

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie organique

Unité de recherche : Département de Pharmaco chimie Moléculaire

**Exploration de l'incorporation métabolique de précurseurs d'acides téichoïques et du peptidoglycane chez Streptococcus pneumoniae**

**Exploration of the metabolic incorporation of teichoic acids' and peptidoglycan's precursors of Streptococcus pneumoniae**

Présentée par :

**Morgane BAUDOIN**

Direction de thèse :

**Yung-sing WONG**  
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Rapporteurs :

**Florence MAHUTEAU-BETZER**  
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Paris Centre

**Boris VAUZEILLES**  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Sud

Thèse soutenue publiquement le **3 octobre 2023**, devant le jury composé de :

**Yung-Sing WONG** Directeur de thèse  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

**Florence MAHUTEAU-BETZER** Rapporteuse  
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Paris Centre

**Boris VAUZEILLES** Rapporteur  
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Sud

**Claire DURMORT** Examinatrice  
MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

**Thierry LOMBERGET** Président  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Lyon 1- Claude Bernard





## Exploration de l'incorporation métabolique de précurseurs d'acides téichoïques et du peptidoglycane chez *Streptococcus pneumoniae*

### Mots-clés

*Streptococcus pneumoniae*, chimie bioorthogonale, peptidoglycane, acides téichoïques, marquage métabolique, fluorescence

### Résumé

Malgré les antibiotiques actuellement sur le marché, on observe, ces dernières années, une augmentation du nombre de décès dus à des infections bactériennes. La principale cause de cette augmentation est le développement de résistances des bactéries aux antibiotiques actuellement sur le marché. Il est donc urgent de découvrir de nouveaux antibiotiques, en particulier des antibiotiques avec un nouveau mode d'action.

La recherche dans le domaine de la chémobiologie a beaucoup évolué ces dernières années, en particulier avec l'essor des réactions clicks et bioorthogonales. Dans la conception de molécules à visée thérapeutique, la chimie bioorthogonale peut permettre un contrôle spatio-temporel du principe actif. Par ailleurs, ces réactions ont permis le développement de marquages métaboliques fluorescents afin de mieux comprendre les processus et les mécanismes régissant les organismes vivants.

*S. pneumoniae* est une bactérie à Gram positif, classée parmi les 12 bactéries les plus menaçantes selon l'OMS. La paroi de cette bactérie est constituée d'une épaisse couche de

peptidoglycane (PG) et d'acides téichoïques (AT). Cette bactérie a la spécificité de posséder de la choline sur ses AT, ce qui a permis, pour la première fois, d'observer les AT par microscopie, grâce à la métabolisation de dérivés de choline. Dans ce projet de thèse, de nouveaux dérivés de D-Alanine et de D-Alanine-D-Alanine, métabolisés par le PG de la bactérie, ainsi que de nouveaux dérivés de choline, métabolisés par ses acides téichoïques, ont été conçus et synthétisés. Ces nouveaux dérivés sont utilisés pour développer une application de réticulation du PG et des AT par réaction bioorthogonale, entre un dérivé métabolisé par le PG et un autre dérivé métabolisé par les AT. De plus, en combinant le marquage métabolique fluorescent du PG et des AT en utilisant la chimie bioorthogonale avec ses nouveaux dérivés ainsi que la méthode de microscopie à haute-résolution dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy), cette approche permet d'observer et de comparer avec précision la biosynthèse du PG et des AT. Pour finir, la conception et la synthèse de composés fluorogéniques ou compatibles avec la microscopie électronique a été initiée.

## **Exploration of the metabolic incorporation of teichoic acids' and peptidoglycan's precursors of *Streptococcus pneumoniae***

### Key words

*Streptococcus pneumoniae*, bioorthogonal chemistry, peptidoglycan, teichoic acids, metabolic labeling, fluorescence

### Abstract

Despite the antibiotics currently on the market, we observe, these past years, an increase of deaths due to bacterial infections. The main cause of this increase is the development of resistances of the bacteria to the antibiotics, currently on the market. The discovery of new antibiotics is urgent, especially antibiotics with a new mode of action.

In the field of chemobiology, research has evolved significantly in recent years, particularly with the rise of click reactions and bioorthogonal reactions. In the design of molecules for therapeutic uses, bioorthogonal chemistry can allow a spatio-temporal control of the active substance. Furthermore, these reactions have enabled the development of fluorescent metabolic labeling, for a better understanding of the processes and mechanisms that govern living organisms.

*S. pneumoniae* is a Gram-positive bacterium, classified amongst the 12 most dangerous bacteria according to the WHO. The bacterial cell wall is composed of a thick peptidoglycan (PG) layer and teichoic acids (TA). This bacterium has the particularity to possess choline on its teichoic

acids, which has allowed, for the first time, the observation by microscopy of the TA, thanks to the metabolization of choline derivatives by the TA. In this project, we have designed and synthesized new derivatives of D-Alanine and D-Alanine-D-Alanine, metabolized by the PG of the bacteria, as well as new derivatives of choline, metabolized by its TA. These new derivatives are used for the purpose of developing a method to perform a cross-link between the PG and the TA thanks to a bioorthogonal reaction, between a derivative metabolized by the PG and a derivative metabolized by the TA. Moreover, a combined approach of metabolic labeling using bioorthogonal chemistry and high-resolution method dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy), enables the observation and the precise comparison of the PG and TA biosynthesis sites. Finally, the design and synthesis of fluorogenic compounds or fluorescent compounds compatible with electronic microscopy were initiated.

*« J'ai appris que la voie du progrès n'était ni rapide ni facile »*

Marie Skłodowska-Curie



---

## Remerciements

---

*L'aventure de la thèse est un long chemin parfois sinueux et, alors que j'arrive à la fin de ce chapitre de ma vie, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de ces trois années et qui m'ont permis de garder espoir, au fur et à mesure que je me rendais compte, qu'en effet, Marie Curie avait raison, la voie du progrès n'est pas rapide, et elle est encore moins facile.*

*Je souhaite, dans un premier temps, remercier les membres du jury, qui ont accepté de juger mes travaux de thèse, à commencer par les rapporteurs Florence Mahuteau-Betzer et Boris Vauzeilles, ainsi que Thierry Lomberget.*

*Un grand merci à Yung-Sing Wong, mon directeur de thèse, pour toute l'aide qu'il m'a apporté au cours de ces dernières années. Ta disponibilité, ta bienveillance et tes conseils m'ont été très précieux pour progresser, prendre confiance en moi et, bien sûr, m'aider à avancer sur ce projet de thèse.*

*Je remercie également les biologistes du groupe Pneumocoque de l'IBS qui ont participé activement à ce projet de thèse par toutes les expériences qu'ils ont menées et dont je parle dans ce manuscrit. Merci à Claire Durmort et Anne Chouquet, pour les expériences de marquages, de croissances et de réticulation ainsi que pour m'avoir formée pendant les trois semaines que je suis venue passer avec vous. Merci à Mai Nguyen et à Cécile Morlot pour votre travail sur la microscopie à haute résolution. Merci également à André Zapun pour ton travail sur les acides téichoïques et les calculs de constantes cinétiques que tu as effectués.*

*Un grand merci également à Basile Pérès, pour ta disponibilité et ton aide au laboratoire. Tu m'as appris plein de petites astuces que je garderai précieusement, et, que, plus tard, je partagerais en disant « ah ça c'est Basile qui me l'a montré ! », tout comme toi tu nous parles du fameux Saïd. Merci pour ta bonne humeur constante et pour tes petites blagues (plus ou moins drôles) qui égayaient les journées au labo. Je ne te remercie pas pour toutes les fois où tu m'as fait sursauter par contre !*

*Merci également à tous les membres permanents du DPM. Philippe, Martine, Romain pour vos remarques et questions pendant mes présentations, Marie-Carmen, pour ton aide à la RMN, Marie-Ange, pour ton aide sur ces dernières semaines avant le rendu de ce manuscrit, ainsi que tous les autres que j'ai côtoyé pendant cette thèse. Merci à Luc, Juliette et Pauline, pour cette collaboration que nous avons démarrée il y a peu et qui, je l'espère, n'en est qu'à ces débuts.*

*Merci à Renaud, co-labo de cette dernière année, pour tes conseils avisés et ton expérience en chimie qui m'ont sortie de plusieurs impasses, et pour nos discussions variées entre deux colonnes, sur le sport, l'environnement, la musique... Un grand merci aussi à Morane, pour ton soutien sur ces dernières semaines, notamment ta relecture attentive de ce manuscrit et pour nos petits coups bus après une journée de dur labeur.*

*Un grand merci aux thésards et stagiaires que j'ai croisé pendant ces trois années et qui ont participé à la bonne ambiance au laboratoire : Brayon, Pascal, Meven, Pamela... Merci en particulier à Maéva, par la suite devenue une réelle amie : à nos vacances, presque plus fatigantes que reposantes, mais si enrichissantes, à nos parties acharnées de jeux de sociétés, à nos randos et sorties sport... Merci également aux stagiaires que j'ai pu encadrer : Sébastien, Elsa et Chirine.*

*Enfin, un grand merci à tous mes proches, qui comprennent plus ou moins ce que je fais au quotidien, mais qui ont toujours été là pour m'encourager, en particulier ces dernières années. A mes amies de longue date, du temps du lycée Marie Curie (le destin ?) : qui aurait pensé qu'avec notre enseignement de physique-chimie chaotique, je finirai par faire carrière dans la chimie ? En particulier merci à ma Cécé, ma fabuleuse coloc' de deux ans, on s'est soutenues mutuellement pour atteindre nos objectifs et je pense qu'on peut être fières de nous ! Aux amis rencontrés pendant ces trois années de thèse qui ont été des oreilles attentives quand je leur contai mes déboires au laboratoire. Aux amies d'Erasmus, avec lesquelles je suis fière d'avoir gardé contact et développé une vraie amitié : I hope I am gonna be able to visit all of you one day ! A mon équipe de hand, qui me permettait de me vider la tête et avec laquelle je viens de vivre une année fabuleuse, clôturée par une belle montée en N3 !*

*Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents, qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes choix, qui m'ont donné la meilleure éducation possible et qui m'ont permis de faire ces études. Sans vous, je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui.*

*Pour finir, je souhaiterais conclure en disant que, tout comme Marie Curie (encore elle ! Promis c'est la dernière fois que j'en parle), je suis de celles « qui pensent que la science est d'une grande beauté » et, pour cette beauté, ces trois années valaient la peine d'être vécues.*

---

## Table des matières

---

<b>Chapitre I :</b> .....	20
Partie bibliographique .....	20
I. Bactéries et antibactériens.....	22
I.1. Historique .....	22
I.2. Structure des bactéries.....	23
I.3. Le peptidoglycane.....	24
I.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	25
I.5. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne .....	27
I.6. Développement de nouveaux antibiotiques .....	28
II. Chimie click et chimie bioorthogonale .....	30
II.1. Réaction de Huisgen et CuAAC.....	30
II.2. SPAAC.....	31
II.3. IEDDA.....	34
II.4. Comparaison des différentes réactions click évoquées.....	37
III. Apports de la chimie click et de la chimie bioorthogonale pour l'incorporation métabolique de dérivés naturels modifiés .....	39
III.1. Importance de l'étude des bactéries et de leur métabolisme .....	39
III.2. Les techniques de marquage antérieures à la chimie click .....	40
III.2.1. Protéine fluorescente verte.....	40
III.2.2. Marquage isotopique et radiomarquage .....	40
III.3. Marquage direct et marquage en 2 étapes .....	41
III.4. Métabolisation de dérivés du peptidoglycane .....	42
III.4.1. Dérivés du nucléotide de Park, de Lipide I et de Lipide II.....	42
III.4.2. Dérivés de D-Ala .....	44
III.4.3. Dérivés de D-Ala-D-Ala.....	52
III.4.4. Autres dérivés de la chaîne peptidique PG .....	57

III.4.5. Conclusion .....	58
III.5. Métabolisation de dérivés de cholines sur les acides téichoïques.....	59
III.5.1. Métabolisation de choline et premier marquage des acides téichoïques .....	59
III.5.2. Marquage en deux couleurs des AT et du PG.....	61
III.5.3. Présence de choline dans les milieux biologiques en dehors des AT .....	63
III.6. Marquage de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.....	66
IV. Développement de nouvelles thérapies profitant des atouts de la chimie bioorthogonale.....	68
IV.1. Thérapie par vectorisation : activation spatio-temporelle d'un principe actif .....	68
IV.2. Désactivation de l'activité d'un anticoagulant par réaction bioorthogonale .....	70
IV.3. Développement d'antibactériens par la chimie bioorthogonale.....	71
V. Projet de recherche .....	73
<b>Chapitre II</b> .....	76
Synthèse de cholines modifiées et évaluation de leur métabolisation par les AT .....	76
I. Synthèse d'une librairie de cholines.....	78
I.1. Azido-cholines et tétrazine-choline .....	79
I.2. Cholines fluorogéniques et fluorescentes .....	80
II. Métabolisation des nouvelles cholines par <i>S. pneumoniae</i> .....	83
II.1. Marquage fluorescent des AT.....	84
II.2. Croissance de <i>S. pneumoniae</i> en présence des cholines modifiées.....	86
II.3. Compétition entre la choline naturelle et les azido-cholines.....	88
II.4. Conclusion .....	89
<b>Chapitre III</b> .....	90
Synthèse de D-Ala et D-Ala-D-Ala modifiées et évaluation de leur métabolisation par le PG.....	90
I. Développement de nouvelles D-Ala modifiées .....	92
I.1. Synthèse des DIBO-DA, BCN-DA et DBCO-DA.....	92
I.2. Synthèse des tétrazine-DA et TCO-DA .....	96
II. Cinétiques des réactions bioorthogonales avec les cyclooctyne-D-Ala.....	98
II.1. Expression des équations de réaction .....	98
II.2. Exemple avec le DIBO-DA .....	99

II.3. Comparaison des constantes de vitesses des cyclooctyne-DA.....	100
III. Incorporation des D-Ala modifiées sur le PG de <i>S. pneumoniae</i> .....	102
III.1. Les cyclooctyne-DA.....	102
III.1.1 Marquage du PG avec les DIBO-DA <b>137</b> et <b>138</b> .....	102
III.1.2. Marquage du PG en « one-pot ».....	102
III.1.3. Influence d'une différence de cinétiques de réaction click avec les cyclooctyne-DA dans le marquage du PG.....	104
III.1.5. Implication de PBP3 dans le marquage inégal du PG avec les cyclooctyne-DA.....	106
III.2. TCO-DA et Tétrazine-DA.....	108
IV. Développement de D-Ala-D-Ala modifiées.....	110
V. Conclusions et perspectives.....	113
<b>Chapitre IV</b> .....	114
Utilisation des nouveaux outils développés pour des applications de thérapie et d'imagerie.....	114
I. Réticulation du PG et des AT pour bloquer la biosynthèse de la paroi bactérienne.....	116
I.1. Principe.....	116
I.2. Réticulation par réaction click directe.....	117
I.2.1. Croissance et morphologie des bactéries avec DIBO-DA <b>137</b> et AzCho <b>77</b> .....	117
I.2.2. Tentative de mise en évidence de la réticulation avec marquage fluorescent : ajout simultané d'AzCho <b>77</b> et de DIBO-DA <b>138</b> .....	118
I.2.3. Stockage de choline dans le cytoplasme de <i>S. pneumoniae</i> .....	119
I.2.4. Mise en évidence de la réticulation avec marquage fluorescent : ajouts successifs d'AzCho <b>77</b> puis de DIBO-DA <b>137</b> .....	120
I.3. Synthèse d'un linker bifonctionnel entre le PG et les AT.....	121
II. Microscopie à haute résolution pour observer le PG et les AT.....	124
II.1. Marquages sans cuivre : DIBO-DA et AzCho.....	124
II.2. Tétrazine-Cho et DIBO-DA : premières images.....	125
Conclusions et perspectives.....	127
<b>Chapitre V</b> :.....	128
Conception et synthèse de fluorophores.....	128
I. Coumarines.....	130

II. Nitrobenzosélenadiazole (NBD-Se) .....	137
III. Eosine .....	141
Conclusion générale .....	144
<b>Chapitre VI :</b> .....	150
Partie expérimentale .....	150
I. Material and methods .....	152
II. General procedures .....	154
General procedure A .....	154
General procedure B .....	154
General procedure C .....	154
General procedure D .....	155
General procedure E .....	155
General procedure F .....	155
General procedure G .....	156
III. Synthesis of cholines .....	157
IV. Synthesis of D-Ala and D-Ala-D-Ala .....	169
V. Synthesis of the linker TCO-(PEG) <sub>4</sub> -DIBO .....	192
VI. Synthesis of fluorophores .....	198
Biological procedures for labeling and growth curves measurements .....	211
Experiments focused on teichoic acids (Chapter II) .....	211
Experiments focused on peptidoglycan (Chapter III) .....	212
Annexes .....	214
Annexe 1 : Structure chimique des fluorophores utilisés en biologie dans ce manuscrit .....	216
Annexe 2 : Données pour la détermination de la constante k avec le BCN-DA .....	218
Annexe 3 : Données pour la détermination de la constante k avec le DBCO-DA .....	219
Références .....	220

---

## Abréviations

---

$[\alpha]_D^{20}$	Pouvoir rotatoire spécifique
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique
ADC	Antibody Drug Conjugate
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AF488	Alexa Fluor 488 nm
AF532	Alexa Fluor 532 nm
AF647	Alexa Fluor 647 nm
Ala	Alanine
AT	Acides Téichoïques
BCN	Bicyclo[6.1.0]non-4-yne
BHI	Brain-Heart Infusion
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
BODIPY	Boron-dipyrromethene
cal.	calculated
CAPAC	Click Activated Prodrugs Against Cancer
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CF647	Clear Fluor 647 nm
COD	Cyclooctadiène
CPase(s)	Carboxypeptidase(s)
CuAAC	Copper(I) catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition
DAB	3,3-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DBC0	Azadibenzocyclooctyne
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIBO-OH	5-Hydroxy-1,2:5,6-dibenzocyclooct-7-yne
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dSTORM	Direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EI	Electron Impact
ESI	ElectroSpray Ionization
Et <sub>2</sub> O	Diethyl ether
FCC	Flash Column Chromatography
FDAA	Fluorescent D-Amino Acid
FDAAD	Fluorescent D-Amino Acid Dipeptide
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSPPM	Fluorescent Stem PentaPeptide Mimics
GA	Groupe activateur
GC-MS	Gas chromatography – Mass Spectrometry
GFP	Green Fluorescent Protein

GlcNAc	<i>N</i> -Acétylglucosamine
Gln	Glutamine
GP	Groupement protecteur
HADA	3-[[[(7-Hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-3-yl)carbonyl]amino]-D-alanine
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IBS	Institut de Biologie Structurale
ICT	Intramolecular Charge Transfer
IEDDA	Inverse-Electron-Demand Diels-Alder
<i>k</i>	Constante cinétique
<i>k</i> <sub>app</sub>	Constante cinétique apparente
LPS	Lipopolysaccharide
LRMS	Low Resolution Mass Spectrometry
LTA	Lipoteichoic Acids
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
<i>m</i> CPBA	Acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque
MLCT	Metal-Ligand Charge Transfer
MurNAc	Acide <i>N</i> -acétylmuramique
NADA	3-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-alanine
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NBD-Se	Nitrobenzosélenadiazole
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PALM	PhotoActivated Localization Microscopy
PIDA	Diacétate d'iodobenzène
PBP	Penicillin-Binding Proteins
PBP3	Penicillin-Binding Protein 3
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyethylene glycol
PET	Photo-induced Electron Transfer
PG	Peptidoglycane
pH	potentiel Hydrogène
PLD	Phospholipase D
ppm	partie par million
R <sub>f</sub>	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SMLM	Single Molecule Localization Microscopy
SPAAC	Strain-Promoted Alkyne-Azide-Cycloaddition
STED	STimulated Emission Depletion
STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy
SuFEx	Sulfur(VI) Fluoride Exchange
ta	température ambiante
TBAB	Tetrabutylammonium bromide

TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
TBET	Through Bond Energy Transfer
TCO	<i>trans</i> -cyclooctyne
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TICT	Twisted Intramolecular Charge Transfer
TIPS	Triisopropylsilyle
TMS	Tetramethyl silane
TMSE-OH	Trimethylsilyl ethanol
TPase(s)	Transpeptidase(s)
UDP	Uridine diphosphate
UV	Ultraviolet
WTA	Wall Teichoic Acids

**Note :**

Tout au long de ce manuscrit, un certain nombre de fluorophores commerciaux de type Alexa Fluor (AF) et Clear Fluor (CF) seront évoqués. La structure chimique de ces fluorophores est représentée en [Annexe 1](#) à la fin de ce manuscrit.

---

## Table des figures, schémas et tableaux

---

### Table des figures

Figure 1 : Chronologie de la découverte des principales nouvelles classes d'antibiotiques .....	23
Figure 2 : Structure d'une bactérie .....	24
Figure 3 : Biosynthèse du PG chez <i>S. pneumoniae</i> . Adapté de Banahene et al. <sup>10</sup> .....	25
Figure 4 : A – Composition de la paroi cellulaire de <i>S. pneumoniae</i> B – Structure chimique d'un acide lipotéichoïque de <i>S. pneumoniae</i> (adapté de N. Gisch et al. <sup>15</sup> ) .....	26
Figure 5 : Structure chimique de différents antibiotiques ciblant la synthèse de la paroi bactérienne ainsi que des biomolécules qu'ils miment .....	28
Figure 6 : Différentes cyclooctynes développées pendant les années suivant l'apparition de la SPAAC, classées suivant une estimation de l'ordre de vitesse. ....	33
Figure 7 : Modèle des orbitales frontières lors de la réaction de cycloaddition [3+2] nommée SPAAC, à demande normale entre un azoture aliphatique et une cyclooctyne aromatique (A) et, à demande inverse entre un azoture aromatique et une cyclooctyne aliphatique (BCN) (B) .....	34
Figure 8 : Mécanisme de l'IEDDA et modèle des orbitales frontières correspondant à la réaction étudiée .....	35
Figure 9 : Différents diénophiles développés pendant les années suivant l'apparition de l'IEDDA. ....	36
Figure 10 : Echelle de réactivité estimée entre les tétrazines utilisées pour l'IEDDA <sup>47</sup> .....	37
Figure 11 : Couverture du journal Science du 11 février 1994 .....	40
Figure 12 : Marquage métabolique fluorescent direct et en 2 étapes .....	42
Figure 13 : Marquage direct du PG d' <i>E. coli</i> par incorporation d'un dérivé du nucléotide de Park et marquage en 2 étapes par réaction entre une cétone et une hydrazide <sup>67</sup> .....	43
Figure 14 : Premiers FDAA synthétisés. ....	45
Figure 15 : Nouvel FDAA sCy <sub>5</sub> DA. ....	47
Figure 16 : Dérivés de D-Ala AlkDA, AzDA et BCN-DA .....	48
Figure 17 : NBDAC (A) et TetDAC (B) développés par Pires et al. ainsi que les marquages correspondants du PG de la bactérie <i>S. aureus</i> .....	49
Figure 18 : Rf470DL, un acide aminé fluorogénique. ....	50
Figure 19 : Réticulation 5,3 non naturelle réalisée sur le PG de la bactérie à Gram positif <i>B. subtilis</i> grâce à la réaction click SuFEx. ....	52
Figure 20 : Dipeptides décrits par Maurelli et VanNieuvenhze. ....	53
Figure 21 : HADA-DA et NADA-DA, deux nouveaux dipeptides développés, permettant le marquage de PG des bactéries <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> <sup>88</sup> .....	54
Figure 22 : Schéma du principe de la technique de microscopie à haute résolution dSTORM, en comparaison avec la microscopie à fluorescence conventionnelle .....	56
Figure 23 : Marquage dSTORM du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec AzDADA et DIBO-AF647. ....	57

Figure 24 : Structure chimique des autres dérivés de la chaîne peptidique du PG évoqués.....	58
Figure 25 : Processus par lequel est métabolisée la choline sur les AT, qu'elle soit modifiée ou non. ....	60
Figure 26 : Marquage des acides téichoïques de <i>S. pneumoniae</i> sur cellules vivantes avec AlkCho. ....	61
Figure 27 : Marquage en 2 étapes (gauche) et marquage one-pot (droite) des AT par l'azidocholine.. ....	62
Figure 28 : Marquage "one-pot" des AT avec AzCho (30 $\mu$ M) et DIBO-AF488 (25 $\mu$ M) et marquage direct du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec HADA (500 $\mu$ M). ....	63
Figure 29 : Structures chimiques de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE).....	63
Figure 30 : Structures chimiques des dérivés de cholines métabolisés sur cellules humaines, images de marquage avec les dérivés seuls et images de marquage avec le dérivé en compétition avec la choline naturelle <b>75</b> <sup>109</sup> .....	64
Figure 31 : A – Hydrolyse de PC et transphosphatidylation par l'enzyme PLD. / B – Marquage en deux étapes des PC et de l'activité de l'enzyme PLD. / C – Marquage fluorogénique des PC et de l'enzyme PLD par réaction bioorthogonale IEDDA.....	65
Figure 32 : Exemples de dérivés métabolisés par le LPS.....	66
Figure 33 : A – Principe de la technologie CAPAC. / B – Composé Dox-TCO entré en phase d'essais cliniques avec le biopolymère modifié-tétrazine .....	70
Figure 34 : Principe de "click & clear" pour inactiver la warfarine, un anticoagulant.....	71
Figure 35 : Schéma du principe de la stratégie développée par Liu et al. en 2018. <sup>127</sup> .....	72
Figure 36 : Nouvelles cholines synthétisées pendant ce projet de thèse.....	78
Figure 37 : Protocoles mis en œuvre pour le marquage des AT avec les différentes cholines. ....	84
Figure 38 : Images de marquage des AT en microscopie à fluorescence en utilisant : A – Les nouvelles azido-cholines développées / B – La tétrazine-choline <b>115</b> / C – La coumarine-choline <b>125</b> .....	86
Figure 39 : Courbes de croissance de <i>S. pneumoniae</i> en présence de différentes cholines.. ....	87
Figure 40 : Réactions SPAAC dont les constantes de vitesses $k$ ont été calculées.....	98
Figure 41 : Détermination des constantes $k_{app}$ . ....	99
Figure 42 : Relation linéaire entre la constante $k_{app}$ et la concentration en DIBO-DA.....	100
Figure 43 : Marquage du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec les DIBO-DA <b>137</b> et <b>138</b> . ....	102
Figure 44 : Marquage du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec les cyclooctyne-DA.....	103
Figure 45 : Marquage du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec les cyclooctyne-DA avec réaction click préalable des deux réactifs .....	105
Figure 46 : Marquage du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec les cyclooctyne-DA sur des souches différentes : R800 et R800 $\Delta$ DacA. ....	107
Figure 47 : Marquage du PG de <i>S. pneumoniae</i> avec la tétrazine-DA <b>158</b> et le TCO-DA <b>161</b> . Marquage réalisé en « one-pot » selon le mode opératoire présenté sur la Figure 43A.. ....	109
Figure 48 : Récapitulatif des D-Ala et D-Ala-D-Ala nouvellement synthétisées pendant ce projet de thèse.....	113
Figure 49 : Principe du projet de réticulation du PG et des AT de <i>S. pneumoniae</i> . ....	116
Figure 50 : Essais de réticulation directe entre le PG et les AT de <i>S. pneumoniae</i> par métabolisation de DIBO-DA <b>137</b> ou <b>138</b> et d'AzCho <b>77</b> .....	117

Figure 51 : Expérience de mise en évidence de la réticulation entre le PG et les AT avec marquage fluorescent, par ajout simultané de DIBO-DA <b>138</b> et d'AzCho <b>77</b> et images de microscopie obtenues.....	119
Figure 52 : Mise en évidence de stockage de choline dans les bactéries.....	120
Figure 53 : Expérience de mise en évidence de la réticulation entre le PG et les AT avec un marquage fluorescent par ajout successif de l'AzCho <b>77</b> puis de DIBO-DA <b>137</b> .....	121
Figure 54 : Stratégie de réticulation du PG et des AT grâce au linker bifonctionnel TCO-(PEG) <sub>4</sub> -DIBO <b>182</b> .....	122
Figure 55 : Double marquage du PG et des AT avec le DIBO-DA <b>137</b> et l'AzCho <b>77</b> . ....	125
Figure 56 : Double marquage du PG et des AT avec TCO-DA <b>161</b> et AzCho <b>77</b> . ....	126
Figure 57 : 7-aminocoumarine excitée sous forme ICT (Intramolecular Charge Transfer) et TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer) .....	131
Figure 58 : Fluorogénicité de la coumarine permise par l'azoture situé en position 3 .....	131
Figure 59 : Azido-coumarine <b>183</b> décrite par Wang et al. <sup>133</sup> et azido-coumarines <b>189</b> et <b>199</b> conçues pour avoir une plus grande fluorescence que l'azido-coumarine <b>183</b> et pouvoir être conjuguées à des biomolécules.....	132
Figure 60 : Différents nitrobenzodiazoles développés comme sondes fluorescentes .....	137
Figure 61 : A – Structure de l'acide aminé NBD-Se-D-Ala <b>207</b> / B – Structure des acides aminés fluorogéniques, en particulier NBD-Se L-Ala <b>208</b> , présentant les meilleures propriétés optiques .....	138
Figure 62 : Nouveaux composés, dérivés de NBD-Se, synthétisés dans ce projet.....	139
Figure 63 : Structure chimique de la fluorescéine (composé <b>216</b> ) et de l'éosine Y (composé <b>217</b> ) .....	141
Figure 64 : Protocole utilisé pour marquer les AT et les observer en microscopie électronique.....	142
Figure 65 : Dérivés de cholines, métabolisées par les AT de <i>S. pneumoniae</i> . ....	146
Figure 66 : Dérivés de D-Ala incorporés sur le PG de <i>S. pneumoniae</i> développés pendant ce projet de thèse....	147
Figure 67 : Fluorophores synthétisés pendant ce projet de thèse .....	148
Figure 68 : Détermination des constantes $k_{app}$ pour la SPAAC entre le BCN-DA et l'Az-AF488 <b>162</b> .....	218
Figure 69 : Valeurs des $k_{app}$ obtenues en fonction de la concentration en BCN-DA.....	218
Figure 70 : Relation linéaire entre la constante $k_{app}$ et la concentration en BCN-DA .....	218
Figure 71 : Détermination des constantes $k_{app}$ pour la SPAAC entre le DBCO-DA et l'Az-AF488 <b>162</b> .....	219
Figure 72 : Valeurs des $k_{app}$ obtenues en fonction de la concentration en DBCO-DA .....	219
Figure 73 : Relation linéaire entre la constante $k_{app}$ et la concentration en DBCO-DA .....	219

