait être la cause de l'activation de ce même composé précédemment observée en cellules vivantes. Pour le confirmer, de nouvelles études sont envisagées.

Dans un environnement cellulaire, les sondes pro-fluorescentes et pH-sensibles, spiro di-orthoester, acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde ont montré des niveaux de fluorescence en accord avec les mesures réalisées en solution à pH 5,5.

L'utilisation des sondes pro-fluorescentes a également permis d'observer deux types de labilités intracellulaires et non-associées à une bio-acidité. Avec le motif THP, c'est la sensibilité d'un conjugué thiol/maléimide qui a de nouveau été observée, tandis que pour le composé carbamate, une activation par voie enzymatique est supposée.

Précédemment, l'étude du composé spiro di-orthoester a validé la méthodologie d'évaluation séquentielle mise au point (voir section IV.5.). L'étude comparée de différents groupements a non seulement permis de généraliser cette méthodologie, mais aussi, de valider l'utilisation de la méthode pour détecter différents niveaux de labilité vis-à-vis d'un même bio-stimulus intracellulaire. Les perspectives de ces travaux consisteront en l'étude *in-vivo* des différentes sondes pro-fluorescentes mises au point. De plus, compte tenu de l'effet de stabilisation observée par la structure des sondes FRET, nous envisageons d'évaluer de nouveaux groupements hydrolysables comme les dérivés oxazolidines.

IV.5. Conclusion

Pour évaluer la labilité d'une liaison chimique pH-sensible en environnements biologiques natifs, nous avons développé une méthode d'évaluation basée sur l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET et pH-sensibles.

Afin de valider la méthodologie envisagée, un composé fluorescent activable a été synthétisé à partir d'un quencheur (BHQ-2), d'un fluorophore (TAMRA) et d'un motif hydrolysable de type spiro di-orthoester. En mesurant l'activation du fluorophore, la labilité du motif pH-sensible a ainsi pu être observée dans des milieux aqueux faiblement acides (pH 5-6), dans les lysosomes de cellules vivantes et dans les organes d'excrétion d'animaux vivants. En conditions cellulaires, des suivis cinétiques par cytométrie de flux ont démontré l'influence d'une variation de pH des lysosomes sur l'hydrolyse de ce composé. Cependant, la labilité du motif pH-sensible vis-à-vis d'acidité intra-tumorale de gliomes de rat C6 n'a pas pu être démontrée. Bien qu'aucune conclusion définitive ne puisse être tirée à ce stade, ce manque de réactivité pourrait être attribué soit à un manque de labilité du groupement spiro

di-orthoester vis-à-vis des bio-stimuli intra-tumoraux, soit à un manque de sensibilité de la méthode, ou encore à un modèle tumoral non-approprié (greffe orthotopique/greffe sous-cutanée). Pour permettre une détection plus fine et une localisation de l'activation intratumorale, l'étude de coupes histologiques de tumeurs est envisagée.

Par la suite, afin de généraliser la méthode d'évaluation séquentielle développée à une gamme étendue de groupements acido-labiles, l'étude comparative de la bio-labilité de motifs pH-sensibles a été entreprise. A partir d'une étude de structure/réactivité effectuée sur des molécules-modèles, quatre groupements chimiques ont été sélectionnés pour être incorporés au cœur de sondes pro-fluorescentes de type FRET. En solution, l'étude de ces composés activables a permis d'établir une échelle de labilité vis-à-vis de conditions acides physiologiques (pH 5,5). La diversification des milieux d'études a révélé la réactivité d'un motif acylhydrazone pour des nucléophiles et l'instabilité du motif adduit thiol/maléimide en conditions oxydantes. L'étude des composés spiro di-orthoester, acylhydrazone et dialkyl acétal d'*o*-anisaldéhyde a validé l'utilisation de la méthode mise au point pour l'évaluation de l'acido-labilité en cellules vivantes.

La méthode séquentielle mise en place a confirmé sa pertinence avec la détection de labilités non-attendues en conditions cellulaires. Le composé non-hydrolysable et dont la structure est basée sur un adduit thiol/maléimide a révélé une activation intracellulaire. De nouvelles études sont envisagées pour associer cette réactivité à un type de compartiment cellulaire spécifique (lysosome ou mitochondrie). Une structure de type carbamate, non-hydrolysable en solution, a également montré une bio-labilité particulière dans les lysosomes. Pour étudier si ce phénomène est associé à des enzymes de type carboxylhydrolase, de nouvelles études sont en cours. Aux vues de ces résultats, et afin d'avoir une vision plus globale de la bio-réactivité des liaisons labiles, il serait intéressant d'étendre le profilage à d'autres stimuli associés à des conditions cellulaires pathologiques ou non (concentrations anormales en glutathion ou peroxyde d'hydrogène).

En permettant de caractériser voire de quantifier une bio-acidité, la méthodologie mise au point devrait permettre, une fois les modèles animaux validés, d'engager une optimisation structurale rationnelle de différents groupements hydrolysables utilisés dans des systèmes de libération contrôlée.

Conclusion générale et perspectives

L'interaction, la manipulation et la visualisation du vivant sont les moteurs du développement d'outils moléculaires dans le domaine de la chimie-biologie. Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur l'étude de réactions chimiques permettant la rupture de liaison dans différents environnements biologiques, allant du lysat cellulaire jusqu'à l'animal vivant. La complexité et la réactivité des milieux biologiques, ainsi que leur sensibilité vis-à-vis de certaines conditions chimiques, impliquent de nombreuses contraintes. Ces limitations constituent le canevas de toute stratégie chimique à mettre en place en milieux biologiques. Dans le cadre de ces travaux, c'est plus particulièrement la rupture de liaison qu'il a fallu adapter. Nous avons ainsi axé notre étude sur deux types réactions biocompatibles :

- celles dont le réactif de coupure est un agent chimique exogène permettant la rupture d'une liaison dans des conditions orthogonales aux systèmes biologiques.
- celles dont le réactif de coupure est un agent endogène permettant la rupture d'une liaison en réponse à la production d'un stimulus biologique comme des enzymes, des métabolites ou des biomolécules.

Ces deux grandes catégories de réactions ont été appliquées à deux domaines : la protéomique chimique et l'imagerie de fluorescence.

Dans une première étude, nous nous sommes intéressés au clivage d'un groupement azobenzène pour le développement de sondes d'enrichissement clivables en conditions non-dénaturantes dans le domaine de la protéomique chimique. Pour permettre la réduction de groupements azobenzène en conditions douces, une étude entre la structure des azobenzènes et leur réactivité au dithionite a été réalisée. Ce travail a abouti à l'identification d'une structure HAZA de type "2-(2'-alkoxy-4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid" extrêmement sensible au dithionite de sodium.⁶ Ce groupement clivable a ensuite été incorporé au cœur d'une sonde d'enrichissement et a été fonctionnalisé par la novobiocine, utilisée comme un ligand de gyrase B. A partir d'un lysat cellulaire, cette sonde a permis d'enrichir un complexe A2B2 de gyrase endogène. Un test d'activité enzymatique de relaxation de l'ADN, effectué sur le complexe A2B2 de gyrase purifié, a démontré le caractère non-dénaturant du clivage du groupement HAZA par le dithionite.⁷ Une étude de protéomique chimique effectuée par le Dr. V. Lamour (département de biologie structurale et génomique - IGBMC - Illkirch) est

actuellement en cours afin d'identifier les protéines partenaires des complexes de gyrase ainsi que les cibles secondaires de la novobiocine.

Pour généraliser l'utilisation du motif HAZA dans le domaine de la protéomique chimique, une seconde étude est en cours pour enrichir, en conditions natives, des néo-glycoprotéines métaboliquement modifiées par des azotures. Une nouvelle sonde d'enrichissement HAZA a été développée pour incorporer dans sa structure une phosphine réagissant avec des azotures par réaction de Staudinger. La fonctionnalisation chimique des protéines par la sonde HAZA *via* une réaction de Staudinger a été validée. Des premiers essais d'enrichissement n'ont pas abouti à l'élution des protéines immobilisées sur un support d'affinité, faute de clivage du groupement HAZA par le dithionite. Des études complémentaires sont actuellement en cours pour comprendre ce phénomène. Il est également envisagé d'étendre la technique de fonctionnalisation par réaction de Staudinger à des néo-protéines intracellulaires modifiées métaboliquement par des groupements azotures.

En ayant mis au point des conditions de clivage douces vis-à-vis des protéines, les outils développés dans ce chapitre ouvrent d'intéressantes perspectives notamment pour l'étude des interactions multi-protéiques associées à des contextes physiopathologiques. L'enrichissement en conditions dénaturantes pourrait également permettre l'identification de cibles secondaires dans le domaine biomédical. Au delà du lien clivable HAZA, ces études ont également démontré la possibilité d'atteindre des niveaux de compatibilité biologique et de réactivité importants, par optimisation structurale de motifs clivables. Il semble intéressant à présent de développer d'autres familles de liens pouvant être rompus de façon orthogonale au lien HAZA à l'aide de réactifs chimiques différents.

Une seconde étude a consisté au clivage, en cellules vivantes, de groupements chimiques en présence de deux types de stimuli, biologique (bio-stimulus) et chimique. Dans le domaine de l'imagerie de fluorescence, ces travaux ont principalement consisté au développement du concept de quencheur chimiquement désactivable. Dans un premier temps, des structures Azo utilisées comme accepteur de fluorescence ont montré, en solution, la possibilité de réactiver la fluorescence d'une sonde FRET par un traitement chimique au dithionite. Puis, un quencheur chimiquement désactivable a été incorporé dans une sonde pro-fluorescente de type FRET et sensible à la Caspase-3. En solution, l'activation de la fluorescence de ce

composé a été réalisée par de la Caspase-3 humaine recombinante, puis, par un traitement au dithionite. *In-vitro*, l'enzyme a permis l'activation de la fluorescence par le clivage d'une séquence d'acides aminés spécifique de type DEVD, tandis que la réduction du quencheur par le dithionite a permis de confirmer la présence de sonde FRET non-activée par l'enzyme. La désactivation chimique du quencheur a ensuite été réalisée sur cellules vivantes afin de confirmer la présence intracellulaire de sonde pro-fluorescente FRET non-activée.⁷³

Bien que très efficace, le système Quencheur/dithionite développé a révélé deux limitations majeures concernant la gamme spectrale d'absorption du quencheur et l'utilisation du dithionite. Des travaux préliminaires ont été conduits pour dépasser ces limitations.

La désactivation par le dithionite des quencheur commerciaux BHQ-1, -2 et -3 a été étudiée. Le quencheur BHQ-3 s'est révélé suffisamment réactif vis-à-vis du dithionite pour envisager sa désactivation *in-cellulo*. Pour les composés BHQ-1 et -2, moins sensibles au dithionite, l'optimisation de leurs structures est envisagée afin d'augmenter leurs réactivités vis-à-vis du réducteur. Cette étude devrait être conduite à partir des résultats obtenus lors de la mise au point de la structure HAZA.⁶

Pour rechercher de nouveaux réactifs capables de désactiver des quencheurs Azo en conditions biocompatibles, une méthode de criblage de réactifs a été développée. Cette stratégie a permis l'identification de cinq réducteurs capables de désactiver un quencheur Azo. Comparés au dithionite de sodium, les différents réactifs identifiés ont présenté de meilleures stabilités et des toxicités moins importantes. Cependant leurs réactivités ont été jugées trop faibles pour les utiliser en conditions cellulaires.

Les perspectives de ce travail consistent principalement à étendre le concept de quencheur désactivable à l'ensemble de la gamme des fluorophores. Couplée à la cytométrie de flux, la méthode développée devrait par exemple permettre la quantification intracellulaire de sonde pro-fluorescente de type FRET. Pour s'affranchir de l'utilisation de réactifs chimiques, une nouvelle stratégie de désactivation consisterait en l'utilisation de réactions bioorthogonales entre deux molécules organiques.

Dans une troisième étude, une méthodologie a été mise au point pour permettre d'évaluer simplement la labilité d'une liaison chimique en organismes vivants (cellulaire ou animal).

Cette méthode d'évaluation est basée sur l'utilisation de sondes pro-fluorescentes de type FRET pour suivre l'hydrolyse d'un groupement bio-labile. Dans le but de mettre au point et valider la méthodologie d'évaluation, nous avons choisi d'étudier l'hydrolyse de groupements pH-sensibles en solution vis-à-vis d'acidités lysosomale et tumorale.

Un composé fluorescent activable a été synthétisé à partir d'un quencheur (BHQ-2), un fluorophore (TAMRA) et un motif hydrolysable de type spiro di-orthoester. En mesurant l'activation du fluorophore, la labilité du motif pH-sensible a ainsi pu être observée dans des milieux aqueux faiblement acides (pH 5-6), dans les lysosomes de cellules vivantes et dans les organes d'excrétion d'animaux vivants. En conditions cellulaires, des suivis cinétiques par cytométrie de flux ont également démontré l'influence du pH sur l'hydrolyse de ce composé. Cependant, dans le milieu tumoral, la labilité du groupement spiro di-orthoester n'a pas pu être clairement démontrée. Des études sont en cours pour déterminer si l'absence de signal est due soit à une labilité trop faible du groupement spiro di-orthoester, soit à un problème de sensibilité de la méthode, ou encore à un modèle tumoral non-approprié.

Afin de généraliser la méthode d'évaluation séquentielle développée à une gamme étendue de fonction chimique acido-labiles, cette étude s'est poursuivie avec l'évaluation comparative de la bio-labilité de quatre structures pH-sensibles, sélectionnées à partir d'une étude de structure/réactivité. Ces composés ont été incorporés dans des sondes pro-fluorescentes de type FRET. En solution, l'étude de ces composés activables a permis d'établir une échelle de labilité vis-à-vis de conditions acides physiologiques (pH 5,5). En cellules vivantes, cette même échelle de labilité a été retrouvée. Il a donc été montré que le système développé permet de mesurer différents niveaux de bio-labilité en milieu cellulaire. Une quantification par cytométrie de flux devra être réalisée.

Cependant, dans les conditions cellulaires nous avons pu observer qu'un adduit thiol/maléimide et un groupement carbamate ont tous deux révélés une bio-labilité non-associée à une bio-acidité. De nouvelles expériences sont envisagées afin d'identifier les bio-stimuli responsables des clivages observés. Ces résultats plaident en faveur d'une extension de la gamme de bio-stimuli testés en solution à d'autres modèles représentatifs de réactivités biologiques (glutathion, ROS, NO).

En permettant de caractériser, voire de quantifier une bio-acidité, la méthodologie d'évaluation mise au point devrait permettre l'optimisation structurale rationnelle de

différents groupements hydrolysables utilisés dans des systèmes de libération contrôlée. De plus, cette approche d'évaluation globale pourrait être également étendue vers d'autres motifs chimiques dont la bio-labilité serait associée à des conditions cellulaires pathologiques (concentrations anormales en glutathion ou peroxyde d'hydrogène).

Partie expérimentale

General Methods

General experimental procedures: Unless otherwise indicated, reactions were carried out under argon atmosphere in flame-dried glassware equipped with magnetic stirring. Air or moisture-sensitive liquids were transferred *via* syringe. If required, solutions were degassed by passing a stream of argon through the solutions. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 15-30 torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization was achieved by 254 or 365 nm UV light and by immersion in an ethanolic solution of cerium sulfate, and subsequent treatment with a heat gun. Column chromatography was carried out as “Flash Chromatography” using silica gel G-25 (40-63 μ M) from Macherey-Nagel.

Materials: All reagents were obtained from commercial sources and used without further purifications. All dry solvents were obtained from Aldrich or Alfa Aesar.

Instrumentation: UV-Vis spectra and kinetics were recorded on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. Fluorescence kinetics were recorded on a multilabel plate reader (Victor X2, PerkinElmer) or on a Fluorolog (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Microwave-assisted experiments were carried out in sealed reaction vessels in a Biotage Initiator (Biotage, Sweden). Reaction times listed refer to ‘hold time’ at the specified temperature. Melting points were taken on a Stuart Scientific SMP3 apparatus from Bibby and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Nicolet 380 FT-IR spectrometer from Thermo Electron Corporation as a CH₂Cl₂ solution or solid on a diamond plate. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 23°C on a Bruker 400 or 500 spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent signals. Data are represented as follows: Chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (*J*, Hz) and integration. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and low resolution mass spectra using a Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL. GC-MS analyses were performed by means of Agilent 7890A Gas Chromatograph equipped with DB-5MS 30 m x 0.25 mm column and JEOL AccuTOF-GCv.

Analytical HPLC method

HPLC experiments were performed on a Shimadzu system (Pump: model LC 20-AD, UV-detector: SPD 20-A, Autosampler: SIL 20-A).

Method in acidic conditions: Column: Sunfire C18 (150 mm \times 4.5 mm i.d., 5 μ m, Waters). Flow: 1 mL/min. Injection volume = 10 μ L. Eluant A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 20 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Method in basic conditions: Column: XBridge C18 (150 mm \times 4.5 mm i.d., 5 μ m, Waters). Flow: 1 mL/min. Injection volume = 10 μ L. Eluant A/B NH₃HCOOH solution (10 mM, pH

8.5)/ACN. Gradient: 5% B to 95% B in 20 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Preparative HPLC method

The semi-preparative HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a 2487 detector (Waters) and a 5 ml sample loop.

Method 1 in acidic conditions: Column: Sunfire C18 (150 mm × 19 mm i.d., 5 μm, Waters). Flow: 17 mL/min. Injection volume = 1 mL. Eluant A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 40 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Method 2 in basic conditions: Column: XBridge C18 (150 mm × 19 mm i.d., 5 μm, Waters). Flow: 17 mL/min. Injection volume = 1 mL. Eluant A/B NH₃HCOOH solution (10 mM, pH 8.5)/ACN. Gradient: 5% B to 95% B in 40 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Dithionite cleavage procedure

Followed by UV: See supporting information of *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 4360-4364.

Followed by fluorescence: See supporting information of *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3224-3226.

Screening of chemical reagents for quencher deactivation

A 1 mM solution of **19** or **23** was prepared in DMSO and diluted in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) to obtain 5.5 μM of dye solution. These solutions were distributed into a 96-well Plate (275 μL/well). 120 mM solutions of each chemical reagent were prepared in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) and were added without delay into the corresponding wells (25 μL). For control experiments, phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) was added instead of chemical reagent solutions. Thus we received 300 μL of solution at 5 μM dye concentration in each well. The plate was shook at 25°C for 1 hour and fluorescence recorded using a multilabel plate reader (Victor X2, PerkinElmer - Excitation and emission used filters were 430/8 nm and 486/10 nm).

Kinetic fluorescence measurements of TAMRA/BHQ-2 compounds in solution

A 5.0 μM solution of **TAMRA/BHQ-2 compound** was prepared in DMSO and diluted in corresponding buffer to obtain a 0.5 μM dye solution (1 mL). For pH 7.4 and 5.5, phosphate buffers were used (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.4 or KH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 5.5, 100 mM). For pH<1, a diluted hydrochloric acid solution (1M) was used. Each solution was immediately

distributed into a 96-well Plate (3*300 μ L/well) and fluorescence was recorded using a multilabel plate reader (Victor X2, PerkinElmer - Excitation and emission used filters were 550/8 nm and 580/10 nm). Fluorescence was measured every 3 minutes for up to 15 hours and the plate was shook 10 seconds before each measurement.

Kinetic HPLC measurements of acid sensitive compounds in solution

A 10 mM solution of the **compound** was prepared in DMSO and diluted in corresponding buffer to obtain a 1 mM solution (1 mL). For pH 7.4 and 5.5, phosphate buffers were used ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.4 or $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 5.5, 100 mM). Each solution was immediately analyzed by analytical HPLC (basic conditions as mention above). Reaction was performed at 25°C and crude was injected every 30 minutes for up to 15 hours.

Synthesis

General procedure A: aldehyde modifications under microwave irradiation.¹⁸⁹

The aldehyde (0.42 mmol), the β -aminoalcohol or amine compound (0.42 mmol) and molecular sieve 4A (0.4 g) were added to CHCl_3 (5.0 mL) and sealed in a microwave tube. Heated to 120°C under microwave irradiation for 10 minutes. After cooling, the mixture was filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Purification was done by distillation or preparative HPLC (method 2).

General procedure B: aldehyde modifications under classical conditions.²¹⁴

A solution of aldehyde (12 mmol), β -aminoalcohol or amine compound (36 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (0.09 mmol) in toluene (27 mL) was refluxed using Dean-Stark apparatus. The solution was cooled to room temperature, quenched with a saturated solution NaHCO_3 (10 mL), and extracted with Et_2O (3*20 mL). The organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL), dried over Na_2SO_4 and evaporated. Purification was done by distillation or silica gel chromatography.

General procedure C: modification of 5-TAMRA by peptide coupling

5-TAMRA (0.167 mmol) was dissolved in DMF (1.20 mL) and TEA (0.334 mmol) was added. The mixture was cooled to 0°C and PyBOP (0.167 mmol) was added. After 10 minutes, the amine (0.200 mmol) was added to the mixture and stirred for additional 16 hours at room temperature. The crude mixture was purified directly by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford the modified TAMRA.