## Table des schémas

Schéma 1 : Réaction de Huisgen, activée par chauffage et formant deux régioisomères et CuAAC, activée par Cu(I) et régiospécifique.....	30
Schéma 2 : Ligation de Staudinger et SPAAC développées par Bertozzi <sup>41</sup> .....	31
Schéma 3 : Premières IEDDA décrites par Hilderbrand <sup>45</sup> et Fox <sup>46</sup> en 2008.....	34
Schéma 4 : Réactions du composé bifonctionnel (E,E)-COD 41 avec un azoture puis avec une tétrazine .....	36
Schéma 5 : Etapes de synthèse des FDAA.....	46

Schéma 6 : « Click and release » entre un TCO et une tétrazine pour libérer la doxorubicine. R <sub>1</sub> et R <sub>2</sub> sont soit des substituants méthyles soit des substituants 2-pyridyles. ....	68
Schéma 7 : Synthèse de l'azido-choline <b>101</b> .....	79
Schéma 8 : Synthèse des dérivés azido-choline <b>105</b> et <b>107</b> .....	79
Schéma 9 : Synthèse des composés <b>108</b> et <b>109</b> .....	80
Schéma 10 : Synthèse de la tétrazine-choline <b>115</b> .....	80
Schéma 11 : Synthèse des cholines <b>117</b> et <b>118</b> .....	81
Schéma 12 : Synthèse de la choline-coumarine <b>125</b> .....	82
Schéma 13 : Synthèse de la choline-coumarine <b>128</b> et de la choline-NBD <b>129</b> .....	82
Schéma 14 : Voie de synthèse des DIBO-DA <b>137</b> et <b>138</b> .....	93
Schéma 15 : Voie de synthèse 1 mise en place pour la synthèse du DBCO-DA .....	94
Schéma 16 : Voie de synthèse 2 pour la synthèse du DBCO-DA .....	95
Schéma 17 : Synthèse du BCN-DA <b>155</b> .....	96
Schéma 18 : Synthèse de la tétrazine-DA <b>158</b> .....	97
Schéma 19 : Synthèse du dérivé TCO-DA <b>161</b> .....	97
Schéma 20 : Voies de synthèses des composés DIBO-DADA <b>169</b> et tétrazine-DADA <b>170</b> .....	111
Schéma 21 : Synthèse du composé <b>170</b> , intermédiaire de la synthèse de l'AzDADA <b>67</b> et de l'AzDA <b>59</b> .....	112
Schéma 22 : Voie de synthèse de l'AzDADA <b>67</b> .....	112
Schéma 23 : Synthèse du (E,E)-cyclooctadiène <b>176</b> .....	122
Schéma 24 : Synthèse de l'intermédiaire <b>180</b> , intermédiaire dans la synthèse du linker TCO-(PEG) <sub>4</sub> -DIBO .....	123
Schéma 25 : Dernières étapes de la synthèse du linker bifonctionnel <b>182</b> .....	123
Schéma 26 : Voie de synthèse 1 pour la synthèse de l'azido-coumarine <b>189</b> .....	133
Schéma 27 : Voie de synthèse 2 pour la synthèse de l'azido-coumarine <b>189</b> .....	134
Schéma 28 : Voie de synthèse pour la synthèse de l'azido-coumarine <b>199</b> .....	135
Schéma 29 : Synthèse de l'azido-coumarine <b>202</b> et de l'azido-coumarine-DA <b>204</b> .....	136
Schéma 30 : Synthèse de l'hétérocycle NBD-Se .....	139
Schéma 31 : Synthèse du composé NBD-Se-DA <b>207</b> .....	140
Schéma 32 : Synthèse des composés fluorogéniques <b>214</b> et <b>215</b> .....	140
Schéma 33 : Synthèse de l'éosine-N <sub>3</sub> <b>219</b> .....	143

## Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau comparant les caractéristiques des réactions click CuAAC, Staudinger, SPAAC et IEDDA<sup>55,56</sup> 38

Tableau 2 : Résultats des tests de marquage fluorescent des AT et de croissance de *S. pneumoniae* pour les nouvelles cholines modifiées ; n.d. = pas de marquage fluorescent effectué ; \* voir Figure 38 ; \*\* voir Figure 39

..... 83

*Tableau 3 : Pourcentages de diminution de la fluorescence obtenus lors de l'expérience de compétition entre la choline naturelle **75** (31  $\mu\text{M}$ ) et les azido-cholines **77**, **101**, **105** et **107** (250  $\mu\text{M}$ ) en comparaison de l'intensité de fluorescence obtenue en condition de non-compétition (azido-choline, 250  $\mu\text{M}$ ). ..... 88*

*Tableau 4 : Valeurs des constantes de vitesses pour la réaction entre le fluorophore Az-AF488 et le dérivé BCN-DA, DIBO-DA ou DBCO-DA..... 100*



# Chapitre I : Partie bibliographique



---

## *I. Bactéries et antibactériens*

---

### I.1. Historique

Bien avant la découverte des bactéries et le développement d'antibactériens, différentes plantes ou potions étaient déjà utilisées pour lutter contre les infections. Par exemple, les chinois utilisaient du caillé de soja moisi pour traiter furoncles et verrues. Plus tard, au Moyen-Age, certains miels étaient utilisés pour les infections causées par les blessures de flèches. A cette époque, personne ne savait que ces infections étaient dues à des bactéries pathogènes.<sup>1</sup>

En 1670, quelques années après avoir inventé le microscope, Antoni Van Leeuwenhoek fut le premier à observer des bactéries, appelées à l'époque animacules.<sup>2</sup> Mais ce n'est que plusieurs siècles plus tard, pendant la seconde moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, que les bactéries ont été associées aux infections qu'elles provoquaient grâce aux découvertes successives d'Ignace Semmelweiss, Louis Pasteur, Robert Koch et Joseph Lister. Premièrement, le médecin hongrois Ignace Semmelweiss a découvert qu'une mortalité post-natale élevée pouvait être associée aux autopsies effectuées par les médecins, juste avant de procéder aux accouchements. Il a ainsi mis en place, en 1847, le lavage systématique des mains des médecins et sage-femmes avant les accouchements, permettant ainsi de réduire fortement la mortalité post-natale des femmes.<sup>3</sup> Ensuite, en 1861, Pasteur a montré que les microbes, rassemblant entre autres bactéries, virus ou encore protozoaires sont présents partout autour de nous et jouent un rôle dans le processus de fermentation. En 1867, le chirurgien écossais Joseph Lister a, lui, été le premier à utiliser un agent antiseptique, l'acide carbolique, aujourd'hui appelé phénol et a rapporté une augmentation du taux de survie lors de ses chirurgies. Enfin, la première preuve que les microbes sont la cause de maladies infectieuses a été apportée par l'allemand Robert Koch en 1876 et il a par la suite identifié des bactéries responsables de maladies telles que la tuberculose, le choléra ou la typhoïde.<sup>4</sup>

La découverte fortuite de la pénicilline, faite par Alexander Fleming en 1928<sup>5</sup> puis son isolement en 1940 par Chain *et al.*<sup>6</sup> a été le premier antibactérien découvert. Rapidement, d'autres antibiotiques ont suivi : le prontosil, de la famille des sulfonamides découvert en 1932 puis commercialisé en 1935, la streptomycine, de la famille des aminoglycosides, mis sur le marché en 1944 ainsi que le chloramphénicol découvert en 1947. Ces découvertes de nouveaux antibiotiques, appartenant à de nouvelles classes se sont poursuivies jusque dans les années 1960.<sup>1</sup> Depuis cette période d'âge d'or, seulement trois nouvelles classes d'antibiotiques ont été identifiées, le reste des nouveaux antibiotiques mis sur le marché étant des modifications structurales de molécules déjà

existantes (Figure 1). Une des raisons expliquant cette diminution de découverte de nouvelles classes d'antibiotiques ces dernières décennies réside dans leur coût de développement en comparaison du bénéfice financier que la commercialisation d'une nouvelle classe apporterait. Développer une nouvelle classe d'antibiotiques demande de longues années de travail de recherche, une majorité des antibiotiques « faciles » à développer ayant déjà été découverts. De plus, l'émergence rapide de résistances des bactéries aux antibiotiques présents sur le marché, observées en moyenne dans les deux ans après la mise sur le marché, réduit le bénéfice qu'apporterait le développement d'une nouvelle classe.<sup>7</sup>

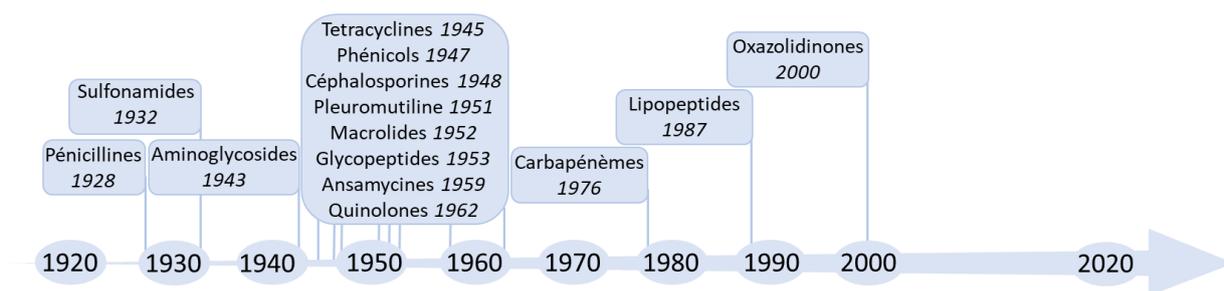


Figure 1 : Chronologie de la découverte des principales nouvelles classes d'antibiotiques

Ainsi, alors que les infections bactériennes semblaient sous contrôle il y a quelques dizaines d'années, l'apparition de résistances aux antibiotiques actuellement présents sur le marché rend urgente la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques ou de nouvelles stratégies anti-infectieuses.<sup>8</sup>

## 1.2. Structure des bactéries

Le succès des antibiotiques cités précédemment vient en partie du fait qu'ils agissent sélectivement sur les cellules bactériennes, faisant partie des procaryotes et non sur les cellules humaines, les eucaryotes. Procaryotes et eucaryotes diffèrent par leur structure biologique ainsi que par leurs voies de biosynthèses. D'abord, les cellules eucaryotes possèdent un noyau ainsi qu'une grande variété d'organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique...). Les cellules procaryotes, quant à elles, ne possèdent pas de noyaux et leur matériel génétique est libre dans le cytoplasme, accompagné de ribosomes et de différentes enzymes. Enfin, une autre différence majeure vient de la paroi cellulaire, qui n'est présente que chez les bactéries et pas dans les cellules humaines (Figure 2).<sup>1</sup>

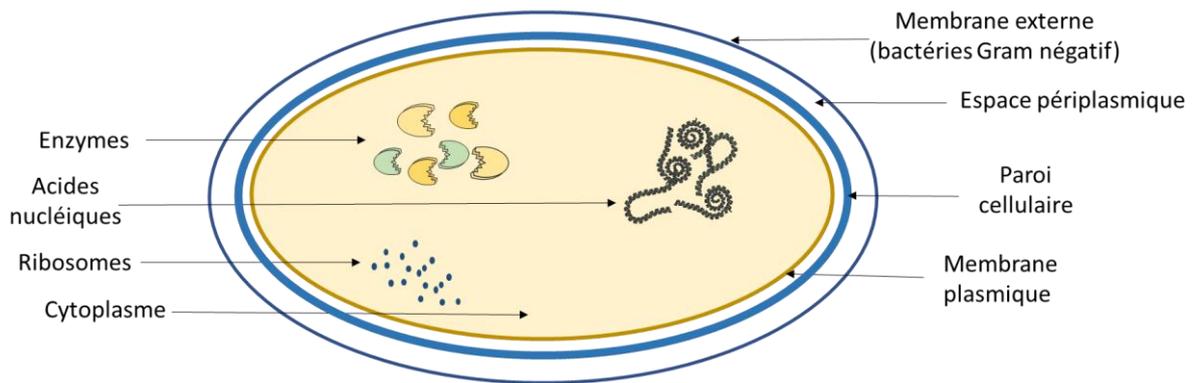


Figure 2 : Structure d'une bactérie

Les bactéries peuvent être divisées en différentes familles en fonction de certaines caractéristiques. Par exemple, certaines bactéries requièrent de l'oxygène, elles sont dites aérobies alors que d'autres n'ont pas besoin d'oxygène pour vivre, elles sont alors anaérobies. La forme des bactéries diffère également : les cocci sont de forme sphérique alors que les bacilles prennent une forme de bâtonnet. Enfin, la composition de la paroi bactérienne permet de différencier trois types de bactéries. Les bactéries à Gram négatif possèdent deux bicouches lipidiques : la membrane plasmique et la membrane externe. L'espace périplasmique séparant ces deux couches contient la paroi, sous forme d'une fine couche de peptidoglycane (2-7 nm). A l'inverse, les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de membrane externe mais une épaisse couche de peptidoglycane (20-40 nm) ainsi que des acides téichoïques (AT).<sup>1</sup> Enfin, il existe une troisième catégorie de bactéries, les mycobactéries, moins répandues que les précédentes. Ce sont des bacilles aérobies dont la composition est à mi-chemin entre celle des bactéries à Gram positif et celle des bactéries à Gram négatif : elles possèdent une épaisse couche de peptidoglycane, comme les bactérie à Gram positif ainsi qu'une membrane externe, similaire à celle des bactéries à Gram négatif.<sup>9</sup>

### 1.3. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est le composant principal de la paroi bactérienne. C'est un polymère constitué de peptides et de sucres qui permet à la bactérie de survivre à des variations de pH, de température ainsi qu'à la pression osmotique. Sans cela, l'eau présente dans le milieu extracellulaire entrerait de manière continue dans la bactérie conduisant à son éclatement, aussi appelé lyse.<sup>1</sup> Le polymère est constitué d'une alternance de deux sucres, le *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc), auquel est accroché un peptide dont la composition et la taille peuvent varier suivant la bactérie considérée.

Un schéma de la biosynthèse du PG est représenté en [Figure 3](#) dans le cas de la bactérie à Gram positif *Streptococcus pneumoniae*. La biosynthèse démarre dans le cytoplasme où l'uridine-diphosphate-GlcNac (UDP-GlcNac) est transformée en UDP-MurNac grâce à MurA et MurB suivi de la liaison des 3 premiers acides aminés du peptide, L-Ala, D-Gln et L-Lys dans le cas de *S. pneumoniae*, à l'UDP-MurNac grâce aux enzymes MurC à MurE. Parallèlement, les deux derniers acides aminés, qui sont D-Ala-D-Ala pour l'ensemble des bactéries, sont assemblés. Grâce à l'enzyme MurF, les deux parties sont assemblées pour former le nucléotide de Park.<sup>10</sup> Différentes enzymes permettent alors successivement d'accrocher ce nucléotide à la membrane plasmique puis d'ajouter le deuxième sucre, GlcNac et enfin de traverser la membrane plasmique pour se retrouver à l'extérieur de la paroi cellulaire. Après polymérisation des sucres, les enzymes de la famille des penicillin-binding-proteins (PBP), les carboxypeptidases (CPases) et les transpeptidases (TPases), agissent pour cliver le dernier acide aminé et créer une réticulation entre le 3<sup>ème</sup> acide aminé d'un peptide et le 4<sup>ème</sup> acide aminé d'un autre.

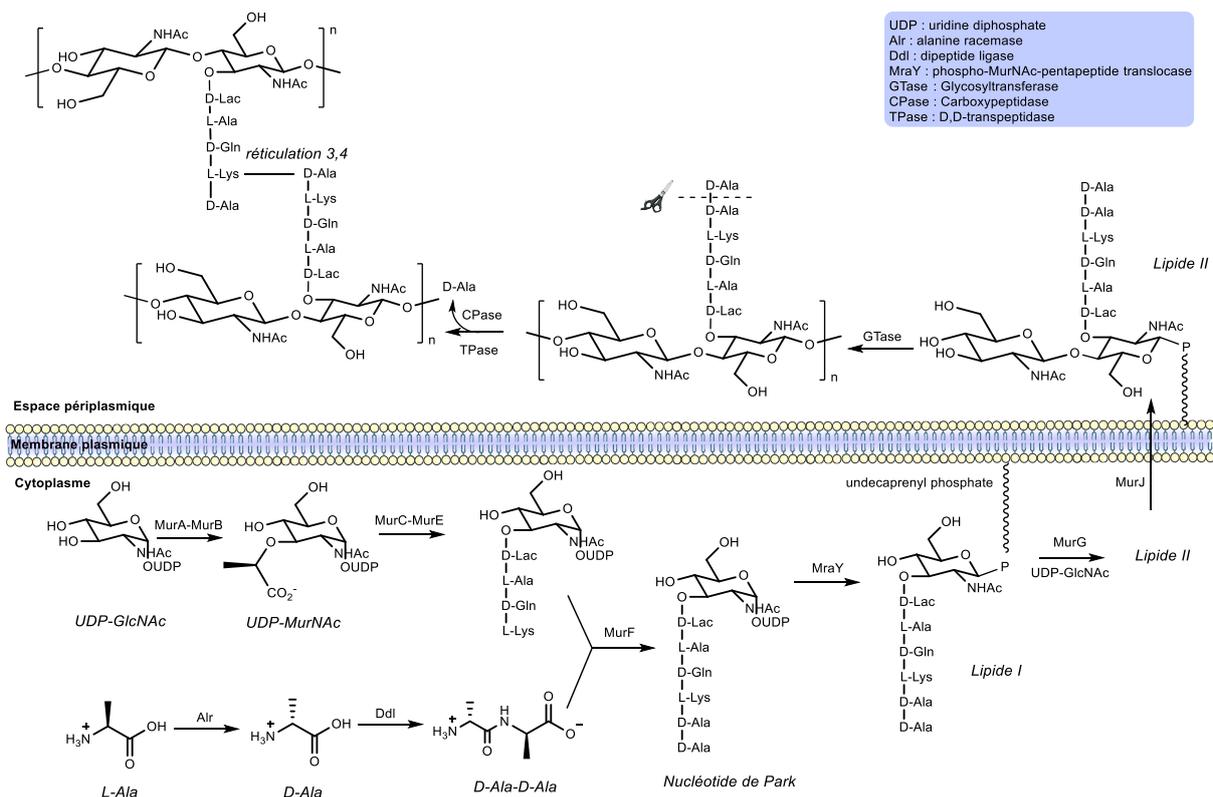


Figure 3 : Biosynthèse du PG chez *S. pneumoniae*. Adapté de Banahene et al.<sup>11</sup>

#### 1.4. *Streptococcus pneumoniae*

La bactérie *S. pneumoniae* est responsable de nombreuses infections telles que la méningite, la pneumonie ou l'otite et a notamment causé 1,5 millions de décès dans le monde en 2015.<sup>12</sup> Elle

affecte principalement les jeunes enfants, en dessous de 2 ans, ainsi que les personnes âgées.<sup>13</sup> Ainsi, *S. pneumoniae* est considérée par l'OMS comme l'une des 12 bactéries les plus menaçantes et il est urgent de développer de nouveaux antibiotiques contre cet agent pathogène, qui présente des résistances aux antibiotiques.<sup>8</sup>

*S. pneumoniae* est une bactérie de la famille des ovococci, elle a une forme ovoïde<sup>14</sup> et est capable de survivre en conditions aérobies et anaérobies.<sup>15</sup> Faisant partie des bactéries à Gram positif, sa paroi cellulaire est donc composée d'une épaisse couche de peptidoglycane et d'acides téichoïques (Figure 4A).

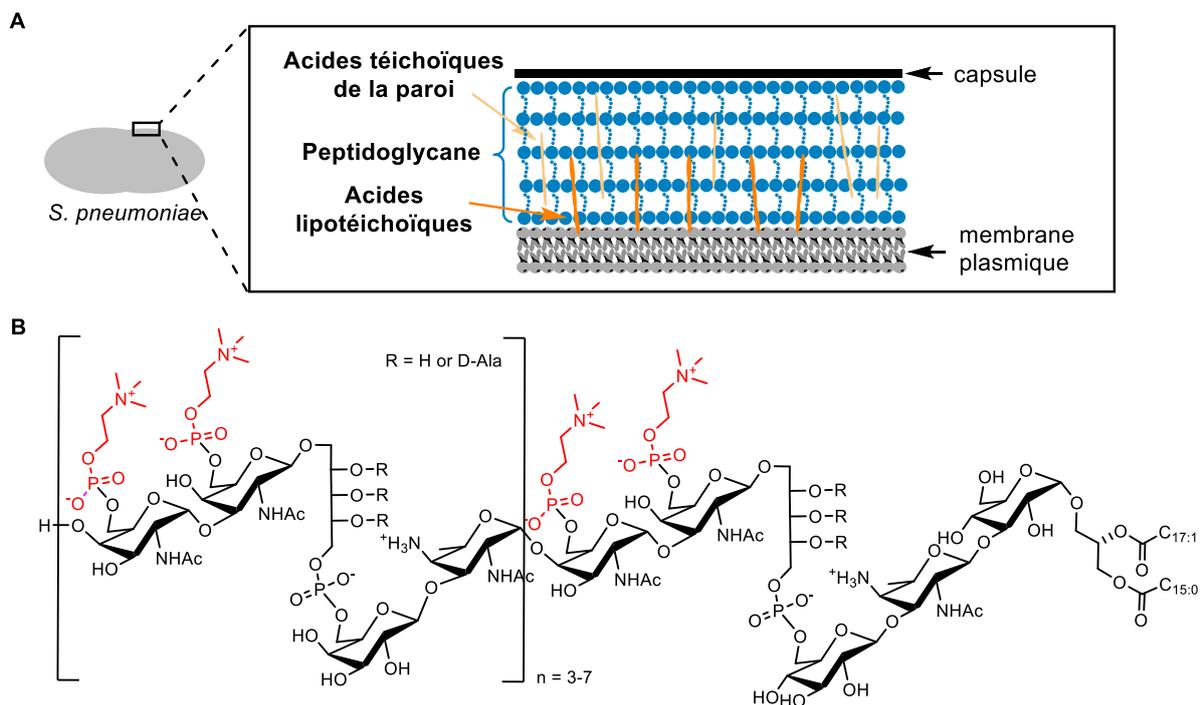


Figure 4 : A – Composition de la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* B – Structure chimique d'un acide lipotéichoïque de *S. pneumoniae* (adapté de N. Gisch et al.<sup>16</sup>). En rouge sont représentées les phosphocholines, spécifiques à *S. pneumoniae*.

Les acides téichoïques sont des glycopolymères qui ont une fonction similaire à la membrane externe, absente des bactéries à Gram positif. Ils permettent notamment de contrôler la perméabilité de la membrane et les interactions extracellulaires et apportent de la stabilité à la paroi cellulaire.<sup>17</sup> Les acides téichoïques sont divisés en 2 catégories : les acides téichoïques de la paroi (wall teichoic acid, WTA), qui sont accrochés de manière covalente à l'épaisse couche de PG et permettent sa solidité, ainsi que les acides lipotéichoïques (lipoteichoic acids, LTA), qui sont accrochés à la membrane plasmique (Figure 4A).<sup>18,19</sup> La structure des acides lipotéichoïques de *S. pneumoniae* est représentée en Figure 4B. Cette bactérie a la particularité de posséder des phosphocholines sur ses AT, représentée en rouge sur la figure ci-dessus. Ainsi, c'est la seule bactérie à avoir un besoin nutritionnel en choline.<sup>20</sup> Cette

particularité a été exploitée par notre équipe de recherche afin de marquer les acides téichoïques de *S. pneumoniae*.<sup>21</sup> Cela sera développée plus en détails dans la suite de ce chapitre.

### I.5. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est essentielle à la survie de la bactérie. Etant absente dans les cellules humaines, cela en fait une cible idéale pour la conception d'antibiotiques. Ainsi, cela constitue la cible de beaucoup d'antibiotiques existants tels que les  $\beta$ -lactamines qui comprennent la pénicilline **1**, les céphalosporines **2** et les carbapénèmes **3** mais également la D-cyclosérine **6** et la vancomycine **8** (Figure 5).

Les  $\beta$ -lactamines agissent comme compétiteur, en imitant la structure de la D-Ala-D-Ala **4** (Figure 5). Ainsi, les transpeptidases, responsables de la réticulation à la fin de la biosynthèse du PG, vont réagir sur le carbonyle présent sur le cycle contraint de la  $\beta$ -lactamine administrée. Cela rend l'enzyme inactive et l'empêche d'effectuer la réticulation entre les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> résidus du peptide.<sup>1,22</sup> Cependant, les bactéries qui, au début des administrations d'antibiotiques, étaient tuées par les  $\beta$ -lactamines ont rapidement évolué et développé des résistances, rendant beaucoup d'antibiotiques inactifs. Une des causes majeures de résistance aux  $\beta$ -lactamines est la présence de sérines  $\beta$ -lactamases, des enzymes similaires aux transpeptidases en termes de structure. Transpeptidases et sérines  $\beta$ -lactamases possèdent une sérine au niveau de leur site actif, qui permet l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame de l'antibiotique et la formation d'un ester clivable. Après ouverture du cycle  $\beta$ -lactame par la sérine  $\beta$ -lactamase, l'ester formé est hydrolysé et l'antibiotique est complètement détruit. Ce mécanisme de résistance touche la grande majorité des bactéries à Gram négatif ainsi que certaines bactéries à Gram positif.

Pour lutter contre ce phénomène, il est possible d'utiliser des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, dont l'acide clavulanique **5** fait partie. Ces composés ont une activité antibiotique faible mais sont efficaces lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec un antibiotique détruit par la  $\beta$ -lactamase. L'acide clavulanique a été isolé en 1976 de *Streptomyces clavuligerus* et a une structure similaire aux pénicillines. Le composé va réagir sur le site actif de la sérine  $\beta$ -lactamase par un mécanisme similaire à celui de la réaction entre la pénicilline et l'enzyme. Au lieu de la rapide hydrolyse de l'ester formé, on a cette fois une seconde réaction avec un nucléophile de l'enzyme afin de lier l'acide clavulanique à la sérine  $\beta$ -lactamase de façon irréversible et ainsi désactiver l'action de l'enzyme.<sup>1</sup>

Ensuite, la D-cyclosérine **6** possède un mode d'action similaire aux  $\beta$ -lactamines. Cependant, cet antibiotique ne mime pas la structure d'une D-Ala-D-Ala, mais la structure de la D-Ala **7**. Il agit au début de la biosynthèse du PG en inhibant deux enzymes : l'alanine racemase (Figure 3, Alr), qui sert à

transformer les L-Alanines en D-Alanines ainsi que la D-Ala-D-Ala ligase (Figure 3, Ddl), qui sert à lier les deux D-Ala.<sup>1</sup>

Enfin, la vancomycine **8**, quant à elle, fait partie de la famille des glycopeptides, un groupe de composés rigides et de grande taille. La vancomycine intervient à la fin du processus de synthèse du PG par l'inhibition de l'enzyme glycosyltransférase (Figure 3, GTase) qui permet la polymérisation des unités de PG. Plus précisément, la vancomycine agit en formant 5 liaisons hydrogènes stables avec le pentapeptide présent sur l'unité de PG. L'encombrement stérique de la vancomycine empêche alors le rapprochement et l'activité de l'enzyme GTase.<sup>23,24</sup> La vancomycine est seulement active contre les bactéries à Gram positif car son poids moléculaire est trop élevé pour passer au travers de la membrane externe présente chez les bactéries à Gram négatif.