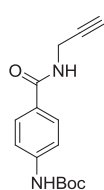
General procedure D: modification of BHQ-2 by peptide coupling

BHQ-2 (0.272 mmol) was dissolved in a mixture of DMF/DCM (1:2) (9.0 mL) and TEA (0.816 mmol) and the amine (0.408 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and PyBOP (0.408 mmol) was added. The solution was allowed to reach room temperature and stirred for 16 hours. The reaction mixture was diluted with saturated NaHCO_3 solution (50

mL) and extracted with EtOAc (3*50 mL). The organic layers were combined, washed successively with saturated NaHCO₃ solution (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL) and dried over Na₂SO₄. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 95:5) to yield the desired product.

Synthesis

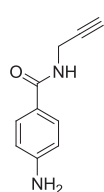
tert-butyl 4-(prop-2-ynylcarbamoyl)phenylcarbamate **5**



To a stirred solution of 4-(*boc*-amino)benzoic acid (0.55 g, 2.33 mmol) in THF (10.0 mL), was added under argon atmosphere, DIEA (0.81 ml, 4.66 mmol) and propargylamine (0.18 ml, 2.80 mmol). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath and then, HBTU (0.97 g, 2.56 mmol) was added. Stirring was continued for 3 hours while the mixture temperature was allowed to rise to room temperature. THF was evaporated and the residue was redissolved in dichloromethane (50 mL). The organic layer was washed with 1M HCl solution, a saturated solution of NaHCO₃, brine and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc (5:5)) to give **5** (0.55 g, 86%) as a white powder.

Rf: 0.45 (Cyclohexane/EtOAc 5:5); ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄ and CDCl₃-*d*₁) δ 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.08 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 2.39 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄ and CDCl₃-*d*₁) δ 169.1, 154.6, 143.8, 129.1, 128.3, 118.7, 81.2, 50.6, 71.7, 29.9, 28.8; IR: 3295, 1698, 1632, 1608, 1433, 1383 cm⁻¹.

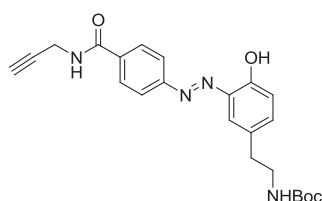
4-amino-*N*-(prop-2-ynyl)benzamide **6**



5 (0.52 g, 1.90 mmol) was suspended in DCM (20 ml) and stirred at 0°C using an ice bath. Then, TFA (1.41 ml, 19.00 mmol) was added to the reaction mixture dropwise. Upon solid dissolution stirring was continued for 16 h while the mixture was warmed up to room temperature. A saturated solution of NaHCO₃ was added to the reaction mixture until basic pH was reached. Then the aqueous solution was extracted with DCM (3*100 mL). The combined organic layers were washed with brine, and dried over Na₂SO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc (3:7)) to give **6** (0.28 g, 84%) as a yellow powder.

Rf: 0.50 (Cyclohexane/EtOAc 2:8); ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄ and CDCl₃-*d*₁) δ 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 2.55 (t, *J* = 2.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD and CDCl₃) δ 170.0, 153.4, 130.1, 122.7, 114.7, 81.3, 71.7, 29.8; IR: 3339, 3288, 1620, 1602, 1567, 1501, 1289, 1185 cm⁻¹; ESI-MS: 175 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-hydroxy-3-((4-(prop-2-ynylcarbamoyl)phenyl)diazenyl)phenethyl carbamate **7**

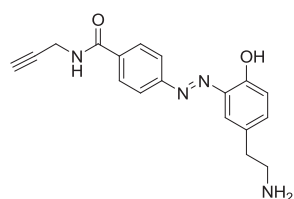


6 (70 mg, 0.401 mmol) was suspended in a mixture of acetone/water (1:1) (0.85 mL). The reaction mixture was cooled to 0°C and concentrated HCl solution (0.16 mL) was added dropwise slowly. After a few minutes, a solution of sodium nitrite (30 mg,

0.417 mmol) in water (0.47 mL) was added and the mixture was stirred for 1 hour at 0°C. In parallel N-Boc-tyramine (105 mg, 0.441 mmol), Na₂CO₃ (68 mg, 0.640 mmol) and NaOH (26 mg, 0.640 mmol) are dissolved in a mix of acetone/water (1:1) (0.85 mL). The first solution was added dropwise to the second at 0°C. After the addition was completed, the mixture was allowed to reach room temperature and was stirred for additional 4 hours. Acetone was evaporated and a mixture of water (10 mL) and DCM (30 mL) was added to the residue. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2*30 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL) and dried over MgSO₄. The crude was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc (5:5)) to give **7** (105 mg, 62%) as an orange powder.

Rf: 0.43 (Cyclohexane/EtOAc 5:5); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.84 (s, 1H), 9.10 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.05 (s, 4H), 7.57 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 2.4, 5.6 Hz, 2H), 3.18-3.11 (m, 3H), 2.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.34 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO- *d*₆) δ 165.2, 155.5, 153.6, 153.2, 138.3, 135.5, 134.8, 130.9, 128.5, 122.4, 121.7, 118.2, 81.2, 77.5, 73.0, 41.4, 34.4, 28.6, 28.2; IR: 3325, 2977, 1686, 1640, 1524, 1495, 1275, 1250, 1171 cm⁻¹; ESI-MS: 421 [M-H]⁻.

4-((5-(2-aminoethyl)-2-hydroxyphenyl)diazenyl)-N-(prop-2-ynyl)benzamide **8**

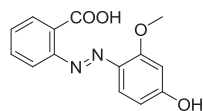


7 (64 mg, 0.15 mmol) was suspended in MeOH (3.0 mL). The reaction mixture was cooled to 0°C and a 4N HCl solution in dioxane (7.6 mL) was added dropwise. After the addition was completed, the mixture was allowed to reach room temperature and was stirred for additional 5 hours. Solvents were evaporated to give **8** (48 mg,

Quant.) as an orange solid.

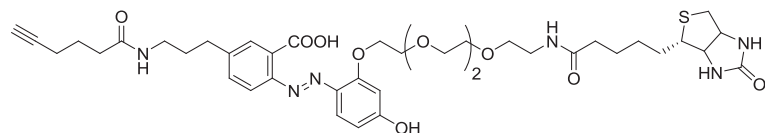
Rf: 0.25 (DCM/MeOH 9:1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.92 (brs, 1H), 9.16 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.06 (s, 4H), 7.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 2.2, 8.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 2.4, 5.6 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO- *d*₆) δ 165.2, 154.1, 153.2, 138.5, 135.5, 134.6, 128.8, 128.7, 128.6, 122.5, 121.4, 118.6, 81.2, 72.9, 31.9, 28.6; IR: 3325, 1680, 1605, 1250, 1120 cm⁻¹; ESI-MS: 323 [M+H]⁺.

2-((4-hydroxy-2-methoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid **10**

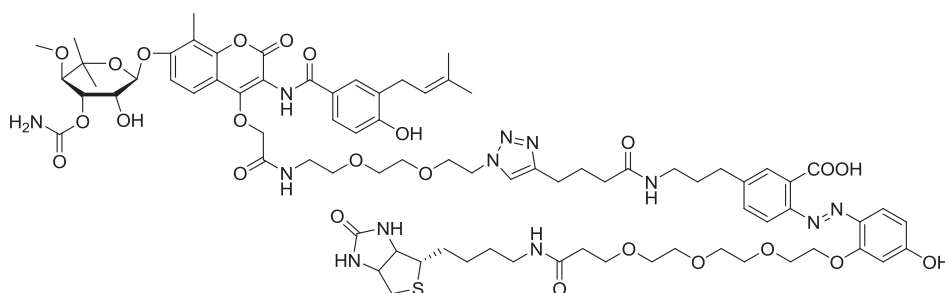


See supporting information of *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 4360-4364.

Alcyne-HAZA-Biotine

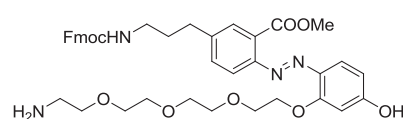


See supporting information of *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 4360-4364.

Novo-N₃

See supporting information of *ChemBiochem.* **2010**, *11*, 2359-2361.

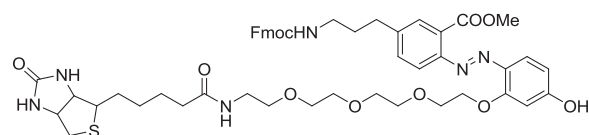
Methyl 5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propyl)-2-((2-(2-(2-(2-(2-amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-4-hydroxyphenyl)diazanyl)benzoate **11**



To a solution of **Fmoc-HAZA-Boc** (70 mg, 0.085 mmol) in DCM (1.6 mL) TFA (150 μ L) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. Solvents were removed in-vacuo and the residue was purified by preparative HPLC (injected as solution in 1 mL of DMSO) (method 1) and lyophilized to afford **11** (57 mg, 93%) as an orange solid.

ESI-MS: 727 [M+H]⁺.

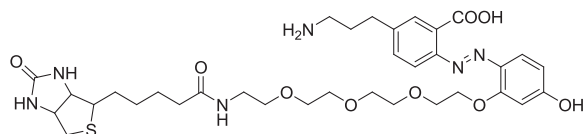
Methyl 5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propyl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazanyl)benzoate **12**



To a stirred solution of **11** (33 mg, 0.045 mmol) in anhydrous DMF (1.0 mL), biotin (11 mg, 0.045 mmol), DIEA (6 μ L, 0.045 mmol) and HBTU (17 mg, 0.045 mmol) were added successively. The reaction mixture was stirred for 19 hours at room temperature. The crude mixture was purified by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford **12** (24 mg, 56%) as an orange solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.57-7.55 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 3H), 7.30-7.23 (m, 3H), 6.67 (brs, 1H), 6.55 (brs, 1H), 6.43 (*J* = 2.0, 9.5 Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.50-4.47 (m, 1H), 4.40-4.38 (m, 4H), 4.32-4.28 (m, 1H), 4.19 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.68-3.46 (m, 11H), 3.38-3.35 (m, 2H), 3.25-3.20 (m, 2H), 3.13-3.06 (m, 1H), 2.86 (dd, *J* = 4.6, 12.8 Hz, 1H), 2.72-2.61 (m, 3H), 2.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.71-1.55 (m, 4H), 1.43-1.35 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 173.5, 164.3, 157.2, 156.5, 143.9, 143.0, 141.9, 141.4, 134.9, 130.4, 127.7, 127.1, 125.0, 120.0, 116.1, 105.5, 102.6, 70.8, 70.5, 70.1, 69.7, 69.0, 68.5, 66.6, 62.0, 60.5, 55.3, 52.4, 47.3, 40.6, 40.4, 39.2, 35.6, 31.5, 27.9, 25.4; IR: 3305, 2929, 1698, 1499, 1243 cm⁻¹; ESI-MS: 953 [M+H]⁺.

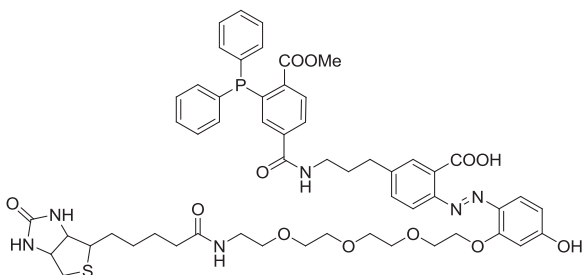
5-(3-aminopropyl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid **13**



To a solution of **12** (20 mg, 0.021 mmol) in MeOH/water (8:2) (3.8 mL) was added LiOH (15 mg, 0.630 mmol) in one portion. The reaction mixture was stirred at 40°C for 8 hours. Methanol was evaporated, and the residue was washed with EtOAc (1 mL). The aqueous layer was then diluted with DMSO (1 mL) and directly purified by preparative HPLC (acidic method) and lyophilized to afford **13** (15 mg, 97%) as an orange solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.70-7.65 (m, 5H), 7.55-7.46 (m, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.50 (dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 4.30 (ddd, *J* = 0.8, 5.7, 7.5 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 4.3, 5.7 Hz, 2H), 4.12 (dd, *J* = 4.8, 7.5 Hz, 1H), 3.84 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.65-3.63 (m, 2H), 3.54-3.45 (m, 5H), 3.10-3.07 (m, 1H), 2.86-2.80 (m, 3H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.58 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.93-1.87 (m, 2H), 1.64-1.58 (m, 1H), 1.52-1.42 (m, 3H), 1.34-1.25 (m, 3H); ESI-MS: 717 [M+H]⁺. HRMS calcd 716.3204 for C₃₄H₄₈N₆O₉S, found 716.3187.

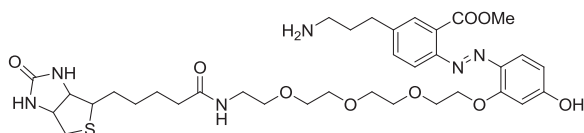
5-(3-(3-(diphenylphosphino)-4-(methoxycarbonyl)benzamido)propyl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid **Phosphine-HAZA-Biotine**



Phosphine-HAZA-Biotine (7.5 mg, 70%) as an orange solid.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ -5.19; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.57 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 3.5, 8.1 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 3.5, 8.1 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.49 (t, *J* = 10.2 Hz, 2H), 7.42-7.37 (m, 6H), 7.24-7.20 (m, 4H), 6.52-6.44 (m, 2H), 6.36 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H), 4.30-4.24 (m, 3H), 4.11-4.09 (m, 1H), 3.85 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.65-3.63 (m, 4H), 3.53-3.42 (m, 7H), 3.23-3.04 (m, 6H), 2.80 (dd, *J* = 12.5, 5.1 Hz, 2H), 2.67-2.61 (m, 4H), 2.33-2.32 (m, 1H), 2.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.83-1.75 (m, 2H), 1.62-1.41 (m, 4H), 1.31-1.24 (m, 2H); HRMS calcd 1062.3967 for C₅₅H₆₃N₆O₁₂PS, found 1062.3962.

Methyl 5-(3-aminopropyl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoate **14**

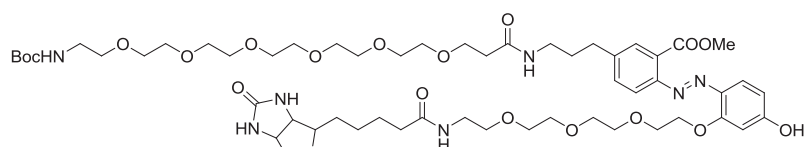


To a solution of **12** (51 mg, 0.053 mmol) in DCM (1.0 mL) piperidine (0.1 mL, 0.535 mmol) was added at 0°C and the resulting mixture was stirred at room temperature for 4

hours. The crude mixture was purified directly by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford **14** (34 mg, 87%) as an orange solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.45 (brs, 1H), 7.82 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.71 (brs, 2H), 7.56-7.49 (m, 4H), 6.61 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.48 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 8.41-8.36 (m, 2H), 4.29 (dd, $J = 5.0, 7.5$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 4.11 (dd, $J = 4.5, 8.2$ Hz, 1H), 3.84-3.79 (m, 5H), 3.65 (dd, $J = 3.9, 6.0$ Hz, 2H), 3.54-3.44 (m, 6H), 3.36 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.15 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.10-3.05 (m, 1H), 2.842.73 (m, 5H), 2.58-2.55 (m, 1H), 2.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.92-1.84 (m, 2H), 1.64-1.42 (m, 4H), 1.32-1.25 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2, 167.8, 163.1, 162.7, 158.7, 149.7, 142.3, 135.2, 131.6, 128.7, 119.7, 117.9, 108.6, 101.2, 70.1, 69.8, 69.7, 69.5, 69.1, 68.8, 68.7, 61.0, 59.2, 55.4, 52.2, 38.4, 38.3, 35.1, 31.2, 28.5, 28.2, 28.0, 25.2; ESI-MS: 731 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 730.3360 for $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$, found 730.3370.

Methyl 5-(2,2-dimethyl-4,26-dioxo-3,8,11,14,17,20,23-heptaoxa-5,27-diazatriacontan-30-yl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoate **15**

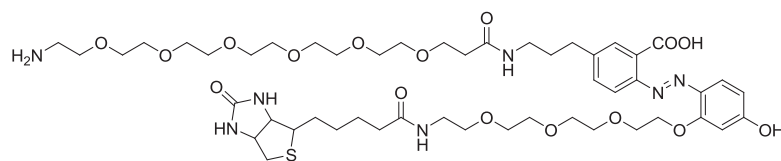


To a stirred solution of **14** (22 mg, 0.030 mmol) in anhydrous DMF (1.0 mL) BocNH-Peg₆-COOH (16 mg,

0.036 mmol), TEA (13 μL , 0.090 mmol) and PyBOP (17 mg, 0.032 mmol) were added successively. The reaction mixture was stirred for 19 hours at room temperature. The crude mixture was purified directly by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford **15** (23 mg, 66%) as an orange solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 2.1, 8.8$ Hz, 1H), 7.3 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.75 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.48 (dd, $J = 1.9, 9.6$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 5.05 (brs, 1H), 4.51 (dd, $J = 4.7, 7.5$ Hz, 1H), 4.44 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 4.32 (dd, $J = 4.7, 7.5$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.72-3.45 (m, 33H), 3.51-3.45 (m, 6H), 3.36 (q, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.28-3.23 (m, 4H), 3.15-3.10 (m, 1H), 2.87 (dd, $J = 4.9, 13.0$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 2.64 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.86-1.78 (m, 2H), 1.71-1.56 (m, 4H), 1.42-1.37 (m, 11H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 173.9, 172.6, 167.7, 164.7, 160.8, 160.4, 160.3, 156.3, 142.7, 138.4, 135.2, 130.7, 130.4, 123.5, 116.4, 105.2, 70.9, 70.7, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 69.8, 69.5, 68.6, 67.4, 62.4, 60.9, 55.5, 52.7, 40.5, 39.5, 39.2, 36.9, 35.7, 32.6, 31.2, 28.6, 28.1, 28.0, 25.6; IR: 3307, 2870, 1698, 1500 cm^{-1} ; ESI-MS: 1188 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd 1165.5828 for $\text{C}_{55}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{S}$, found 1165.5798.

*5-(1-amino-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid **16***

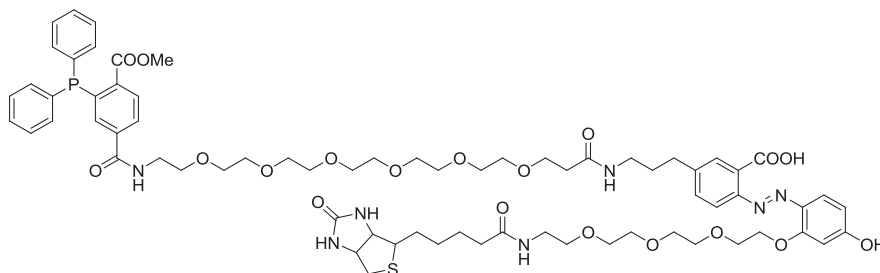


To a solution of **15** (22 mg, 0.019 mmol) in DCM (0.9 mL) TFA (0.1 mL) was added at 0°C and the reaction

mixture was stirred at room temperature for 3 hours. When the starting material had been consumed according to TLC, the mixture was evaporated to dryness in vacuo. The residue was dissolved in a mixture of MeOH/water (3:1) and LiOH (14 mg, 0.570 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 19 hours at 40°C, then purified by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford **16** (18 mg, 88%) as an orange solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.8 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, 1H), 6.41 (dd, *J* = 2.2, 9.2 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.37 (ddd, *J* = 0.8, 5.0, 7.9 Hz, 1H), 4.30 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.17 (dd, *J* = 4.5, 7.9 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 3.9, 6.1 Hz, 2H), 3.66-3.61 (m, 6H), 3.60-3.50 (m, 22H), 3.47-3.45 (m, 2H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.34 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.20-3.14 (m, 4H), 3.08-3.01 (m, 3H), 2.80 (dd, *J* = 5.0, 12.7 Hz, 1H), 2.65 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.59 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.39 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.63-1.41 (m, 4H), 1.33-1.25 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 176.2, 174.1, 170.1, 166.2, 159.7, 147.8, 143.5, 135.5, 135.1, 134.0, 132.4, 123.0, 117.4, 116.7, 104.0, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5 (two peaks), 71.4 (three peaks), 71.3, 71.2, 71.1, 70.9, 70.7, 70.6, 70.0, 68.5, 68.1, 63.5, 61.8, 57.1, 41.2, 40.8, 40.5, 40.1, 37.6, 36.9, 33.8, 32.1, 29.9, 29.6, 27.0; IR (neat): 3293, 1689, 1440, 1197, 1111 cm⁻¹; ESI-MS: 1052 [M+H]⁺. HRMS calcd 1051.5147 for C₄₉H₇₇N₇O₁₆S, found 1051.5139.

*5-(1-(3-(diphenylphosphino)-4-(methoxycarbonyl)phenyl)-1,23-dioxo-5,8,11,14,17,20-hexaoxa-2,24-diazaheptacosan-27-yl)-2-((4-hydroxy-2-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyloxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine***



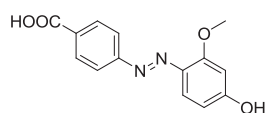
16 (17.4 mg, 0.017 mmol) and NHS-Phosphine (8.4 mg, 0.018 mmol) were dissolved in DMF (1 mL). TEA (3 μL, 0.018 mmol) was

added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours. The crude mixture was directly purified by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to afford **Phosphine-Peg₆-HAZA-Biotine** (14.3 mg, 62%) as an orange solid.

³¹P NMR (162 MHz, MeOD-*d*₄) δ -3.94; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.47 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 3.6, 8.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.82-7.79 (m, 2H), 7.45-7.41 (m, 2H), 7.37-7.33 (m, 7H), 7.28-7.24 (m, 3H), 6.36 (dd, *J* = 2.2, 9.5 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.46-4.40 (m, 3H), 4.25 (dd, *J* = 4.4, 7.9 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 2.8, 5.0 Hz, 2H), 3.73-3.70

(m, 4H), 3.67 (s, 3H), 3.60-3.50 (m, 23H), 3.46-3.41 (m, 6H), 3.28 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.16-3.12 (m, 1H), 2.88 (dd, $J = 5.0, 12.7$ Hz, 1H), 2.70-2.66 (m, 3H), 2.44 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.16 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H), 1.72-1.51 (m, 4H), 1.41-1.36 (m, 2H); 176.2, 174.1, 169.5, 166.2, 161.6, 143.2, 142.5, 139.1, 138.8, 138.7, 138.5, 138.3, 137.4, 135.3, 135.1, 134.6, 133.1, 132.3, 131.8, 131.7, 130.3, 129.9, 129.8, 128.0, 116.5, 105.1, 71.8, 71.6, 71.5, 71.4, 71.3, 70.7, 70.5, 70.4, 70.0, 68.5, 63.5, 61.7, 57.1, 52.8, 41.2, 41.1, 40.5, 40.2, 37.9, 36.9, 33.8, 32.2, 29.9, 29.6, 27.0.

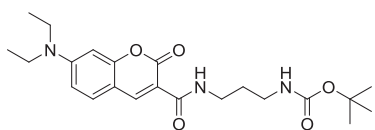
4-(4-hydroxy-2-phenylazo)benzoic acid **17**



4-aminobenzoic acid (203 mg, 1.48 mmol) was suspended in a mixture of acetone/water (1:1) (3.60 mL) and cooled to 0°C using an ice bath. Then, concentrated HCl (0.64 mL) was added dropwise. After 5 minutes of stirring, a solution of NaNO₂ (119 mg, 1.73 mmol) in water (1.70 mL) was added dropwise. This mixture was stirred for 1 hour at 0°C and then added into a mixture of water/acetone (1:1) (3.6 mL), 3-methoxyphenol (153 mg, 1.23 mmol), Na₂CO₃ (261 mg, 2.46 mmol) and NaOH (197 mg, 4.92 mmol) at 0°C. Stirring was continued for 3 additional hours while the mixture was allowed to rise to room temperature. The acetone was evaporated and the reaction crude was diluted with 1M HCl. Formed precipitate was filtered off, washed with water, dichloromethane, ether and dried by lyophilization to give **17** (313 mg, 90%) as a red solid.

Rf : 0.21 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 230°C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 2.4, J = 8.9$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 163.8, 159.7, 155.1, 135.0, 131.3, 130.5, 122.0, 117.6, 108.4, 99.9, 55.8; IR (neat) : 2988, 1693, 1601, 1494, 1361 cm⁻¹; ESI-MS 273 [M+H]⁺. HRMS calcd 272.0797 for C₁₄H₁₂N₂O₄ found 272.0800.

tert-butyl 3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propylcarbamate **18**

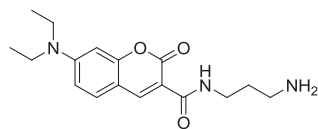


To a stirred solution of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (100 mg, 0.38 mmol) in DMF (3.8 mL), were added successively, DIEA (200 μL, 1.15 mmol) and *tert*-butyl 3-aminopropylcarbamate (73 mg, 0.42 mmol). The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath, then HBTU (160 mg, 0.42 mmol) was added. Stirring was continued for 16 hours while the mixture was allowed to rise to room temperature. The reaction mixture was poured into a solution of 1M HCl solution and extracted twice with EtOAc. The unified organic layers were washed twice with water and once with brine, then were dried over Na₂SO₄ and were concentrated under reduce pressure. Silica gel chromatography (DCM/MeOH 100% to 95/5) gave the compound **18** (159 mg, quant.) as a yellow powder.

Rf : 0.87 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 118°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 8.82 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 2.4, 9.0$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.30 (m, 1H), 3.48-3.44 (m, 2H), 3.43-3.36 (m, 4H), 3.12 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 163.7, 162.7, 157.6,

156.1, 152.6, 148.1, 131.1, 110.0, 108.3, 96.5, 78.8, 45.1, 37.4, 36.5, 30.2, 28.4, 12.4; IR (neat) : 3334, 1694, 1615, 1507, 1229, 1132 cm^{-1} ; ESI-MS: 418 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 440 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS calcd 417.2263 for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$, found 417.2268.

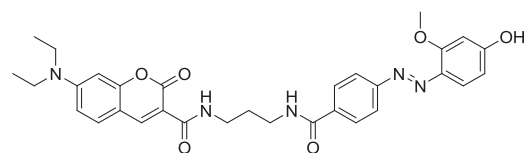
N-(3-aminopropyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide **19**



Compound **18** (125 mg, 0.30 mmol) was dissolved in DCM (3.6 ml) and TFA (1.2 mL) was added at 0°C. The solution was stirred at room temperature for 5 hours then concentrated *in vacuo*. The residue was redissolved with saturated NaHCO_3 (3 mL) and extracted three times with EtOAc (6 mL). The unified organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduce pressure to yield the product **19** (131 mg, quant.) as a yellow powder.

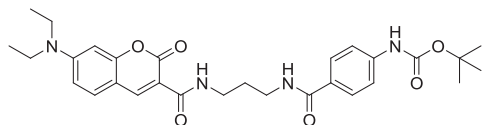
Rf : 0.21 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 170-173°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.61 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 2.5, 9.1$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.55-3.50 (m, 6H), 3.00 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 166.4, 164.0, 159.3, 154.8, 149.5, 132.7, 111.7, 109.7, 10.9.5, 97.3, 46.0, 38.3, 37.1, 29.0, 12.7; IR (neat) : 3081, 1677, 1616, 1537, 1508, 1351, 1132 cm^{-1} ; ESI-MS 318 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 317.1739 for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$, found 317.1745.

7-(diethylamino)coumarin-*N*-(3-(4-(4-hydroxy-2-methoxyphenylazo)benzamido)propyl)amide **20**



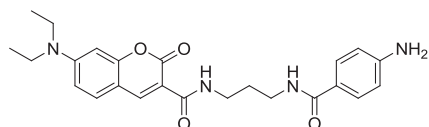
To a stirred solution of **17** (16 mg, 0.059 mmol) in anhydrous DMF (0.3 mL) under argon atmosphere, **19** (30 mg, 0.071 mmol) and DIEA (21 μL , 0.118 mmol) were added. The reaction mixture was stirred and cooled to 0°C using an ice bath, before HBTU (27 mg, 0.071 mmol) was added. Stirring was continued for additional 16 hours while the mixture was allowed to rise to room temperature. The solvent was evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5) to yield **20** (10 mg, 30%) as an orange solid.

Rf : 0.63 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 187°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.46 (s, 1H); 8.78 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.65-8.63 (m, 2H), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.80 (dd, $J = 2.4$ Hz, 8.9 Hz, 1H), 6.62-6.60 (m, 2H), 6.47 (dd, $J = 2.4$ Hz, 8.9 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.46 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 3.41-3.36 (m, 2H), 1.78 (tt, $J = 6.0, 7.3$ Hz, 2H), 1.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 165.6, 163.3, 162.3, 161.6, 159.5, 157.2, 152.4, 147.6, 135.3, 135.0, 131.5, 128.3, 121.8, 117.6, 110.1109.5, 108.2, 107.6, 99.92, 95.5, 12.1, 20.1, 36.5, 36.7, 44.2, 55.8, 85.6, 55.8, 44.3, 37.0, 36.7, 29.3, 12.3; IR (neat) : 2977, 1698, 1616, 1507, 1239, 1007, 837, 792 cm^{-1} ; ESI-MS 570 $[\text{M}-\text{H}]^-$. HRMS calcd 571.2431 for $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6$, found 571.2432.

tert-butyl-4-(3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propylcarbamoyl)phenylcarbamate **21**

To a stirred solution of 4-(Boc-amino)benzoic acid (50 mg, 0.16 mmol) in DMF (1.6 mL), were added successively, DIPEA (83 μ L, 0.48 mmol) and compound **19** (42 mg, 0.17 mmol). The reaction mixture was cooled to 0°C using an ice bath and then HBTU (67 mg, 0.17 mmol) was added. Stirring was continued for 2 hours while the mixture was allowed to reach room temperature. The reaction mixture was poured into a solution of 1M HCl solution and extracted twice with EtOAc. The unified organic layers were washed successively twice with water and once with brine, then dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduce pressure. Silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc 5/5 to 2/8) yielded the compound **21** (58 mg, 68%) as a yellow powder.

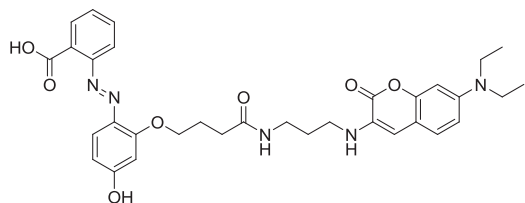
Rf : 0.56 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 42°C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃-d₁) δ 9.00 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.64 (dd, *J* = 2.2 Hz, 9.0 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.58 (m, 2H), 3.46 (m, 6H), 1.82 (m, 2H), 1.50 (s, 9H), 1.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 166.8, 164.6, 162.8, 157.8, 152.8, 152.6, 148.5, 141.4, 131.3, 128.9, 128.3, 117.8, 110.2, 109.6, 108.4, 96.6, 80.8, 45.2, 36.3, 35.9, 29.7, 28.4, 12.4; IR (neat) : 2972, 1698, 1506, 1230 cm⁻¹; ESI-MS 537 [M+H]⁺. HRMS calcd 536.2635 for C₂₉H₃₆N₄O₆, found 536.2638.

N-(3-(4-aminobenzamido)propyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide **22**

Compound **21** (53 mg, 0.12 mmol) was dissolved in DCM (2.0 mL) and TFA (0.5 mL) was added at 0°C. The resulting solution was stirred at room temperature for 2 hours and was then concentrated. The residue was redissolved with a saturated solution of NaHCO₃ (3 mL) and extracted three times with EtOAc (6 mL). The organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduce pressure giving product **22** (43 mg, 82%) as a yellow powder.

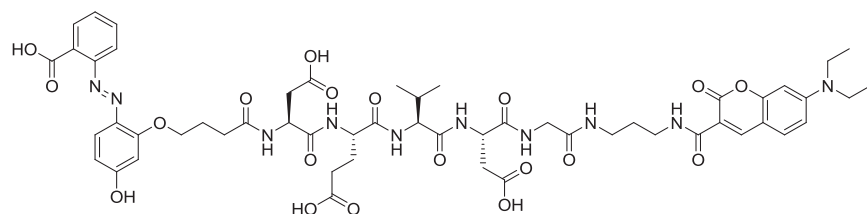
Rf : 0.47 (DCM/MeOH 9/1); m.p. 72°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 8.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 2.4, 8.9 Hz, 2H), 6.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.49-3.44 (m, 2H), 3.38-3.31 (m, 6H), 1.74-1.70 (m, 2H), 1.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 167.1, 164.5, 162.9, 157.8, 152.9, 149.6, 148.4, 131.3, 129.0, 124.6, 114.3, 110.2, 109.9, 108.5, 96.7, 45.2, 36.5, 36.0, 30.1, 29.8, 12.6; IR (neat) : 3333, 2922, 1694, 1614, 1504, 1415, 1349 cm⁻¹; ESI-MS 437 [M+H]⁺. HRMS calcd 436.2124 for C₂₄H₂₈N₄O₄, found 436.2117.

2-((2-(4-(3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-ylamino)propylamino)-4-oxobutoxy)-4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoic acid **23**



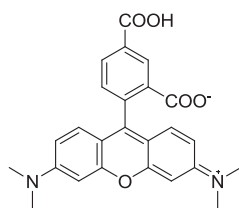
See supporting information of *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3224-3226.

CDQ-Asp(OH)-Glu(OH)-Val-Asp(OH)-Gly-DEAC **24**



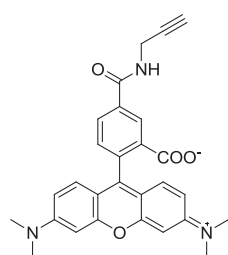
See supporting information of *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3224-3226.

2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-5-(prop-2-ynylcarbamoyl) Benzoate **25** or **6-TAMRA**



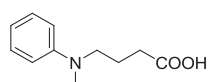
This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁷²

2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-5-(prop-2-ynylcarbamoyl) benzoate **26** or **TAMRA-Alcyne**

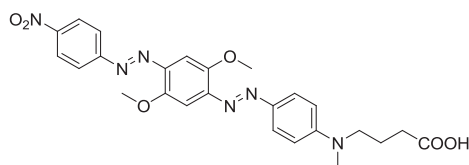


TAMRA-Alcyne was synthesized according to the general procedure C. 5-TAMRA (246 mg, 0.57 mmol) was reacted with propargylamine (44 μ L, 0.69 mmol) to give **TAMRA-Alcyne** as a fluffy pink solid (215 mg, 80%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.37 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.7 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 1.8, 7.9 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.06-7.00 (m, 4H), 6.94 (brs, 2H), 4.15 (dd, J = 2.6, 5.6 Hz, 1H), 3.26 (s, 12H), 3.19 (t, J = 2.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.9, 164.4, 156.6, 135.3, 131.3, 130.5, 114.4, 96.3, 81.0, 73.1, 40.5, 28.7; ESI-MS: 468 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 467.18451 for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$, found 467.1847.

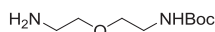
4-(methyl(phenyl)amino)butanoic acid **28**

This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁷⁴

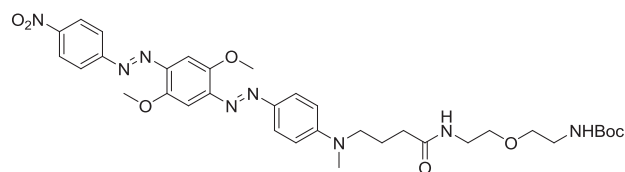
4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanoic acid **30** or **BHQ-2**

Fast Black K hemi(zinc chloride) salt (practical grade, $\approx 30\%$ dye content) (7.76 g) was suspended in cold water (150.0 mL, 0°C) and stirred for 20 minutes. The suspension was filtered, and the red solution was added dropwise to a cold (0 °C) mixture of **28** (1.33 g, 6.88 mmol), concentrated hydrochloric acid (3.1 mL) and sodium acetate (3.6 g) in water and acetone (1:1) (150.0 mL). The reaction mixture was stirred at 10 °C for 15 minutes and at room temperature for 2 hours. Then the reaction crude was extracted with EtOAc (3*150 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100% EtOAc, then 100% DCM to DCM/MeOH (95:5)). **BHQ-2** (1.36 g, 39%) was obtained as a dark violet solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.31 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.5 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.98-1.90 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 176.2, 157.1, 154.3, 153.0, 151.4, 149.0, 147.4, 145.0, 142.6, 126.9, 125.3, 124.2, 112.1, 101.7, 100.7, 57.2, 52.3, 39.0, 31.6, 22.9.

tert-butyl 2-(2-aminoethoxy)ethylcarbamate **34**

This compound was synthesized according to the described procedure.¹⁷⁶

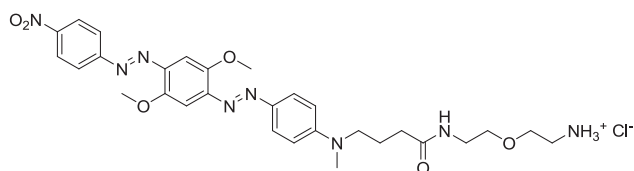
tert-butyl 2-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethylcarbamate **35**

Compound **35** was synthesized according to the general procedure D. **BHQ-2** (306 mg, 0.60 mmol) reacted with **34** (102 mg, 0.78 mmol) to give **35** as a dark violet solid (200 mg, 48%).

Rf: 0.58 (DCM/MeOH 95:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 8.32 (d, $J = 9.00$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J = 9.00$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.00$ Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.10 (brs, 1H), 4.87 (brs, 1H), 4.05 (s, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.50-3.41 (m, 8H), 3.26 (dt, $J = 4.6, 5.9$ Hz, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.00-1.94 (m, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 172.2, 156.6, 156.3, 153.8, 152.4, 151.1, 148.5, 147.0, 144.6, 142.2, 126.4, 124.9, 123.7, 111.6, 101.1, 100.2, 79.6, 70.4, 69.8, 56.9, 51.9, 40.5, 38.6,

33.3, 28.6, 23.0; ESI-MS: 693 $[M+H]^+$. HRMS calcd 692.3282 for $C_{34}H_{44}N_8O_8$, found 692.3290.

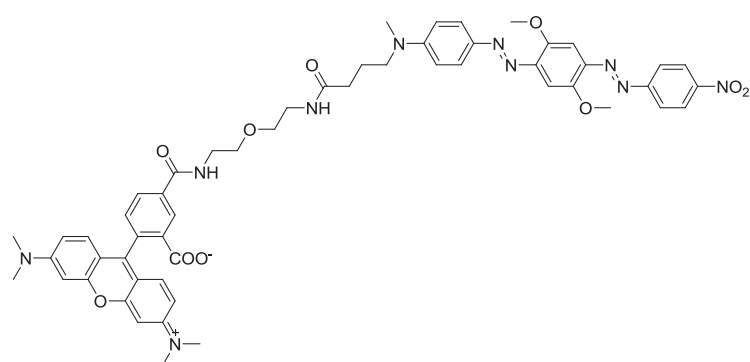
2-(2-(4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethanaminium chloride **36**



35 (156 mg, 0.225 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/MeOH (2:1) (2.7 mL) at 0°C and a 4M HCl solution in dioxane (1.8 mL) was added dropwise to the solution. The reaction mixture was stirred

at room temperature for 2 hours. When there is no more starting material left in the reaction mixture, the solvents were evaporated and gave **36** as a dark violet solid. The crude was directly engaged in the next step without further purification.

4-(2-(2-(4-((4-((E)-(2,5-dimethoxy-4-((E)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate (**BHQ-2**)-Amide-TAMRA or **37**

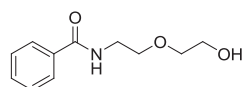


37 (0.225 mmol) was dissolved in a mixture of DMF/DCM (1:1) (5.0 mL) and DIEA (117 μ L, 0.675 mmol) and **5-TAMRA** (97 mg, 0.225 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and PyBOP (117 mg, 0.225 mmol) was added. The solution was allowed to reach room

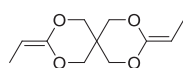
temperature and stirred for 16 hours. DCM was evaporated under reduced pressure and reaction crude was purified by preparative HPLC (method 1) without work-up. (**BHQ-2**)-Amide-TAMRA (79 mg, 35%) was obtained as a dark violet-pink solid.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.41 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.32 (dd, J = 2.1, 8.0 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.95 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.98 (s, 4H), 6.87-6.82 (m, 4H), 3.98 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.61 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.55-3.42 (m, 6H), 3.27 (dt, J = 5.4 Hz, 2H), 3.22 (s, 12H), 3.03 (s, 3H), 2.18 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.82-1.76 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.7, 165.9, 164.8, 158.7, 156.5, 155.6, 153.0, 152.0, 150.3, 148.0, 146.0, 143.4, 141.3, 135.9, 131.2, 131.1, 130.4, 129.5, 125.7, 125.1, 123.4, 114.4, 112.6, 111.4, 100.5, 99.8, 96.2, 68.9, 68.6, 56.4, 56.3, 51.2, 40.4, 38.5, 38.2, 32.1, 22.4; HRMS calcd 1004.4181 for $C_{54}H_{56}N_{10}O_{10}$, found 1004.4144.