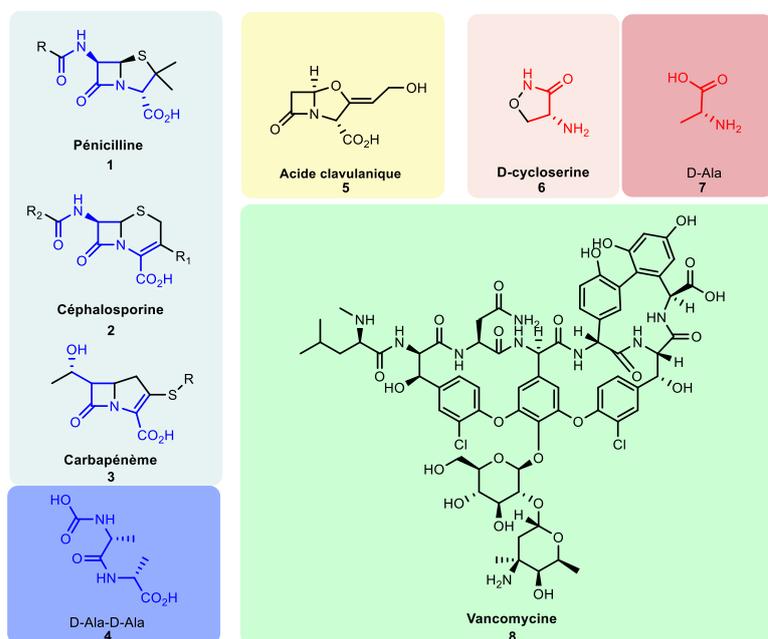


Figure 5 : Structure chimique de différents antibiotiques ciblant la synthèse de la paroi bactérienne ainsi que des biomolécules qu'ils miment

En dehors des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, il existe des antibiotiques agissant sur la membrane plasmique (valinomycine,<sup>25</sup> lipopeptides<sup>26</sup>), des inhibiteurs du métabolisme cellulaire (sulfonamides<sup>27</sup>), des inhibiteurs d'acides nucléiques (fluoroquinolones<sup>28</sup>, proflavine<sup>29</sup>) et enfin des perturbateurs de la synthèse de protéines essentielles à la survie des bactéries (oxazolidinones,<sup>30</sup> aminoglycosides,<sup>31</sup> chloramphénicol<sup>32</sup>).

## 1.6. Développement de nouveaux antibiotiques

Le premier antibiotique a été découvert il y a maintenant presque 100 ans et pourtant, les infections bactériennes sont encore responsables de millions de décès chaque année dans le monde.

Le développement d'analogues a, dans un premier temps, permis de contenir le nombre d'infections bactériennes fatales, malgré une augmentation du nombre de bactéries résistantes. Seulement, de moins en moins d'analogues sont aujourd'hui identifiés comme antibiotique efficace, ce qui cause une augmentation du nombre de décès dus à ces pathogènes ces dernières années. Il a été estimé en 2014 qu'environ 700 000 personnes décèdent chaque année dans le monde à cause de bactéries multi-résistantes et que, si le scénario d'augmentation de résistance se poursuit, cela pourrait causer 10 millions de décès chaque année.<sup>33</sup> Cela pose un problème pour le traitement des infections bactériennes mais également dans d'autres domaines médicaux comme en cancérologie, où les antibiotiques sont vitaux pour éviter les infections pendant les chimiothérapies. De plus, des opérations chirurgicales qui sont aujourd'hui fréquentes et avec des risques contrôlés pourraient devenir beaucoup plus risquées si le nombre de bactéries multi-résistantes continue à croître.<sup>33</sup> Ainsi, il est urgent de développer de nouvelles stratégies anti-infectieuses, avec un mécanisme d'action différent des antibiotiques déjà mis sur le marché.

La recherche dans le domaine de la chimobiologie et pour la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique a beaucoup évolué depuis le début des années 2000, notamment avec l'émergence des réactions de chimie click développées par Sharpless<sup>34</sup> et Meldal<sup>35</sup>, puis des réactions de chimie bioorthogonale développées par Bertozzi.<sup>36</sup>

Ces nouvelles réactions ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies pour la conception de nouveaux médicaments<sup>37</sup> car elles permettent notamment un contrôle spatio-temporel du principe actif. Ainsi, c'est source d'espoir pour la découverte d'antibiotiques avec un mécanisme d'action novateur. En outre, cette catégorie de réactions chimiques a aussi révolutionné les techniques de marquage métabolique qui permettent, en particulier, de mieux comprendre les processus et les mécanismes régissant le métabolisme de bactéries. Les nouvelles connaissances développées grâce au marquage métabolique peuvent ainsi servir d'outils pour la conception de nouveaux médicaments, notamment de nouvelles stratégies anti-infectieuses.<sup>38</sup>

Ainsi, dans la suite de ce chapitre, les réactions de chimie click et de chimie bioorthogonale vont être développées, puis nous verrons comment ces réactions ont été utilisées pour le marquage métabolique et pour la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

## II. Chimie click et chimie bioorthogonale

### II.1. Réaction de Huisgen et CuAAC

Le terme de « chimie click » a été employé pour la première fois par Barry Sharpless *et al.* en 2001<sup>34</sup> et désigne un ensemble de réactions chimiques qui présentent des critères précis. De hauts rendements, des sous-produits absents ou non toxiques, une stéréospécificité, des conditions de réactions faciles (présence d'oxygène et d'eau) et la possibilité de mener ses réactions sans solvant ou dans l'eau, sont les principaux critères décrits par Sharpless. Le but de ces réactions chimiques est, dans un premier temps, de permettre une plus grande rapidité et une plus grande diversité de synthèse de nouveaux composés.<sup>34</sup>

Les réactions chimiques décrites comme étant des réactions clicks sont, au départ, les réactions de cycloadditions (la cycloaddition 1,3-dipolaire et les réactions de Diels-Alder), les réactions de substitutions nucléophiles, notamment celles permettant une ouverture d'hétérocycles (époxydes, aziridines...), les réactions sur des carbonyles (formation d'urée, hydrazones, amides...) ainsi que les additions sur doubles liaisons carbone-carbone (époxydation, dihydroxylation, formations d'aziridines...).<sup>34</sup> Par la suite, la réaction click qui s'est révélée la plus utilisée est la cycloaddition 1,3-dipolaire, aussi appelée la réaction de Huisgen, du nom de l'allemand Rolf Huisgen qui a commencé à l'exploiter en 1963.<sup>39</sup> Cette réaction de cycloaddition se produit entre un azoture **9** et un alcyne **10**, est activée par chauffage, et forme un mélange de triazoles disubstitués en position 1,4 **11** et en position 1,5 **12** (Schéma 1). En 2002, Barry Sharpless *et al.*<sup>40</sup> et Meldal *et al.*<sup>35</sup> ont, de manière simultanée, démontré qu'en utilisant du cuivre(I), la réaction pouvait se faire à température ambiante et qu'elle était régiospécifique pour former exclusivement le triazole 1,4 **11** (Schéma 1). Alors que Meldal *et al.* ont utilisé l'iodure de cuivre comme source de Cu<sup>I</sup>, Sharpless a, quant à lui, utilisé une source de Cu<sup>II</sup>, le sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub> ainsi qu'un réducteur, l'acide ascorbique (ou l'ascorbate de sodium) afin de réduire le Cu<sup>II</sup> en Cu<sup>I</sup> *in situ*. Cette réaction a pris le nom de Copper(I) catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC).

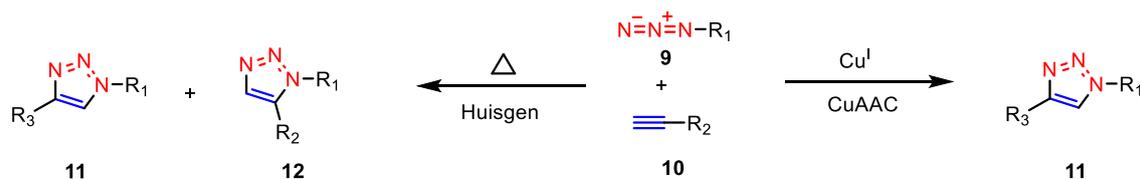


Schéma 1 : Réaction de Huisgen, activée par chauffage et formant deux régioisomères et CuAAC, activée par Cu(I) et régiospécifique

## II.2. SPAAC

Les réactions de chimie click ont d'abord été décrites dans le but d'être réalisées au laboratoire, pour la synthèse de nouveaux composés organiques. Mais il a rapidement été imaginé que les caractéristiques de ces réactions en font des réactions idéales pour être réalisées dans le milieu vivant, mêlant ainsi la chimie et la biologie. Malgré l'essor de techniques permettant l'observation du milieu vivant grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes (comme les Green Fluorescent Proteins (GFP)<sup>41</sup>), il était encore impossible au début des années 2000 d'observer par fluorescence des biomolécules telles que les acides nucléiques, les lipides ou les glycanes.<sup>42</sup>

Ainsi, Carolyn R. Bertozzi *et al.* ont défini et développé des réactions dites bioorthogonales, réactions chimiques n'interférant pas avec le milieu vivant et avec des cinétiques rapides à température et pH physiologiques. De par sa petite taille et son absence de réactivité avec les fonctions chimiques présentes dans le milieu vivant, l'azoture était un candidat idéal pour entrer en jeu dans des réactions bioorthogonales. La ligation de Staudinger, adaptée de la réaction de Staudinger, mettant en jeu un azoture **9** et une phosphine spécifique **14** a ainsi été développée en premier lieu (Schéma 2).<sup>43</sup> Cependant, cette réaction possède une cinétique assez lente et impose donc de travailler à forte concentration. Elle n'est ainsi pas idéale pour des réactions en milieu vivant, qui, par définition, n'est pas figé et évolue rapidement. Carolyn R. Bertozzi s'est donc inspirée de la CuAAC développée par Sharpless et Meldal, qui a une cinétique beaucoup plus rapide. Cependant, la présence de cuivre, cytotoxique, limite son utilisation dans le milieu vivant. La fonction du cuivre dans la CuAAC est d'activer l'alcyne linéaire, fonction chimique peu réactive. Rendre cette fonction chimique plus réactive a été possible en la contraignant dans un cycle, formant ainsi une cyclooctyne **16** qui réagit rapidement avec l'azoture sans présence de cuivre par une réaction de cycloaddition [3+2] nommée Strain-Promoted Alkyne-Azide-Cycloaddition (SPAAC) (Schéma 2). Lorsque Bertozzi l'a décrite pour la première fois, cette cyclooctyne a été conjuguée à la biotine et a ainsi permis l'observation par fluorescence de cellules contenant des sucres, modifiés métaboliquement avec un azoture.<sup>36</sup>

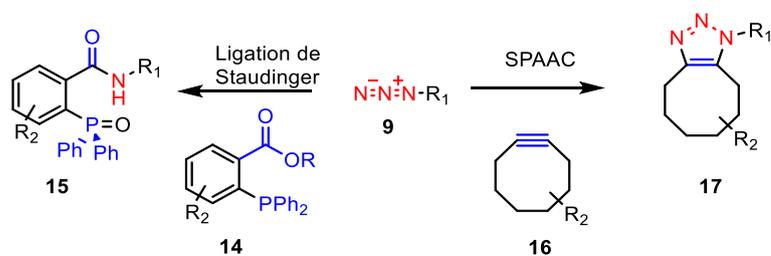


Schéma 2 : Ligation de Staudinger et SPAAC développées par Bertozzi<sup>42</sup>

Malgré les grands espoirs fondés par la première réaction SPAAC utilisant la cyclooctyne OCT **18** (Figure 6), la cinétique de cette réaction s'est en fait révélée assez faible, nécessitant une grande quantité de réactifs, des temps d'incubation longs et menant à un signal faible. Beaucoup de recherches ont donc été menées dans la fin des années 2000 aboutissant à la découverte d'une variété de cyclooctynes, de plus en plus rapides.<sup>44</sup>

Ainsi, au fur et à mesure des années et des découvertes de nouvelles cyclooctynes, dont quelques exemples sont représentés en Figure 6, les cinétiques de réaction ont augmenté. Il est important de préciser ici, que les valeurs de constantes cinétiques indiquées Figure 6 n'ont pas toutes été calculées dans des conditions parfaitement identiques et reproductibles. Il est donc présenté ici une estimation des rapports de vitesse entre les différentes cyclooctynes. Suivant les conditions d'expérience, leur vitesse relative peut donc varier.

De par les différents exemples décrits, on distingue deux classes de cyclooctynes : les premières synthétisées sous forme aliphatique (OCT **18**, MOFO **19**, DIFO **20** et BCN **22**), puis des cyclooctynes dibenzoannulées (DIBO **21**, DBCO **23**, BARAC **24**). La différence de réactivité entre ces deux classes vient du fait que la contrainte de cycle est augmentée par l'ajout de carbones hybridés  $sp^2$  chez les cyclooctynes dibenzoannulées. Cependant, bien que le BARAC soit le composé permettant la réaction parmi les plus rapides, il est moins stable et se décompose assez rapidement. Par ailleurs, le BCN est un cas particulier de cyclooctyne aliphatique présentant une grande réactivité. Cela est dû à la fusion des cycles cyclooctynes et cyclopropane.<sup>44</sup>

Quelques autres cyclooctynes ont été identifiées dans les années qui ont suivi, sans pour autant parvenir à accroître davantage leur réactivité. L'une des raisons est que l'augmentation de la réactivité va, en général, de pair avec la diminution de la stabilité du composé. Un juste milieu semble donc avoir été trouvé avec les composés décrits ici. Finalement, les principales cyclooctynes aujourd'hui utilisées sont le dibenzocyclooctyne (DIBO), le bicyclo[6.1.0]non-4-yne (BCN) et l'azadibenzocyclooctyne (DBCO) et ces composés sont maintenant commercialisés, bien qu'à des prix assez élevés.

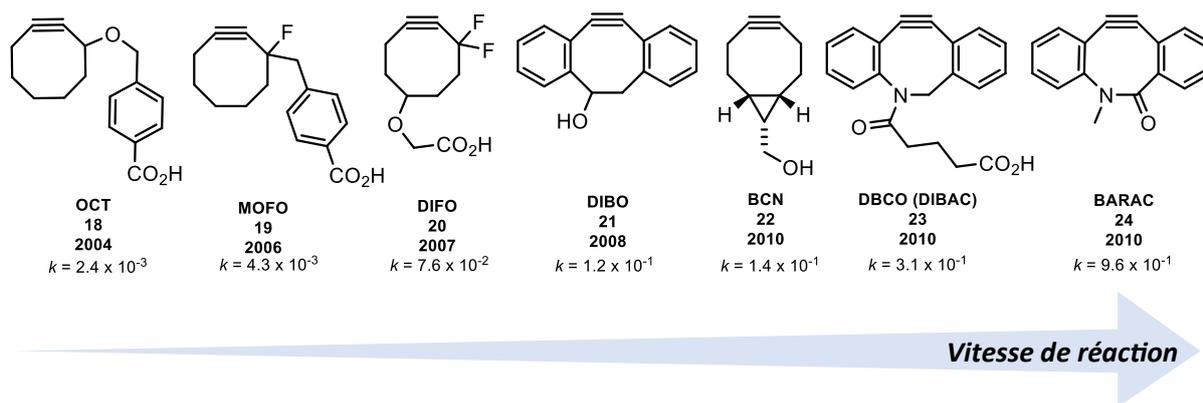


Figure 6 : Différentes cyclooctynes développées pendant les années suivant l'apparition de la SPAAC, classées suivant une estimation de l'ordre de vitesse. Les constantes cinétiques  $k$  sont indiquées à température ambiante en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$  et sont calculées par réaction avec un azoture aliphatique tel que le  $BnN_3$ . Les réactions ont été effectuées dans  $CD_3CN$  (OCT, MOFO, DIFO, BARAC), dans un mélange  $CD_3CN : D_2O$  (3 : 1) (DIBO) ou dans  $CD_3OD$  ou  $CH_3OH$  (BCN, DBCO)<sup>44</sup>

Après avoir détaillé les différences de réactivité de la cyclooctyne, jouant le rôle de diénophile dans la cycloaddition SPAAC, il est aussi possible de modifier la réactivité de la réaction en jouant sur le caractère aliphatique ou aromatique de l'azoture. C'est notamment l'objet d'une étude effectuée par Van Delft *et al.* et publiée en 2014.<sup>45</sup> Avant cette publication, la plupart des études cinétiques étaient effectuées en utilisant un azoture aliphatique, principalement l'azoture de benzyle. Ainsi, les cyclooctynes aromatiques présentaient des cinétiques de réactions plus élevées que les cyclooctynes aliphatiques, comme décrits ci-dessus, en effectuant une cycloaddition [3+2] à demande normale : l'orbitale moléculaire haute occupée, en anglais Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO), de l'azoture réagissant avec l'orbitale moléculaire basse vacante, en anglais Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO), de la cyclooctyne (Figure 7A).

Lorsque l'on remplace l'azoture aliphatique par un azoture aromatique, diminuant ainsi la densité électronique de l'azoture, l'HOMO de l'azoture est plus basse en énergie et la réaction est ralentie par une plus grande différence d'énergie entre les HOMO et LUMO concernées. Seulement, de façon surprenante, une réactivité inverse a été observée lorsque l'étude a été faite avec le BCN, une cyclooctyne aliphatique : la vitesse de réaction entre le BCN et un azoture aromatique est 8 fois supérieure à la vitesse de réaction entre le DIBAC et le même azoture aromatique, alors que la tendance est inversée lors de la réaction avec un azoture aliphatique. Sur la base de ces observations et des études de modélisation, il a été conclu par cette même équipe que la réaction entre le BCN, cyclooctyne aliphatique et les azotures aromatiques fonctionne par un mécanisme de cycloaddition à demande inverse. Ce sont la LUMO de l'azoture et l'HOMO du BCN qui réagissent ensemble (Figure 7B).

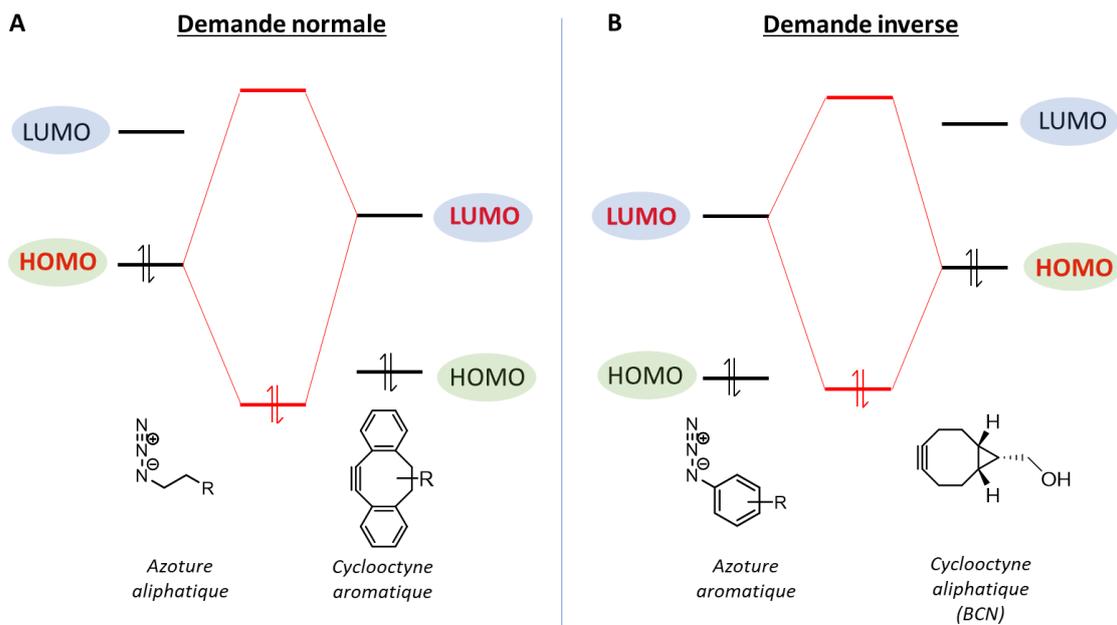


Figure 7 : Modèle des orbitales frontières lors de la réaction de cycloaddition [3+2] nommée SPAAC, à demande normale entre un azoture aliphatique et une cyclooctyne aromatique (A) et, à demande inverse entre un azoture aromatique et une cyclooctyne aliphatique (BCN) (B)

### II.3. IEDDA

Par la suite, une autre réaction bioorthogonale, la cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse en électron, nommée IEDDA (Inverse-Electron-Demand Diels-Alder), a été introduite simultanément en 2008, par Hilderbrand *et al.*<sup>46</sup> ainsi que par Joseph M. Fox *et al.*<sup>47</sup> Le premier a décrit cette réaction entre une tétrazine monosubstituée **25** et le norbonène **26**, un alcène *cis* contraint dans un cycle, et a décrit une vitesse de réaction de  $1,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Fox a, quant à lui, décrit une vitesse de réaction 1000 fois supérieure grâce à l'utilisation d'une *trans*-cyclooctyne (TCO) **28**, réagissant avec la tétrazine aromatique **29** (Schéma 3).

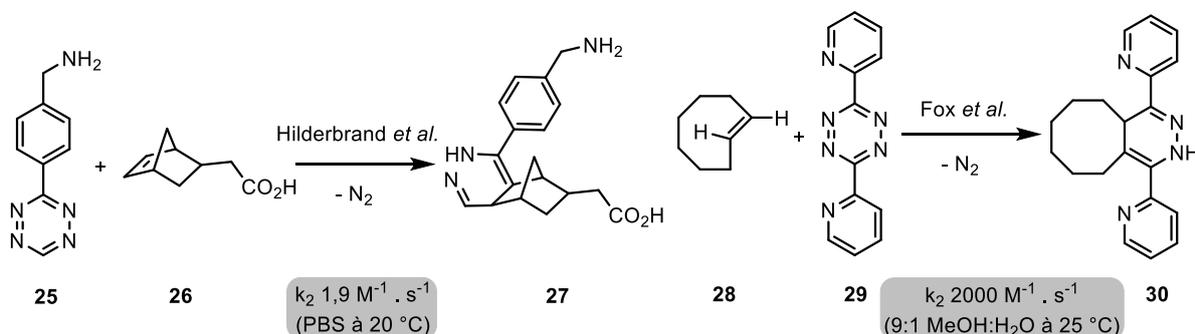


Schéma 3 : Premières IEDDA décrites par Hilderbrand<sup>46</sup> et Fox<sup>47</sup> en 2008

Si on s'intéresse au mécanisme de cette réaction (Figure 8A), la première étape est la cycloaddition entre une tétrazine **31**, le diène et une double liaison tendue **32**, le diénophile qui forme

le composé bicyclique **33**. C'est l'étape limitante de la réaction, celle qui détermine sa cinétique d'ordre 2. Ensuite, une étape de rétro-Diels-Alder permet de former la 4,5-dihydropyridazine **34** tout en libérant du diazote, seul sous-produit de la réaction. Cette étape est suivie par une prototropie formant l'isomère **35**.

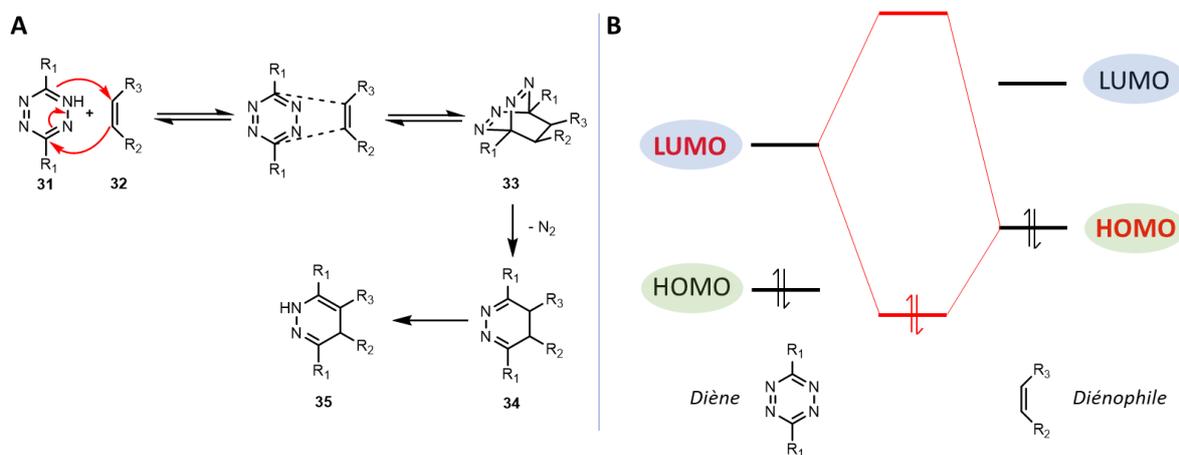


Figure 8 : Mécanisme de l'IEDDA (A) et modèle des orbitales frontières correspondant à la réaction étudiée (B)<sup>48</sup>

Comme son nom l'indique, l'IEDDA est une cycloaddition à demande inverse. Ainsi, l'orbitale LUMO du diène, la tétrazine, réagit avec l'orbitale HOMO du diénophile, l'alcène tendu (Figure 8B). Pour augmenter la vitesse de cette réaction, on peut modifier les deux réactifs. Premièrement, diminuer la densité électronique de la tétrazine par des groupements électroattracteurs a pour conséquence d'abaisser l'énergie de son orbitale LUMO. A l'inverse, augmenter la densité électronique du diène par des groupement électrodonneurs va accroître l'énergie de son orbitale HOMO. Différents alcènes tendus et différentes tétrazines ont ainsi été développés ces dernières années.

Les différentes modifications effectuées montrent que les plus grosses différences de réactivité ont lieu lorsque l'on modifie l'alcène tendu. Ainsi, les principaux diénophiles développés sont représentés en Figure 9. Premièrement, les cinétiques déterminées sont bien plus rapides que les cinétiques de la réaction SPAAC indiquées en Figure 6. L'IEDDA est ainsi la réaction bioorthogonale présentant les cinétiques les plus rapides parmi toutes les réactions bioorthogonales aujourd'hui identifiées.

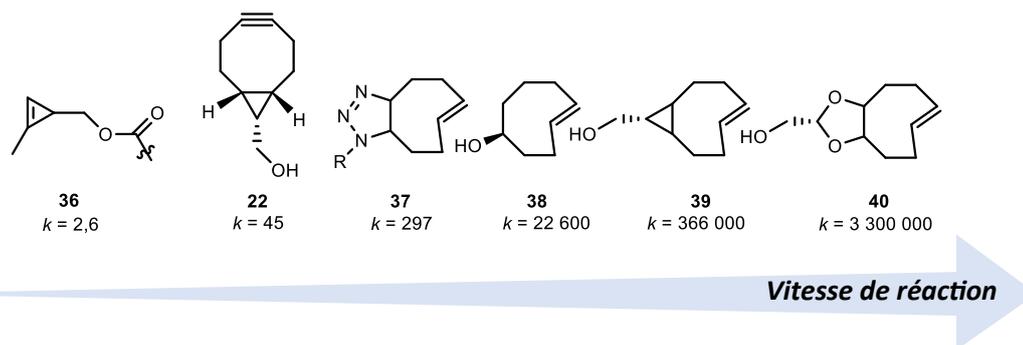


Figure 9 : Différents diénophiles développés pendant les années suivant l'apparition de l'IEDDA. Les constantes cinétiques  $k$  sont indiquées en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$  et sont calculées par réaction avec la 3,6-di-(2-pyridyl)-1,2,4,5-tétrazine **29** ou un de ses dérivés<sup>49</sup>

A la suite de la première description d'IEDDA avec le TCO **28**, Fox et *al.* ont développé deux autres TCO ayant une réactivité encore supérieure : en créant un bicyclic entre le TCO et un cyclopropane (**39**)<sup>50</sup> ou un dioxolane (**40**)<sup>51</sup>, le système est forcé d'être dans une conformation de « demi-chaîne », le rendant ainsi plus réactif.<sup>50</sup> Prescher et *al.*<sup>52</sup> suivis de Devaraj et *al.*<sup>53</sup> ont par ailleurs utilisé le cyclopropène comme diénophile tendu, dont un exemple est le composé **36**, qui, bien qu'ayant une réactivité grandement inférieure aux TCO, présente une bonne stabilité *in vivo*. Wang et *al.* ont, quant à eux, réutilisé le groupement BCN **22**, initialement impliqué dans les SPAAC, pour réagir avec la tétrazine avec une cinétique plus lente que les TCO mais plus rapides que les cyclopropènes. Enfin, Leeper et *al.*<sup>54</sup> ont développé un diénophile bifonctionnel, le *trans,trans*-cyclooctadiène ((*E,E*)-COD) **41** qui a la particularité de pouvoir réagir doublement : un premier alcène du cycle réagit avec un azote grâce à une cycloaddition [3+2] pour former le composé **37** qui peut alors réagir de nouveau avec une tétrazine (Schéma 4) avec une constante de vitesse inférieure au TCO mais supérieure au BCN.

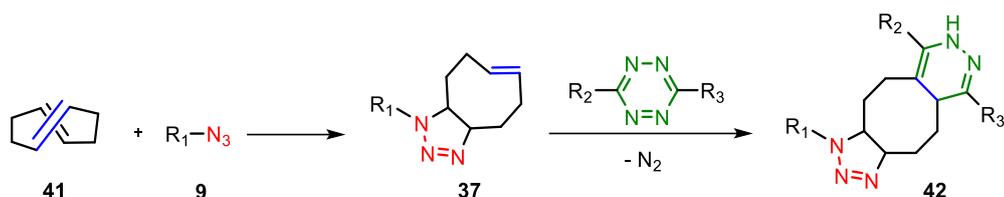


Schéma 4 : Réactions du composé bifonctionnel (*E,E*)-COD **41** avec un azote puis avec une tétrazine

L'optimisation des tétrazines pour modifier leur réactivité est, quant à elle, moins développée. Ceci est en partie dû à des problèmes de stabilité. Une échelle de réactivité estimée pour différentes tétrazines synthétisées est représentée en Figure 10. Cependant, aucune étude n'a réellement comparé ces différentes tétrazines en effectuant la cycloaddition avec un diénophile fixé. Comme prévu par la théorie des orbitales frontières, la tendance générale est que plus la tétrazine est appauvrie en électrons, plus sa réactivité est augmentée. Ainsi, les tétrazines **49** et **50**, présentant des groupements trifluorométhyles  $CF_3$  et acides carboxyliques sont les plus rapides. Cependant, la tétrazine est ainsi

fragilisée, moins stable *in vivo* et sa synthèse chimique est rendue plus compliquée, souvent avec des rendements très faibles. Il est également observé que les tétrazines encombrées sont plus lentes, l'encombrement empêchant l'approche facile du diénophile.

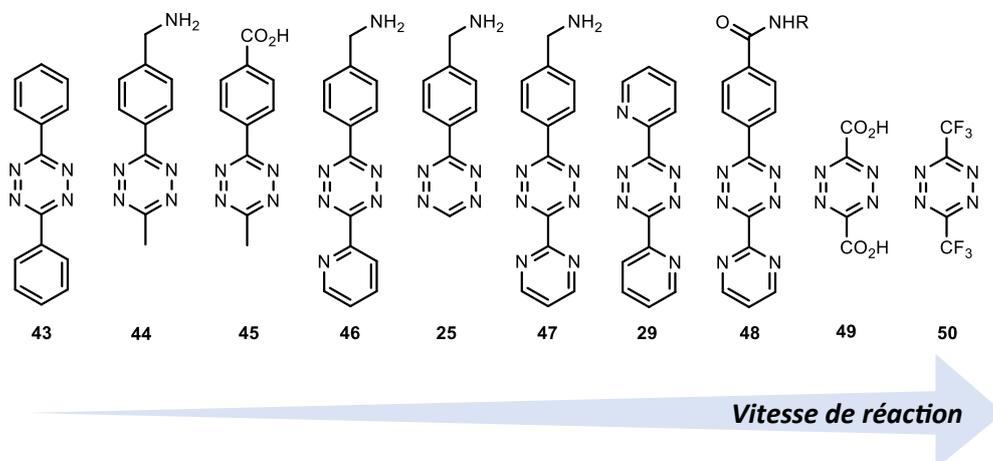


Figure 10 : Echelle de réactivité estimée entre les tétrazines utilisées pour l'IEDDA<sup>48</sup>

#### II.4. Comparaison des différentes réactions click évoquées

Pour conclure sur cette partie, le [Tableau 1](#) ci-après résume les caractéristiques et compare les quatre réactions évoquées : CuAAC, ligation de Staudinger, SPAAC, IEDDA. Ces deux dernières réactions sont les plus largement utilisées ces dernières années dans le domaine de la chémobiologie afin d'effectuer des réactions *in vivo*. Elles possèdent des cinétiques de réaction correctes, contrairement à la ligation de Staudinger, trop lente, et elles sont non toxiques *in vivo* car elles ne nécessitent pas la présence de cuivre, contrairement à la CuAAC. Cependant, les principaux inconvénients de la SPAAC sont l'encombrement stérique de la cyclooctyne ainsi que la réactivité de certains de ces dérivés avec des nucléophiles du milieu vivant, notamment les thiols. C'est principalement le cas du BCN.<sup>55</sup> Du côté de l'IEDDA, la réactivité des réactifs est parfois tellement élevée qu'ils en deviennent instables, que ce soit pour leur synthèse chimique ou pour leur stabilité *in vivo*.

Tableau 1 : Tableau comparant les caractéristiques des réactions click CuAAC, Staudinger, SPAAC et IEDDA <sup>56,57</sup>

Nom	Constante cinétique	Avantages	Inconvénients
<b>CuAAC</b>	$\sim 1 - 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Fonctions chimiques de petite taille Réactifs commerciaux et bon marché Cinétique assez rapide	Toxicité du cuivre <i>in vivo</i>
<b>Ligation de Staudinger</b>	$\sim 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Amide formé stable	Cinétique très lente Phosphine sensible à l'oxydation <sup>58</sup>
<b>SPAAC</b>	$\sim 0.02 - 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Pas de catalyseur : adaptable à <i>l'in vivo</i>	Cinétique moyenne Cyclooctyne encombrante Cyclooctyne pas parfaitement bioorthogonale <sup>55</sup>
<b>IEDDA</b>	$\sim 1 - 1\,000\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Cinétique très rapide Pas de catalyseur : adaptable à <i>l'in vivo</i>	Deux structures modérément encombrantes TCO parfois instable

L'essor de l'utilisation de la CuAAC, que ce soit pour la synthèse de nouveaux composés originaux ou pour l'utilisation du triazole comme bioisostère des amides, esters et acides carboxyliques<sup>59</sup> ainsi que le développement de la chimie bioorthogonale pour des applications de chémobiologie a permis à leurs inventeurs, Sharpless, Meldal et Bertozzi d'obtenir le prix Nobel de chimie en 2022. Nous sommes encore loin d'avoir exploité tous les atouts de ces réactions et il devrait y avoir, dans les prochaines années, de nouvelles découvertes prometteuses dans ce domaine, tant au niveau de nouvelles réactivités que pour les applications qui en découlent.

---

### III. Apports de la chimie click et de la chimie bioorthogonale pour l'incorporation métabolique de dérivés naturels modifiés

---

#### III.1. Importance de l'étude des bactéries et de leur métabolisme

Malgré plusieurs décennies d'étude sur les bactéries, beaucoup d'inconnues demeurent concernant les dynamiques et les mécanismes impliquant notamment les glycanes présents dans les bactéries. L'étude de ces mécanismes permet diverses applications dans les domaines biotechnologique et médical ainsi que pour l'agriculture et l'environnement.<sup>11</sup>

La santé humaine est incontestablement associée aux bactéries, d'un côté par l'existence de bactéries pathogènes, provoquant des maladies parfois mortelles, mais également de manière positive, par l'existence de bactéries bénéfiques, présentes dans le microbiote, dont l'équilibre est essentiel pour la santé. En effet, les bactéries du microbiote intestinal (*Lactobacilles*, *Bacteroides*, *Clostridium*...) participent à divers processus comme la digestion de nutriments, le développement du système immunitaire ou encore la prévention contre certains pathogènes. Ainsi, une diminution de la diversité du microbiote est impliquée dans l'apparition de diverses maladies telles que l'inflammation du côlon (colite) et certains cancers du côlon.<sup>60</sup> Il est donc important d'étudier et de comprendre les interactions entre les composants des bactéries du microbiote et leur environnement. Par ailleurs, comme évoqué précédemment, les bactéries sont impliquées dans beaucoup de maladies mortelles et l'émergence de bactéries multirésistantes, dont l'une des plus préoccupantes est le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), rend urgent le développement de nouveaux traitements et de nouvelles méthodes de diagnostic.<sup>61</sup>

Malgré les nombreuses études déjà réalisées, beaucoup de travail reste à accomplir dans ce domaine. Premièrement, l'étude de la structure des différents composants de la paroi bactérienne est difficile par leur diversité et par la complexité des méthodes de séparation et d'analyse utilisées. Ensuite, lorsque la structure du composant biologique est élucidée, il reste encore à comprendre les processus impliqués dans leur biosynthèse, leur transport, leur dégradation et leur recyclage. Ces investigations sont souvent rendues difficiles par la reproduction *in vitro* complexe de l'environnement dans lequel évoluent les bactéries *in vivo*.<sup>11</sup>

### III.2. Les techniques de marquage antérieures à la chimie click

Avant l'arrivée de la chimie bioorthogonale qui a ouvert la voie au développement de nombreuses techniques de marquage métabolique, quelques méthodes étaient connues et utilisées pour la caractérisation de structures biologiques et l'élucidation des processus biologiques.

#### III.2.1. Protéine fluorescente verte

La découverte de la protéine fluorescente verte, GFP, remonte à 1962 et est attribuée à Osamu Shimomura.<sup>62</sup> Il a isolé cette protéine de la méduse *Aequorea victoria* et a décrit ses propriétés de fluorescence exceptionnelles. Par la suite, en 1994, c'est Martin Chalfie qui réussit à exprimer cette protéine dans la bactérie *E. coli* ainsi que dans le vers *C. elegans*, permettant de marquer les neurones sensoriels du vers (Figure 11).<sup>63</sup> Dans les années qui suivirent, les travaux de Tsien *et al.* ont permis de développer des variants de cette protéine émettant à différentes longueurs d'onde et donc affichant d'autres couleurs que le vert.<sup>41</sup> Ces 3 chercheurs ont obtenu le prix Nobel de chimie en 2008 pour ces découvertes.



Figure 11 : Couverture du journal Science du 11 février 1994

La fusion du gène codant pour la GFP au gène codant pour une protéine spécifique permet de rendre cette dernière fluorescente lorsqu'elle est exprimée dans une cellule. Ainsi, cette technologie n'est pas applicable à la modification et l'observation de biomolécules telles que les glycanes, les acides nucléiques ou les lipides. D'autres techniques ont donc été développées.

#### III.2.2. Marquage isotopique et radiomarquage

Une technique permettant le marquage métabolique de ces biomolécules est l'utilisation d'isotopes stables ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) ou radiomarqués (par exemple  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ). Par exemple, parmi les avancées permises par l'utilisation d'isotopes, le mode d'action de la vancomycine a pu être précisé. Pour cela, les acides aminés D-alanine, glycine et L-lysine présents sur le PG de la bactérie *S. aureus* ont été remplacés par des isotopes marqués par  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ . Cela a permis d'observer par RMN du carbone et de l'azote que la réticulation effectuée par les enzymes TPases n'était pas modifiée en présence de la vancomycine. Ainsi, il a été conclu que la vancomycine n'intervient pas dans la transpeptidation mais lors de l'étape précédente, la transglycosylation (Figure 3).<sup>64</sup> Cependant, bien que ces méthodes utilisant le marquage avec des isotopes stables et la RMN permettent d'élucider la composition de la paroi bactérienne, elle ne permet pas d'étudier des processus dynamiques comme sa biosynthèse.

Le radiomarquage a ainsi pu être également utilisé afin de participer à la compréhension des mécanismes de la biosynthèse du PG.<sup>65</sup> Un exemple de radiomarquage est l'incorporation d'acides aminés modifiés dans le peptidoglycane en utilisant des méthionines radiomarquées avec  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ <sup>66</sup> ou de l'acide *meso*-[3,4,5]diaminopimélique marqué au tritium ( $^3\text{H}$ -dap).<sup>67</sup> Dans un second exemple, De Pedro *et al.* ont montré, grâce à l'incorporation de  $^3\text{H}$ -dap ainsi que d'autres acides aminés (D-Met, D-Trp et D-Phe) suivi d'analyses HPLC, qu'un échange d'acides aminés D avait lieu sur le PG dans l'espace périplasmique et que cet échange impliquait des enzymes TPase.<sup>67</sup>

Ces techniques présentent néanmoins des inconvénients comme un coût élevé, des procédures expérimentales complexes et coûteuses en matériel ainsi qu'un risque sur la santé encouru par l'utilisateur.<sup>11</sup> Bien que certaines équipes de recherche continuent encore à utiliser ces techniques, cela ne correspond plus à la majorité des recherches d'aujourd'hui.

### III.3. Marquage direct et marquage en 2 étapes

Aujourd'hui de nouvelles techniques de marquage métabolique sont développées, utilisant des fluorophores et, souvent, en association avec la chimie bioorthogonale. Ce marquage peut s'effectuer de deux façons : directement ou en 2 étapes (Figure 12). Le marquage direct est possible lorsque la biomolécule que l'on souhaite modifier possède une tolérance stérique élevée lors de son incorporation. Il est alors possible de la modifier en utilisant un fluorophore lié de manière covalente à la biomolécule et l'analyse en microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux confirme ou non l'incorporation du dérivé. En général, cette méthode est possible lorsque le processus d'incorporation de la biomolécule modifiée se produit à l'extérieur de la paroi bactérienne : le passage de la membrane plasmique et/ou la reconnaissance de cette biomolécule par les protéines de transport spécifiques n'est donc pas une contrainte. Cette molécule ne suit alors pas un processus métabolique complet, le terme d'incorporation est donc souvent utilisé à la place de métabolisation.

En revanche, lorsque la métabolisation de la biomolécule se produit dans le cytoplasme et donc à l'intérieur de la paroi bactérienne, un marquage en deux étapes est alors privilégié (Figure 12). Cette fois, un groupement fonctionnel permettant une réaction click, souvent un azoture ou un alcyne linéaire, privilégiés pour leurs petites tailles, est lié de façon covalente à la biomolécule. Après métabolisation de cette biomolécule, une réaction click peut avoir lieu avec un fluorophore possédant le groupement fonctionnel adéquat. Une fois la réaction click effectuée, et après lavage pour retirer le fluorophore n'ayant pas réagi, les bactéries sont analysées en microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux.

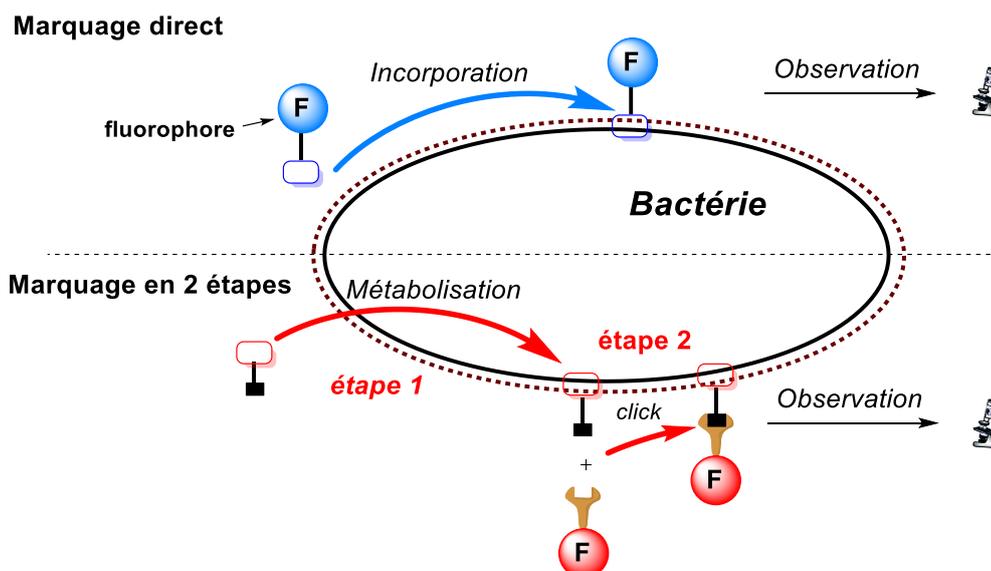


Figure 12 : Marquage métabolique fluorescent direct et en 2 étapes

Dans la suite de cette partie, des exemples de marquages métaboliques fluorescents seront décrits. Les avancées sur le développement de dérivés métabolisés par le peptidoglycane seront d'abord explicitées, puis le développement de dérivés métabolisés par les acides téichoïques et enfin, le développement d'autres dérivés sera abordé.

### III.4. Métabolisation de dérivés du peptidoglycane

#### III.4.1. Dérivés du nucléotide de Park, de Lipide I et de Lipide II

En 2002, Nishimura *et al.* ont été les premiers à développer des dérivés incorporables métaboliquement sur la paroi bactérienne.<sup>68</sup> Pour cela, ils se sont inspirés de Bertozzi qui a incorporé un dérivé de sucre, non pas sur la paroi bactérienne, mais à la surface d'une cellule humaine, permettant ainsi la bioconjugaison de biotine grâce à une réaction entre une cétone et une hydrazide formant une hydrazone.<sup>69</sup> Nishimura *et al.* ont, quant à eux, synthétisé des dérivés du nucléotide de Park, de lipide I et de lipide II de *E. coli* dont la structure est montrée en Figure 3, afin qu'ils soient métabolisés par le PG pendant son processus de biosynthèse.

Dans le cas du nucléotide de Park, les deux types de marquage métabolique ont été effectués. Premièrement, un marquage direct où la fluorescéine est liée de façon covalente au nucléotide pour former le composé **51** et deuxièmement un marquage en 2 étapes qui utilise la réaction développée par Bertozzi où l'hydrazide, nucléophile, liée à un fluorophore (ici Alexa Fluor 488) va réagir en attaquant le site électrophile de la cétone du nucléotide modifié **52** (Figure 13).

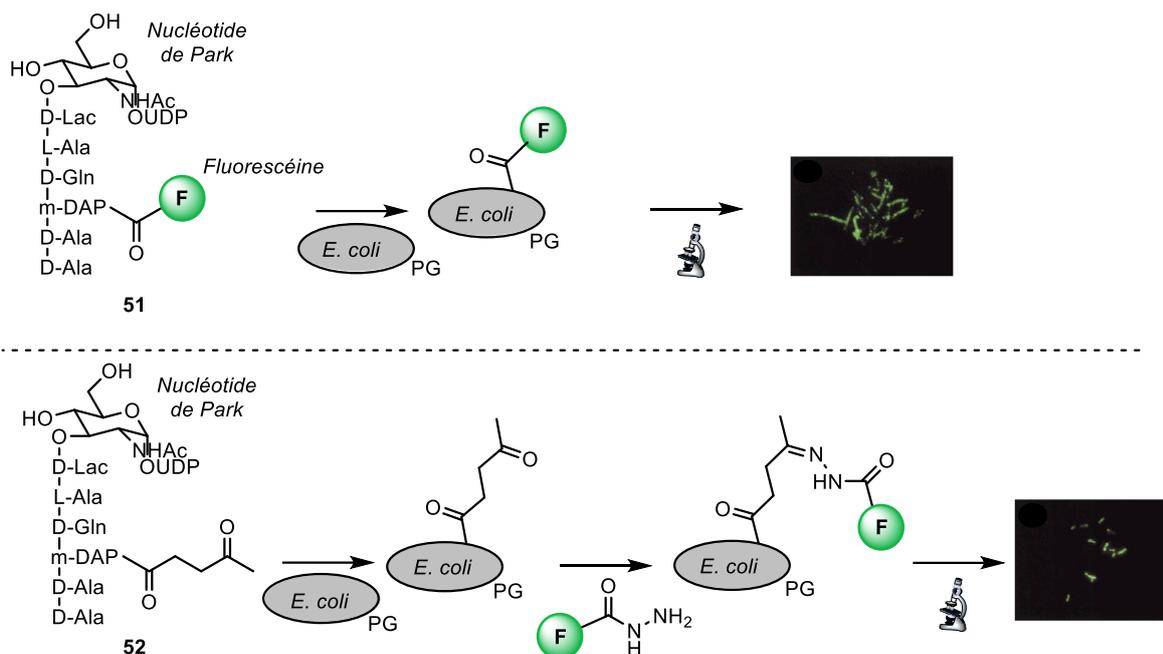


Figure 13 : Marquage direct du PG d'*E. coli* par incorporation d'un dérivé du nucléotide de Park et marquage en 2 étapes par réaction entre une cétone et une hydrazide <sup>68</sup>

La bactérie *E. coli* est une bactérie à Gram négatif, possédant une membrane externe entourée d'une épaisse couche de lipopolysaccharide, difficile à franchir. Ainsi, le traitement des bactéries à l'EDTA<sup>70</sup> en amont de l'ajout des dérivés a été nécessaire afin d'augmenter la perméabilité de la couche de lipopolysaccharide et de permettre l'incorporation du dérivé du nucléotide de Park, qui est encombrant et chargé. Les bactéries à Gram positif ne possédant pas cette membrane externe, ce même marquage direct avec le dérivé du nucléotide de Park a pu être effectué sur trois bactéries à Gram positif de la famille des *Lactobacilles*, sans nécessiter le traitement à l'EDTA.<sup>68</sup>

Par ailleurs, il est important de préciser que malgré les images obtenues qui laissent penser que les dérivés ont correctement été métabolisés, il n'est pas certain que les dérivés soient réellement métabolisés par la bactérie en utilisant la voie métabolique visée. Depuis cette première publication, d'autres études vont dans le sens d'une métabolisation à travers la voie métabolique de biosynthèse du PG mais toujours sans certitude.<sup>71</sup>

Enfin, bien que la réaction utilisée entre la cétone et l'hydrazide pour réaliser le marquage en 2 étapes ressemble à une réaction bioorthogonale, elle n'en présente pas les caractéristiques idéales pour l'utiliser aujourd'hui comme telle. En effet, cette réaction est lente : dans le cas décrit ici, les bactéries sont tuées pour les fixer et permettre à la réaction d'avoir le temps de se produire. De plus, d'autres électrophiles sont présents dans le milieu biologique et peuvent rentrer en compétition avec la cétone. Enfin, elle nécessite une catalyse acide et donc le pH physiologique n'est pas idéal pour cette réaction. Cette réaction chimique n'est donc plus utilisée comme telle aujourd'hui.

Cette première étude d'incorporation métabolique dans le PG a ouvert la voie à d'autres études dans les années qui suivirent. La taille, la complexité chimique et les difficultés de caractérisation de ces dérivés de nucléotide de Park, lipide I et lipide II n'en font pas des dérivés parfaits pour étudier le PG. D'autres dérivés, plus petits et facilement accessibles chimiquement, ont, par la suite, été développés.

#### III.4.2. Dérivés de D-Ala

Bien avant le développement de la chimie bioorthogonale, des dérivés de D-Ala étaient utilisés pour être incorporés dans le peptidoglycane, utilisant par exemple des techniques de radiomarquage présentées dans la partie III.2.2. [Marquage isotopique et radiomarquage](#).<sup>66,67</sup> Une autre méthode de marquage, développée par De Pedro *et al.*, a permis le marquage du PG d'*E. coli* avec de la D-cystéine et son observation par microscopie en introduisant un thiol qui réagit avec une biotine activée.<sup>72</sup> Cette expérience permet d'obtenir des images de division bactérienne et montre le potentiel de l'utilisation de dérivés de D-Ala pour marquer le PG. Mais, ces méthodes, qui exploitent des acides aminés radiomarqués ou un thiol qui n'est pas bioorthogonal (réagissant soit avec des électrophiles soit pour former des ponts disulfures), présentent plusieurs inconvénients dont le fait de nécessiter des traitements avant l'observation au microscope, ce qui contraint à tuer les cellules avant marquage et donc empêche l'observation de cellules vivantes.<sup>11</sup>

##### III.4.2.1 Marquage direct avec des FDAA (Fluorescent D-amino acids)

Comme il a été évoqué précédemment, la D-Trp, qui est plus encombrante que la D-Ala car elle possède un indole, est incorporable dans le PG.<sup>67</sup> Ainsi, en se basant sur ce fait, les chercheurs VanNieuwenhze et Brun ont émis l'hypothèse qu'il serait également possible d'incorporer sur le PG des acides aminés fluorescents.<sup>73</sup> Les acides aminés **53** et **55**, appelés respectivement HADA et NADA, ont d'abord été synthétisés en utilisant deux fluorophores de petite taille, respectivement la 7-hydroxycoumarine (longueur d'onde d'émission de 450 nm, émission dans le bleu) et le nitrobenzoxadiazole (NBD) (longueur d'onde d'émission de 538 nm, émission dans le vert) ([Figure 14A](#)).<sup>73,74</sup>

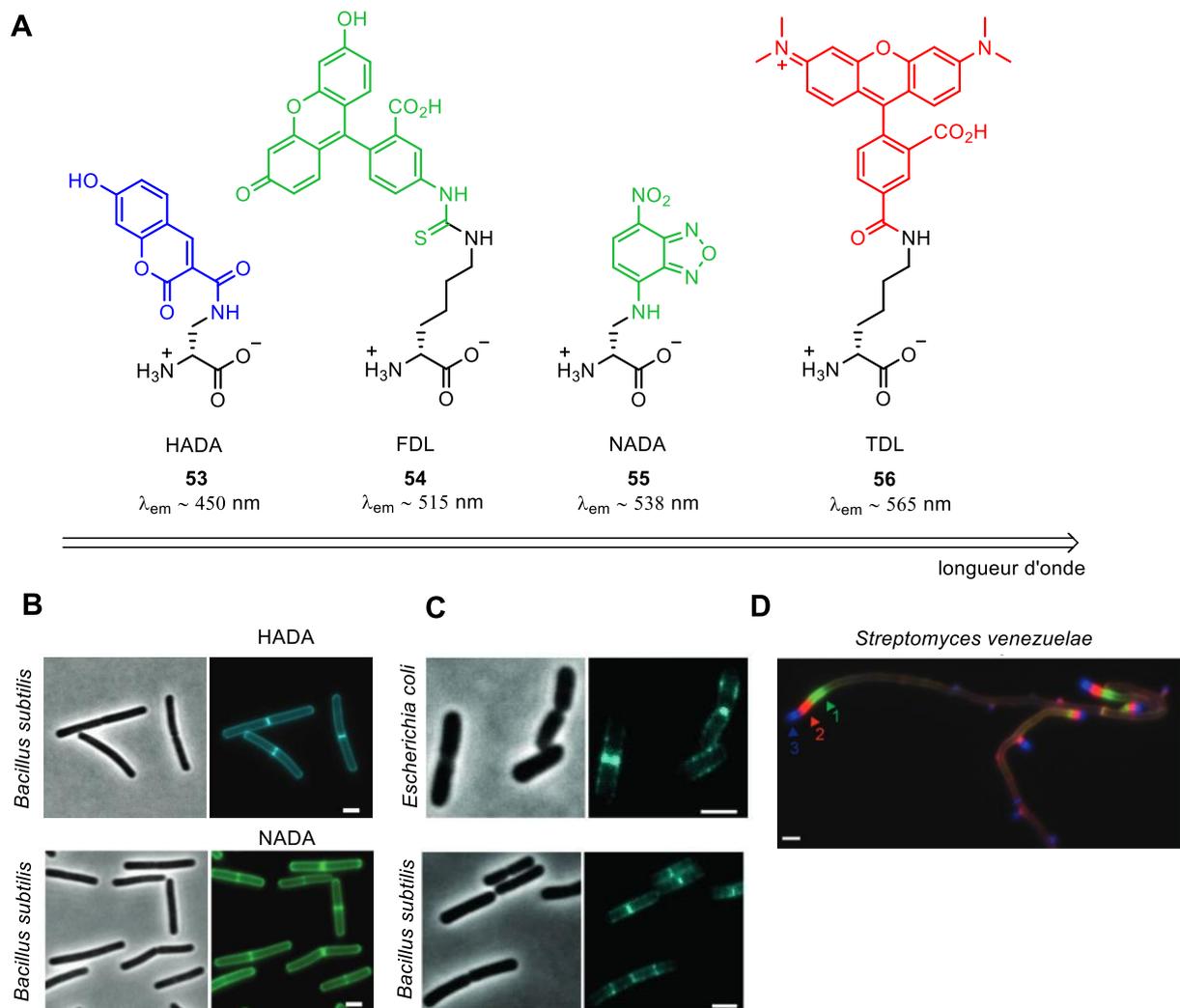


Figure 14 : Premiers FDAA synthétisés. A – Structure et longueurs d'onde d'émission / B – Marquage du peptidoglycane de *B. subtilis* avec HADA et NADA / C – Expériences de pulse avec HADA pour marquer le peptidoglycane naissant de *E. coli* et *B. subtilis* / D – Marquage en pulses successifs avec NADA, TDL puis HADA pour *S. venezuelae*<sup>73</sup>

La synthèse de ces acides aminés se fait en deux étapes principales : le couplage entre le fluorophore activé par un bon groupement activateur (GA) et l'acide aminé protégé par un groupement protecteur (PG) et portant une fonction amine sur sa chaîne latérale, puis, la déprotection de l'amine de l'acide aminé, soit en milieu acide, soit en milieu basique, suivant le groupement protecteur choisi (Schéma 5).