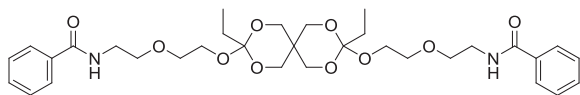
N-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzamide **38**



This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁷⁸

3,9-diethylidene-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane 40

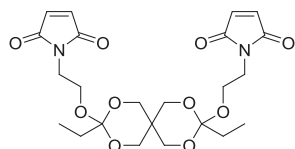
This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁷⁹

***N,N'*-(2,2'-(2,2'-(3,9-diethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane-3,9-diyl)bis(oxy)bis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy)bis(ethane-2,1-diyl))dibenzamide 41**

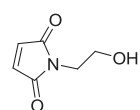
This compound was synthesized following a reported protocol for orthoester synthesis.¹⁷⁷

38 (425 mg, 2.03 mmol) was dissolved in anhydrous Et₂O (36 mL) and the spiro diketene acetal **40** (196 mg, 0.92 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 5 hours at room temperature and evaporated *in vacuo*. The obtained residue was then purified by preparative HPLC (method 2) to yield **41** (210 mg, 36%) as a colorless oil.

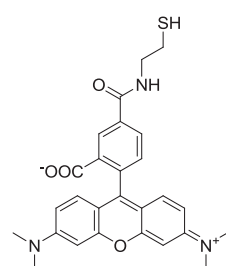
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 7.78 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.53-7.42 (m, 6H), 7.08 (brs, 2H), 3.96 (dd, *J* = 2.4, 10.8 Hz, 2H), 3.89 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 3.66-3.62 (m, 10H), 3.55-3.49 (m, 8H), 3.17 (dd, *J* = 2.4, 11.3 Hz, 2H), 1.66 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 132.3, 129.5, 128.0, 118.4, 113.5, 70.7, 70.3, 63.6, 63.5, 62.9, 40.5, 31.4, 29.2, 7.9.

3,9-bis(maleimedioethoxy)-3,9-ethane-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane 42

42 was synthesized in one step according to the described procedure.¹⁷⁷

***N*-(2-Hydroxyethyl)maleimide 45**

Starting from maleic anhydride, **45** was synthesized in three steps according to the described procedure.²¹⁵

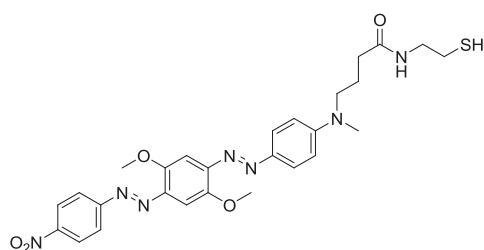
2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3*H*-xanthen-9-yl)-4-(2-mercaptoethylcarbamoyl) benzoate **TAMRA-SH or 46**

5-TAMRA (92 mg, 0.214 mmol) was dissolved in DMF (1.60 mL) and TEA (208 μ L, 1.50 mmol) was added. The mixture was cooled to 0°C and PyBOP (111 mg, 0.214 mmol) was added. After 10 minutes, cystamine dihydrochloride (162 mg, 1.07 mmol) was added to the solution and the reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature. Then, the reaction mixture was diluted with DCM (3.00 mL) and stirred for an

additional 1 hour at room temperature after DTT (198 mg, 1.28 mmol) addition. DCM was removed under reduce pressure, the crude purified by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford the desired **TAMRA-SH** as a fluffy pink solid (78 mg, 75%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.06 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.30 (dd, $J = 1.8, 8.0$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.08-7.02 (m, 4H), 6.95 (s, 2H), 3.52-3.42 (m, 2H), 3.26 (s, 12H), 2.72 (dt, $J = 6.8, 8.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.0, 164.7, 156.8, 156.6, 135.9, 131.2, 130.6, 114.6, 96.3, 42.9, 40.5, 23.3; ESI-MS: 490.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 489.1722 for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, found 489.1723.

4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)-
N-(2-mercaptoethyl)butanamide (**BHQ-2-SH** or **47**)

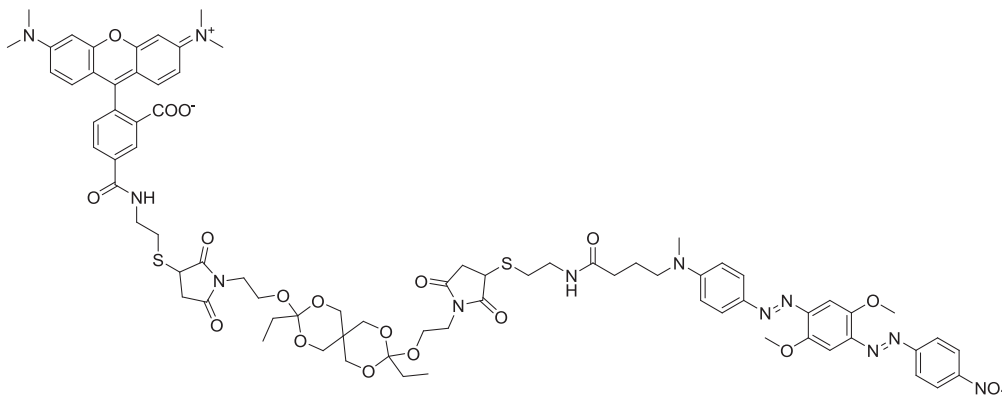


BHQ-2 (92 mg, 0.182 mmol) was dissolved in a mixture of DMF/DCM (1:2) (15.0 mL) and TEA (150 μL , 1.09 mmol) and cystamine dichloride (138 mg, 0.95 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and HBTU (69 mg, 0.182 mmol) was added. The solution was allowed to reach room temperature and stirred for 16 hours. When total conversion was

reached, DTT (168 mg, 1.09 mmol) was added. After the resulting mixture has been stirred for 10 minutes at room temperature, the crude was diluted with saturated NaHCO_3 solution (75 mL) and extracted with EtOAc (2*50 mL). The organic layers were combined, washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried over Na_2SO_4 . The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 95:5) to yield (**BHQ-2-SH**) as a dark violet solid (61 mg, 59%).

Rf: 0.33 (DCM/MeOH 95:5); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.33 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.0 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.9 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 9.00$ Hz, 2H), 5.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.41 (dt, $J = 6.2, 6.4$ Hz, 2H), 2.64 (td, $J = 6.4, 8.47$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.01-1.94 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ 172.2, 156.6, 153.8, 152.4, 151.1, 148.5, 147.0, 144.7, 142.3, 126.4, 124.9, 123.7, 111.6, 101.2, 100.3, 57.0, 56.9, 51.8, 42.5, 38.7, 33.4, 24.9, 23.0; IR (neat): 2939, 1594, 1518, 1339, 1155 cm^{-1} ; ESI-MS: 566.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 565.2107 for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$, found 565.2105.

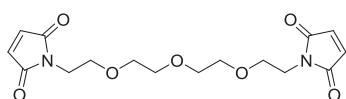
4-(2-(1-(2-(9-(2-(3-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethylthio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethoxy)-3,9-diethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan-3-yloxy)ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-ylthio)ethylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate
(BHQ-2)-Orthoester-TAMRA or **48**



TAMRA-SH (11.5 mg, 0.023 mmol) was dissolved in degassed anhydrous MeOH (1.7 mL) and TEA (20 μ L) was added to this solution. Then, a solution of **(BHQ-2)-SH** (13.3 mg, 0.023 mmol) in degassed anhydrous DCM (1.7 mL) was added to the previous solution. A solution of **42** (11 mg, 0.023 mmol) in DCM (0.2 mL) was added to the previous solution and the reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature. The solvents were removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in DMSO (1.0 mL), purified by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to afford the desired **(BHQ-2)-Orthoester-TAMRA** (7 mg, 20%) as a fluffy violet-pink solid.

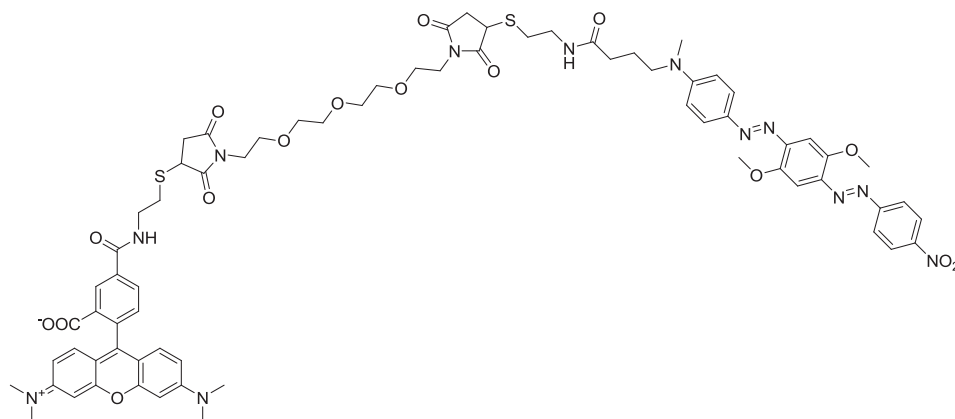
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.99 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.44-8.42 (m, 3H), 8.22 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.06-8.02 (m, 3H), 7.81 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.52-6.45 (m, 6H), 4.11-4.03 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.87-3.85 (m, 4H), 3.77-3.75 (m, 4H), 3.63-3.55 (m, 6H), 3.48-3.47 (m, 6H), 3.29-3.17 (m, 6H), 3.06 (s, 3H), 2.93-2.87 (m, 14H), 2.58-2.54 (m, 2H), 2.16 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.59 (q, J = 7.4 Hz, 4H), 0.78 (t, J = 7.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 176.7, 176.6, 171.7, 168.3, 164.8, 155.7, 154.9, 153.1, 152.2, 152.1, 152.0, 150.3, 148.1, 146.2, 143.5, 141.4, 135.9, 134.4, 128.3, 126.9, 125.7, 125.1, 124.2, 123.4, 123.1, 112.0, 111.5, 108.9, 105.5, 100.8, 100.1, 98.0, 62.1, 62.0, 58.2, 51.2, 38.3, 38.2, 38.0, 35.9, 32.2, 30.6, 30.3, 29.9, 27.7, 22.4, 7.3; MS analysis yield two products of orthoester hydrolysis : HRMS calcd 706.2533 for $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$, found 706.2523. HRMS calcd 630.2148 for $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$, found 630.2142.

N,N'-[1,2-ethanediyltris(oxy-2,1-ethanediyl)]bismaleimide **49**



Starting from 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecane, **49** was synthesized in two steps according to the described procedure.¹⁸¹

5-(2-(1-(2-(2-(2-(2-(3-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethylthio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-ylthio)ethylcarbonyl)-2-(6-(dimethylamino)-3(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)**

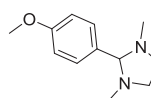


TAMRA-SH (21 mg, 0.043 mmol) was dissolved in degassed anhydrous MeOH (3.5 mL) and TEA (16 μ L) was added. Then, a solution of **(BHQ-2)-SH** (24 mg, 0.043 mmol)

in degassed anhydrous DCM (3.5 mL) was added to the previous solution. A solution of **49** (15 mg, 0.043 mmol) in DCM (0.5 mL) was added to the previous solution and the reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature. The solvents were removed under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in DMSO (1.0 mL), purified by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to yield the desired **TAMRA-Maléimide-(BHQ-2)** (13 mg, 21%) as a fluffy violet-pink solid.

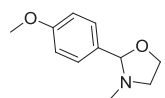
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.99 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.45-8.43 (m, 3H), 8.22 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.07-8.01 (m, 3H), 8.22 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.53-6.46 (m, 6H), 4.09-4.06 (m, 1H), 4.04-4.00 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.56-3.45 (m, 18H), 3.25-3.15 (m, 4H), 3.06 (s, 3H), 3.03-2.83 (s, 16H), 2.76-2.67 (m, 2H), 2.58-2.50 (m, 2H+DMSO), 2.17 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84-1.77 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 176.6, 176.5, 174.9, 174.8, 171.7, 168.3, 164.8, 155.7, 154.9, 153.1, 152.1, 152.0, 151.9, 150.3, 148.1, 146.2, 143.5, 141.3, 135.8, 134.4, 128.4, 126.9, 125.7, 125.0, 124.2, 123.4, 123.1, 111.5, 109.0, 105.5, 100.7, 100.0, 98.0, 69.7, 69.4, 69.3, 56.5, 56.4, 51.2, 38.2, 38.0, 37.9, 37.8, 35.8, 32.1, 30.4, 30.2, 22.4; ESI-MS: 1407 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 1406.5100 for $\text{C}_{70}\text{H}_{78}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}_2$, found 1406.5053.

2-(4-methoxyphenyl)-1,3-dimethylimidazolidine **50**



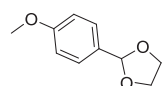
Following general procedure A, compound **50** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and N,N'-dimethylethylenediamine. Purification was achieved by distillation.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.37 (dt, J = 3.5, 4.5 Hz, 2H), 3.19 (s, 1H), 2.52 (dt, J = 3.5, 4.5 Hz, 2H), 2.14 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 130.1, 113.9, 92.1, 55.4, 53.4, 39.6.

2-(4-methoxyphenyl)-3-methyloxazolidine **51**

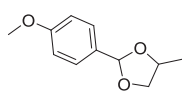
Following general procedure A, compound **51** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and 2-(methylamino)ethanol. Purification was achieved by distillation.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.55$ Hz, 2H), 4.55 (s, 1H), 4.09-3.96 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.31 (ddd, $J = 2.8, 6.7, 9.3$ Hz, 2H), 2.65 (dt, $J = 7.9, 9.3$ Hz, 2H), 2.23 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 129.0, 113.9, 98.2, 65.4, 55.4, 54.9, 38.2.

2-(4-methoxyphenyl)-1,3-dioxolane **52**

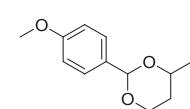
Following general procedure B, compound **52** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and ethylene glycol. Purification was achieved by chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/TEA, 700:100:1).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.74 (s, 1H), 4.12-4.09 (m, 2H), 4.00-3.97 (m, 2H), 3.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 128.0, 113.9, 103.9, 65.4, 55.4.

2-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-1,3-dioxolane **53**

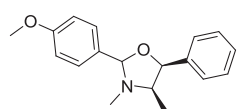
Following general procedure B, compound **53** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and 1,2-propanediol. Purification was achieved by chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/TEA, 700:100:1). The dioxolane compound was obtained with an enantiomeric ratio of 60/40.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.39 (dt, $J = 2.1, 8.6$ Hz, 2H), 6.88 (dd, $J = 2.7, 8.6$ Hz, 2H), 5.89 (s, 0.4H, isomer A), 5.75 (s, 0.6H, isomer B), 4.39-4.29 (m, 1H), 4.25 (dd, $J = 6.1, 8.1$ Hz, 0.4H, isomer A), 4.08 (dd, $J = 6.1, 7.5$ Hz, 0.6H, isomer B), 3.79 (s, 3H), 3.59 (t, $J = 7.5$ Hz, 0.6H, isomer B), 3.52 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H, 0.4H, isomer A), 1.37 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, isomer B) 1.32 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, isomer A); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 160.4, 128.2, 127.9, 113.9, 104.2, 103.1, 73.5, 72.4, 72.2, 71.6, 55.5, 18.9, 18.6.

2-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-1,3-dioxane **54**

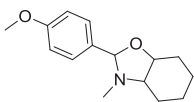
Following general procedure B, compound **54** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and 1,3-butanediol. Purification was achieved by chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/TEA, 700:100:1). The dioxane compound was obtained with an enantiomeric ratio of 91/9.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5.45 (s, 0.91H, isomer A), 5.23 (s, 0.09H, isomer B), 4.21 (ddd, $J = 1.4, 5.0, 11.5$ Hz, 1H), 3.97-3.87 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 1.77 (dddd, $J = 5.0, 11.5, 12.4, 13.3$ Hz, 1H), 1.48 (dtd, $J = 1.4, 2.5, 13.3$ Hz, 1H), 1.30 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 159.9, 131.5, 127.4, 113.5, 101.2, 73.3, 67.0, 55.2, 33.0, 21.8.

(4R,5S)-2-(4-methoxyphenyl)-3,4-dimethyl-5-phenyloxazolidine **55**

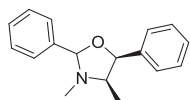
Following general procedure A, compound **55** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and (-) (1*R*-2*S*) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2). Compound **41** was obtained in an enantiomeric ratio of 93/7.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.33-7.24 (m, 4H), 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.55 (d, $J = 5.3$ Hz, 0.07H, isomer A), 5.27 (s, 0.07H, isomer A), 5.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 0.93H, isomer B), 4.63 (s, 0.93H, isomer B), 3.83 (s, 3H), 2.97-2.90 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 0.76 (d, $J = 6.4$ Hz, 2.91H, isomer B), 0.7 (d, $J = 6.9$ Hz, 0.14H, isomer A); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 160.4, 140.0, 130.3, 129.6, 128.0, 127.9, 127.6, 113.9, 98.6, 82.3, 64.0, 55.3, 35.7, 15.1.

2-(4-methoxyphenyl)-3-methyloctahydrobenzo[*d*]oxazole **56**

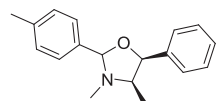
Following general procedure B, compound **56** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and 2-(methylamino)cyclohexanol. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2).

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN - d_3) δ 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.53 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.6 (ddd, $J = 3.9, 8.9, 11.2$ Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00-1.93 (m, 3H), 1.82-1.78 (m, 2H), 1.46-1.20 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN - d_3) δ 161.0, 134.4, 130.2, 118.3, 114.5, 99.8, 83.0, 71.5, 56.0, 36.2, 31.1, 28.7, 24.8.

(4R,5S)-3,4-dimethyl-2,5-diphenyloxazolidine **57**

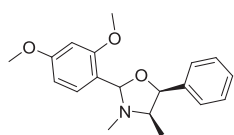
Following general procedure A, compound **57** was obtained by reaction of benzaldehyde and (-) (1*R*-2*S*) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.64 (dd, $J = 1.9, 7.7$ Hz, 2H), 7.44-7.24 (m, 8H), 5.14 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.69 (s, 1H), 3.00-2.96 (qd, $J = 6.45, 8.3$ Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 0.78 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 140.0, 138.3, 129.4, 128.7, 128.6, 128.2, 128.1, 127.8, 99.0, 82.7, 64.2, 36.0, 15.2.

(4R,5S)-3,4-dimethyl-5-phenyl-2-*p*-tolylloxazolidine **58**

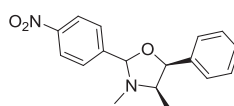
Following general procedure A, compound **58** was obtained by reaction of *p*-tolualdehyde and (-) (1*R*-2*S*) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2). Compound **58** was obtained in an enantiomeric ratio of 93/7.

^1H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.42-7.24 (m, 7H), 5.46 (d, $J = 5.6$ Hz, 0.07H, isomer A), 5.27 (s, 0.07H, isomer A), 5.11 (dd, $J = 8.3$ Hz, 0.93H, isomer B), 4.60 (s, 0.93H, isomer B), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.10 (s, 0.20 H, isomer A), 2.06 (s, 2.80H, isomer B), 0.66 (d, $J = 6.40$ Hz, 2.80 H, isomer B), 0.59 (d, $J = 6.6$ Hz, 0.2H, isomer A); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO - d_6) δ 140.1, 138.3, 135.3, 128.9, 128.1, 127.7, 127.4, 97.7, 81.1, 63.0, 35.2, 20.8, 14.7.

(4R,5S)-2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3,4-dimethyl-5-phenyloxazolidine **59**

Following general procedure A, compound **59** was obtained by reaction of 2,4-dimethoxybenzaldehyde and (-) (1R-2S) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2). Compound **59** was obtained with an enantiomeric ratio of 93/7.

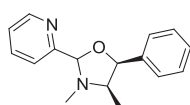
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.29-7.13 (m, 6H), 6.52 (dd, $J = 2.4, 8.5$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.77 (s, 0.07H, isomer A), 5.43 (d, $J = 5.3$ Hz, 0.07H, isomer A), 5.09 (s, 0.93H, isomer B), 5.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.93H, isomer B), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, H), 2.92-2.85 (m, 1H), 2.18 (s, 0.20 H, isomer A), 2.11 (s, 2.80H, isomer B), 0.69 (d, $J = 6.4$ Hz, 2.80 H, isomer B), 0.66 (d, $J = 7.1$ Hz, 0.2H, isomer A); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 161.5, 160.1, 140.4, 129.5, 128.2, 127.9, 127.6, 105.0, 98.7, 91.9, 82.7, 64.0, 55.8, 55.6, 36.2, 15.1.

(4R,5S)-3,4-dimethyl-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyloxazolidine **60**

Following general procedure A, compound **61** was obtained by reaction of 4-nitrobenzaldehyde and (-) (1R-2S) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2). Compound **61** was obtained

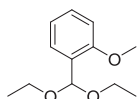
in an enantiomeric ratio of 9/1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 8.27 (d, $J = 8.6$ Hz, 1.8H, isomer A), 8.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 0.2H, isomer B), 7.81 (d, $J = 8.6$ Hz, 1.8H, isomer A), 7.70 (dd, $J = 8.6$ Hz, 0.2H, isomer B), 7.38-7.26 (m, 5H), 5.55 (d, $J = 5.3$ Hz, 0.1H, isomer B), 2.38, (s, 0.1H, isomer B), 5.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 0.9H, isomer A), 4.79 (s, 0.9H, isomer A), 3.73-3.68 (m, 0.1H, isomer B), 3.03 (qd, $J = 6.5, 8.2$ Hz, 0.9H, isomer A), 2.27 (s, 0.3H, isomer B), 2.21 (s, 2.7H, isomer A), 0.78 (d, $J = 6.5$ Hz, 2.7H, isomer A), 0.73 (d, $J = 6.6$ Hz, 0.3H, isomer B); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 148.8, 145.6, 139.3, 129.5, 129.5, 128.3, 128.1, 128.0, 123.9, 97.5, 83.1, 64.2, 36.1, 15.3.

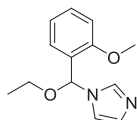
(4R,5S)-3,4-dimethyl-5-phenyl-2-(pyridin-2-yl)oxazolidine **61**

Following general procedure A, compound **61** was obtained by reaction of 2-pyridinecarboxaldehyde and (-) (1R-2S) ephedrine. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2). Compound **61** was obtained in an enantiomeric ratio of 93/7.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 8.76 (d, $J = 4.8$ Hz, 0.93H, isomer A), 8.72 (d, $J = 4.8$ Hz, 0.07H, isomer B), 7.95-7.83 (m, 2H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.48-7.38 (m, 4H), 5.73 (d, $J = 5.3$ Hz, 0.07H, isomer B), 5.53 (s, 0.07H, isomer B), 5.40 (s, 0.93H, isomer A), 5.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.93H, isomer A), 4.96 (s, 1H), 3.83 (dq, $J = 5.4, 6.7$ Hz, 0.07H, isomer B), 3.15 (qd, $J = 6.4, 8.2$ Hz, 0.93H, isomer A), 2.46 (s, 0.21H, isomer B), 2.43 (s, 2.79H, isomer A), 0.90 (d, $J = 6.4$ Hz, 2.79H, isomer A), 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 0.21H, isomer B); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 158.4, 149.2, 139.9, 137.1, 128.2, 128.1, 127.9, 123.9, 122.3, 98.9, 83.0, 64.4, 36.2, 15.1.

anisaldehyde dimethyl acetal **62**

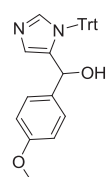
This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁵¹

1-(ethoxy(2-methoxyphenyl)methyl)-1H-imidazole **63**

This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁵¹

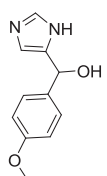
5-iodo-1-trityl-1H-imidazole **65**

This compound was synthesized in two steps, following a reported protocol.¹⁹¹

(4-methoxyphenyl)(1-trityl-1H-imidazol-5-yl)methanol **66**

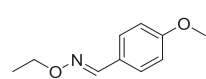
Ethylmagnesium bromide (2.80 mL, 3M solution in Et₂O) was added to a solution of **65** (3.13 g, 7.18 mmol) in DCM (14.0 mL). After stirring for 30 min, a solution of p-anisaldehyde (0.98 g, 7.20 mmol) in DCM (3.0 mL) was added slowly. After stirring overnight, NH₄Cl (50 mL, half-saturated solution in water) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted three times with DCM (3*50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed in vacuo. Trituration in Et₂O gave **66** (2.19 g, 68%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.40 (s, 1H), 7.31-7.29 (m, 11H), 7.10-7.08 (m, 6H), 6.82-6.80 (m, 2H), 6.57 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 3.76 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 159.2, 144.4, 142.4, 138.9, 135.3, 129.9, 129.5, 128.3, 127.5, 127.3, 118.6, 113.9, 75.8, 70.6, 55.5.

(1H-imidazol-5-yl)(4-methoxyphenyl)methanol **67**

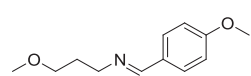
Hydrochloric acid (4 mL, 1 M) was added to a solution of **67** (269 mg, 0.617 mmol) in ethanol (8 mL). After refluxing for 3 h the mixture was washed three times with diethyl ether (3*30 mL). The aqueous layer was basified with a saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) and then extracted twice with EtOAc (2*50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the residue was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH, from 95:5 to 90:10) to yield **67** (110 mg, 73%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 8.90 (brs, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 3.74 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-d₁) δ 159.3, 139.7, 135.4, 133.2, 128.5, 117.7, 113.9, 77.4, 55.4.

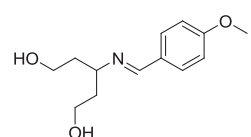
4-methoxybenzaldehyde *O*-ethyl oxime 71

To a stirred solution of *O*-ethylhydroxylamine hydrochloride (94 mg, 0.97 mmol) in a mixture of DCM/MeOH (3:1) (7 mL) MgSO₄ (370 mg), TEA (135 μL, 0.97 mmol) and *p*-anisaldehyde (120 mg, 0.88) were added. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature and filtered. The filtrate was evaporated and the residue was purified by preparative HPLC (method 2) to give **71** (120 mg, 76%) as a pinkish oil.

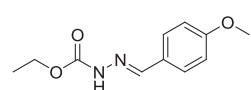
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.5, 147.9, 128.2, 124.6, 114.2, 66.7, 55.1, 14.4.

3-methoxy-*N*-(4-methoxybenzylidene)propan-1-amine 72

This compound was synthesized following a reported protocol synthesis.²¹⁶

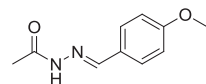
3-(4-methoxybenzylideneamino)pentane-1,5-diol 73

This compound was synthesized following a reported protocol.²¹⁷

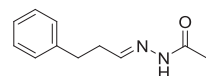
ethyl 2-(4-methoxybenzylidene)hydrazinecarboxylate 74

Following general procedure A (140°C, 40 min), compound **74** was obtained by reaction of *p*-anisaldehyde and ethylcarbazate. Purification was achieved by preparative HPLC (method 2).

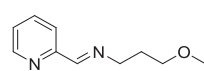
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 8.19 (brs, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.27 (dt, *J* = 6.2, 8.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 161.4, 144.6, 129.0, 126.6, 114.3, 62.1, 55.5, 14.8.

***N*'-(4-methoxybenzylidene)acetohydrazide 75**

This compound was synthesized following a reported protocol.²¹⁸

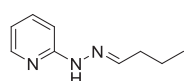
***N*'-(3-phenylpropylidene)acetohydrazide 76**

This compound was synthesized following a reported protocol for acylhydrazone synthesis.²¹⁸

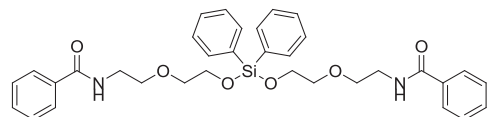
3-methoxy-N-(pyridin-2-ylmethylene)propan-1-amine **77**

Following general procedure A (140°C, 40 min), compound **77** was obtained by reaction of 2-pyridinecarboxaldehyde and 3-methoxypropylamine. The reaction mixture was filtered and then immediately purified on basic alumina gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 5:5). Imine **77** (453 mg, 60%) was obtained as orange oil.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (dd, $J = 1.8, 4.9$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.95 (dt, $J = 1.0, 7.9$ Hz, 1H), 7.86 (dt, $J = 1.8, 7.9$ Hz, 1H), 7.45 (ddd, $J = 1.8, 4.9, 7.9$ Hz, 1H), 3.66 (dt, $J = 1.5, 6.9$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.23 (s, 3H), 1.86 (tt, $J = 6.8, 6.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.9, 154.1, 149.3, 136.7, 125.0, 120.3, 69.6, 57.8; 57.0, 30.2.

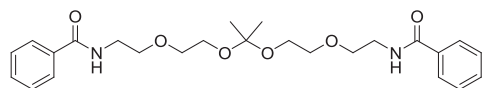
(2-butylidenehydrazinyl)pyridine **78**

This compound was synthesized following a reported protocol for acylhydrazone synthesis.²¹⁸

N,N'-(7,7-diphenyl-3,6,8,11-tetraoxa-7-silatriscane-1,13-diyl)dibenzamide **81**

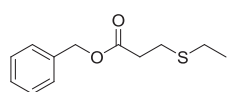
This compound was synthesized following a reported protocol for silyl ether synthesis.¹⁵⁵ **38** (116 mg, 0.56 mmol) was dissolved in DCM (1 mL) and TEA (78 μL , 0.56 mmol) was added. After stirring for 5 minutes at 0°C, dichlorodiphenyl silane (30 μL , 0.14 mmol) was added dropwise and stirring was continued for 16 hours while the mixture was warmed up to room temperature. DCM was removed in vacua and the crude was directly purified by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to afford **816** (61 mg, 73%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.69 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H), 7.62 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H), 7.44-7.36 (m, 4H), 7.33-7.28 (m, 8H), 6.66 (s, 2H), 3.91 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 3.58-3.57 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 167.7, 135.1, 134.7, 132.5, 131.5, 130.7, 128.7, 128.1, 127.2, 72.3, 69.9, 62.8, 40.0.

N,N'-(7,7-dimethyl-3,6,8,11-tetraoxatridecane-1,13-diyl)dibenzamide **82**

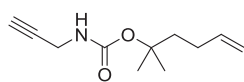
To a stirred solution of **38** (212 mg, 1.01 mmol) in CHCl_3 (3:1) (10 mL) 4A molecular sieve (200 mg), 2,2-dimethoxypropane (57 μL , 0.46 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (2 mg, 0.01) were added. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature and was filtered. The filtrate was evaporated and the residue was purified by preparative HPLC (method 2) to give **82** (15 mg, 7%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.48-7.37 (m, 6H), 6.80 (brs, 2H), 3.73 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.64 (s, 8H), 3.58 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 2.13 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 167.9, 134.7, 131.6, 128.7, 127.2, 72.5, 70.1, 61.9, 40.0, 31.1, 29.9.

benzyl 3-(ethylthio)propanoate **83**

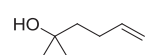
To a stirred solution of benzylacrylate (118 mg, 0.73 mmol) in THF (2 mL) TEA (304 μ L, 2.18 mmol) and ethanethiol (107 μ L, 1.46 mmol) were added successively. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature and evaporated *in vacuo*. The obtained residue was then purified by preparative HPLC (method 2) to yield **83** (88 mg, 55%) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 7.46-7.29 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 2.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.63 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.52 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 172.1, 136.6, 129.0, 128.6, 128.5, 117.4, 66.6, 35.3, 26.8, 26.1, 15.0.

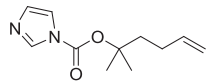
2-methylhex-5-en-2-yl prop-2-ynylcarbamate **88**

90 (465 mg, 2.76 mmol) was dissolved in anhydrous THF (26 mL) at 0°C and methyl triflate was added dropwise. After complete addition, the reaction mixture was stirred at 0°C for 30 minutes. Then, a solution of propargylamine (167 mg, 3.04 mmol) in THF (9 mL) was added dropwise and the mixture was stirred for additional 90 minutes at room temperature. Solvent was evaporated and the crude product was purified by aluminum oxide gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 9:1) to provide **88** (428 mg, 79%) as colorless oil.

Rf: 0.68 (Cyclohexane/EtOAc 8:2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 5.83-5.73 (m, 1H), 5.02-4.89 (m, 2H), 4.76 (brs, 1H), 3.88 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 2.19 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.09-2.03 (m, 2H), 1.82-1.76 (m, 2H), 1.41 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ 155.3, 138.7, 114.6, 80.3, 71.4, 40.4, 30.6, 28.5, 26.5; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 195.1259 for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, found 195.1260.

2-methylhex-5-en-2-ol **89**

This compound was synthesized according to the described procedure.²¹⁹

2-methylhex-5-en-2-yl 1H-imidazole-1-carboxylate **90**

89 (1.41 g, 12.26 mmol), CDI (2.39 g, 14.71 mmol) and KOH (0.02 g, 0.36 mmol) were dissolved in anhydrous toluene (4.6 mL) and the reaction mixture was heated under microwave irradiation to 100°C for 40 minutes.

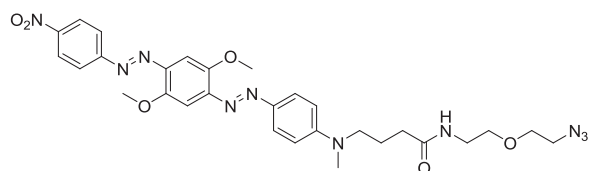
Upon cooling, a white crystalline precipitate formed and was removed by filtration. The solid was washed with Et_2O and combined with the mother liquor, both were evaporated to yield **90** (2.22 g, 87%) as colorless oil.

Rf: 0.20 (Cyclohexane/EtOAc 8:2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.03 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H); 5.84-5.74 (m, 1H), 5.04-4.94 (m, 2H), 2.17-2.11 (m, 2H), 1.98-1.94 (m, 2H), 1.59 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ 147.2, 137.7, 137.2, 130.5, 117.3, 115.3, 87.7, 40.0, 28.4, 26.0; IR (neat): 2979, 1752, 1380, 1286 cm^{-1} .

2-(2-azidoethoxy)ethanamine **91**

NCCOCCN=[N+]=[N-] This compound was synthesized according to the described procedure.²²⁰

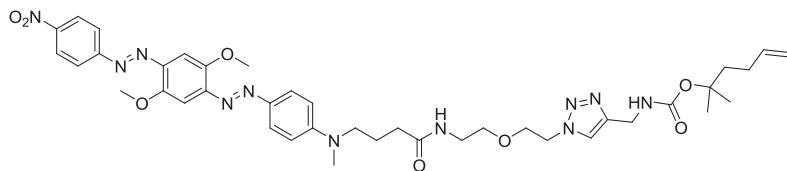
N-(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)butanamide **(BHQ-2)-N₃** or **92**



(BHQ-2)-N₃ was synthesized according to the general procedure D. **BHQ-2** (222 mg, 0.44 mmol) reacted with **91** (122 mg, 0.942 mmol) to give **(BHQ-2)-N₃** as a dark violet solid (219 mg, 81%).

Rf: 0.67 (DCM/MeOH 95:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 8.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 5.87 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.65 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.55-3.44 (m, 6H), 3.33 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.01-1.94 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 172.0, 156.5, 153.7, 152.2, 151.0, 148.4, 146.9, 144.5, 142.1, 126.2, 124.7, 123.5, 111.5, 101.0, 100.1, 70.2, 69.8, 56.9, 56.8, 51.7, 50.6, 39.2, 38.5, 33.2, 22.9; ESI-MS: 619 [M+H]⁺. HRMS calcd 618.2663 for C₂₉H₃₄N₁₀O₆, found 618.2667.

2-methylhex-5-en-2-yl (1-(2-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)butanamido)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylcarbamate **93**



Compounds **(BHQ-2)-N₃** (104.0 mg, 0.167) and **88** (36.0 mg, 0.184 mmol) were dissolved in a mixture of THF/*t*-BuOH (1:1) (8.0 mL).

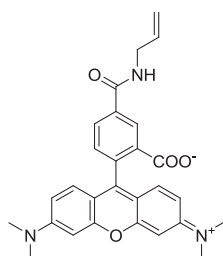
When solution was completed water (4.0 mL), copper(II) sulfate pentahydrate (8.4 mg, 0.033 mmol) and sodium ascorbate (13.2 mg, 0.066 mmol) were added successively to the reaction mixture. Stirring was continued for 16 h at room temperature. The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting aqueous solution was extracted with DCM (30 mL). The organic layer was washed with water (20 mL) and dried over Na₂SO₄. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (1:0 EtOAc then DCM/MeOH 95:5) to yield **93** as a dark violet solid (101 mg, 74%).

Rf: 0.45 (DCM/MeOH 95:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 8.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.0 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.22 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.80-5.70 (m, 1H), 5.25-5.23 (m, 1H), 4.98-4.88 (m, 2H), 4.44 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.31 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.77 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.51-3.46 (m, 4H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.05-1.95 (m, 4H), 1.79-1.75 (m, 2H), 1.39 (s, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 172.5, 156.6, 156.0, 153.8, 152.4, 151.1, 148.5, 147.0, 145.7, 144.6, 142.2, 138.6, 126.4, 124.9, 123.7, 123.2, 114.6, 111.6, 101.2, 100.2, 81.7, 69.9, 69.1, 56.9, 51.9, 50.2, 40.4, 39.3, 38.6,

36.4, 33.16, 28.4, 26.5, 23.1; ESI-MS: 814 $[M+H]^+$. HRMS calcd 813.3922 for $C_{40}H_{51}N_{11}O_8$, found 813.3921.

5-(allylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate

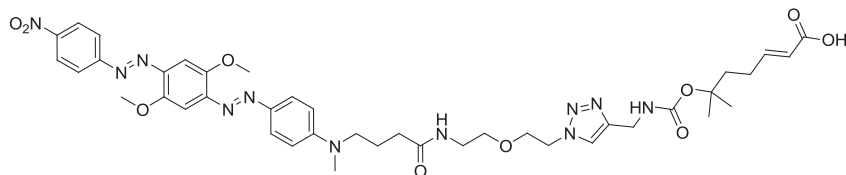
TAMRA-Alcène or **94**



TAMRA-Alcène was synthesized according to the general procedure C. **5-TAMRA** (60 mg, 0.139 mmol) reacted with allylamine (11 μ L, 0.139 mmol) to give **TAMRA-Alcène** as a fluffy pink solid (52 mg, 81%).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.96 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.32-8.25 (m, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.09-7.03 (m, 4H), 6.93 (s, 2H), 5.93-5.83 (m, 1H), 5.20-5.08 (m, 2H), 3.91 (tdd, J = 1.6, 5.0, 5.6 Hz, 2H), 3.25 (s, 12H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 165.9, 165.2, 156.7, 156.6, 137.5, 134.9, 133.0, 131.0, 130.7, 129.0, 128.7, 115.7, 114.5, 112.7, 96.2, 41.8, 40.5; IR (neat) : 2928, 1716, 1648, 1592, 1408, 1345, 1186 cm^{-1} ; ESI-MS: 470 $[M+H]^+$.

6-((1-(2-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazanyl)phenyl)diazanyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylcarbamoyloxy)-6-methylhept-2-enoic acid **96**

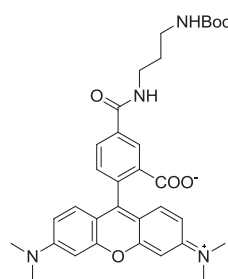


93 (23 mg, 0.028 mmol) was placed in a microwave-tube and dissolved in DCM (0.7 mL). Then, acrylic acid

(20 μ L, 0.028 mmol) and Grubbs Catalyst, 2nd Generation (12 mg, 0.014 mmol) were added successively to the reaction mixture which was then heated under microwave irradiation to 40°C for 20 minutes. After cooling, the solvent was removed and the crude was purified by preparative HPLC (method 1) without further work-up. **96** (17 mg, 69%) was obtained as a violet solid.

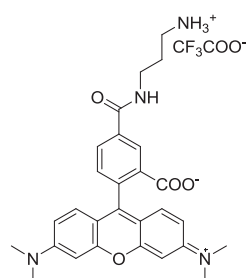
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ 8.34 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.99-6.95 (m, 1H), 6.75 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.29 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.77 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 5.55 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.45 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 4.33 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.80 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.51-3.47 (m, 4H), 3.39-3.35 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.25-2.23 (m, 4H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.86-1.82 (m, 2H), 1.40 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ 212.2, 173.1, 157.0, 156.2, 154.2, 152.8, 151.4, 148.9, 147.3, 145.9, 144.9, 142.6, 126.7, 125.3, 124.0, 123.5, 112.0, 101.6, 100.6, 81.4, 70.3, 69.3, 57.3, 52.2, 50.5, 39.8, 39.7, 36.6, 33.6, 27.6, 26.8, 23.4; IR (neat) : 2923, 1705, 1593, 1518, 1340, 1244, 1154 cm^{-1} ; ESI-MS: 858 $[M+H]^+$.