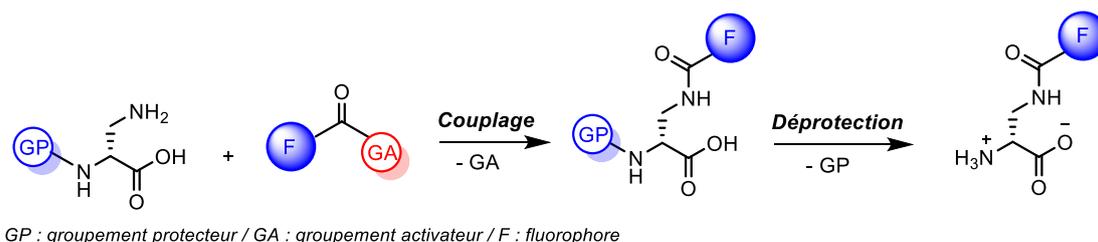


Schéma 5 : Etapes de synthèse des FDAA

Ces fluorophores ont permis de marquer, par marquage direct, la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* sur tout le peptidoglycane de la bactérie, c'est-à-dire sur les sites périphériques tout autour de la bactérie, mais également au niveau du septum, au centre de la bactérie, site de la division bactérienne (Figure 14B). Pour les FDAA 53 et 55, des analyses HPLC ont montré qu'entre 0.2 et 2.8 % des unités de PG étaient modifiées. Ces valeurs ont été déterminées avec une incorporation des D-Ala modifiées sur plusieurs heures, du début à la fin de la croissance de trois bactéries différentes (*B. subtilis*, *E. coli* et *A. tumefaciens*). Ce pourcentage permet d'avoir un signal fluorescent suffisant tout en évitant la toxicité due à une concentration trop forte en acide aminé modifié. De plus, des analyses MS/MS ont confirmé que l'incorporation se produisait par échange du dernier acide aminé de la chaîne peptidique lors de la réticulation entre 2 chaînes peptidiques, catalysée par les transpeptidases.<sup>73</sup> Par ailleurs, des expériences de marquage court (2 à 8 % du temps de division bactérienne), appelées pulse, ont été menées avec HADA et ont permis de marquer le PG nouvellement synthétisé pour plusieurs bactéries dont *E. coli* et *B. subtilis*, représentés en Figure 14C. Enfin, ils ont montré, dans le cas de la bactérie *B. subtilis*, que bien que les acides téichoïques possèdent de la D-Ala sur leur structure, les composés HADA et NADA n'étaient pas incorporés sur ces derniers mais seulement sur le PG.<sup>73</sup>

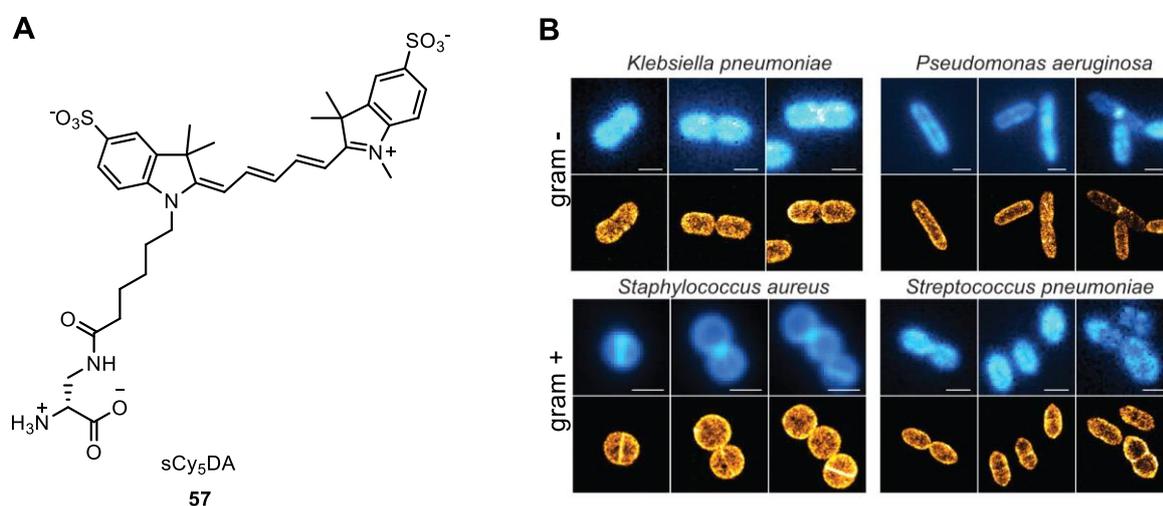
Dans la même étude, VanNieuwenzhe et Brun, encouragés par la bonne incorporation des HADA et NADA, ont développé deux autres FDAA, possédant des fluorophores avec une meilleure fluorescence, mais également plus encombrants. Ils ont ainsi développé le FDL 54, utilisant la fluorescéine comme fluorophore (longueur d'onde d'émission de 515 nm, émission dans le vert) et le TDL 56, avec un dérivé de rhodamine, carboxytétraméthylrhodamine (longueur d'onde d'émission de 565 nm, émission dans le orange-rouge). La voie de synthèse est similaire à celle utilisée pour HADA et NADA sauf qu'une D-lysine a été utilisée au départ, à la place de l'acide D-diaminopropionique, dans le but d'éloigner le fluorophore, à l'encombrement stérique plus important, de la chaîne principale de l'acide aminé. Le marquage des bactéries à Gram positif est similaire avec ces deux fluorophores si l'on compare au marquage obtenu avec HADA et NADA. En revanche, le marquage des bactéries à Gram négatif est différent : pour *E. coli*, le marquage est très faible avec FDL et même inexistant pour TDL. Cela est probablement dû à la perméabilité réduite de la membrane externe pour des molécules

encombrantes. Ainsi, des expériences de marquage successif ont pu être réalisées avec ces différents FDAA, par exemple le marquage en pulse de la bactérie à Gram positif *Streptomyces venezuelae* avec NADA puis TDL puis HADA a permis d'obtenir l'image de microscopie représentée en [Figure 14D](#).

Par la suite, VanNieuwenzhe et Brun ont développé d'autres FDAA avec des longueurs d'onde d'émission couvrant une plus grande palette du spectre visible. On trouve, parmi les principaux, le BADA avec un fluorophore boron-dipyrromethene (BODIPY) (longueur d'onde d'émission de 502 nm, émission dans le vert), le YADA, avec un fluorophore jaune Lucifer (longueur d'onde d'émission de 535 nm, émission dans le jaune-vert), ou encore le Atto<sub>610</sub>ADA avec le fluorophore Atto<sub>610</sub> (longueur d'onde d'émission de 631 nm, émission dans le rouge).<sup>75</sup>

Dans une récente étude publiée en 2022 par une équipe suisse,<sup>76</sup> de nouveaux FDAA ont été mis au point afin de réaliser de la microscopie à haute résolution et d'obtenir des images de marquage avec plus de détails. La microscopie par super-localisation (en anglais, Single Molecule Localization Microscopy, SMLM) est utilisée ici. Le choix a été fait de ne pas s'étendre sur cette méthode ici puisque la microscopie à haute résolution sera détaillée plus en détail dans la partie [III.4.3.2. Marquage en microscopie à haute résolution du PG avec AzDADA](#) de ce chapitre.

Un des nouveaux FDAA présenté dans cette étude est représenté sur la [Figure 15A](#). Il s'agit du sCy<sub>5</sub>DA **57** possédant un fluorophore commercial, le sulfo-cyanine 5.



**Figure 15 : Nouvel FDAA sCy<sub>5</sub>DA. A – Structure / B – Marquage en microscopie conventionnelle (haut) et en haute résolution SMLM (bas) du PG de différentes bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Concentrations en FDAA de 0.1 mM pour *S. aureus* et *S. pneumoniae*, de 0.5 mM pour *K. pneumoniae* et de 1 mM pour *P. aeruginosa*<sup>76</sup>**

L'incorporation de ce FDAA a permis le marquage du PG sur la totalité des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif et ce marquage est représenté en microscopie conventionnelle (en bleu) et en microscopie à haute résolution (en orange) sur la [Figure 15B](#). Alors que pour les

bactéries à Gram positif, le marquage s'est effectué à une concentration en sCy5DA de 0.1 mM, il a été nécessaire d'augmenter fortement cette concentration pour les bactéries à Gram négatif (0.5 mM voire 1 mM pour *P. aeruginosa*).

### III.4.2.2. Marquage en 2 étapes : AlkDA et AzDA, BCN-DA, NBDAC et TetDAC

Dans la publication où ils décrivent les FDAA, VanNieuwenzhe et Brun mentionnent aussi la mise en place de marquage indirect grâce à deux D-Ala modifiées : l'AlkDA **58**, possédant un alcyne sur la chaîne latérale et l'AzDA **59**, possédant un azoture sur la chaîne latérale (Figure 16A).<sup>73</sup> La même année, Bertozzi *et al.* ont publié une étude utilisant ces deux mêmes acides aminés pour marquer le PG en 2 étapes.<sup>77</sup> Avec ces deux dérivés, le PG de différentes bactéries est alors marqué. Premièrement, les bactéries sont incubées en présence d'un des dérivés, puis elles sont fixées et une réaction click avec un fluorophore est effectuée : pour le AlkDA, une CuAAC avec un azoture et du Cu(I) et pour le AzDA, une CuAAC avec un alcyne et du Cu(I) ou alors une SPAAC avec une cyclooctyne. Enfin, les images de marquage sont obtenues par microscopie à fluorescence. En Figure 16B sont représentées les images de marquage obtenues avec AlkDA incorporé sur la totalité du PG de la bactérie pour *E. coli* (Ec), *L. monocytogenes* (Lm), *C. glutamicum* (Cg) et *M. tuberculosis* (Mt).<sup>77</sup>

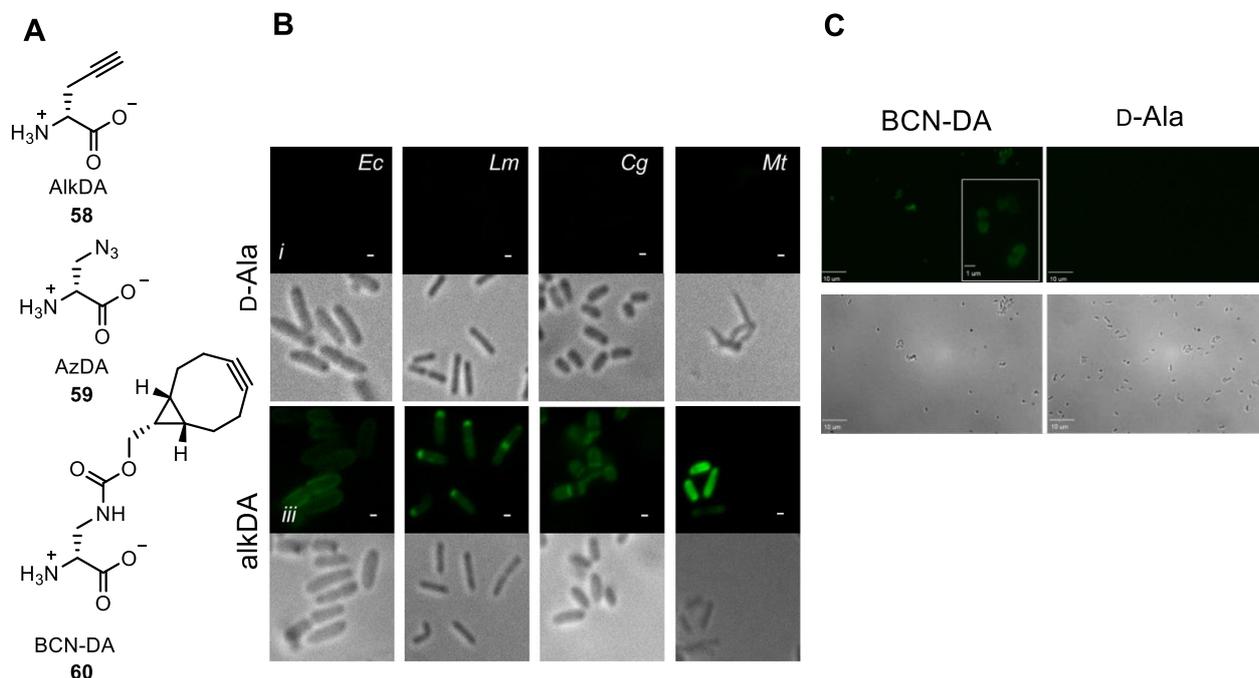


Figure 16 : Dérivés de D-Ala AlkDA, AzDA et BCN-DA. A – Structures chimique / B – Images de fluorescence obtenues par marquage avec AlkDA **58** sur *E. coli* (Ec), *L. monocytogenes* (Lm), *C. glutamicum* (Cg) et *M. tuberculosis* (Mt). En haut, les images sont obtenues après incorporation de D-Ala, aucun marquage n'apparaît. En bas, le marquage obtenu est dû à l'incorporation d'AlkDA **58** / C – A gauche, images de fluorescence obtenues par marquage avec le BCN-DA **60** sur la bactérie *E. coli*. A droite, les images sont obtenues après incorporation de D-Ala, et donc, aucun marquage n'apparaît

Un peu plus tard, en 2014, Carolyn R. Bertozzi *et al.* ont décrit un nouvel acide aminé modifié, le BCN-DA **60** (Figure 16A) qui est incorporé sur le PG.<sup>78</sup> Le marquage en 2 étapes du PG nouvellement synthétisé est ainsi montré en Figure 16C pour la bactérie *E. coli*. Lors de cette étude, ils ont également développé un nouveau composé fluorogénique dans le proche infrarouge, l'azido Si-rhodamine, qui n'est pas fluorescent en l'état mais qui le devient lorsque son azoture réagit par réaction click CuAAC ou SPAAC. Cependant, ce fluorophore n'a pas permis le marquage des bactéries à Gram négatif, car sa charge et son encombrement ne lui permettent probablement pas de passer la membrane externe.<sup>78</sup>

Dans une étude de 2015, Pires *et al.* ont, quant à eux, développé un dérivé de D-Ala possédant une norbonène, le composé **61**, et permettant de réaliser la réaction click IEDDA avec un fluorophore tétrazine.<sup>79</sup> Ce nouveau composé a permis le marquage de la bactérie à Gram positif *S. aureus*, comme représenté sur la Figure 17A. En 2017, cette même équipe a développé une nouvelle D-Ala modifiée, la TetDAC **62**, en ayant inversé les partenaires de la réaction click : la tétrazine est sur le dérivé D-Ala et le fluorophore possède un TCO qui réagit avec la tétrazine (Figure 17B) pour marquer, par exemple, *S. aureus*.<sup>80</sup> Ces deux nouveaux composés ont la particularité de posséder une fonction carboxamide à la place de l'acide carboxylique, ce qui permet de marquer plus efficacement le PG de certaines bactéries, notamment celles à Gram positif, comme le suggère une étude de Kahne et Walker.<sup>81</sup>

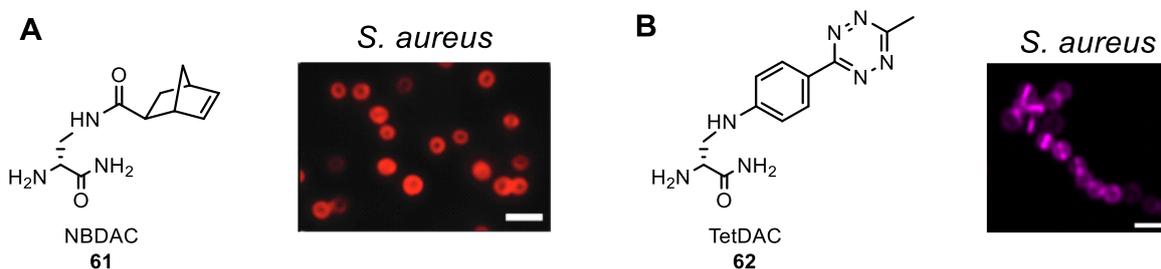


Figure 17 : NBDAC (A) et TetDAC (B) développés par Pires *et al.* ainsi que les marquages correspondants du PG de la bactérie *S. aureus*

#### III.4.2.3. Dérivé de D-Ala sous forme de rotor moléculaire fluorescent

Toutes les méthodes de marquage décrites précédemment nécessitent une étape de lavage pour retirer l'excès de fluorophore avant analyse par microscopie de fluorescence ou cytométrie en flux. Cependant, cette étape de lavage se fait par centrifugation et prend plusieurs minutes, pendant lesquelles les bactéries peuvent être perturbées, ou peuvent continuer à évoluer et à se diviser. Cela peut donc contribuer à réduire la résolution des images de marquage, notamment pendant les marquages successifs comme en Figure 14D.

Afin d'éviter cette étape de lavage, VanNieuwenzhe *et al.* ont développé en 2019 plusieurs dérivés de D-Ala qui utilisent la technologie des rotors moléculaires fluorescents.<sup>82</sup> Il s'agit d'une classe

de fluorophores dont l'intensité de fluorescence est modifiée suivant l'environnement dans lequel il se trouve. Dans un environnement peu restreint, le fluorophore adopte une conformation non fluorescente spécifique, en effectuant une rotation autour d'une liaison reliant la partie donneuse d'électrons et la partie acceptrice d'électrons, le mettant ainsi dans un état de transfert de charge intramoléculaire torsadé, en anglais Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT). En revanche, dans un environnement restreint et encombré, cet état TICT peut être empêché, restaurant ainsi la fluorescence du composé.<sup>83</sup> Le PG étant un environnement encombré et restreint, l'hypothèse a été émise qu'une fois incorporé, la rotation d'un composé rotor moléculaire fluorescent serait restreinte, permettant ainsi un effet fluorescent « turn-on ».

Un des dérivés développés est représenté en Figure 18A et les images de fluorescence obtenues sont représentées en Figure 18B sur la bactérie à Gram positif *B. subtilis*. De gauche à droite, les images de fluorescence représentent le marquage avec le dérivé Rf470DL **63** sans lavage puis des contrôles : une absence de marquage avec la version L-acide aminé (Rf470LL), le marquage sans lavage avec HADA, conduisant à une image saturée en fluorophore et enfin le marquage avec lavage de HADA, déjà décrit précédemment. Cependant, le marquage sur la bactérie à Gram négatif *E. coli* n'a pas fonctionné, encore une fois probablement à cause de la membrane externe ne permettant pas le passage de molécules de grande taille.<sup>82</sup>

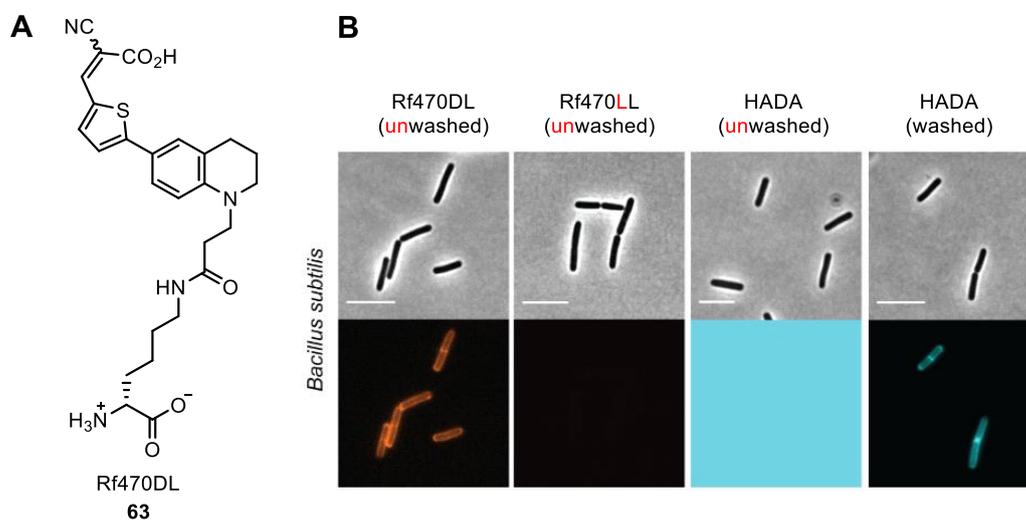


Figure 18 : Rf470DL, un acide aminé fluorogénique. A – Structure chimique / B – Images de marquage obtenues avec ce dérivé et marquages de contrôle effectués sur la bactérie *B. subtilis*<sup>82</sup>

Par ailleurs, une autre application de ces dérivés a été le développement d'un test de screening spectrophotométrique permettant d'étudier l'activité de l'enzyme D,D-transpeptidase en présence de différents antibiotiques. Jusqu'à présent, ces tests étaient limités par un bruit de fond important, qui ne permettait pas une lecture directe mais obligeait le passage par une étape de purification. Ces

nouveaux composés avec leur effet « turn-on » permettant d'éviter lavages et bruit de fond sont donc prometteurs pour ce type d'application. L'exemple de test décrit a été mené *in vitro* avec l'enzyme TPase de la bactérie *S. aureus*, avec un substrat mimant la chaîne peptidique du PG, avec le composé Rf470DL et en présence de différents antibiotiques au mode d'action connu. Ainsi, par exemple, pour la céfoxitine, inhibiteur de la TPase, aucune fluorescence n'a été observée. Au contraire, avec le chloramphénicol qui agit sur une enzyme du ribosome, l'activité de la TPase est conservée permettant l'incorporation du composé Rf470DL et un effet « turn-on » de la fluorescence. Cette application pourrait déboucher à une méthode de screening à haut débit de composés pour déterminer un effet antibactérien possible sur l'enzyme TPase.<sup>82</sup>

#### III.4.2.4. Réticulation entre dérivés de D-Ala incorporés sur le PG

Dernièrement, en 2021, l'incorporation sur le PG de dérivés de D-Ala possédant des fonctions clickables a conduit à une nouvelle application. Les équipes de Schultz<sup>84,85</sup> et de Siegrist<sup>86</sup> ont simultanément décrit la formation d'une réticulation non naturelle entre deux chaînes peptidiques du PG grâce à une réaction click.

Premièrement, Schultz *et al.* ont utilisé la réaction Sulfur(VI) Fluoride Exchange (SuFEx), réaction click décrite pour la première fois par Sharpless en 2014.<sup>87</sup> Cette réaction se produit par l'attaque d'un nucléophile sur le soufre d'un groupement sulfonyl  $\text{SO}_2\text{F}$  qui entraîne le départ du fluor. Cette réaction a par la suite été complétée par l'utilisation d'autres groupes partants que le fluor. La réticulation effectuée par cette équipe a d'abord été décrite sur *E. coli*,<sup>84</sup> bactérie à Gram négatif puis, sur *B. subtilis*,<sup>85</sup> bactérie à Gram positif, menant à deux publications différentes. En Figure 19 la réticulation dans le cas de la bactérie *B. subtilis* est représentée. Un dérivé de D-Ala possédant un sulfonyl, tel que le composé **64**, permettant la réaction SuFEx, est incorporé sur le PG. Cette incorporation se produit au moment de l'action des enzymes CPases et TPases qui interviennent lors de la réticulation entre les chaînes peptidiques à la fin du processus de biosynthèse du PG (voir Figure 3). Premièrement, la D-Ala terminale de la chaîne peptidique est remplacée par une enzyme TPase au niveau d'un de ses résidus sérine (Figure 19, étape 1). Il est important de noter que l'action de la TPase est un processus dynamique : en temps normal, soit une D-Ala libre du milieu vient à nouveau substituer le résidu sérine, soit la réticulation naturelle, présentée en Figure 3, a lieu. Des D-Ala sont donc échangées en continu sur l'extrémité de la chaîne peptidique. Ici, au lieu d'avoir la réticulation naturelle ou l'échange de D-Ala, l'acide aminé non-naturel avec le sulfonyl **64** substitue ce résidu sérine (Figure 19, étape 2). Par la suite, une réaction click SuFEx peut se produire entre le sulfonyl et l'amine nucléophile présente sur le résidu m-DAP, en 3<sup>ème</sup> position d'une autre chaîne peptidique (Figure 19, étape 3). La réticulation est alors formée entre le 5<sup>ème</sup> acide aminé d'une chaîne peptidique et le 3<sup>ème</sup>

acide aminé d'une autre chaîne. Dans le cas d'*E. coli*, un maximum de 31 % de réticulation a été déterminée par HPLC, sans que cela modifie la croissance et/ou la morphologie des bactéries.<sup>84</sup> En revanche, dans le cas de *B. subtilis* où un maximum de 19 % de réticulation a été déterminé, il a été observé une élongation des bactéries ainsi que la lyse de certaines d'entre elles.<sup>85</sup>

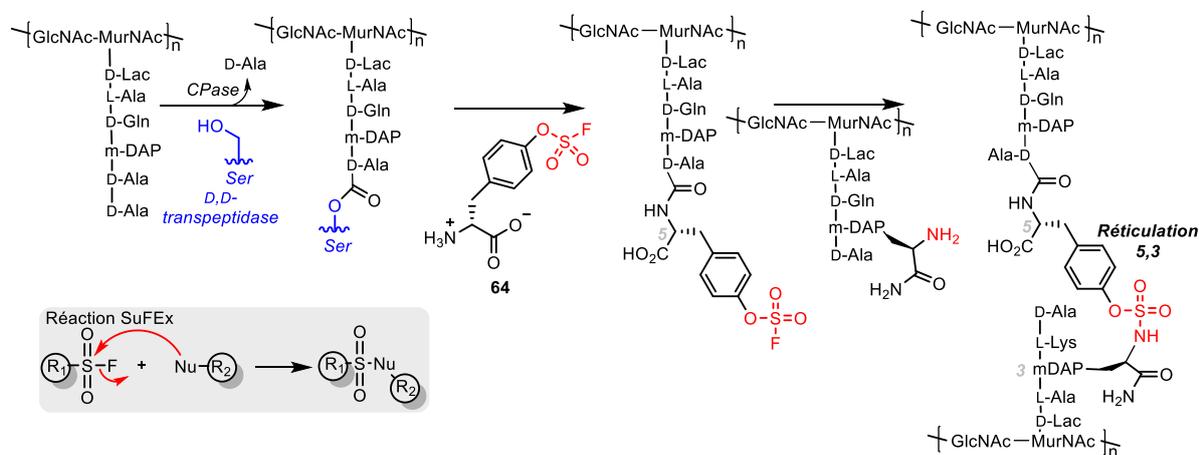


Figure 19 : Réticulation 5,3 non naturelle réalisée sur le PG de la bactérie à Gram positif *B. subtilis* grâce à la réaction click SuFEx. Dans l'encadré gris est décrite la réaction SuFEx, entre un sulfonyle et un nucléophile

Parallèlement, Siegrist *et al.* ont utilisé une méthode similaire pour réaliser une réticulation grâce, cette fois, à la réaction click CuAAC. En effet, ils ont d'abord incorporé simultanément deux dérivés de D-Ala, l'AlkDA **58** et l'AzDA **59** (Figure 16) dans le PG de bactéries à Gram positif *L. monocytogenes* et à Gram négatif *E. coli* puis, ils ont ajouté du Cu(I) afin d'induire la CuAAC entre l'alcyne et l'azoture, incorporés sur deux chaînes peptidiques différentes. La présence de la réticulation a été prouvée à la fois par analyses MS/MS et par diverses expériences de fluorescence. Il a ainsi été déterminé qu'il y a une augmentation totale de réticulation (naturelle et non-naturelle) de 20 % pour *E. coli* entre les bactéries mises en croissance en présence d'AlkDA **58**, d'AzDA **59** et des conditions de CuAAC et les bactéries en croissance normale. De plus, il a été montré que la présence de ces dérivés protège *E. coli* de l'action des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, l'ampicilline et la carbénicilline.<sup>86</sup>

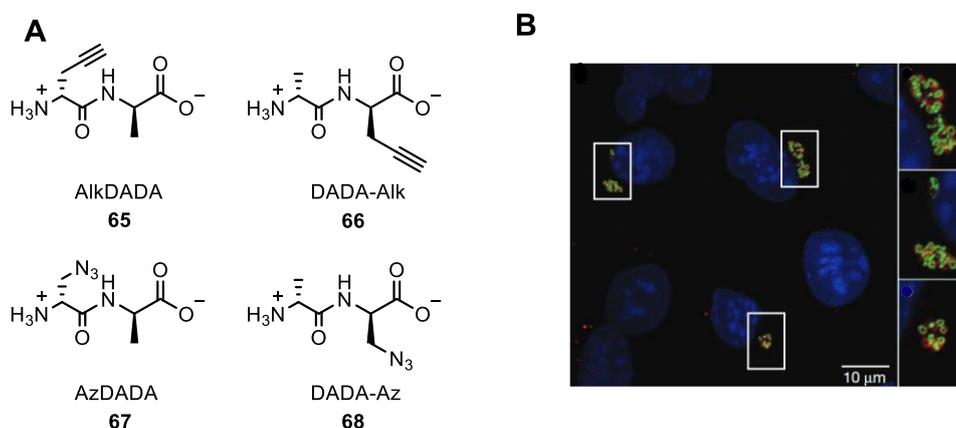
### III.4.3. Dérivés de D-Ala-D-Ala

#### III.4.3.1. AlkDADA, AzDADA, HADA-DA et NADA-DA

Les dérivés de D-Ala décrits précédemment ont montré une incorporation sur le PG soit en rentrant dans le cytoplasme, par la voie métabolique de synthèse du PG initiée par l'enzyme Ddl soit par l'échange de D-Ala en position 5 de la chaîne peptidique, initié par une enzyme TPase. Afin d'obtenir une métabolisation exclusivement par voie intracellulaire, d'autres outils ont été développés. Il s'agit de dérivés de D-Ala-D-Ala, aussi appelés DADA, qui sont métabolisés par le PG en traversant la

membrane plasmique pour rentrer dans le cytoplasme et sont accrochés, grâce à l'enzyme MurF, au tripeptide déjà formé, pour obtenir le nucléotide de Park (voir [Figure 3](#)). Les dipeptides AlkDADA **65**, DADA-Alk **66**, AzDADA **67** et DADA-Az **68** ([Figure 20A](#)) ont donc été décrits par Maurelli *et al.* en 2014.<sup>88</sup> Suivant la position de l'alcyne et de l'azoture du côté N-terminal ou du côté C-terminal, l'acide aminé modifié sera incorporé soit en 4<sup>ème</sup> position (si du côté N-terminal) soit en 5<sup>ème</sup> position (si du côté C-terminal).