4-(3-aminopropylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl) benzoate **97**



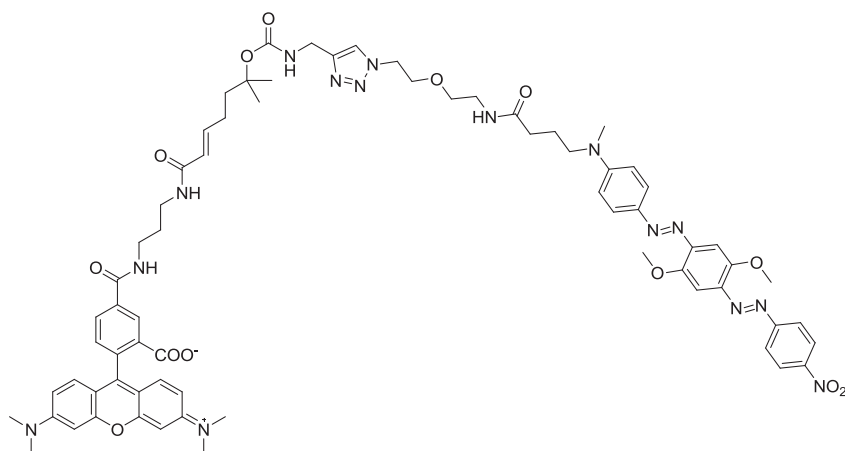
97 was synthesized according to the general procedure C. **5-TAMRA** (72 mg, 0.167 mmol) reacted with *N*-Boc-1,3-propanediamine (32 mg, 0.200 mmol) to give **98** as a fluffy pink solid (80 mg, 82%).
 ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.69 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 8.17 (dd, J = 1.9, 8.1 Hz, 1 H), 7.43 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.05-6.87 (m, 6H), 3.41 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 3.23 (s, 12H), 3.08 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.36 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ 168.2, 167.4, 160.7, 159.1, 159.0, 138.1, 137.8, 132.9, 132.3, 132.0, 131.3, 115.6, 114.8, 97.5, 41.0, 39.0, 38.7, 30.9, 28.9; ESI-MS: 587 [M+H] $^+$. HRMS calcd 586.2791 for C₃₃H₃₈N₄O₆, found 586.2797.

4-(3-ammoniopropylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl) benzoate 2,2,2-trifluoroacetate **TAMRA-NH₂** or **98**



97 (40 mg, 0.068 mmol) was dissolved in an HCl solution in dioxane (4M, 3 mL) and stirred for 3 hours. Solvent was removed *in-vacuo* and **98** (41 mg, Quant.) was obtained as a pink solid.
 ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.72 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 1.9, 8.1 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.07-6.90 (m, 6H), 3.52 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.22 (s, 12H), 3.00 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ 168.9, 167.4, 160.5, 159.1, 159.0, 138.3, 137.2, 133.0, 132.3, 132.0, 131.9, 131.4, 115.6, 114.8, 97.5, 41.0, 38.5, 37.8, 28.9; ESI-MS: 487 [M+H] $^+$. HRMS calcd 486.2267 for C₂₈H₃₀N₄O₄, found 486.2262.

4-(3-(6-((1-(2-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylcarbamoyloxy)-6-methylhept-2-enamido)propylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate **TAMRA-Carbamate-(BHO-2)** or **99**

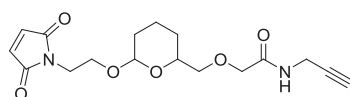


96 (18 mg, 0.021 mmol) was dissolved in a mixture of DMF/DCM (1:1) (1.0 mL) and TEA (8 μL , 0.063 mmol) and **TAMRA-NH₂** (16 mg, 0.027 mmol) were added. The mixture was cooled to 0°C and HBTU (9 mg, 0.023 mmol) was added. The solution was allowed to reach room

temperature and stirred for 16 hours. Reaction crude was purified by preparative HPLC (method 2) without work-up. **TAMRA-Carbamate-(BHQ-2)** (13 mg, 46%) was obtained as a violet-pink solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 8.70 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.29 (dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.86-6.71 (m, 6H), 6.54-6.52 (m, 4H), 5.86 (d, $J = 15.5$ Hz, 2H), 5.81-5.77 (m, 1H), 4.43 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.30 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.73 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.51-3.32 (m, 10H), 3.06 (s, 12H), 2.26 (t, $J = 6.92$ Hz, 2H), 2.19-2.14 (m, 2H), 1.95-1.90 (m, 2H), 1.82-1.76 (m, 4H), 1.39 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 172.9, 167.2, 166.4, 156.7, 155.2, 154.6, 153.9, 152.5, 151.1, 148.6, 147.1, 145.9, 144.6, 144.3, 142.2, 136.8, 133.1, 130.1, 126.5, 124.9, 124.1, 123.7, 123.5, 111.7, 111.3, 109.8, 101.2, 100.3, 97.8, 69.9, 69.1, 57.0, 52.0, 50.3, 40.7, 39.9, 39.4, 38.7, 36.9, 36.5, 36.4, 33.2, 31.5, 29.3, 27.0, 26.5, 23.1; ESI-MS: 1326 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 1325.5982 for $\text{C}_{69}\text{H}_{79}\text{N}_{15}\text{O}_{13}$, found 1325.5962.

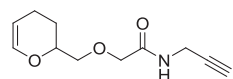
2-((6-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methoxy)-*N*-(prop-2-ynyl)acetamide **100**



pTsOH (6 mg, 0.03 mmol) was added to a cooled solution of **101** (300 mg, 1.44 mmol) in anhydrous DCM (1.2 mL) and the reaction was stirred at 0°C for 5 minutes. Then, a solution of **45** (244 mg, 1.73 mmol) in DCM (1.7 mL) was added dropwise to the solution and the reaction mixture was stirred for additional 3 hours at room temperature. The reaction was quenched with a 1N NaOH solution (1.0 mL) and extracted with DCM (2*10 mL). The organic layers were combined, washed with water (20 mL) and dried over Na_2SO_4 . The crude oil was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc 5:5 to 3:7) to afford **100** (388 mg, 77%) as colorless oil.

Rf: 0.53 (Cyclohexane/EtOAc 3:7); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 7.45 (brs, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.90-4.89 (m, 1H), 4.16-3.91 (m, 5H), 3.87-3.77 (m, 2H), 3.74-3.67 (m, 1H), 3.6 (dd, $J = 4.0, 9.0$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 2.6, 10.1$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 7.1, 10.1$ Hz, 1H), 2.22 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 3H), 1.48-1.44 (m, 1H), 1.37-1.30 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 170.7, 169.8, 134.2, 96.7, 79.9, 75.3, 71.6, 70.6, 68.5, 63.5, 37.7, 29.5, 28.8, 26.9, 17.6; IR (neat): 2929, 1708, 1666, 1592, 1518, 1339, 1098 cm^{-1} ;

2-((3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)methoxy)-*N*-(prop-2-ynyl)acetamide **101**

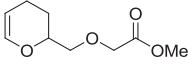


103 (247 mg, 1.44 mmol) was dissolved in DMF (18.00 mL) and DIEA (0.49 mL, 1.72 mmol) was added. The mixture was cooled to 0°C and HBTU (6.52 mg, 1.72 mmol) was added. After 10 minutes, propargylamine (0.11 mL, 1.72 mmol) was added dropwise to the solution and the reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature. The reaction was quenched with saturated NaHCO_3 solution (100 mL) and extracted with EtOAc (3*50 mL). The organic layers were combined, washed with saturated NaHCO_3 solution (100 mL), water (100 mL),

brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated. The crude oil was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc 5:5) to afford pure **101** (214 mg, 71%) as yellow oil.

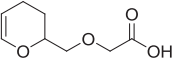
Rf: 0.40 (Cyclohexane/EtOAc 5:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.12 (brs, 1H), 6.38 (td, *J* = 1.6, 6.3 Hz, 1H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.05 (dd, *J* = 2.6, 5.5 Hz, 2H), 4.0 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.64-3.54 (m, 2H), 2.21 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.14-2.05 (m, 1H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 1H), 1.72-1.68 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 169.7, 143.3, 101.0, 79.4, 74.6, 74.0, 71.7, 70.7, 28.8, 24.2, 19.5; IR (neat): 3291, 2921, 1667, 1650, 1523, 1239, 1066 cm⁻¹; ESI-MS: 210 [M+H]⁺. HRMS calcd 209.1052 for C₁₁H₁₅NO, found 209.1050.

methyl 2-((3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)methoxy)acetate **102**

 3,4-dihydro-2H-pyran-2-methanol (0.9 mL, 8.67 mmol) was added dropwise to a suspension of NaH (60% in mineral oil, 0.52 g, 13.00 mmol) in anhydrous THF (100 mL) at 0°C. 30 minutes after addition completion, bromomethyl acetate (1.65 mL, 17.34 mmol) was added dropwise to the reaction mixture. After 3 hours at 0°C, the reaction was quenched with a saturated NH₄Cl solution and THF was removed under reduced pressure. The obtained aqueous solution was extracted twice with DCM (2*100 mL) and the combined organic phases were washed with saturated NaHCO₃ solution (100 mL), water (100 mL), brine (100 mL) and were dried over Na₂SO₄. The crude oil was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc 8:2) to afford **102** (1.13 g, 70%) as colorless oil.

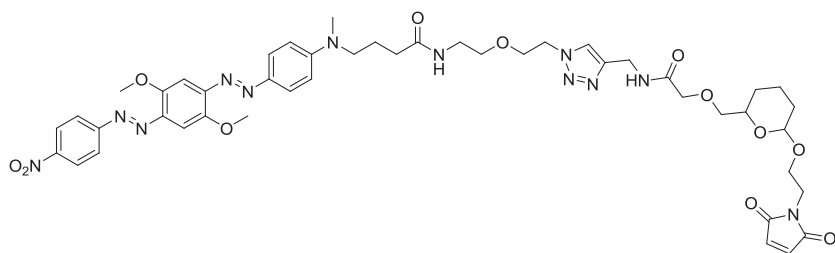
Rf: 0.34 (Cyclohexane/EtOAc 8:2); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 6.34 (td, *J* = 1.6, 6.3 Hz, 1H), 4.67-4.64 (m, 1H), 4.15 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.04-3.98 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.63 (d, *J* = 5.05 Hz, 2H), 2.12-2.02 (m, 1H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.85-1.81 (m, 1H), 1.71-1.61 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ 170.9, 143.5, 100.6, 74.2, 74.1, 68.8, 51.9, 24.4, 19.4; IR (neat) : 2921, 1754, 1734, 1437, 1143, 1067 cm⁻¹.

2-((3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)methoxy)acetic acid **103**

 To a solution of **102** (1.13 g, 6.07 mmol) in MeOH/water (1:1) (5.0 mL) LiOH (145 mg, 6.07 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 hours. The crude was dried by lyophilization to give **103** (1.04 mg, Quant.) as a white solid. The product was used without further purification.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 6.35 (td, *J* = 1.6, 6.3 Hz, 1H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.06-4.00 (m, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.63-3.56 (m, 2H), 2.16-2.08 (m, 1H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.92-1.86 (m, 1H), 1.69-1.61 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-d₄) δ 178.0, 144.4, 102.0, 75.4, 74.3, 72.1, 25.6, 20.4; IR (neat): 2920, 1605, 1429, 1066, cm⁻¹.

4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)-N-(2-(2-(4-((2-((6-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methoxy)acetamido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethyl)butanamide **104**

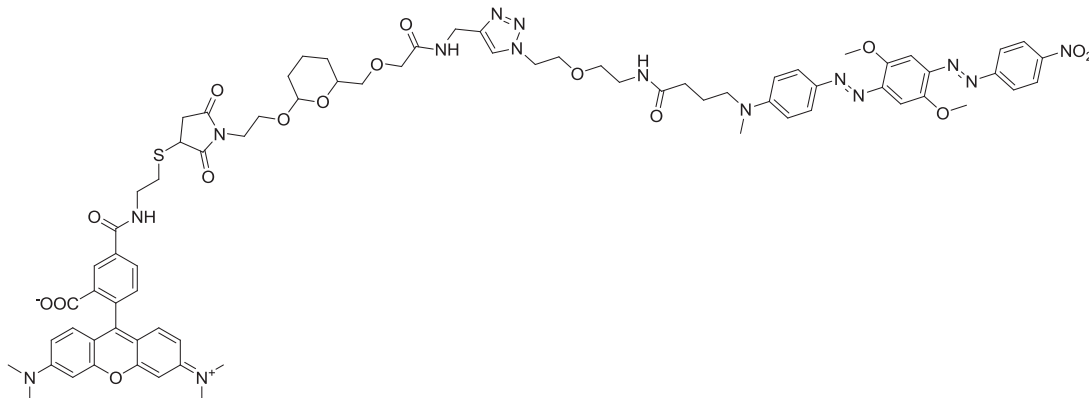


(BHQ-2)-N₃ (131 mg, 0.211 mmol) and **100** (111 mg, 0.317 mmol) were dissolved in a mixture of THF/*t*-BuOH (1:1) (10.0 mL). When solution was completed, water (5.0

mL), copper(II) sulfate pentahydrate (16 mg, 0.063 mmol) and sodium ascorbate (25 mg, 0.126 mmol) were added successively to the reaction mixture which was heated by microwave irradiation to 50°C for 1 hour. The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting aqueous solution was extracted with DCM (50 mL). The organic layer was then washed with water (20 mL) and dried over Na₂SO₄. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (1:0 EtOAc then DCM/MeOH 95:5) to yield **104** as a violet solid (151 mg, 74%).

Rf: 0.56 (DCM/MeOH 95:5); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 8.33 (d, *J* = 9.00 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 9.00 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 9.30 Hz, 2H), 7.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 9.30 Hz, 2H), 6.69-6.68 (m, 2H), 6.30 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.58-4.48 (m, 2H), 4.45 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 3.78-3.71 (m, 5H), 3.66-3.63 (m, 1H), 3.51-3.45 (m, 5H), 3.40-3.33 (m, 4H), 3.06 (s, 3H), 2.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.80-1.30 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ 172.5, 170.9, 170.4, 156.6, 153.8, 152.4, 151.1, 148.5, 147.0, 145.0, 144.6, 142.2, 134.3, 126.4, 124.9, 123.8, 123.7, 111.6, 101.2, 100.2, 96.9, 75.3, 70.8, 70.0, 69.1, 68.4, 63.3, 57.0, 51.9, 50.2, 39.4, 38.6, 37.7, 34.8, 33.11, 29.4, 27.0, 23.0, 17.6; IR (neat) : 2925, 1709, 1659, 1593, 1518, 1098 cm⁻¹; ESI-MS: 991 [M+Na]⁺. HRMS calcd 968.4141 for C₄₆H₅₆N₁₂O₁₂, found 968.4141.

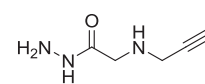
4-(2-(1-(2-(6-((2-((1-(2-(2-(4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanamido)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylamino)-2-oxoethoxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-ylthio)ethylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate
TAMRA-THP-(BHQ-2) or **105**



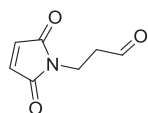
TAMRA-SH (14 mg, 0.028 mmol) was dissolved in degassed anhydrous MeOH (1.8 mL) and TEA (9 μ L) was added. Then, **104** (21 mg, 0.022 mmol) in DCM (1.8 mL) was added to the solution and the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was dissolved in DMSO (1.0 mL), purified by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to afford the desired **TAMRA-THP-(BHQ-2)** (20 mg, 66%) as a dark fluffy violet-pink solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.99 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.44-8.42 (m, 3H), 8.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.09-8.05 (m, 3H), 7.90 (s, 1H), 7.86 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.52-6.45 (m, 6H), 4.71 (s, 1H), 4.48 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.36 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.77 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.67-3.36 (m, 12H), 3.28-3.17 (m, 3H), 3.05 (s, 4H), 2.93 (s, 13H), 2.57-2.54 (m, 1H), 2.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.81-1.77 (m, 2H), 1.66-1.41 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 176.6, 176.5, 171.7, 169.1, 168.3, 164.8, 155.7, 154.9, 153.1, 152.1, 152.0, 151.9, 150.3, 148.1, 146.2, 144.5, 143.5, 141.3, 135.2, 134.4, 128.3, 126.9, 125.7, 125.1, 124.2, 123.4, 123.2, 123.1, 111.5, 109.0, 105.5, 100.7, 100.0, 98.0, 95.7, 95.6, 74.1, 70.1, 68.8, 68.4, 67.6, 67.5, 61.8, 61.7, 56.5, 56.4, 51.2, 49.2, 38.3, 38.2, 38.0, 35.8, 35.7, 33.8, 32.1, 30.3, 30.2, 29.0, 28.9, 28.7, 26.5, 22.4, 17.0; ESI-MS: 1458 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 1457.5863 for $\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{N}_{15}\text{O}_{16}\text{S}$, found 1457.5862

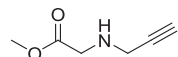
2-(prop-2-ynylamino)acetohydrazide **105**

 Compound **107** (155 mg, 1.22 mmol) was dissolved in MeOH (25 mL) and hydrazine monohydrate (1.19 mL, 24 mmol) was added to the reaction mixture which was stirred for 3 hours at room temperature. Solvents were removed *in-vacuo* and **105** (151 mg, 98%) was obtained a yellow oil and without further purification.

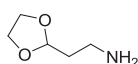
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 3.36 (s, 2H), 3.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.2 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H).

3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanal 106

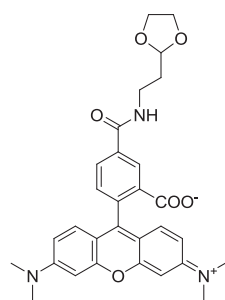
This compound was synthesized following a reported protocol.¹⁹⁷

N-Propargyl-glycine methyl ester 107

This compound was synthesized following a reported protocol.²²¹

2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethanamine 110

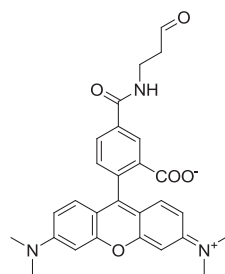
This compound was synthesized according to the described procedure.²²²

5-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate 111

111 was synthesized according to the general procedure C. **5-TAMRA** (81 mg, 0.189 mmol) reacted with **110** (35 mg, 0.264 mmol) to give **111** as a fluffy pink solid (88 mg, 88%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.68 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 1.8, 8.0 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.96 (dd, *J* = 2.4, 9.4 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 4.91 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.94-3.90 (m, 2H), 3.81-3.77 (m, 2H), 3.52 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.21 (s, 12H), 1.95 (dt, *J* = 4.5, 7.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ

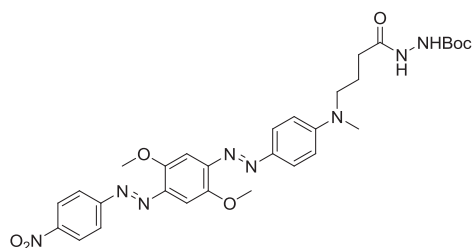
168.1, 167.5, 160.2, 159.2, 159.1, 138.2, 138.0, 133.0, 132.4, 132.1, 131.4, 115.7, 114.9, 104.3, 97.6, 66.2, 41.1, 36.8, 34.4; IR (neat): 2930, 1646, 1594, 1408, 1346, 1186 cm⁻¹; HRMS calcd 529.2213 for C₃₀H₃₁N₃O₆, found 529.2207.

2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-5-(3-oxopropylcarbamoyl)benzoate 112

111 (19 mg, 0.035 mmol) was dissolved in dioxane (0.7 mL) and concentrated HCl solution (0.3 mL) was added. The reaction was stirred at room temperature for 16 hours and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DMSO (1.0 mL), purified by preparative HPLC (method 1) and lyophilized to afford the desired **112** as a fluffy pink solid (12 mg, 70%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.74 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.99 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 8.27 (dd, *J* = 1.8, 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.00-6.92 (m, 6H), 3.63 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.24 (s, 12H), 2.75 (dt, *J* = 1.8, 6.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 202.2, 164.7, 144.4, 135.7, 130.5, 130.4, 130.3, 114.7, 111.4, 101.6, 96.4, 43.0, 40.3, 33.6, HRMS calcd 485.1951 for C₂₈H₂₇N₃O₅, found 485.1951.

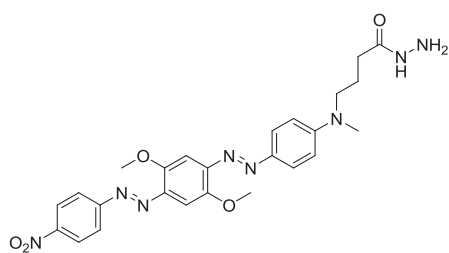
tert-butyl 2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanoyl)hydrazinecarboxylate **113**



113 was synthesized according to the general procedure D. **BHQ-2** (115 mg, 0.227 mmol) reacted with *t*-butyl carbazate (45 mg, 0.34 mmol) to give **113** as a dark violet solid (112 mg, 80%).

Rf: 0.41 (DCM/MeOH 95:5); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 8.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.9 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.50 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.04-1.97 (m, 2H), 1.64 (brs, 2H), 1.46 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 172.0, 156.7, 153.8, 152.3, 151.2, 148.6, 147.0, 144.8, 142.3, 126.4, 124.9, 123.7, 111.7, 101.2, 100.3, 82.2, 57.0, 57.1, 51.7, 38.8, 30.9, 28.4, 22.7; IR (neat) : 3254, 1717, 1595, 1519, 1489, 1366, 1244, 1156 cm^{-1} ; ESI-MS: 620 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 620.2707 for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_7$, found 620.2709.