La métabolisation de ces biomolécules a d'abord été prouvée pour les bactéries *E. coli* et *B. subtilis* et il a été mis en évidence que les dipeptides AlkDADA et AzDADA sont métabolisés par le PG avec une meilleure efficacité que DADA-Alk et DADA-Az. Cela concorde avec le fait que pour DADA-Alk et DADA-Az, l'alcyne et l'azoture sont placés en position 5 sur la chaîne peptidique et sont donc sujets à échange par action des enzymes CPase et TPase.



*Figure 20 : Dipeptides décrits par Maurelli et VanNieuvenhze. A – Structures chimiques / B – Première mise en évidence du PG de *C. trachomatis*. Fibroblastes de souris infectés par *C. trachomatis* en présence de AlkDADA et du fluorophore Azido-AF488 liés par réaction click CuAAC après fixation des bactéries. En bleu est marqué le noyau des cellules hôtes, en rouge une protéine majoritaire de la membrane externe (MOMP) de la bactérie et en vert le PG*

Ensuite, le dipeptide AlkDADA a été utilisé pour mettre en évidence, pour la première fois, la présence de PG dans la bactérie *Chlamydia trachomatis* ([Figure 20B](#)).<sup>88</sup> En effet, toutes les tentatives de marquage de PG précédentes effectuées sur cette bactérie n'avaient pas fonctionné, il y avait donc une grande interrogation sur l'existence, ou non, de PG chez cette bactérie. *C. trachomatis* est une bactérie à multiplication intracellulaire, elle nécessite un hôte pour se multiplier. Ainsi, des fibroblastes de souris ont été utilisés ici comme hôte (noyaux colorés au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) : fluorescence bleue sur la [Figure 20B](#)). Sur cette même figure, une protéine de la membrane externe de la bactérie est représentée en rouge et le PG de la bactérie est marqué en vert, grâce à la réaction click CuAAC avec le fluorophore Azido-AF488. Une hypothèse de la raison pour laquelle le marquage a, cette fois, fonctionné est que, contrairement à l'incorporation de dérivés de D-Ala simples, l'incorporation

de dérivés de D-Ala-D-Ala a permis de positionner l'alcyne en 4<sup>ème</sup> position du peptide, position non sujette à l'action des CPases.

Pendant plusieurs années à la suite de la synthèse de ces dipeptides, aucun autre nouveau dipeptide permettant le marquage du PG n'a été découvert. En effet, à cause du fait que le dérivé de dipeptide doit traverser la membrane plasmique et entrer dans le cytoplasme, la taille du groupement à rajouter sur le dérivé ne doit, a priori, pas être trop importante. Mais, en 2021, de nouveaux dipeptides ont été décrits, possédant des fluorophores sur leur structure. Ils ont été appelés Fluorescent D-Amino Acid Dipeptide (FDAAD).<sup>89</sup> Deux exemples de FDAAD sont représentés en Figure 21, le HADA-DA **69** possédant une coumarine sur sa structure et le NADA-DA **70**, possédant un NBD. Le marquage sur la totalité du PG a été effectué avec ces deux FDAAD pour les bactéries *E. coli* (Gram négatif) et *B. subtilis* (Gram positif) (Figure 21).

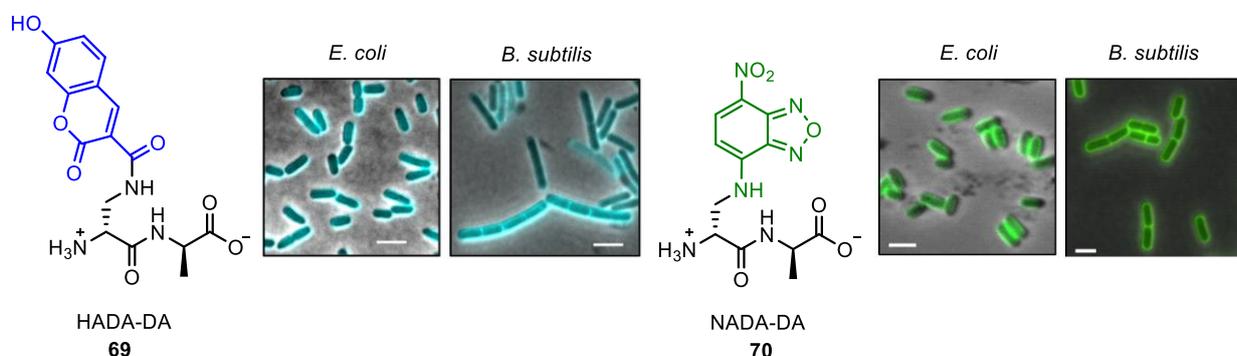


Figure 21 : HADA-DA et NADA-DA, deux nouveaux dipeptides développés, permettant le marquage de PG des bactéries *E. coli* et *B. subtilis*<sup>89</sup>

Ces nouveaux dipeptides ont permis de caractériser le processus de biosynthèse du PG de la bactérie *A. tumefaciens* et notamment d'apporter des précisions sur l'activité des Penicillin-binding proteins (PBP) dont font partie les enzymes TPases.<sup>89</sup> Cela ouvre également des perspectives pour le développement d'autres dipeptides possédant des groupements d'une taille plus importante que l'azoture et l'alcyne.

#### III.4.3.2. Marquage en microscopie à haute résolution du PG avec AzDADA

L'équipe Pneumocoque à l'IBS (Institut de Biologie Structurale), travaille actuellement, en collaboration avec notre équipe du DPM, sur le développement de marquage de la paroi bactérienne de *S. pneumoniae* en utilisant la microscopie à haute résolution direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM).

Dans le domaine de l'imagerie, la résolution des images en microscopie conventionnelle est limitée par la diffraction de la lumière, ce qui empêche la distinction par fluorescence de deux tâches

qui sont séparées par moins de 250 nm. Ainsi, deux molécules situées à moins de 250 nm l'une de l'autre et émettant de la lumière simultanément ne pourront pas être distinguées par microscopie conventionnelle.<sup>90</sup> Des recherches ont été menées ces dernières décennies pour contourner la limite imposée par la diffraction de la lumière et ont abouti à la mise au point de la microscopie à haute-résolution au travers de trois techniques : STimulated Emission Depletion (STED), PhotoActivated Localization Microscopy (PALM) et STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). Les chercheurs Stephan W. Hell, Eric Bertzig et William E. Moerner ont obtenu le prix Nobel de chimie en 2014 pour ces découvertes.

La technique de microscopie STED, décrite en 2000 par Stephan Hell<sup>91</sup> a pour principe de réduire le diamètre de la tâche de diffraction par extinction d'une partie de la lumière émise. Pour cela, à la suite de l'excitation d'un fluorophore par un premier faisceau, un second faisceau en forme d'anneau est émis, avec une énergie différente et judicieusement choisie. Celle-ci provoque une perte d'énergie du fluorophore, éteignant sa fluorescence naturelle. Ainsi, la fluorescence restante correspond à la tâche centrale, non touchée par le deuxième faisceau. Cette technique permet d'obtenir une résolution de 20 nm pour l'observation d'échantillons biologiques avec des fluorophores organiques, non protéiques. Elle présente l'avantage d'être compatible avec une grande variété de fluorophores différents, bien que certains soient plus photo-stables dans ces conditions précises d'imagerie. En revanche, l'imagerie en deux couleurs est limitée par la double illumination nécessaire à cette technique.<sup>90</sup>

Les techniques de PALM<sup>92</sup> et STORM<sup>93</sup> sont des techniques de microscopie par super-localisation SMLM et ont été décrites en 2006 par des équipes de recherches indépendantes. Elles fonctionnent toutes les deux sur le même principe avec pour différence la nature du (ou des) fluorophore(s) utilisé(s). Dans le cas de PALM, une forme photo-activable de la protéine GFP tient le rôle de fluorophore alors qu'il s'agit d'une paire de sondes fluorescentes organiques pour le STORM, en particulier de la famille des cyanines.<sup>90</sup> Le principe du STORM est l'illumination aléatoire de fluorophores, rendue possible par la nature du fluorophore utilisé, capable de passer d'un état excité, illuminé (on-state) à un état désexcité, éteint (dark-state). Cependant, la réversibilité du processus n'est pas parfaite et le retour à l'état désexcité peut être permanent. Ainsi, revenir à l'état excité, fluorescent, nécessite l'illumination à une seconde longueur d'onde ainsi que la présence d'un second fluorophore, ayant le rôle d'activateur.<sup>94</sup>

Le dSTORM est une variante du STORM qui ne nécessite qu'un seul fluorophore organique, capable de passer d'un état excité à un état désexcité grâce à un agent réducteur, souvent un thiol. Ainsi, des milliers d'images sont enregistrées les unes à la suite des autres avec, pour chaque image,

une petite partie des fluorophores qui sont sous un état excité fluorescent. L'acquisition de toutes ces images et leur superposition permet la construction d'une image finale avec une résolution d'environ 20 nm.<sup>95</sup> La Figure 22 schématise cette technique, qui permet d'améliorer grandement la résolution des images en comparaison à la résolution de la microscopie à fluorescence conventionnelle.

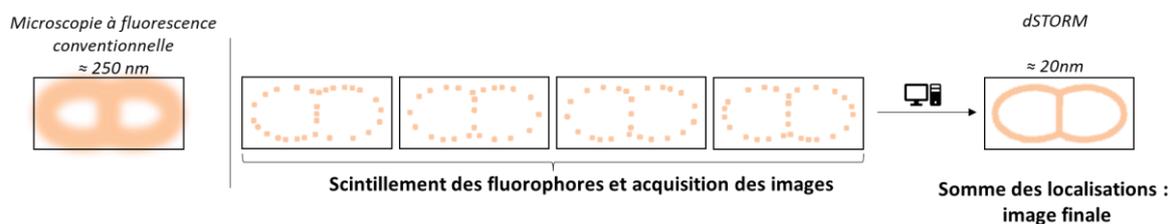


Figure 22 : Schéma du principe de la technique de microscopie à haute résolution dSTORM, en comparaison avec la microscopie à fluorescence conventionnelle

Grâce à cette technique de microscopie à haute résolution dSTORM, le PG de *S. pneumoniae* a été marqué en utilisant le dérivé AzDADA **67** présenté Figure 20A ainsi que le fluorophore DIBO-AF647, permettant de réaliser le marquage par réaction click sans cuivre SPAAC.<sup>96</sup>

Le PG des bactéries est synthétisé selon deux processus : l'élongation, permettant l'allongement de la taille de la bactérie, et la septation, permettant la division de la bactérie. Dans les bacilles tels que *E. coli* et *B. subtilis*, ces deux processus sont distincts dans l'espace et ont été décrits grâce à la microscopie à fluorescence conventionnelle. Dans le cas des bacilles, on a alors l'existence de PG latéral, résultat du processus d'élongation et de PG septal, résultat de la septation.<sup>97</sup>

Au contraire, dans le cas des ovococci, bactéries de forme ovoïde, dont *S. pneumoniae* fait partie, l'élongation et la septation ne sont pas des processus distincts. Des expériences menées antérieurement sont en faveur de l'existence de la septation et l'élongation qui se produiraient toutes les deux au septum, c'est-à-dire au centre de la bactérie.<sup>14</sup> Cependant, la limite de résolution de la microscopie conventionnelle empêche de distinguer ces deux processus, situés dans une région de taille nanométrique.

L'observation au microscope à haute résolution dSTORM du marquage en 2 étapes effectué entre l'AzDADA et DIBO-AF647 a permis de décrire de façon précise la biosynthèse du PG de *S. pneumoniae* et les images obtenues sont représentées Figure 23. Des images ont été obtenues pour les bactéries à différentes étapes de leur division cellulaire : au début de la division, lorsque le septum est marqué, sans pour autant observer de constriction au niveau du septum ; au milieu de la division, lorsqu'une constriction du septum est visible, laissant apparaître le contour des deux futures cellules-filles ; et à la fin de la division, lorsque les deux cellules-filles commencent elles-aussi à se diviser.

L'analyse de ces images a permis de confirmer l'existence des deux processus : l'élongation, pendant laquelle le PG périphérique est synthétisé, permettant l'allongement de la bactérie, et la septation, pendant laquelle le PG septal est synthétisé, formant une paroi transversale qui aboutit à la division de la cellule mère en deux cellules filles (Figure 23).

Ainsi, au début de la division, élongation et septation sont confondues. Par la suite, l'élongation et la septation se distinguent pour former deux anneaux de synthèse concentriques : le plus petit, au centre, forme le PG septal, permettant la division de la bactérie et le plus grand, à l'extérieur, forme le PG périphérique, permettant l'allongement de la bactérie (Figure 23). Enfin, à la fin du processus de division, alors que la synthèse de PG septal s'achève, le PG périphérique continue d'être synthétisé.<sup>96</sup>

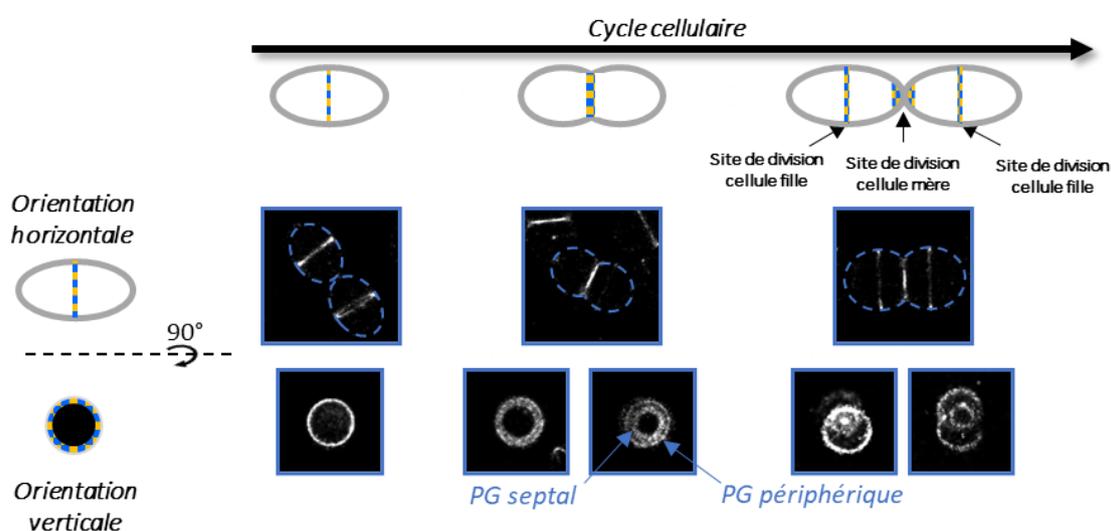


Figure 23 : Marquage dSTORM du PG de *S. pneumoniae* avec AzDADA et DIBO-AF647. Des images dSTORM sont montrées tout au long du cycle cellulaire pour des bactéries orientées horizontalement et verticalement<sup>96</sup>

#### III.4.4. Autres dérivés de la chaîne peptidique PG

D'autres dérivés du peptide du PG ont été développés ces dernières années. En 2011, Breukink *et al.* ont développé le tripeptide AeK-NBD **71** (Figure 24), dérivé fluorescent du tripeptide L-Ala-D-iGlu-L-Lys situé en position 1 à 3 du peptide du PG d'*E. coli*.<sup>98</sup> Le PG de cette bactérie a donc pu être marqué directement avec ce dérivé qui traverse la membrane plasmique et est métabolisé dans le cytoplasme par le processus décrit en Figure 3.

Par ailleurs, Spiegel *et al.* ont développé des dérivés fluorescents de la chaîne peptidique, appelés Fluorescent Stem PentaPeptide Mimics (FSPPM), sous la forme du tripeptide L-Lys-D-Ala-D-Ala auquel est lié un peptide flexible (Gly-Gly-L-Lys) se terminant par un fluorophore, soit la fluorescéine (composé **72**), soit Alexa-Fluor 568 (composé **73**). Contrairement aux dérivés évoqués précédemment, celui-ci ne rentre pas dans le processus d'incorporation métabolique, mais imite la chaîne peptidique

du PG afin que les TPases interviennent et effectuent la réticulation avec ce composé à la place d'une chaîne peptidique naturelle du PG.<sup>99</sup>

Enfin, dans une publication de 2023, Pires *et al.* ont décrit plusieurs nouveaux dérivés de la chaîne peptidique du PG dont le composé **74** appelé TetD.<sup>100</sup> Selon la même technologie que Spiegel *et al.*, ce dérivé, sous forme de tétrapeptide possédant un groupement DBCO à l'extrémité, va imiter la chaîne peptidique naturelle du PG et va permettre la réticulation avec un autre peptide du PG pour être lié à lui de façon covalente. Pires *et al.* ont ainsi développé une stratégie permettant de déterminer, par microscopie de fluorescence après réaction SPAAC avec le DBCO, la perméabilité de la mycomembrane de la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis* pour une série de composé portant un azoture sur leur structure.<sup>100</sup>

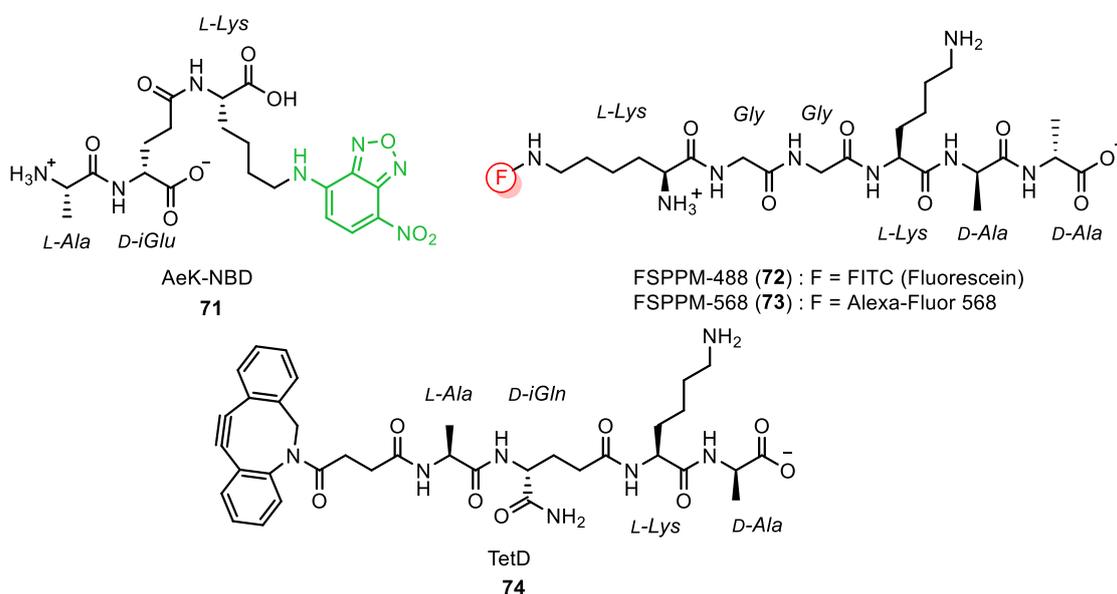


Figure 24 : Structure chimique des autres dérivés de la chaîne peptidique du PG évoqués

#### III.4.5. Conclusion

Dans cette partie, il a ainsi été listé les différentes possibilités existantes actuellement pour la métabolisation de dérivés de l'unité peptidique du PG, des plus petits dérivés, les D-Ala modifiées, aux plus gros, comme les nucléotides de Park **51** et **52** et le tétrapeptide **74**. Suivant l'application désirée, une variété de dérivés a été décrite : des dérivés avec des fonctions click pour le marquage en 2 étapes avec ou sans cuivre, des dérivés fluorescents pour le marquage direct, des dérivés fluorogéniques, permettant de s'affranchir de lavages...

L'utilité principale de ces techniques est le marquage de PG d'une grande variété de bactéries qui a permis de préciser, au cours des dernières années, la biosynthèse du PG, soit par la mise en

évidence de l'action de certaines protéines soit par la localisation précise des processus de biosynthèse du PG.

Enfin, nous nous sommes concentrés dans cette partie à décrire des dérivés du peptide, mais il est également possible de métaboliser des dérivés des sucres GlnNAc et MurNAc, formant la partie glycane du PG et de les utiliser pour effectuer un marquage en 2 étapes par réaction click.<sup>11</sup> Ces dérivés ne seront cependant pas décrits dans ce document.

### III.5. Métabolisation de dérivés de cholines sur les acides téichoïques

En complément du PG, les bactéries à Gram positif possèdent des acides téichoïques dont un exemple de structure a été décrit dans la partie I.4. *Streptococcus pneumoniae*. Contrairement au PG, qui possède plusieurs dérivés qui sont utilisés pour le marquage, le marquage et l'observation au microscope des AT ont longtemps été empêchés par le manque de dérivés pouvant être utilisés. Aujourd'hui, seule la choline, spécifiquement présente sur les AT de *S. pneumoniae* a pu être utilisée pour le marquage des AT. Nous allons voir dans la partie qui suit comment la métabolisation de dérivés de choline sur les AT de *S. pneumoniae* a été accomplie.

#### III.5.1. Métabolisation de choline et premier marquage des acides téichoïques

La choline est un composant essentiel à la croissance de *S. pneumoniae*.<sup>101</sup> En 1944, Elizabeth Badger a remplacé la choline naturelle par différents dérivés de choline et a comparé la croissance de *S. pneumoniae* en présence de ces dérivés. Ainsi, la croissance de la bactérie est conservée lorsque la choline naturelle **75** (Figure 25) est retirée du milieu et est remplacée par la diméthyléthanolamine, par la méthyl-diéthanolamine, par la triéthylcholine ou encore par l'éthanolamine.

En 2017, l'équipe Pneumocoque de l'IBS en collaboration avec notre équipe du DPM ont décrit pour la première fois un marquage d'acides téichoïques chez une bactérie à Gram positif. Ce marquage a été réalisé en tirant profit de la spécificité de *S. pneumoniae* à posséder de la choline sur ses AT (Figure 4B).<sup>21</sup> La choline modifiée métabolisée dans ces travaux est la propargyl-choline appelée AlkCho **76**. Le processus de métabolisation de cette choline est identique au processus de métabolisation de la choline naturelle **75** et est représenté en Figure 25. L'ajout de choline sur les AT se fait dans le cytoplasme : de la choline du milieu extérieur est donc acheminée dans le cytoplasme en traversant la membrane plasmique grâce à la protéine membranaire LicB. La choline est ensuite modifiée en phosphorylcholine puis en cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) par les protéines LicA et LicC respectivement. LicD1 et LicD2 transfèrent alors cette CDP-choline sur le résidu GalNAc d'une unité d'AT en cours de synthèse. La biosynthèse de l'AT se termine par la polymérisation des unités d'AT grâce à la

protéine membranaire Spr1222 puis par le transfert vers l'espace périplasmique de l'AT polymérisé grâce à la protéine TacF.<sup>21</sup>

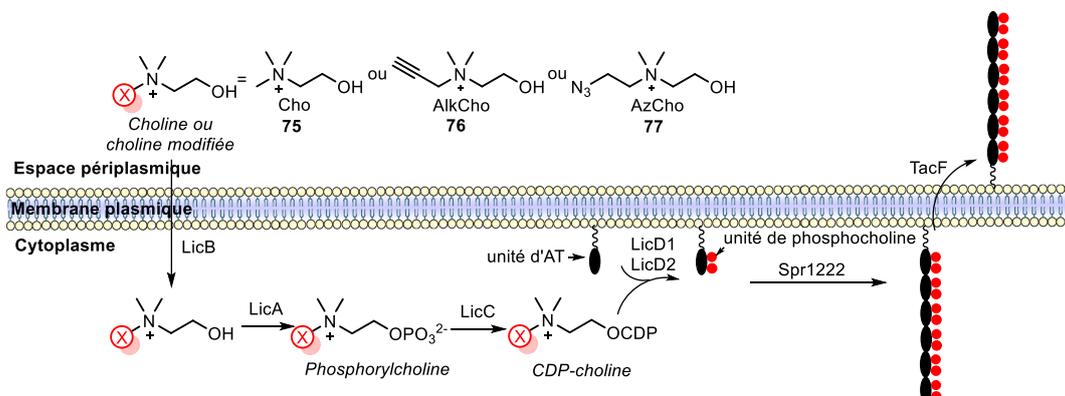


Figure 25 : Processus par lequel est métabolisée la choline sur les AT, qu'elle soit modifiée ou non. Adapté de A.M. Di Guilmi et al.<sup>21</sup>

La choline modifiée AlkCho **76** a été utilisée pour marquer les AT de la bactérie *S. pneumoniae* et les images de marquage obtenues par microscopie conventionnelle sont représentées en Figure 26A. A gauche, les bactéries sont mises en culture en présence d'AlkCho pendant 3 heures, puis, l'AlkCho, métabolisée par les AT, est révélée par CuAAC avec un fluorophore azidocoumarine pendant 30 minutes. A droite, la même expérience est réalisée, en utilisant de la choline naturelle au lieu d'AlkCho. Cette expérience de contrôle confirme que le marquage est absent dans ce cas-là, et donc, que le marquage observé correspond bien à la réaction click spécifique entre l'AlkCho et le fluorophore.

Par la suite, une application de ce marquage spécifique de *S. pneumoniae* a été de l'utiliser pour détecter facilement et rapidement cette bactérie lorsqu'elle est en présence d'autres espèces de bactéries. Trois bactéries ont été sélectionnées pour ce test de détection : *B. subtilis* et *E. coli*, respectivement bactéries à Gram positif et à Gram négatif qui ne contiennent pas de choline, ainsi que *P. aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, qui contient de la choline mais sur la membrane lipidique sous forme de phosphatidylcholine, en pas sur les AT.<sup>102</sup> Pour cette expérience, chaque espèce de bactérie a été mise en culture de façon indépendante en présence d'AlkCho ou de choline naturelle puis *S. pneumoniae* a été mélangée à chacune des espèces de bactéries et elles ont été mises en conditions de réaction CuAAC avec l'azidocoumarine. Les images montrent que seule *S. pneumoniae* a été marquée quand elle était en présence d'AlkCho. Les autres espèces de bactéries ne présentent aucun marquage et les expériences de contrôle avec la choline naturelle ne montrent pas de marquage non plus (Figure 26B).

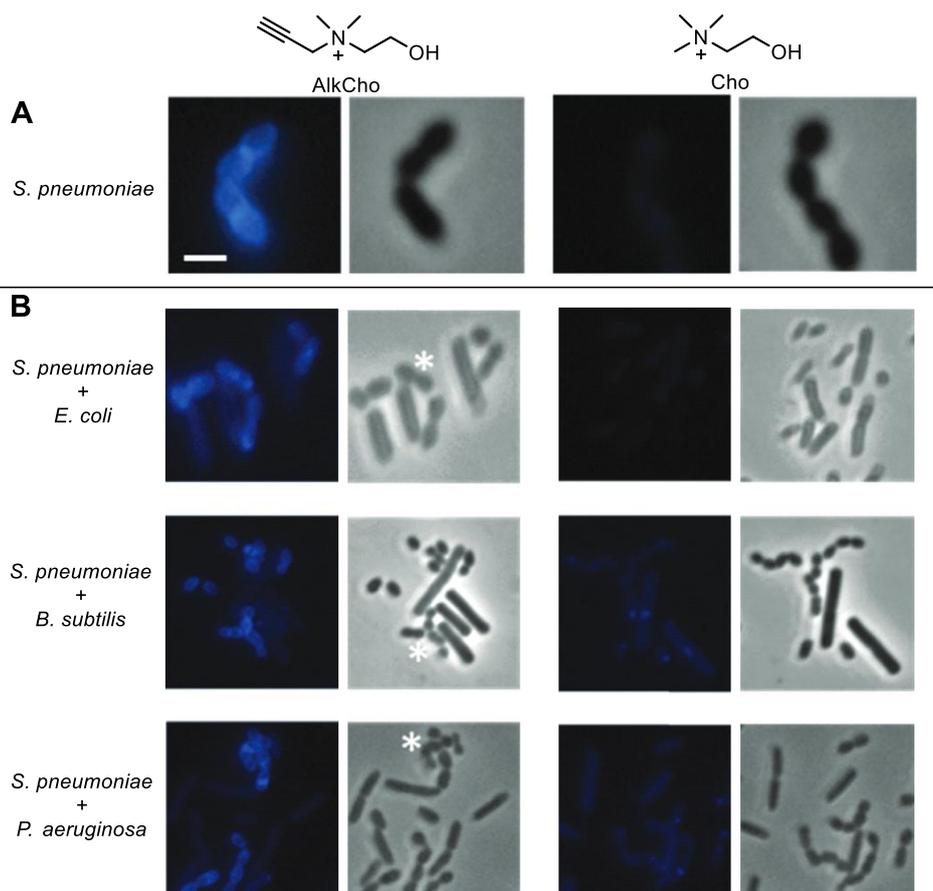


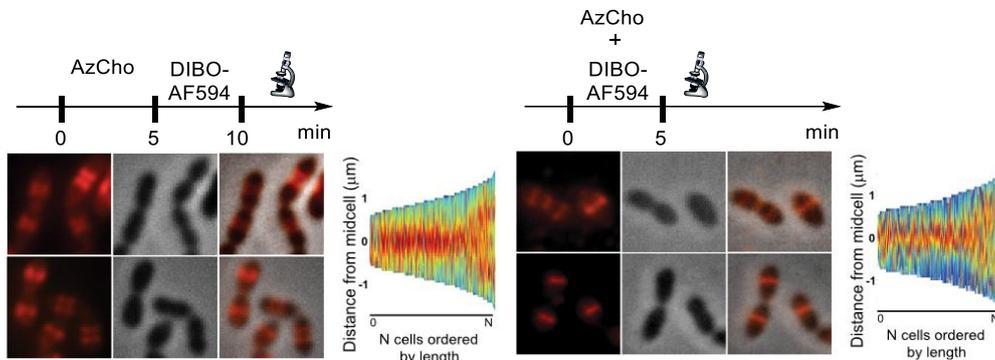
Figure 26 : Marquage des acides téichoïques de *S. pneumoniae* sur cellules vivantes avec AlkCho. / A – Sur *S. pneumoniae* seule, croissance pendant 3 h avec AlkCho ou Cho puis réaction en conditions CuAAC avec fluorophore azidocoumarine / B – Détection spécifique de *S. pneumoniae* (\*) en présence d'*E. coli*, de *B. subtilis* et de *P. aeruginosa*.<sup>21</sup>

### III.5.2. Marquage en deux couleurs des AT et du PG

Une expérience de pulse court en utilisant AlkCho a également été effectuée dans l'étude publiée en 2017. Cette expérience a montré un marquage au septum de la bactérie suggérant que le site de biosynthèse des AT se situe à cet endroit, donc proche du site de biosynthèse du PG.<sup>21</sup> Cependant, la cinétique de la réaction et la nécessité d'utiliser du cuivre pour réaliser la CuAAC limite la précision et la qualité des images obtenues, et nécessite de travailler sur cellules fixées car les concentrations de cuivre nécessaires pour la réaction click sont toxiques pour *S. pneumoniae*.