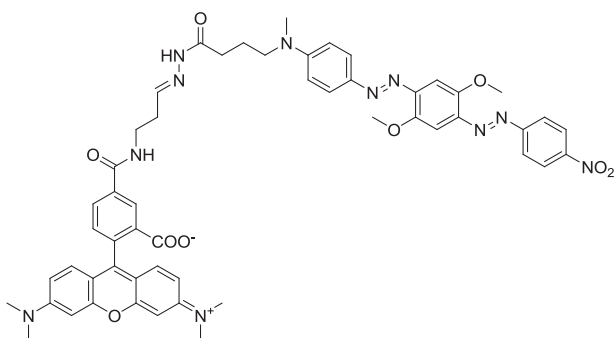
4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((*E*)-(4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanehydrazide **114**



113 (102 mg, 0.164 mmol) was dissolved in DCM (4.0 mL) and 4N HCl in dioxane (2.0 mL) was added. The reaction was stirred at room temperature for 4 hours and the solvents were removed under reduced pressure. The resulting residue was extracted with DCM (20 mL), the organic layer was washed with saturated NaHCO_3 solution (50 mL), water (50 mL) and dried over Na_2SO_4 .

114 was obtained as a dark violet solid and directly engaged in the next step without further purification.

5-(3-(2-(4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methyl)amino)butanoyl)hydrazono)propylcarbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** or **115**

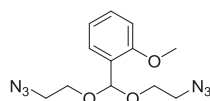


A solution of **112** (12 mg, 0.023 mmol) in anhydrous EtOH (0.7 mL) was added to a solution of **114** (9.3 mg, 0.018 mmol) in anhydrous DCM (0.7 mL). The reaction was stirred for 20 hours at room temperature. Then the solvents were removed under reduced pressure and the residue was dissolved in DMSO (1.0 mL), purified by preparative HPLC (method 2) and

lyophilized to afford the desired **TAMRA-Acylhydrazone-(BHQ-2)** (7.6 mg, 43%) as a fluffy violet-pink solid.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.07 (s, 1H, minor isomer 43%), 10.90 (s, 1H, major isomer, 57%), 8.95-8.89 (m, 1H), 8.44-8.42 (m, 3H), 8.23-8.20 (m, 1H), 8.05 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.79 (dd, $J = 4.3, 9.00$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H minor isomer 43%), 7.43 (s, 1H), 7.38-7.32 (m, 3H include major isomer of one proton), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.55-6.45 (m, 6H), 3.99 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.55-3.43 (m, 4H), 3.05 (s, 3H minor isomer 43%), 3.03 (s, 3H major isomer 57%), 2.93 (s, 12H), 2.20 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.87-1.77 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.2, 168.2, 167.7, 164.8, 164.7, 155.7, 153.0, 152.0, 150.3, 150.2, 148.0, 147.9, 146.1, 146.2, 144.8, 143.5, 143.4, 141.4, 141.3, 136.1, 136.0, 134.3, 128.4, 125.7, 125.1, 123.5, 122.0, 111.5, 109.1, 100.7, 99.9, 97.9, 56.4, 56.3, 51.2, 51.1, 38.2, 38.1, 36.9, 36.7, 32.3, 32.0, 30.8, 29.0, 22.1, 21.3; HRMS calcd 987.4028 for $\text{C}_{53}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_9$, found 987.4042.

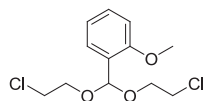
1-(bis(2-azidoethoxy)methyl)-2-methoxybenzene **116**



117 (710 mg, 2.55 mmol) was dissolved in DMF (4.0 mL) and sodium azide (827 mg, 12.72 mmol) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at 80°C for 16 hours. After cooling, the reaction mixture was extracted with hexane three times (3×5 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL) and dried over Na_2SO_4 . After evaporation, **118** (194 mg, 26%) was obtained as yellow oil.

^1H NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{CN-}d_3$) δ 7.53 (dd, $J = 1.8, 7.7$ Hz, 1H), 7.35 (dt, $J = 1.8, 7.7$ Hz, 1H), 7.01-6.96 (m, 2H), 5.87 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.78-3.66 (m, 4H), 3.40-3.37 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{CD}_3\text{CN-}d_3$) δ 131.1, 128.1, 121.1, 118.3, 112.1, 98.7, 66.3, 56.4, 51.8; HRMS calcd 292.1284 for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$, found 292.1276.

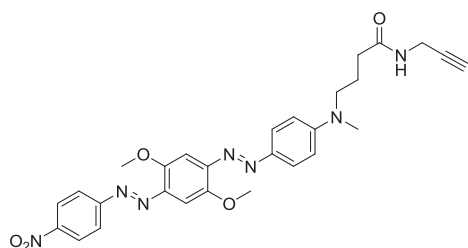
1-(bis(2-chloroethoxy)methyl)-2-methoxybenzene **117**



Starting from 2-anisaldehyde, **117** was synthesized as described for 4-anisaldehyde.²²³ 2-Chloroethanol (8.30 mL, 123 mmol), 2-anisaldehyde (6.98 g, 51.3 mmol), benzene (25 mL), and *p*-toluenesulfonic acid (10 mg, 0.05 mmol) were mixed and heated to reflux for 16 hours. The water formed was removed by a Dean-Stark trap. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched using a solution of sodium methoxide (0.1 g) in methanol (2 mL). The solvent was removed and the crude was purified using a Kugelrohr distillation apparatus. **117** (5.54 g, 40%) was obtained as oil.

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) δ 7.57 (dd, $J = 1.8, 7.7$ Hz, 1H), 7.31 (ddd, $J = 1.8, 7.7, 8.3$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.93 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (dt, $J = 2.3, 5.8$ Hz, 1H), 3.62 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) δ 130.2, 127.6, 120.5, 110.9, 97.5, 66.2, 55.8, 43.1.

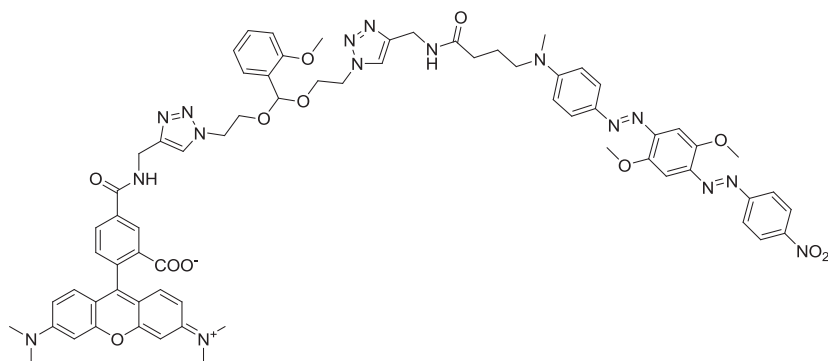
4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)-N-(prop-2-ynyl)butanamide (**BHQ-2**)-Alcyne or **118**



(**BHQ-2**)-Alcyne was synthesized according to the general procedure D. **BHQ-2** (138 mg, 0.272 mmol) reacted with propargylamine (22 mg, 0.408 mmol) to give (**BHQ-2**)-Alcyne as a dark violet solid (111 mg, 75%).

Rf: 0.43 (DCM/MeOH 95:5); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.31 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.81 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.87 (dd, $J = 2.4, 5.5$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.19 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.84-1.77 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.0, 155.6, 152.8, 151.9, 150.2, 147.9, 146.3, 143.4, 141.5, 128.5, 125.2, 124.5, 123.0, 111.2, 101.3, 100.8, 80.9, 72.0, 56.7, 50.9, 37.7, 27.5, 22.1; ESI-MS: 544 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS calcd 543.2230 for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_5$, found 543.2229.

5-((1-(2-((2-4-((4-((2,5-dimethoxy-4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)diazenyl)phenyl)(methylamino)butanamido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)(2-methoxyphenyl)methoxy ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylcarbonyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** or **119**



(**BHQ-2**)-Alcyne (37 mg, 0.068 mmol) and **TAMRA-Alcyne** (32 mg, 0.068 mmol) were dissolved in a mixture of THF/DMSO (1:1) (1.0 mL). When solution was completed water (0.5 mL), copper(II) sulfate

pentahydrate (7 mg, 0.027 mmol) and sodium ascorbate (11 mg, 0.054 mmol) were added successively to the reaction mixture which was stirred at room temperature for 3 hours. The crude was diluted with DMSO (0.5 mL), purified directly by preparative HPLC (method 2) and lyophilized to afford the desired **TAMRA-Acétal-(BHQ-2)** (8 mg, 10%) as a fluffy violet-pink solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.40 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.36 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.24 (dd, $J = 1.8, 8.0$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.86-6.82 (m, 3H), 6.51-6.44 (m, 6H), 5.68 (s, 1H), 4.56 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.48-4.39 (m, 4H), 4.29 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.70-3.63 (m, 7H), 3.46-3.42 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.93 (s, 12H), 2.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.83-1.76 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 164.6, 156.5, 155.7, 153.0, 152.2, 152.1, 152.0, 150.3, 148.1, 146.1, 144.8, 144.7, 143.4, 141.3, 135.7, 134.4, 131.6, 129.9, 128.6, 128.3, 126.6, 125.7, 125.2, 125.1, 123.5, 123.4, 123.0, 119.8, 111.5,

111.1, 109.0, 100.7, 100.0, 97.9, 96.6, 64.1, 64.0, 56.4, 56.3, 55.4, 51.1, 49.4, 49.3, 38.2, 35.0, 34.1, 32.0, 22.4; HRMS calcd 1302.5359 for C₆₈H₇₀N₁₆O₁₂, found 1302.5358.

Biological procedures

Cell culture and imaging (preliminary studies, section II): Huh7 cells (human hepatoma cell line) were incubated with dyes at a final concentration of 100 μM in culture medium (Dubelco's modified Eagle Medium 4.5 g/L glucose supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptavidin) for 4 hours at 37°C, 5% CO₂. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) solution and incubated with dithionite at a final concentration of 10 mM in Hank's buffered salt solution (HBSS) for 15 minutes at room temperature. The cells were washed again with PBS and incubated with 1.5% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature in order to achieve cell fixation, followed by optical fluorescence microscopy imaging. **Fluorescence imaging:** Fluorescence images were recorded with an inverted microscope (Leica DMIRE2, Leica Microsystems) equipped with a Black & White CCD Camera (Photometrics CoolSnap Fx) and controlled by image acquisition software (MetaMorph, Molecular Devices Corp.). A dry objective HCX PL Fluotar 40X/0.60 CORR PH and Leica CFP Filter (excitation 436/20 nm, Dichroic mirror 455 nm, emission 480/40 nm) were used.

MTT assay: In vitro cytotoxicity was measured using an MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The experiments were performed in 96-well plates with HaCaT cells grown to confluence in culture media (RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum and 1 mM Glutamin, 200 μl per well). Cells were incubated with chemical reagent at different concentrations (100 μM to 10 mM) at 37°C for 24 hours. After incubation of the treated cells, the supernatant was replaced with fresh culture media containing MTT (300 μg/ml). After 2 hours of incubation at 37 °C, the media was carefully removed and 100 μL of DMSO were added to solubilize the formazan crystals generated by mitochondrial enzymes-induced reduction of the MTT. The absorbance was measured at 595 nm using a microplate spectrophotometric reader (Synergy HT, Biotek). The cell viabilities were expressed as percent of untreated control cells.

Cell culture (section IV): Mice liver BNL CL.2 cells were grown in Dulbecco's MEM medium with 1 g/L glucose (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Perbio, Brebieres, France), 2 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (Eurobio). Cells were maintained in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C.

Fluorescence imaging: 24 hours prior to experiment, 2.5x10⁴ BNL CL.2 cells were seeded per well in 8-well Lab-Tek II Chambered coverglass plates (ref 155409, Nunc, Naperville, IL, USA). The fluorescent probes were diluted up to 300 μL in MEM complete medium and then added onto the cells for a defined amount of time. After experiment completion the cells were washed twice with MEM and were incubated with a 5 μg/mL of Hoechst 33258 (ref H1399,

Invitrogen) solution and a 100 nM LysoTracker green DND-26 solution (ref L7526, Invitrogen). After washing with 10% FBS red phenol free Eagle's MEM medium cells images were acquired on a confocal Leica TSC SPE II microscope (405, 488, or 561 nm) and controlled by image acquisition software (Leica confocal LAS AF, Leica). Two different objectives were used: HXC PL APO 20x/0.7 CS and HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS.

Cytometry: 24h before the experiment, BNL CL.2 cells were seeded in 96-plates (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) at 2.0×10^4 cells/well in Dulbecco's MEM complete medium. Cells were grown with or without 200 μ M chloroquine (SIGMA, St Louis, MO, USA) for 2 hours. The dyes were prepared at 1 μ M in Dulbecco's MEM complete medium in presence or absence of 200 μ M chloroquine and added onto cells for different defined amounts of times. After washing with PBS (Eurobio), 5 min incubation with 40 μ l trypsin, and addition of 160 μ l of PBS EDTA 5 mM, the cells were analyzed by flow cytometry on a PCA-96 Guava cytometer (Guava Technologies Merck Millipore, Billerica, MA, USA) with a green laser (excitation at 532 nm and emission at 580-583 nm).

In-vivo experiments: Experiments were performed on nude mice bearing solid tumors. C6 Rat glioma cells (3.10^6) were used for subcutaneous transplantation of gliomas. Thus prepared gliomas were used 24-29 days after inoculation. The dyes were administrated by intravenous or intratumoral injections (1 mM, 100 μ L ion PBS). Fluorescence kinetics were recorded on a NightOWL LB 983 (Berthold Technologies) with excitation at 530 nm and emission at 600 nm. After the kinetics were completed, the mice were sacrificed and dissected in order to acquire fluorescence images of organs and tumors. For control experiment tumor homogenate was prepared and treated with HCl solution (2M) to reveal inactivated probes.

Bibliographie

- (1) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- (2) Leriche, G.; Chisholm, L.; Wagner, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *20*, 571-582.
- (3) Cravatt, B. F.; Wright, A. T.; Kozarich, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383-414.
- (4) Rix, U.; Superti-Furga, G. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616-624.
- (5) Budin, G.; Dimala, M. M.; Lamour, V.; Oudet, P.; Mioskowski, C.; Meunier, S.; Brino, L.; Wagner, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 79-82.
- (6) Leriche, G.; Budin, G.; Brino, L.; Wagner, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 4360-4364.
- (7) Budin, G.; Moune-Dimala, M.; Leriche, G.; Saliou, J.-M.; Papillon, J.; Sanglier-Cianféran, S.; Van Dorsselaer, A.; Lamour, V.; Brino, L.; Wagner, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2359-2361.
- (8) Bayer, E. A.; Wilchek, M. *J. Chromatogr. A* **1990**, *510*, 3-11.
- (9) Budin, G. Synthèse et étude d'outils moléculaires pour la protéomique, University of Strasbourg, 2010.
- (10) Hirsch, J. D.; Eslamizar, L.; Filanoski, B. J.; Malekzadeh, N.; Haugland, R. P.; Beechem, J. M.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 343-357.
- (11) Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3382-3387.
- (12) Howarth, M.; Chinnapen, D. J.-F.; Gerrow, K.; Dorrestein, P. C.; Grandy, M. R.; Kelleher, N. L.; El-Husseini, A.; Ting, A. Y. *Nat. Meth.* **2006**, *3*, 267-73.
- (13) Babé, L. M.; Craik, C. S. *Cell* **1997**, *91*, 427-430.
- (14) Speers, A. E.; Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018-10019.
- (15) Dieterich, D. C.; Lee, J. J.; Link, A. J.; Graumann, J.; Tirrell, D. A.; Schuman, E. M. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 532-540.
- (16) Zhou, H.; Ranish, J. A.; Watts, J. D.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 512-515.
- (17) Olejnik, J.; Sonar, S.; Krzymańska-Olejnik, E.; Rothschild, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7590-7594.
- (18) Thiele, C.; Fahrenholz, F. *Anal. Chem.* **1994**, *218*, 330-337.
- (19) Wang, Z.; Udeshi, N. D.; O'Malley, M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Hart, G. W. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 153-160.
- (20) Bongo, N. B.; Tomohiro, T.; Hatanaka, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 80-82.
- (21) Gartner, C. A.; Elias, J. E.; Bakalarski, C. E.; Gygi, S. P. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1482-1491.
- (22) Marie, J.; Seyer, R.; Lombard, C.; Desarnaud, F.; Aumelas, A.; Jard, S.; Bonnafous, J. C. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8943-8950.

- (23) Shimkus, M.; Levy, J.; Herman, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2593-2597.
- (24) Abdella, P. M.; Smith, P. K.; Royer, G. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 734-742.
- (25) Jahng, W. J.; David, C.; Nesnas, N.; Nakanishi, K.; Rando, R. R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6159-6168.
- (26) Geurink, P. P.; Florea, B. I.; Li, N.; Witte, M. D.; Verasdonck, J.; Kuo, C.-L.; Van Der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6802-6805.
- (27) Van Der Veken, P.; Dirksen, E. H. C.; Ruijter, E.; Elgersma, R. C.; Heck, A. J. R.; Rijkers, D. T. S.; Slijper, M.; Liskamp, R. M. J. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2271-2280.
- (28) Szychowski, J.; Mahdavi, A.; Hodas, J. J. L.; Bagert, J. D.; Ngo, J. T.; Landgraf, P.; Dieterich, D. C.; Schuman, E. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351-18360.
- (29) Park, J.-J.; Sadakane, Y.; Masuda, K.; Tomohiro, T.; Nakano, T.; Hatanaka, Y. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 814-818.
- (30) Yokoshima, S.; Abe, Y.; Watanabe, N.; Kita, Y.; Kan, T.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Fukuyama, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6869-6871.
- (31) Sturm, M.; Leitner, A.; Lindner, W. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 211-217.
- (32) Fasold, H.; Klappenberger, J.; Meyer, C.; Remold, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 795-801.
- (33) Jaffe, C. L.; Lis, H.; Sharon, N. *Biochemistry* **1980**, *19*, 4423-4429.
- (34) Denny, J.; Blobel, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5286-5290.
- (35) Verhelst, S. H. L.; Fonović, M.; Bogyo, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 1284-1286.
- (36) Fonović, M.; Verhelst, S. H. L.; Sorum, M. T.; Bogyo, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761-1770.
- (37) Yang, Y.-Y.; Ascano, J. M.; Hang, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3640-3641.
- (38) Rangan, K. J.; Yang, Y. Y.; Charron, G.; Hang, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 465-473.
- (39) Yount, J. S.; Moltedo, B.; Yang, Y.-Y.; Charron, G.; Moran, T. M.; López, C. B.; Hang, H. C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 610-614.
- (40) Grammel, M.; Zhang, M. M.; Hang, H. C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5970-5974.
- (41) Landi, F.; Johansson, C. M.; Campopiano, D. J.; Hulme, A. N. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56-59.
- (42) Yang, Y.-Y.; Grammel, M.; Raghavan, A. S.; Charron, G.; Hang, H. C. *Chemistry & Biology* **2010**, *17*, 1212-1222.

- (43) Shiu, H.-Y.; Chan, T.-C.; Ho, C.-M.; Liu, Y.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3839-3850.
- (44) Dirksen, A.; Yegneswaran, S.; Dawson, P. E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 2023-2027.
- (45) Park, K. D.; Liu, R.; Kohn, H. *Chemistry & Biology* **2009**, *16*, 763-772.
- (46) Klement, E.; Lipinszki, Z.; Kupihár, Z.; Udvardy, A.; Medzihradsky, K. F. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2200-2206.
- (47) Foettinger, A.; Melmer, M.; Leitner, A.; Lindner, W. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1678-1683.
- (48) Khalid, A.; Arshad, M.; Crowley, D. E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 361-369.
- (49) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- (50) Hooker, J. M.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718-3719.
- (51) Schlick, T. L.; Ding, Z.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718-3723.
- (52) Zbaida, S.; Levine, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *260*, 554-561.
- (53) Higgins, N. P.; Peebles, C. L.; Sugino, A.; Cozzarelli, N. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 1773-1777.
- (54) Reece, R. J.; Maxwell, A. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1399-1405.
- (55) Dieterich, D. C.; Link, A. J.; Graumann, J.; Tirrell, D. A.; Schuman, E. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9482-9487.
- (56) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. a; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19-24.
- (57) Weissleder, R.; Mahmood, U. *Radiology* **2001**, *219*, 316-333.
- (58) Fowler, J. S.; Wolf, A. P. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 181-188.
- (59) Phelps, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9226-9233.
- (60) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620-2640.
- (61) Weissleder, R.; Tung, C. H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 375-378.
- (62) Funovics, M.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 956-963.
- (63) Urano, Y.; Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 104-109.
- (64) Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6696-6697.