Dans une deuxième étude publiée en 2018,<sup>103</sup> un autre dérivé de choline est décrit : il s'agit de l'AzCho 77 (représenté en Figure 25). Ce dérivé, possédant un azoture à la place de l'alcyne, a l'avantage de pouvoir réagir par réaction SPAAC, sans cuivre, avec un fluorophore possédant une cyclooctyne. Dans cette étude, les fluorophores DIBO Alexa Fluor 488 et 594 ont été choisis. Plusieurs conditions de marquage ont été testées, notamment différents temps d'incubation, différents délais d'ajout entre l'AzCho et le fluorophore ainsi que des conditions de fixation ou non des cellules avant ajout du

fluorophore. Finalement, le meilleur marquage, c'est-à-dire la méthode permettant un marquage au septum le plus défini et le plus fin, a été obtenu lorsque l'AzCho et le fluorophore sont ajoutés en même temps pendant 5 minutes d'incubation suivi de lavages et d'une observation au microscope, sans fixation préalable des cellules. Sur la [Figure 27](#), ces conditions de marquage appelées « one-pot » sont représentées à droite alors qu'à gauche est représenté le marquage obtenu en 2 étapes successives : incubation de l'AzCho pendant 5 minutes, suivi de l'ajout du fluorophore pendant 5 minutes. Sur le graphique correspondant, à droite des images de microscope, sont représentées toutes les bactéries marquées et alignées de la plus petite à la plus grande. Ce graphique permet de voir l'amélioration de la qualité du marquage entre les deux conditions décrites : dans le cas du marquage « one-pot » (à droite), le marquage au septum (rouge) est plus centré, précis et fin alors qu'il est sous forme de deux bandes lorsqu'il est effectué en 2 étapes (à gauche). L'apparition de ces deux bandes provient du fait que les bactéries ont continué à pousser pendant l'ajout du fluorophore et donc, l'AzCho métabolisée n'est plus localisée seulement au septum de la bactérie. Enfin, il est important de préciser que ce marquage « one-pot » est rendu possible par la métabolisation de l'AzCho qui est bien plus rapide que la cinétique de la réaction click, qui se produit donc après métabolisation, une fois que l'AzCho a quitté le cytoplasme et est à la surface de la membrane plasmique, dans l'espace périplasmique (représenté en [Figure 28](#) : sur le schéma  $k_1 \gg k_2$ ).



*Figure 27 : Marquage en 2 étapes (gauche) et marquage one-pot (droite) des AT par l'azidochole. Sur le graphique, chaque bactérie marquée est représentée sous forme d'une ligne verticale et elles sont alignées de la plus petite à la plus grande. Le marquage le plus intense est représenté en rouge et le moins intense en bleu.*

Cette méthode de marquage « one-pot » a, par la suite, été utilisée en complément d'un marquage simultané du PG avec HADA **53** afin de marquer en même temps les AT et le PG ([Figure 28](#)). Pour cela, les trois composés AzCho, DIBO AF488 et HADA ([Figure 14](#)) sont ajoutés simultanément et les bactéries sont incubées pendant 5 minutes durant lesquelles le HADA est incorporé sur le PG et l'AzCho est métabolisée par les AT puis réagit avec le DIBO AF488 ([Figure 28](#)). Ensuite les bactéries sont lavées et observées au microscope pour obtenir les images de marquage en [Figure 28](#), soit en marquage seul des AT et du PG, soit en superposant les deux images.

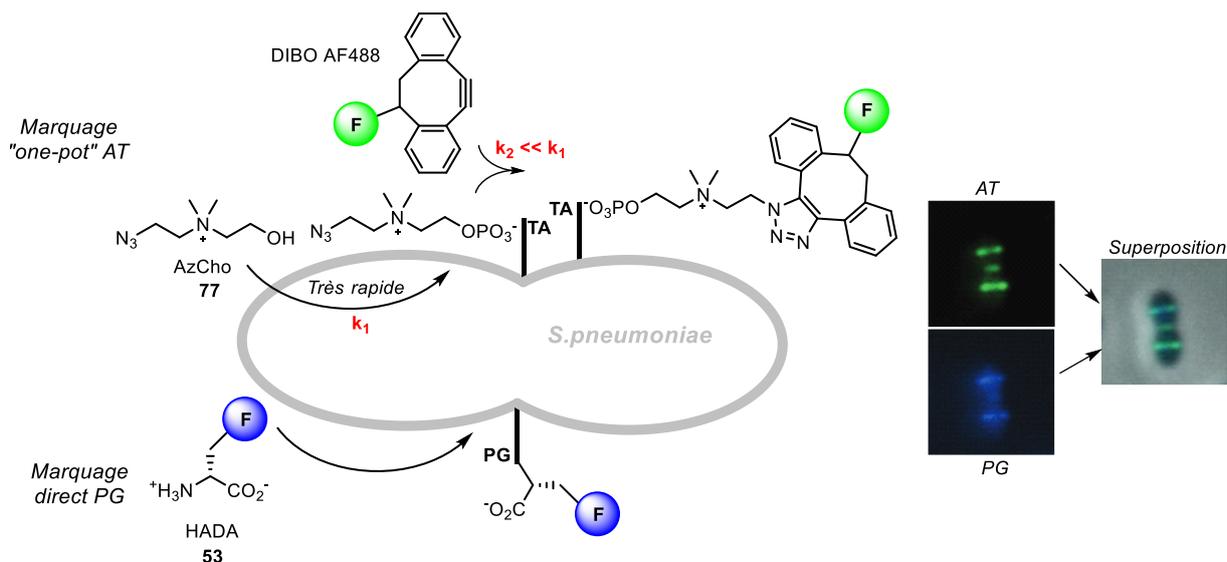


Figure 28 : Marquage "one-pot" des AT avec AzCho (30  $\mu$ M) et DIBO AF488 (25  $\mu$ M) et marquage direct du PG de *S. pneumoniae* avec HADA (500  $\mu$ M). Les images du marquage des AT (en vert) et du marquage du PG (en bleu) sont superposées.

Ce double marquage a permis de conclure que les sites de biosynthèse du PG et des AT sont colocalisés au septum de la bactérie, et qu'elles s'effectuent en même temps. Néanmoins, une comparaison approfondie des différents marquages à différentes étapes de la division bactérienne a permis de distinguer une petite différence : il semblerait que la biosynthèse des AT se poursuive après la fin de la biosynthèse du PG.<sup>103</sup>

### III.5.3. Présence de choline dans les milieux biologiques en dehors des AT

La choline n'est pas seulement présente sur les AT de *S. pneumoniae*, mais elle est également un nutriment essentiel pour les cellules humaines.<sup>104</sup> Dans les cellules humaines, la choline est principalement présente sous forme de phosphatidylcholine (PC) **78** (Figure 29) qui peut être synthétisée à partir de la voie de synthèse de Kennedy<sup>105</sup> ou recyclée par le cycle de Lands.<sup>106</sup> Le reste de la choline présente dans les cellules humaines l'est sous forme de choline libre, de phosphocholine, de glycérophosphocholine, de CDP-choline ou encore d'acétylcholine.<sup>104</sup>

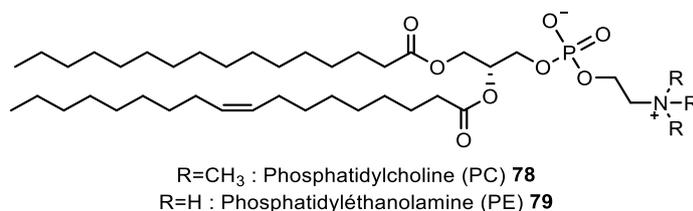


Figure 29 : Structures chimiques de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE)

La phosphatidylcholine est un des composants principaux des phospholipides des cellules eucaryotes, tout comme la phosphatidyléthanolamine (PE) **79** (Figure 29), également synthétisée à

partir de la voie de synthèse de Kennedy.<sup>104</sup> En revanche, les phospholipides présents chez les bactéries contiennent de la PC seulement pour environ 10 % des bactéries<sup>104</sup>, dont *S. pneumoniae*.<sup>107</sup> Alors que la PE présente sur les phospholipides des bactéries est synthétisée par la voie de Kennedy, la PC ne l'est pas et est synthétisée soit par méthylations successives de PE avec la S-adénosylméthionine comme source de méthyle<sup>102</sup>, soit par voie enzymatique spécifique à partir de cholines.<sup>104,108</sup>

En 2009, Salic *et al.* ont développé une méthode de marquage métabolique pour marquer les phospholipides de cellules eucaryotes *in vivo* grâce à la métabolisation de l'AlkCho **76** sur les PC.<sup>109</sup> Un marquage en deux étapes a été effectué : d'abord l'AlkCho a été incorporé sur les PC des phospholipides pour former des phosphatidyl-propargylcholines, puis un fluorophore avec un azoture a été ajouté (AlexaFluor568-azide ou fluorescéine). Le marquage a été effectué *in vitro* sur des cellules eucaryotes de souris (NIH 3T3) et *in vivo* chez la souris (cellules du foie, de l'intestin, du rein et de la rate marquées).

De même, d'autres cholines ont été récemment développées par Kalia *et al.*<sup>110</sup> afin de marquer des cellules humaines, et certaines sont représentées en Figure 30. Toutes les cholines représentées ont permis le marquage des cellules, et donc ont été métabolisées. Cependant, les dérivés **80**, **82** et **85** ont permis de meilleurs marquages. Une des conclusions que l'on peut tirer de ces marquages est que la métabolisation de dérivés plus long (composé **81**) est moins bonne que pour des dérivés courts (composé **80**). De plus, la présence de deux groupements méthyles sur l'azote n'est pas essentielle pour la métabolisation des dérivés de choline par les AT (composé **82** à **85**). Enfin, pour chacun de ces dérivés, une expérience de compétition a été effectuée avec une quantité équimolaire de choline naturelle **75** (2 mM) (Figure 30). Ainsi, dans les cas des composés **82**, **83** et **84**, le dérivé non naturel est en partie métabolisé dans la cellule alors que pour les composés **80**, **81** et **85**, la fluorescence est totalement supprimée et le composé non naturel n'est pas métabolisé.<sup>110</sup>

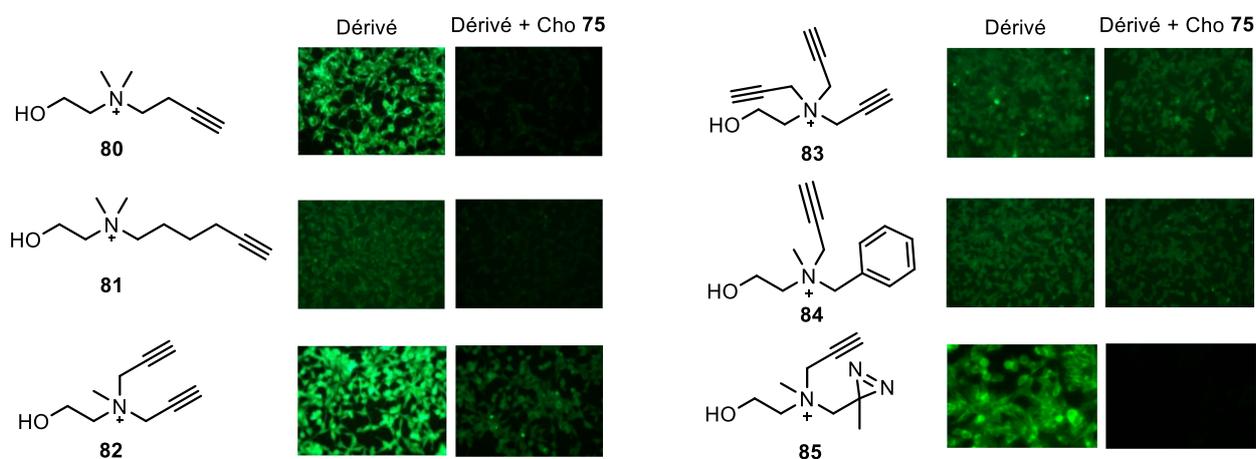


Figure 30 : Structures chimiques des dérivés de cholines métabolisés sur cellules humaines, images de marquage avec les dérivés seuls et images de marquage avec le dérivé en compétition avec la choline naturelle **75**<sup>110</sup>

Baskin *et al.* travaillent également sur le marquage de phospholipides et notamment sur une méthode ayant pour but de préciser l'activité des acides phosphatidiques, intermédiaire de la synthèse des phospholipides et produit de l'hydrolyse de PC sous l'action de l'enzyme phospholipase D (PLD).<sup>111-113</sup> En effet, cette enzyme permet soit la formation d'acide phosphatidique par hydrolyse, soit la formation d'un phosphatidyl-alcool par substitution de la choline par un alcool primaire comme le butanol grâce à une réaction de transphosphatidylation (Figure 31A).<sup>111</sup>

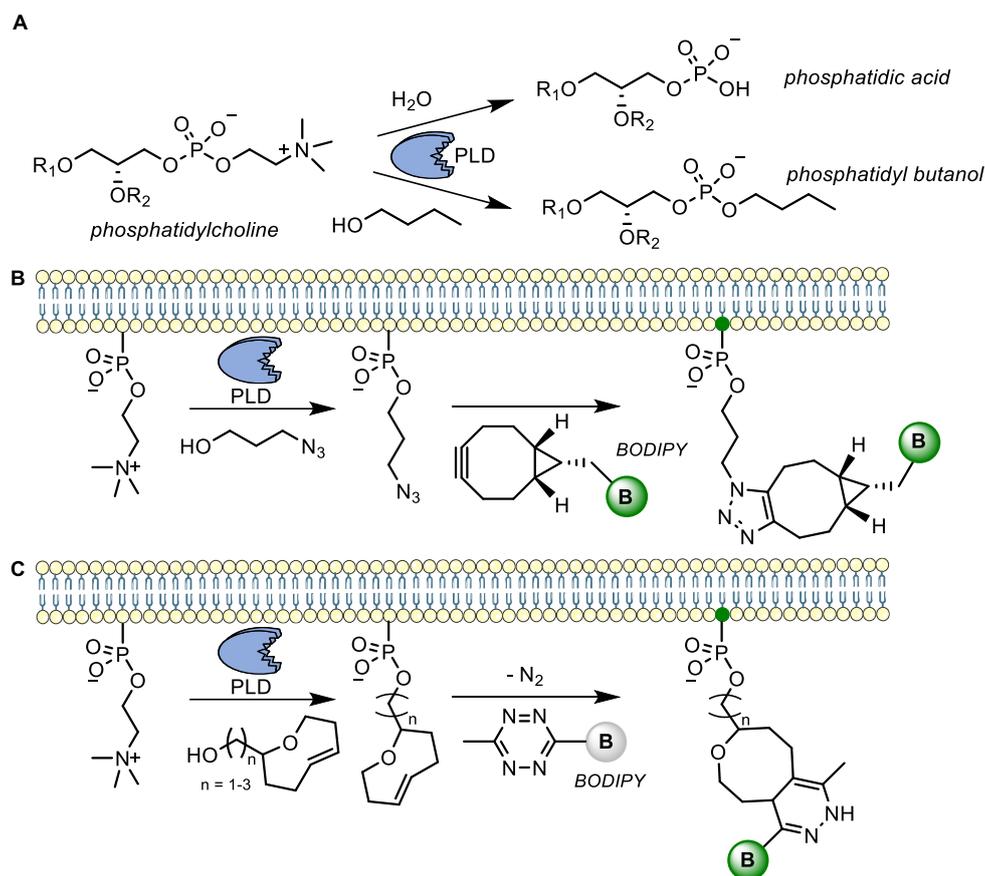


Figure 31 : A – Hydrolyse de PC et transphosphatidylation par l'enzyme PLD. Adapté de Baskin *et al.*<sup>111</sup> / B – Marquage en deux étapes des PC et de l'activité de l'enzyme PLD. Adapté de Baskin *et al.*<sup>112</sup> / C – Marquage fluorogénique des PC et de l'enzyme PLD par réaction bioorthogonale IEDDA. Adapté de Baskin *et al.*<sup>113</sup>

Ainsi, la méthode développée permet l'incorporation, grâce à cette enzyme, du 3-azido-propanol qui installe ainsi un azoture sur le phospholipide. Cela permet la réaction SPAAC entre l'azoture sur le phospholipide modifié et le BCN lié de façon covalente à un fluorophore, le BODIPY (Figure 31B).<sup>112</sup>

Par la suite, Baskin *et al.* ont étendu cette méthode à l'incorporation d'un alcool possédant un TCO modifié (oxo-TCO).<sup>113</sup> Au lieu de la réaction SPAAC, une cycloaddition IEDDA est effectuée avec le BODIPY et cette réaction est, cette fois, fluorogénique : avant la réaction click, le BODIPY est non-fluorescent dû à la présence de la tétrazine, et après réaction click, la tétrazine est modifiée, il devient

alors fluorescent (Figure 31C). Cette technique permet donc une détection en temps réel, sans lavage.<sup>113</sup>

Ainsi, cette technique de marquage illustre le fait que la choline présente sur les PC est mobile et peut être échangée par un autre alcool, d'une taille telle que celle de l'alcool possédant le TCO modifié.

### III.6. Marquage de la membrane externe des bactéries à Gram négatif

Jusqu'à présent, nous avons parcouru les différents dérivés qui ont été développés pour être métabolisés sur le PG de diverses bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que sur les acides téichoïques de la bactérie à Gram positif *S. pneumoniae*. Nous nous sommes focalisés sur les dérivés de PG et des AT car ce sont ces deux macromolécules qui nous intéresseront par la suite.

Il est également important d'évoquer que d'autres composants de la bactérie ont servi de marqueur métabolique ces dernières années. En particulier, le lipopolysaccharide (LPS), composant la membrane externe des bactéries à Gram négatif, a été beaucoup étudié.<sup>78,114</sup>

Par exemple, Vauzeilles *et al.* ont décrit le KDO-N<sub>3</sub> **86** (Figure 32), qui est un dérivé de l'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique, composant le noyau du LPS. Ce dérivé a permis de marquer une grande majorité des bactéries à Gram négatif.<sup>115</sup> Par ailleurs, Wang *et al.* ont, quant à eux, utilisé un dérivé de fucose, le FucAz **87** permettant de marquer sélectivement l'antigène-O du LPS d'*E. coli* modifiée pour contenir du fucose.<sup>116</sup>

Enfin, Vauzeilles *et al.* ont également développé un dérivé d'un antigène-O, le composé **88**. Il s'agit, cette fois, de l'antigène-O de la bactérie *Legionella pneumophila*, une bactérie pathogène pouvant contaminer l'eau et causer de graves infections dans la population si la contamination n'est pas détectée. La métabolisation de ce composé **88** dans le LPS de la bactérie suivie de la CuAAC avec un fluorophore a ainsi permis de développer une méthode qui détecte sélectivement et rapidement la présence de la bactérie.<sup>117</sup>

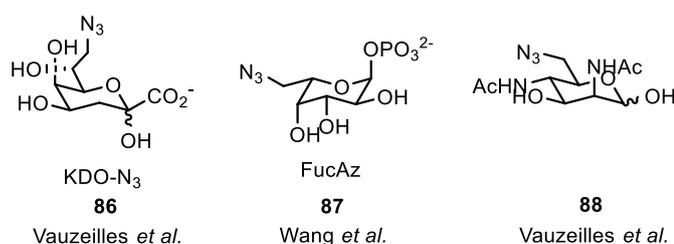


Figure 32 : Exemples de dérivés métabolisés par le LPS

Il est également possible de marquer de façon fluorescente des protéines de la bactérie, notamment des glycoprotéines, ainsi que les acides nucléiques de la bactérie ou encore des enzymes.<sup>118</sup> Cependant, cela ne sera pas évoqué dans ce document.

Ces différents marquages permettent de mieux comprendre les dynamiques régissant la vie de la bactérie mais il est également possible d'utiliser la métabolisation de dérivés et la chimie bioorthogonale pour des applications de screening<sup>82</sup> ou de détection<sup>117</sup> simples et rapides comme nous en avons vu quelques exemples précédemment. Enfin, il est également possible d'imaginer des applications thérapeutiques profitant des avantages apportés par la chimie bioorthogonale. Ceci est l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

## IV. Développement de nouvelles thérapies profitant des atouts de la chimie bioorthogonale

Un certain nombre de thérapies basées sur la chimie click et la chimie bioorthogonale voient le jour ces dernières années. Le principal atout des réactions clicks dans la conception de thérapies innovantes est qu'elles permettent un contrôle spatio-temporel du principe actif dans le milieu dans lequel il se trouve : le principe actif peut ainsi être activé ou désactivé à un endroit précis et/ou à un moment précis. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les applications de chimie bioorthogonale, sans cuivre. Ainsi, dans une première partie, nous verrons deux exemples permettant l'activation de principes actifs à un endroit précis. Puis, nous verrons que la chimie bioorthogonale peut aussi servir à désactiver un principe actif à un moment précis. Enfin, nous développerons deux exemples d'antibactériens développés grâce à la chimie bioorthogonale.

### IV.1. Thérapie par vectorisation : activation spatio-temporelle d'un principe actif

Une première application développée est appelée « click and release » et permet de concevoir des prodrogues : le principe actif est modifié pour le rendre inactif au moment où il est injecté. Le fragment modifié du principe actif réagit par réaction click avec un composé spécifique, puis, par une deuxième réaction spécifique, le principe actif est relargué. Au départ, cette technologie a été développée avec la ligation de Staudinger,<sup>119</sup> mais cette réaction était trop lente et donc rendait l'application difficile. D'autres techniques similaires ont donc été développées, et, parmi elles, la « click and release » avec l'IEDDA entre une tétrazine et un TCO décrite par Robillard *et al.* en 2013.<sup>120</sup> Le principe de la réaction est représenté en Schéma 6 avec l'exemple du relargage de la doxorubicine. Cet anticancéreux cytotoxique est lié à un TCO (composé **89**) et réagit par cycloaddition [4+2] avec une tétrazine **90**. Le produit **91** formé libère alors la doxorubicine **92**, du CO<sub>2</sub> et la pyridazine **93** qui s'aromatise par tautomérisation (non représentée).

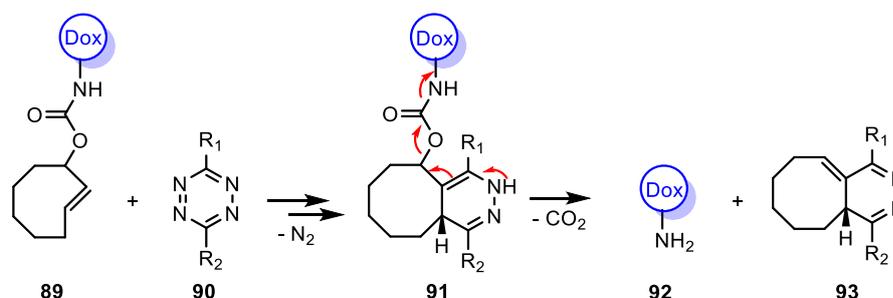


Schéma 6 : « Click and release » entre un TCO et une tétrazine pour libérer la doxorubicine. R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont soit des substituants méthyles soit des substituants 2-pyridyles.

A la suite de la première publication décrivant la réaction de « click and release » et sa cinétique, elle a été appliquée, dans un deuxième temps, à un Antibody Drug Conjugate (ADC) sur lequel a été lié de façon covalente le complexe TCO-doxorubicine **89**.<sup>121</sup> Les ADC sont des biomolécules prenant la forme d'anticorps spécialement conçus pour avoir une forte affinité avec les antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses.<sup>122</sup> Ainsi, l'ADC, injecté en premier lieu, est dirigé sur les cellules cancéreuses et le simple ajout d'une tétrazine permet les réactions en cascade décrites en [Schéma 6](#) ainsi que la libération de doxorubicine, au plus proche des cellules cancéreuses. Le relargage de doxorubicine au niveau de la tumeur a été prouvé *in vivo* chez la souris et a montré une bonne stabilité des composés et une libération efficace de la doxorubicine, retenue au niveau de la tumeur.<sup>121</sup>

Par ailleurs, avec une technologie assez similaire à la « click and release » présentée ci-dessus, Roysen *et al.* ont développé la méthode Click Activated Prodrugs Against Cancer (CAPAC).<sup>123</sup> Le but de cette thérapie est également de diriger un anticancéreux sur une tumeur afin, soit de la rendre moins cytotoxique et d'injecter de plus fortes doses (doxorubicine), soit de permettre une plus grande efficacité d'administration pour des anticancéreux peu solubles, limitant la dose maximale administrée (paclitaxel, étoposide). Le principe de la CAPAC est décrit en [Figure 33](#) et se découpe en quatre étapes. Dans un premier temps, un biopolymère modifié avec un groupement tétrazine est injecté au niveau du site de la tumeur ([Figure 33A](#) : 1 Injection). Puis, l'anticancéreux, rendu moins cytotoxique par la modification de ce dernier avec un TCO, est injecté ([Figure 33A](#) : 2 Infusion). Lorsque l'anticancéreux atteint la tumeur au niveau de laquelle se situe le biopolymère, la cycloaddition entre la tétrazine du polymère et le TCO de l'anticancéreux se produit ([Figure 33A](#) : 3 Capture). Enfin, l'anticancéreux est libéré et activé par réaction en chaîne, similaire à celle produite par le « click and release » ([Figure 33A](#) : 4 Activation).

Les études *in vitro* menées avec quatre anticancéreux (doxorubicine, paclitaxel, étoposide, gemcitabine) ont montré les meilleurs résultats avec la doxorubicine, molécule avec laquelle s'est ensuivie une étude *in vivo* sur souris. La dose maximale tolérée de la prodrogue doxorubicine-TCO en combinaison avec le biopolymère modifié-tétrazine représenté en [Figure 33A](#) ( $383 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) s'est ainsi révélée 19 fois supérieure à la dose maximale tolérée de la doxorubicine seule ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Ces résultats *in vitro* et *in vivo* prometteurs ont permis à la prodrogue Dox-TCO **94** ([Figure 33B](#)) d'entrer en essais cliniques, d'abord en phase I en 2021<sup>123</sup> et maintenant (2023) au début de la phase II.<sup>124</sup>

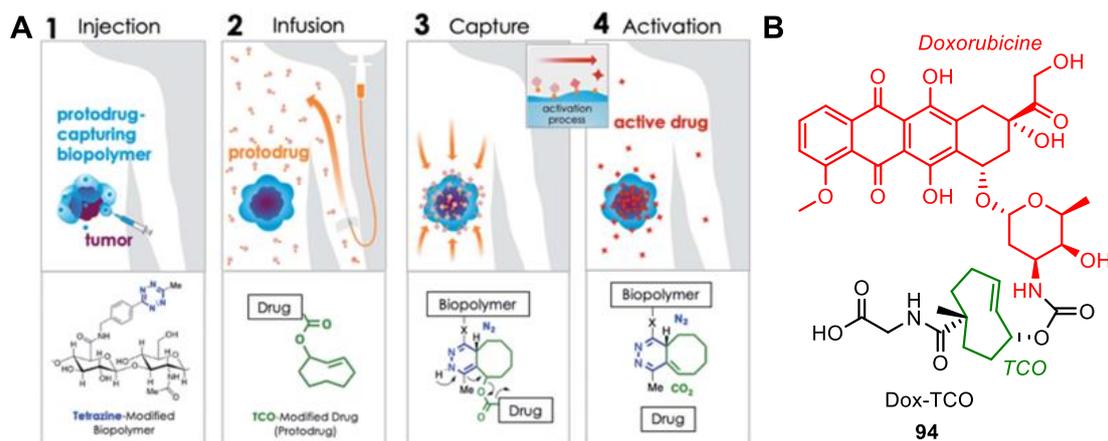


Figure 33 : A – Principe de la technologie CAPAC. Reproduit de Roysen *et al.*<sup>123</sup> / B – Composé Dox-TCO entré en phase d'essais cliniques avec le biopolymère modifié-tétrazine

Au-delà de la technologie novatrice développée, ce qui est à souligner ici est le fait que les essais cliniques soient avancés au niveau de la phase II : c'est le médicament utilisant la chimie bioorthogonale qui est le plus avancé dans des phases d'essais cliniques pour l'instant. Cela fournit ainsi la preuve que la chimie bioorthogonale peut servir à concevoir des médicaments efficaces chez l'humain.