- (65) Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10324-10325.
- (66) Medvedeva, N.; Martin, V. V.; Weis, A. L.; Likhtenshten, G. I. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, *163*, 45-51.
- (67) Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3918-3929.
- (68) Shiraishi, Y.; Sumiya, S.; Hirai, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4953-4955.
- (69) Kawaguchi, M.; Okabe, T.; Okudaira, S.; Hanaoka, K.; Fujikawa, Y.; Terai, T.; Komatsu, T.; Kojima, H.; Aoki, J.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12021-12030.
- (70) Pham, W.; Choi, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1403-1407.
- (71) Pham, W.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3659-3662.
- (72) Law, B.; Curino, A.; Bugge, T. H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 99-106.
- (73) Leriche, G.; Budin, G.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S.; Wagner, A. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3224-3226.
- (74) Stryer, L. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- (75) Marras, S. A. E. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *335*, 3-16.
- (76) Johansson, M. K. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *335*, 17-29.
- (77) Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4953-4958.
- (78) Tung, C.-H. *Peptide Science* **2004**, *76*, 391-403.
- (79) Biswas, P.; Cella, L. N.; Kang, S. H.; Mulchandani, A.; Yates, M. V.; Chen, W. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5259-5261.
- (80) Redy, O.; Kisin-Finifer, E.; Sella, E.; Shabat, D. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 710-715.
- (81) Cha, E.-J.; Jang, E. S.; Sun, I.-C.; Lee, I. J.; Ko, J. H.; Kim, Y. I.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Ahn, C.-H. *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 152-158.
- (82) Debunne, M.; Portal, C.; Delest, B.; Brakenhielm, E.; Lallemand, F.; Henry, J.-P.; Ligeret, H.; Noack, P.; Massonneau, M.; Romieu, A.; Renard, P.-Y.; Thuillez, C.; Richard, V. *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, *2011*, 413290.
- (83) Mawn, T. M.; Popov, A. V.; Beardsley, N. J.; Stefflova, K.; Milkevitch, M.; Zheng, G.; Delikatny, E. J. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2434-2443.
- (84) Popov, A. V.; Mawn, T. M.; Kim, S.; Zheng, G.; Delikatny, E. J. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1724-1727.

- (85) Texier, I.; Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Coll, J.; Rizo, P. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **2007**, *571*, 165-168.
- (86) Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-hui; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
- (87) Pullেলা, P. K.; Chiku, T.; Carvan, M. J.; Sem, D. S. *Anal. Chem.* **2006**, *352*, 265-273.
- (88) Shiu, H.-Y.; Chong, H.-C.; Leung, Y.-C.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3308-3313.
- (89) Liu, C.; Pan, J.; Li, S.; Zhao, Y.; Wu, L. Y.; Berkman, C. E.; Whorton, A. R.; Xian, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 10327-10329.
- (90) Kadirvel, M.; Gbaj, a; Mansell, D.; Miles, S.; Arsic, B.; Bichenkova, E.; Freeman, S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5598-5603.
- (91) Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J.-X.; Low, P. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462-468.
- (92) Singer, V. L.; Haugland, R. P. *U.S. Patent 6323337*, 2001.
- (93) Tyagi, S.; Marras, S. a; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- (94) Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.
- (95) Li, J. J.; Fang, X.; Tan, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 31-40.
- (96) Bernacchi, S.; Mély, Y. *Nucleic Acid Res.* **2001**, *29*, E62-2.
- (97) Crisalli, P.; Kool, E. T. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2345-2354.
- (98) Cook, R. M.; Lyttle, M.; Dick, D. *U.S. Patent 0092679*, 2011.
- (99) McIntyre, J. C.; Sleight, R. G. *Biochemistry* **1991**, *30*, 11819-11827.
- (100) Bergen, J. M.; Kwon, E. J.; Shen, T. W.; Pun, S. H. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 377-384.
- (101) Paquet-Durand, F.; Bicker, G. *Brain Res.* **2004**, *1011*, 33-47.
- (102) Johansen, D.; Cruciani, V.; Sundset, R.; Mikalsen, S.-O. *Cellular Physiol. Biochem.* **2011**, 103-114.
- (103) Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Oushiki, D.; Nakamura, T.; Kajimura, M.; Suematsu, M.; Nishimatsu, H.; Yamane, T.; Terai, T.; Hirata, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15846-15848.
- (104) An, H.; Qian, Y.; Gu, X.; Tang, W. Z. *Chemosphere* **1996**, *33*, 2533-2542.
- (105) Fieser, L. F. *Org. Synth., Collect. Vol.* **1943**, *2*, 33.
- (106) Hodgson, H. H.; Ward, E. R. *J. Chem. Soc.* **1947**, 327-331.
- (107) Cadogan, J. I. G. *Synthesis* **1969**, *1969*, 11-17.
- (108) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chem. Act.* **1919**, *2*, 635-646.
- (109) Shashoua, V. E. *Biochemistry* **1964**, *3*, 1719-1720.

- (110) Todd, D. *Org. React.* **1948**, *4*, 378–422.
- (111) Zhang, C.-R.; Wang, Y.-L. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 4205-4208.
- (112) Rüegg, U. T.; Rudinger, J. *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 111–116.
- (113) Cleland, W. W. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480-482.
- (114) Chakravarthi, S.; Jessop, C. E.; Bulleid, N. J. *EMBO reports* **2006**, *7*, 271-275.
- (115) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (116) Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 306-313.
- (117) Belenky, P.; Bogan, K. L.; Brenner, C. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 12-9.
- (118) Johns, R. B.; Markham, K. R. *J. Chem. Soc.* **1962**, 3712-3717.
- (119) Turner, W. R.; Stock, J. T.; Singh, K.; Banerji, N. N.; Hill, J. A.; Le Quesne, W. J.; Marquardt, F.-H.; Bonnett, R.; Gale, I. A. D.; Stephenson, G. F.; Cotter, J. L.; Mammi, M.; D'Angeli, F.; Bezzi, S.; Puranik, G. S.; Rajagopal, S.; El Khadem, H.; El-Shafei, Z. M.; Meshreki, M. H.; Morrison, D. C.; Downer, J. D.; Colchester, J. E.; Robinson, S. D.; Shaw, B. L.; Brown, D. J.; England, B. T.; Mongkolsuk, S.; Sdarwonvivat, C.; Banister, A. J.; Greenwood, N. N.; Hewgill, F. R.; Hewitt, D. G.; Brewis, S.; Dent, W. T.; Smith, R. D.; Bolton, R.; Badar, Y.; Ling, C. C. K.; Cooke, A. S.; Harris, M. M.; Smith, D. C. C.; Steere, D. E.; Newbold, B. T.; LeBlanc, R. P.; Bell, F.; Buck, K. R.; Holliday, A. K.; Jessop, G. N.; Taylor, F. B.; Birch, A. J.; Siddall, J. B.; Cunningham, J.; Gigg, R.; Selby, K.; Cantley, M.; Holker, J. R.; Hough, L.; Hepworth, J. D.; Tittensor, E.; Brown, D. H.; Dixon, K. R.; Kemmitt, R. D. W.; Sharp, D. W. A.; Jones, D. M.; Wood, N. F.; Dixon, A. F. G.; Martin-Smith, M.; Subramanian, G.; van Es, T. *J. Chem. Soc.* **1965**, 1511-1564.
- (120) Hudlicky, M. *Reductions in Organic Chemistry, Second Edition.*; Society, A. C., Ed.; 1996.
- (121) Ayling, E. E.; Gorvin, J. H.; Hinkel, L. E. *J. Chem. Soc.* **1942**, 755-758.
- (122) Smith, L. I.; Opie, J. W. *Org. Synth., Collect. Vol.* **1955**, *3*, 56.
- (123) Olaya, A. J.; Ge, P.; Gonthier, J. F.; Pechy, P.; Corminboeuf, C.; Girault, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12115-12123.
- (124) Oakes, J.; Gratton, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2563-2568.
- (125) Danehy, J. P.; Zubritsky, C. W. *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 391-395.
- (126) Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 2869-2872.
- (127) *Drug Delivery: Principles and Applications*; Wang, B.; Siahaan, T. J.; Soltero, R., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2005.
- (128) Zhu, M.; Ma, L.; Zhang, D.; Ray, K.; Zhao, W.; Humphreys, W. G.; Skiles, G.; Sanders, M.; Zhang, H. *Drug. Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1722-1733.

- (129) Zhang, H.; Zhang, D.; Ray, K.; Zhu, M. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 999-1016.
- (130) Feener, E. P.; Shen, W. C.; Ryser, H. J. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18780-18785.
- (131) Bridger, G. J.; Abrams, M. J.; Padmanabhan, S.; Gaul, F.; Larsen, S.; Henson, G. W.; Schwartz, D. A.; Longley, C. B.; Burton, C. A.; Ultee, M. E. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 255-264.
- (132) Austin, C. D.; Wen, X.; Gazzard, L.; Nelson, C.; Scheller, R. H.; Scales, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17987-17992.
- (133) Razgulin, A.; Ma, N.; Rao, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4186-4216.
- (134) Hollender, J.; Hopp, J.; Dott, W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4567-4572.
- (135) Sanderson, R. J.; Hering, M. A.; James, S. F.; Sun, M. M. C.; Doronina, S. O.; Siadak, A. W.; Senter, P. D.; Wahl, A. F. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 843-852.
- (136) Fleige, E.; Quadir, M. A.; Haag, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, in press.
- (137) Bildstein, L.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 3-23.
- (138) Warbrug, O. *Science* **1956**, *124*, 267-272.
- (139) Bartrons, R.; Caro, J. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 223-229.
- (140) Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373-4384.
- (141) Tian, L.; Bae, Y. H. *Collo. Surf. B: Biointer.* **2011**, in press.
- (142) Gatenby, R. A.; Gawlinski, E. T. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3847-3854.
- (143) Ivanovic, Z. *J. Cell Physiol.* **2009**, *219*, 271-275.
- (144) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- (145) Ulbrich, K.; Subr, V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1023-1050.
- (146) Jain, R.; Standley, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457.
- (147) Heller, J.; Barr, J.; Ng, S. Y.; Schwach, K.; Gurny, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1015-1039.
- (148) Santi, D. V.; Schneider, E. L.; Reid, R.; Robinson, L.; Ashley, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6211-6216.
- (149) Johansen, M.; Bundgaard, H. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 1294-1298.
- (150) Buur, A.; Bundgaard, H. *Int. J. Pharm.* **1984**, *18*, 325-334.
- (151) Kong, S. D.; Luong, A.; Manorek, G.; Howell, S. B.; Yang, J. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 293-296.
- (152) Luong, A.; Issarapanichkit, T.; Kong, S. D.; Fong, R.; Yang, J. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5105-5109.
- (153) Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624-1625.

- (154) Oishi, M.; Sasaki, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1426-1432.
- (155) Parrott, M. C.; Luft, J. C.; Byrne, J. D.; Fain, J. H.; Napier, M. E.; Desimone, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928-17932.
- (156) Gillies, E. R.; Goodwin, A. P.; Fréchet, J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1254-1263.
- (157) Huang, Z.; Guo, X.; Li, W.; MacKay, J. A.; Szoka, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 60-61.
- (158) Guo, X.; Szoka, F. C. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 291-300.
- (159) Fiume, L.; Baglioni, M.; Bolondi, L.; Farina, C.; Di Stefano, G. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 1002-1009.
- (160) Unger, C.; Häring, B.; Medinger, M.; Dreves, J.; Steinbild, S.; Kratz, F.; Mross, K. *Clini. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4858-4866.
- (161) Kale, A. A.; Torchilin, V. P. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 363-370.
- (162) Walker, G. F.; Fella, C.; Pelisek, J.; Fahrmeir, J.; Boeckle, S.; Ogris, M.; Wagner, E. *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 418-25.
- (163) Hinman, L. M.; Hamann, P. R.; Wallace, R.; Menendez, A. T.; Dãrr, F. E.; Upeslakis, J. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3336-3342.
- (164) Moreno, O. A.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8180-8181.
- (165) Kratz, F.; Abu Ajaj, K.; Warnecke, A. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2007**, *16*, 1037-1058.
- (166) [Http://www.cytrx.com/inno_206](http://www.cytrx.com/inno_206) No Title.
- (167) [Http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm216458.htm](http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm216458.htm) No Title.
- (168) Kwon, Y. J.; Standley, S. M.; Goodwin, A. P.; Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 83-91.
- (169) Han, J.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2709-2728.
- (170) Johnson, I.; Technologies, L.; Spence, M. T. Z. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*; Life Technologies, 2010.
- (171) Khanna, P. L.; Ullman, E. F. *Anal. Biochem.* **1980**, *108*, 156-161.
- (172) Kvach, M. V.; Stepanova, I. A.; Prokhorenko, I. A.; Stupak, A. P.; Bolibrukh, D. A.; Korshun, V. A.; Shmanai, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1673-1682.
- (173) Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20-53.

- (174) Dombrowski, G. W.; Dinnocenzo, J. P.; Zielinski, P. A.; Farid, S.; Wosinska, Z. M.; Gould, I. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3791-3800.
- (175) Caruso, U.; Casalboni, M.; Fort, A.; Fusco, M.; Panunzi, B.; Quatela, A.; Roviello, A.; Sarcinelli, F. *Opt. Mater.* **2005**, *27*, 1800-1810.
- (176) Heetebrij, R. J.; Kok, R. J.; Talman, E. G.; Poelstra, K.; Molema, G. *European Patent, EP 1745802 A1*.
- (177) Srinivasachar, K.; Neville, D. M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2501-2509.
- (178) Krakowiak, K. E.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Zamecka-Krakowiak, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4061-4067.
- (179) Ng, S. Y.; Penhale, D. W.; Heller, J. *U.S. Patent 4513143, 1985*.
- (180) Leadley, S. R.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Heller, J.; Franson, N. M.; Paul, A. J.; Brown, A. M.; Watts, J. F. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1353-1360.
- (181) Kim, Y. H.; Stites, W. E. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8804-8814.
- (182) Galindo, F.; Burguete, M. I.; Vigarra, L.; Luis, S. V.; Kabir, N.; Gavrilovic, J.; Russell, D. A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6504-6508.
- (183) Tietz, P. S.; Yamazaki, K.; LaRusso, N. F. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 1419-1421.
- (184) Deriy, L. V.; Gomez, E. A.; Zhang, G.; Beacham, D. W.; Hopson, J. A.; Gallan, A. J.; Shevchenko, P. D.; Bindokas, V. P.; Nelson, D. J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35926-35938.
- (185) Ng, S. Y.; Shen, H. R.; Lopez, E.; Zhrebina, Y.; Barr, J.; Schacht, E.; Heller, J. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 367-374.
- (186) Alkatout, J. A.; Benz, M. E.; Sparer, R. V. *U.S. Patent 8133968, 2012*.
- (187) Wen, P. Y.; Kesari, S. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 492-507.
- (188) Nasarre, C.; Roth, M.; Jacob, L.; Roth, L.; Koncina, E.; Thien, A.; Labourdette, G.; Poulet, P.; Hubert, P.; Crémel, G.; Roussel, G.; Aunis, D.; Bagnard, D. *Oncogene* **2010**, *29*, 2381-2392.
- (189) Diwischek, F.; Heller, E.; Holzgrabe, U. *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 1105-1111.
- (190) Sigmund, A. E.; Hong, W.; Shapiro, R.; DiCosimo, R. *Adv. Synth. Cat.* **2001**, *343*, 587-590.
- (191) Wijtmans, M.; Celanire, S.; Snip, E.; Gillard, M. R.; Gelens, E.; Collart, P. P.; Venhuis, B. J.; Christophe, B.; Hulscher, S.; van der Goot, H.; Lebon, F.; Timmerman, H.; Bakker, R. a; Lallemand, B. I. L. F.; Leurs, R.; Talaga, P. E.; de Esch, I. J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2944-2953.
- (192) Brown, R. S.; Ulan, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2382-2388.
- (193) Parrott, M. C.; Finniss, M. C.; Luft, J. C.; Pandya, A.; Gullapalli, A.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, in press.

- (194) Schoenmakers, R. G.; van de Wetering, P.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A. *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 291-300.
- (195) Newman, M. S.; Harper, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6350-6355.
- (196) Saha, A. K.; Rapoport, H.; Schultz, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4856-4859.
- (197) Sun, C.; Aspland, S. E.; Ballatore, C.; Castillo, R.; Smith, A. B.; Castellino, A. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 104-107.
- (198) Keller, O.; Rudinger, J. *Helv. Chim. Acta.* **1975**, *58*, 531-541.
- (199) Zhang, S.; Zhao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10642-10644.
- (200) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006.
- (201) Markó, I.; Ates, A.; Gautier, A.; Leroy, B.; Plancher, J.; Quesnel, Y.; Vanherck, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 3207-3209.
- (202) Majumdar, S.; Bhattacharjya, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5682-5685.
- (203) Ukaji, Y.; Koumoto, N.; Fujisawa, T. *Chem. Lett.* **1989**, 1623-1626.
- (204) Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, *7*, 65-74.
- (205) Hyman, L. M.; Franz, K. J. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, in press.
- (206) Lippert, A. R.; Van de Bittner, G. C.; Chang, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793-804.
- (207) Kim, T.-I.; Park, S.; Choi, Y.; Kim, Y. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1358-1361.
- (208) Hou, M.-F.; Liao, L.; Zhang, W.-D.; Tang, X.-Y.; Wan, H.-F.; Yin, G.-C. *Chemosphere* **2011**, *83*, 1279-83.
- (209) Chen, F.; Zhao, J.; Hidaka, H. *Int. J. Photoenergy* **2003**, *5*, 209-217.
- (210) Yamasaki, R. B.; Osuga, D. T.; Feeney, R. E. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 183-189.
- (211) Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. *Nature Chemistry* **2010**, *2*, 490-497.
- (212) Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J. M.; Peng, L.; Goeldner, M. *Chembiochem* **2001**, *2*, 438-444.
- (213) Cywin, C. L.; Firestone, R. A.; McNeil, D. W.; Grygon, C. A.; Crane, K. M.; White, D. M.; Kinkade, P. R.; Hopkins, J. L.; Davidson, W.; Labadia, M. E.; Wildeson, J.; Morelock, M. M.; Peterson, J. D.; Raymond, E. L.; Brown, M. L.; Spero, D. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 733-740.
- (214) Akeboshi, T.; Ohtsuka, Y.; Ishihara, T.; Sugai, T. *Adv. Synth. Cat.* **2001**, *343*, 624-637.
- (215) Gramlich, W. M.; Robertson, M. L.; Hillmyer, M. A. *Macromolecules* **2010**, *43*, 2313-2321.

- (216) Spreti, N.; Brinchi, L.; Germani, R.; Vincenza Mancini, M.; Savelli, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 4379-4384.
- (217) Desino, K. E.; Ansar, S.; Georg, G. I.; Himes, R. H.; Michaelis, M. L.; Powell, D. R.; Reiff, E. A.; Telikepalli, H.; Audus, K. L. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7537-7543.
- (218) Berger, R.; Rabbat, P. M. A.; Leighton, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9596-9597.
- (219) Schomaker, J. M.; Travis, B. R.; Borhan, B. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3089-3092.
- (220) Sirion, U.; Kim, H. J.; Lee, J. H.; Seo, J. W.; Lee, B. S.; Lee, S. J.; Oh, S. J.; Chi, D. Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3953-3957.
- (221) Struthers, H.; Spingler, B.; Mindt, T. L.; Schibli, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 6173-6183.
- (222) Gribble, G. W.; Switzer, F. L. *Synth. Commun.* **1987**, 17, 377-383.
- (223) Zhang, S.; Zhao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10642-10644.

Etude de fonctions chimiques clivables en milieux biologiques et leurs applications en protéomique chimique et imagerie de fluorescence

Résumé

Cette étude a consisté au développement et à l'utilisation de fonctions chimiques clivables en milieux biologiques. Dans le domaine de la protéomique chimique, ce travail a abouti à la conception d'une sonde d'enrichissement clivable en conditions non-dénaturantes. Appliquée à l'étude de topoisomérases, cette sonde a permis l'extraction et l'analyse de complexes fonctionnels A2B2 de gyrase. Dans un second temps, un nouveau concept de quencheur chimiquement désactivable a été introduit. Incorporé dans une sonde pro-fluorescente de type FRET, ce type de quencheur permet notamment de visualiser la présence de sondes non-activées dans des cellules. Enfin, une méthode a été développée pour permettre l'évaluation de la labilité d'une liaison chimique en milieux biologiques natifs. Basée sur l'utilisation de sondes pro-fluorescentes, cette méthodologie a plus particulièrement été appliquée à l'étude de la bio-labilité de groupements acido-labiles.

Mots-clés : lien clivable, protéomique chimique, non-dénaturant, FRET, imagerie de fluorescence, sonde pro-fluorescente, quencheur désactivable, bio-labilité, bio-acidité.

Résumé en anglais

The general main topic of this work was the use and the development of cleavable linkers in biological systems. This study led to the design of a cleavable enrichment probe in non-denaturing conditions for chemical proteomic applications. In a topoisomerase analysis, this probe allowed the extraction and analysis of a functional DNA gyrase A2B2 complex. For fluorescence imaging, a new concept of chemically deactivatable quencher was introduced. This quencher was used to reveal inactivated FRET-based probe in cell experiments. Finally, a methodology based on biolability measurements of acid-sensitive molecules was developed for the evaluation of chemical bond lability in native biological environments. This work was focused on biolability measurements of acid-sensitive molecules.

Keywords : cleavable linker, chemical proteomic, non-denaturing, FRET, fluorescence imaging, turn-on probe, deactivatable quencher, biolability, bioacidity