#### IV.2. Désactivation de l'activité d'un anticoagulant par réaction bioorthogonale

A l'inverse des prodrogues présentées précédemment, il est aussi possible de concevoir une stratégie permettant la désactivation d'un principe actif à un moment précis par réaction bioorthogonale. Cela a été fait par Wagner *et al.* qui ont développé une méthode qu'ils ont appelé « click & clear »<sup>125</sup> et qui permet de rendre inactive à un moment précis la warfarine, un anticoagulant couramment utilisé, rétablissant ainsi la coagulation du sang. La warfarine est stable *in vivo* et éliminée lentement, elle peut rester longtemps dans le système et peut avoir l'effet inverse à celui désiré initialement, en provoquant une hémorragie.<sup>126</sup> Être capable de la rendre rapidement inactive et renverser son effet est donc important.

La réaction bioorthogonale utilisée pour cette application est représentée Figure 34 et a été testée *in vivo* chez la souris. La warfarine est modifiée pour ajouter un azoture (composé **95**) tout en s'assurant que l'activité anticoagulante du dérivé est conservée. Par la suite, cette activité anticoagulante peut être rapidement supprimée par ajout de BCN-(PEG)<sub>6</sub>-OH **96**, conçu pour être soluble, polaire et réagir rapidement avec l'azoture. Le composé **97** formé est ainsi inactif et rapidement éliminé.

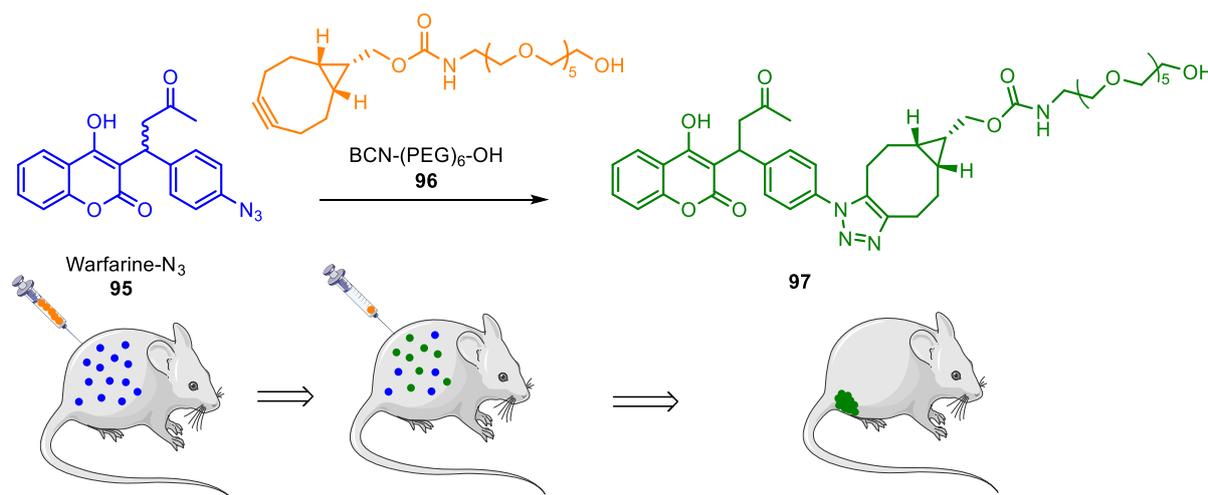


Figure 34 : Principe de "click & clear" pour inactiver la warfarine, un anticoagulant. Adapté de Wagner *et al.*<sup>125</sup>

Les études *in vivo* menées ont permis de confirmer l'efficacité de cette stratégie. En effet, 60 min après la dernière injection de BCN **96** (trois injections au total, espacées de 5 min), la warfarine modifiée **95** est quasiment entièrement éliminée du plasma de la souris et on retrouve le composé inactif **97**, principalement dans l'urine de la souris (à 95.3 % dans l'urine par rapport aux quantités retrouvées dans le plasma et le foie).<sup>125</sup>

### IV.3. Développement d'antibactériens par la chimie bioorthogonale

Pour finir, certaines stratégies thérapeutiques ont été développées pour concevoir des antibiotiques. Premièrement, une méthode similaire à la stratégie de « click and release » détaillée précédemment a été développée par Mejia Oneto *et al.*,<sup>127</sup> pour deux antibiotiques provoquant des effets secondaires et présentant une fenêtre thérapeutique restreinte : la vancomycine (voir Figure 5) et la daptomycine. Le principe est d'utiliser un gel d'alginate, modifié avec une tétrazine en surface. Ce biomatériau est injecté au niveau de l'infection bactérienne puis, une prodrogue similaire au composé **89**, composée d'un des deux antibiotiques évoqués plus haut et d'un groupement TCO, est injectée. La cycloaddition IEDDA suivie du relargage de l'antibiotique décrit en Schéma 6 se produit alors. Les études *in vitro* et *in vivo* menées ont montré une bonne efficacité de cette stratégie en éliminant après 24 h l'infection par des souches de *S. aureus* résistant à la méticilline chez la souris. Par ailleurs, cette stratégie peut encore être améliorée en augmentant la solubilité dans l'eau de la prodrogue ainsi qu'en la modifiant différemment, afin de la rendre moins active lorsqu'elle est sous forme de prodrogue. Cela permettrait ainsi de rendre l'antibiotique sélectif grâce à injection localisée du biomatériau au niveau de l'infection bactérienne, de diminuer les effets secondaires de l'antibiotique et d'éviter le développement de résistance par action de l'antibiotique sur des bactéries saines.<sup>127</sup> Cependant, cette

stratégie, bien qu'innovante, se base sur la modification d'antibiotiques déjà développés et non sur le développement d'antibiotiques avec un nouveau mode d'action.

En 2018, Liu *et al.* ont développé une stratégie permettant la détection par imagerie ainsi que le traitement d'infections bactériennes.<sup>128</sup> Le schéma de la stratégie est représenté en Figure 35 et se découpe en plusieurs étapes. Premièrement, une nanoparticule est synthétisée à partir d'un réseau métallo-organique, MIL-100 (Fe), d'un polymère améliorant la biocompatibilité de la nanoparticule (F127) et de D-AzAla (composé 59 appelé AzDA dans ce document) (Figure 35A). Dans l'étude *in vivo* menée, la nanoparticule est injectée chez la souris et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins au niveau du site de l'infection bactérienne permet l'accumulation des nanoparticules sur le lieu de l'infection. La présence accrue d' $H_2O_2$  au niveau du site infectieux va permettre à ces nanoparticules de se décomposer, libérant l'AzDA, qui est alors incorporée sur le PG des bactéries pathogènes (Figure 35B). Dans une troisième et dernière étape, une autre nanoparticule est injectée, l'AIE NPs-DBCO. Cette nanoparticule réagit par réaction SPAAC avec l'azoture présent à la surface des bactéries et une irradiation par thérapie photodynamique permet la génération d'oxygène singulet, toxique pour la bactérie (Figure 35C). Ainsi, l'étude *in vivo* menée avec cette stratégie a montré une diminution significative de la quantité de bactéries au niveau de l'infection et une diminution de l'inflammation.<sup>128</sup>

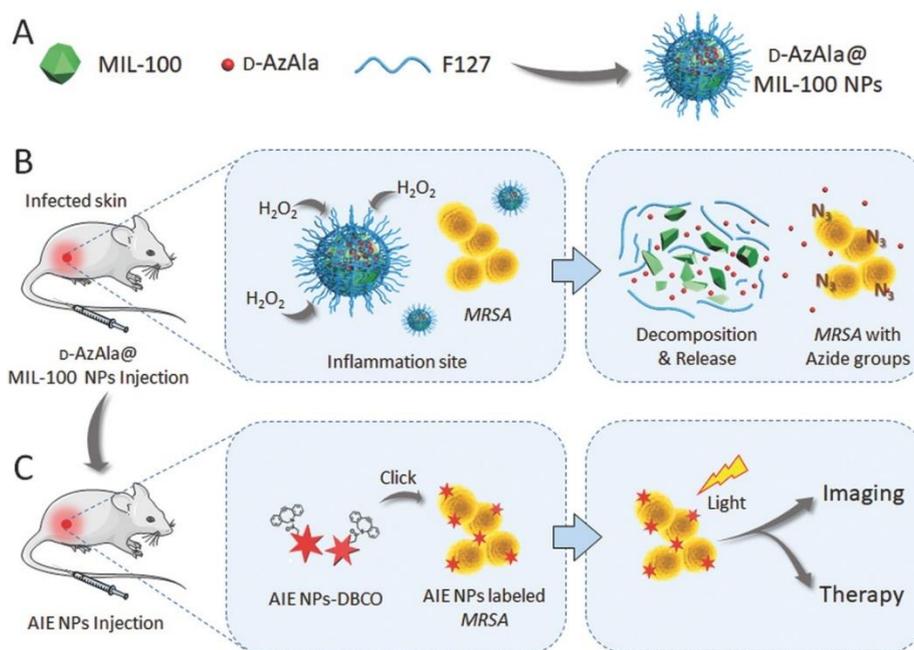


Figure 35 : Schéma du principe de la stratégie développée par Liu *et al.* en 2018.<sup>128</sup> Schéma emprunté de Liu *et al.*<sup>128</sup> avec permission

---

## V. Projet de recherche

---

Malgré toutes les recherches déjà effectuées, dont une partie des résultats a été présentée dans ce chapitre, certaines questions demeurent concernant les processus biodynamiques régissant la vie de la bactérie. Par ailleurs, dans un contexte de développement de résistance face aux antibiotiques existants, il devient urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques agissant par un nouveau mécanisme d'action. Ainsi, mon projet de thèse a été dédié à explorer ces problématiques, spécifiquement pour la bactérie *S. pneumoniae*. Pour cela, la chimie bioorthogonale, telle qu'elle a été développée ces dernières années, est un atout majeur. Les travaux qui seront présentés par la suite ont été effectués en collaboration avec le groupe Pneumocoque de l'IBS à Grenoble. Au DPM, nous nous sommes principalement concentrés sur la synthèse chimique et la caractérisation des composés qui seront présentés par la suite et l'équipe Pneumocoque de l'IBS a été chargée d'effectuer les tests biologiques sur des souches de *S. pneumoniae*.

La bactérie *S. pneumoniae* a la particularité de posséder de la choline sous forme de phosphocholine sur ses acides téichoïques. Après avoir réussi, pour la première fois, à marquer les AT et à les observer au microscope grâce à la métabolisation de l'AzCho **77**<sup>21</sup> (III.5.1. Métabolisation de choline et premier marquage des acides téichoïques), nous souhaitons répondre à la question suivante : quelle est la tolérance des AT pour métaboliser des dérivés de choline de taille et de composition différentes ? Le but premier de cette étude est d'étudier la possibilité d'utiliser d'autres cholines afin notamment d'améliorer l'efficacité de métabolisation de cholines et par conséquent le marquage des AT. Cette étude concernera la première partie de la description de mes travaux de thèse.

En plus de l'étude des AT, le marquage du PG par des dérivés de D-Ala ou de D-Ala-D-Ala nous intéresse aussi. Antérieurement à ces travaux, la technologie disponible au laboratoire pour le marquage du PG en deux étapes utilisait le composé AzDADA **67**, présenté dans la partie III.4.3.1. AlkDADA, AzDADA, HADA-DA et NADA-DA.<sup>96</sup> Dans un deuxième temps, nous nous sommes ainsi concentrés sur le développement de nouveaux dérivés de D-Ala et de D-Ala-D-Ala permettant le marquage en deux étapes, sans cuivre.

Les nouveaux outils développés et permettant le marquage du PG et des AT ont été exploités pour étudier s'ils pouvaient avoir un effet, bactériostatique ou bactéricide, sur la bactérie. A la manière de Schultz *et al.*<sup>85</sup> et de Siegrist *et al.*<sup>86</sup> (III.4.2.4. Réticulation entre dérivés de D-Ala incorporés sur le PG) qui ont effectué une réticulation non naturelle entre différentes chaînes peptidiques du PG, l'idée

est, dans ce projet, d'étudier la possibilité de former une réticulation entre le PG et les AT de la bactérie *S. pneumoniae* dans le but de bloquer la biosynthèse de sa paroi bactérienne.

Pour finir, les résultats de marquage simultané du PG et des AT, présentés en 2018 par nos équipes<sup>103</sup> et décrits dans la partie [III.5.2. Marquage en deux couleurs des AT et du PG](#), semblent montrer une concordance spatio-temporelle des biosynthèses de ces deux parties de la paroi bactérienne. Ces résultats ont été obtenus en microscopie conventionnelle et ont donc une précision qui peut être améliorée, notamment en modifiant la technique de microscopie pour augmenter la résolution. En 2021, des précisions ont été apportées sur la biosynthèse du PG grâce au marquage et à l'observation de ce dernier par microscopie à haute résolution dSTORM.<sup>96</sup> Ces travaux ont été décrits dans la partie [III.4.3.2. Marquage en microscopie à haute résolution du PG avec AzDADA](#). L'objectif d'une partie de ces travaux de thèse est donc également d'utiliser les dérivés de choline et de D-Ala développés précédemment afin de marquer simultanément le PG et les AT avec la méthode de microscopie à haute résolution dSTORM.



## Chapitre II

### Synthèse de cholines modifiées et évaluation de leur métabolisation par les AT

Les recherches antérieures à ce projet ont déjà montré que les cholines modifiées, AlkCho **76** et AzCho **77** sont incorporables par métabolisation ([Chapitre I, III.5. Métabolisation de dérivés de cholines sur les acides téichoïques](#)). Les modifications apportées sur ces deux dérivés sont de petites tailles et ces dérivés sont donc reconnus par le transporteur membranaire LicB et par les enzymes responsables de la métabolisation de la choline par les AT. Ces deux dérivés ont permis le marquage des AT par réaction CuAAC et SPAAC, et, plus largement, ont déjà été utilisés pour d'autres applications impliquant la choline dans d'autres systèmes vivants (cellules humaines<sup>110,129</sup>, plantes<sup>130</sup> ...).

Ce chapitre traite de l'étude de la tolérance des AT pour métaboliser des dérivés de cholines de différentes tailles et de différentes compositions. Au travers de la question de la tolérance, l'objectif est l'identification de nouveaux dérivés permettant une application en lien avec le marquage métabolique et la chimie bioorthogonale.



## I. Synthèse d'une librairie de cholines

Pour cette étude, une librairie de 11 nouvelles cholines, aux propriétés diverses a été synthétisée (Figure 36).

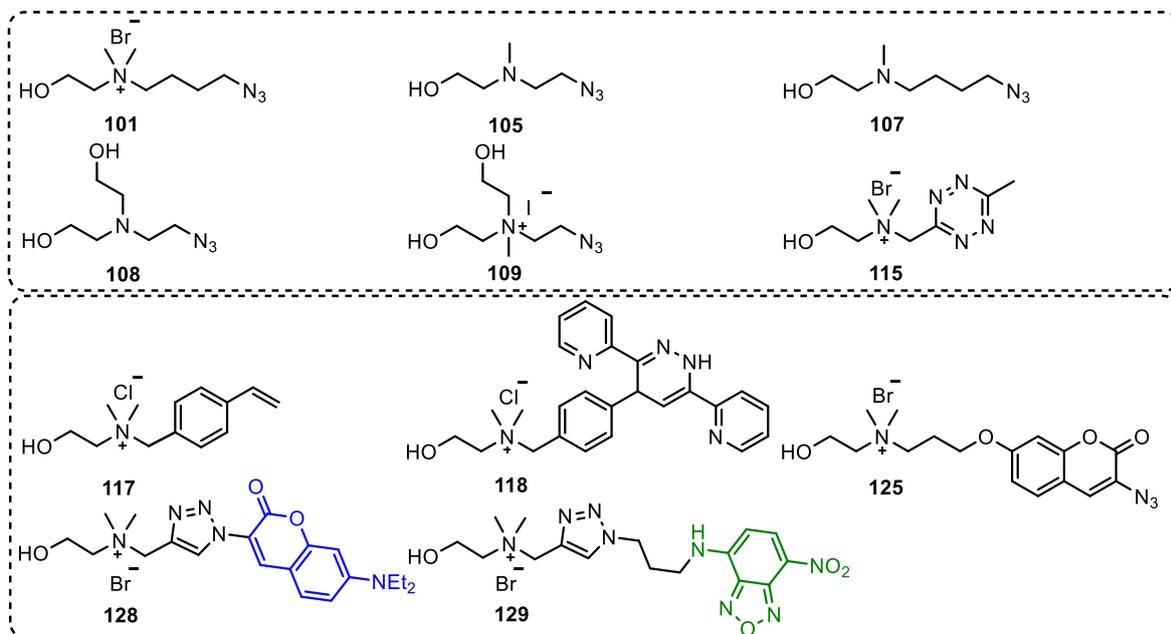


Figure 36 : Nouvelles cholines synthétisées pendant ce projet de thèse

Les composés **101**, **105**, **107**, **108** et **109** sont conçus comme dérivés de l'AzCho **77**. Le composé **101** possède 2 carbones supplémentaires sur sa chaîne par rapport à l'AzCho **77**, et permet donc d'évaluer la différence de métabolisation de ces composés avec l'augmentation de la longueur de chaîne. De plus, dans l'étude de Badger de 1944,<sup>131</sup> la croissance de *S. pneumoniae* est poursuivie lorsque la choline naturelle est remplacée par des cholines non chargées (trialkyl amines) et par des cholines possédant deux chaînes alcool. Ces constats ont mené à la conception des dérivés **105**, **107**, **108** et **109**. Par ailleurs, le composé **115** possède une tétrazine et permettrait donc d'effectuer la réaction bioorthogonale IEDDA sur une choline métabolisée par les AT. Ensuite, les composés **117** et **118** ont été conçus en suivant les résultats d'une étude de Guo *et al.*<sup>132</sup> qui décrit la réaction bioorthogonale et fluorogénique entre le styrène et la tétrazine **29** dont la structure est décrite sur le Schéma 3. Ainsi, le composé **117**, dérivé du styrène et non-fluorescent, peut réagir avec la tétrazine **29** pour conduire à un produit de type **118** qui possède une fluorescence. De la même manière, le composé **125** possède une coumarine, non-fluorescente, qui devient fluorescente lors d'une réaction click CuAAC ou SPAAC. Enfin, les composés **128** et **129** sont des cholines fluorescentes, résultat de la

réaction click entre l'AlkCho **76** et un fluorophore (respectivement coumarine et NBD), et permettraient de marquer les AT de façon directe.

### I.1. Azido-cholines et tétrazine-choline

Tout d'abord, le composé **101** est synthétisé en deux étapes suivant le [Schéma 7](#) en s'inspirant du protocole décrit par Liu *et al.* pour la synthèse de l'AzCho **77**. Le diméthylaminoéthanol **99** réagit avec le dibromobutane **98** dans le THF pour former la choline bromée **100** avec un rendement de 86 %. Ensuite, un large excès d'azoture de sodium (10 équivalents) permet de substituer le brome pour former l'azido-choline **101** avec un rendement de 53 %.

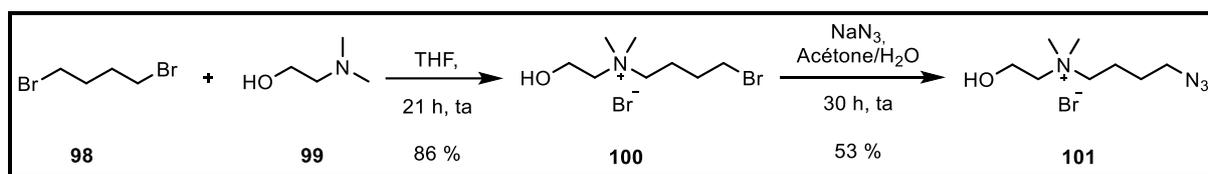


Schéma 7 : Synthèse de l'azido-choline **101**

Les composés **105** et **107** sont synthétisés en deux étapes suivant le [Schéma 8](#) en partant des composés dibromés, respectivement **102** et **98**, dont l'un des bromes est substitué par un azoture pour former les composés **104** et **106**, qui sont des composés volatiles et très peu visibles sur CCM. Ils sont donc mis en réaction directement, sans purification. Le *N*-méthyléthanolamine réagit alors sur ces composés en présence de  $\text{NaHCO}_3$  pour former les composés **105** et **107** avec des rendements respectifs sur deux étapes de 25 % et 28 %. Les faibles rendements obtenus peuvent s'expliquer par une combinaison de différents facteurs : les composés mono- et dibromés sont volatils, le produit intermédiaire n'est pas purifié, ce qui entraîne des impuretés dans la deuxième étape et enfin, l'azoture de sodium peut substituer les deux bromes du réactif de départ, malgré l'excès de réactif dibromé introduit au départ (2 équivalents).

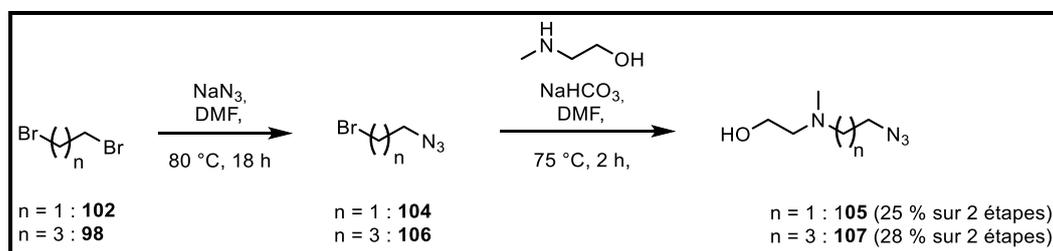


Schéma 8 : Synthèse des dérivés azido-choline **105** et **107**

Pour la synthèse des dérivés de choline avec deux alcools **108** et **109**, le composé **104** est formé de la même façon que précédemment puis, il est mis en réaction avec la diéthanolamine pour former l'amine tertiaire et dérivé de choline **108** avec un rendement de 39 % sur les deux étapes. La choline

chargée **109** est ensuite formée par méthylation de l'amine tertiaire grâce à l'iodométhane avec un rendement de 64 % (Schéma 9).

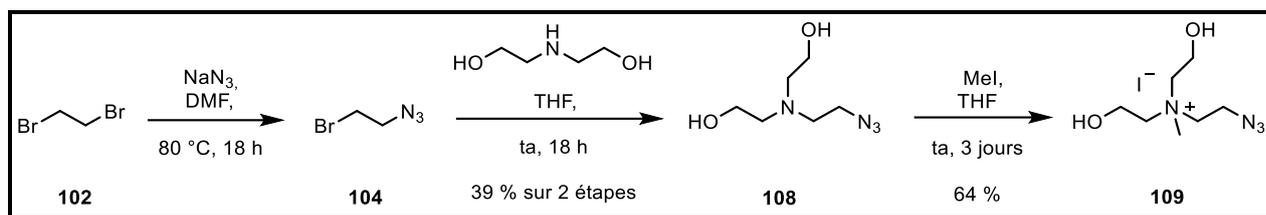


Schéma 9 : Synthèse des composés **108** et **109**

La tétrazine-choline **115** est formée en 4 étapes en partant de l'acétonitrile **110** et du méthoxyacétonitrile **111**. La synthèse de l'intermédiaire **114** a déjà été décrite par Wombacher *et al.*<sup>133</sup> et les conditions de réaction ont été reproduites ici, avec seulement quelques changements mineurs. Premièrement, la tétrazine asymétrique et volatile **112** est obtenue avec un rendement de 26 % à partir des deux nitriles **110** et **111**, par une réaction catalysée par le trifluorométhanesulfonate de nickel(II). Ensuite, l'alcool **113** est obtenu avec un rendement de 64 % par déméthylation à -78 °C avec  $\text{BBr}_3$  puis la réaction d'Appel avec la triphénylphosphine et le tétrabromure de carbone permet la formation de la tétrazine bromée **114** avec 62 % de rendement. Pour finir, la tétrazine-choline **115** est obtenue par substitution du brome par le diméthylaminoéthanol avec un rendement de 71 %.

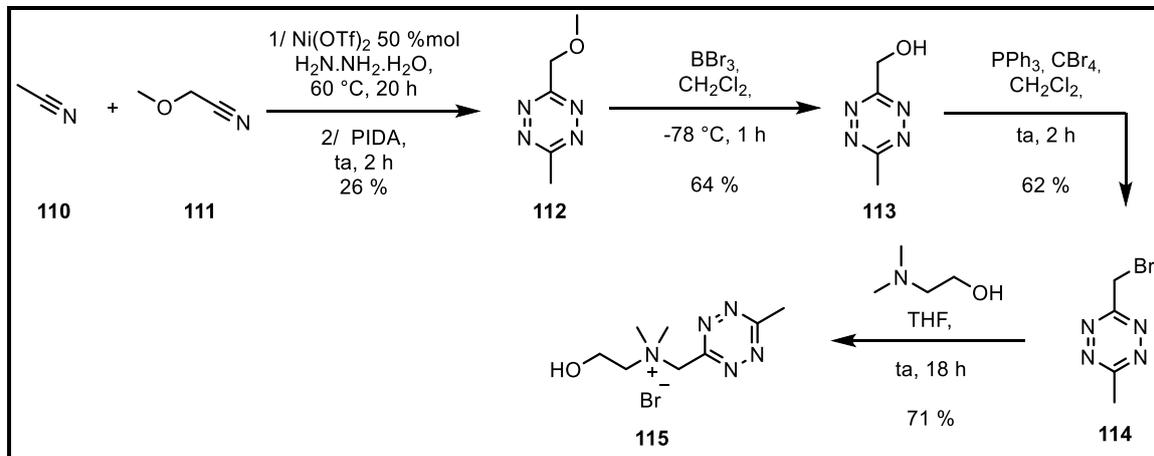


Schéma 10 : Synthèse de la tétrazine-choline **115**

## 1.2. Cholines fluorogéniques et fluorescentes

La choline **117** est synthétisée par substitution nucléophile du chlore du 1-(chlorométhyl)-4-vinylbenzène **116** par l'amine tertiaire du diméthylaminoéthanol avec un rendement de 72 %. Ensuite, la réaction click entre le composé **117** et la tétrazine **29** est réalisée dans le dichlorométhane pour former le composé **118** avec un rendement de 17 % (Schéma 11).

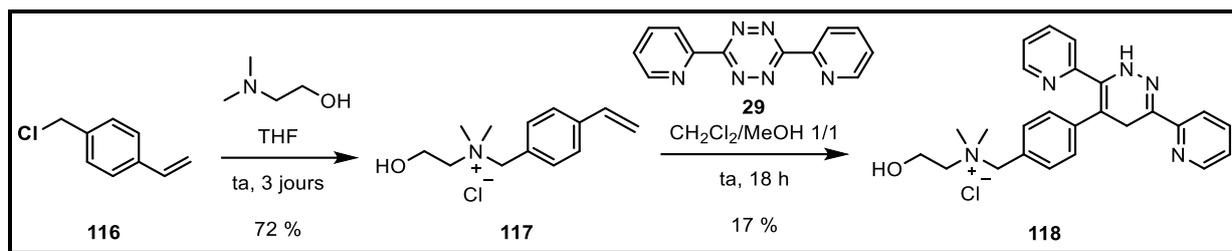


Schéma 11 : Synthèse des cholines **117** et **118**

Le Schéma 12 représente la voie de synthèse utilisée pour obtenir le composé **125**. Tout d'abord, la coumarine **120** est formée par réaction de Perkin en partant du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **119** et de la glycine en présence d'acétate de sodium, puis la 3-azido-7-hydroxycoumarine **121** est obtenue par addition successive d'HCl pour l'hydrolyse de l'ester et de l'amide, de nitrite de sodium pour former le groupement nitro et d'azoture de sodium pour former l'azoture. Wang *et al.* décrivent cette synthèse en one-pot,<sup>134</sup> sans isoler la coumarine **120**, et avec un rendement de 51 %. Cependant, il ne nous a jamais été possible de reproduire ce rendement, le maximum obtenu étant 13 %. En revanche, en isolant et purifiant le composé **120**, un rendement global de 25 % a pu être obtenu : 31 % pour la première étape puis 81 %.

Ensuite, nous souhaitons au départ former la choline **123**, possédant deux carbones entre l'ammonium quaternaire et la coumarine. Pour cela, du 1,2-dibromoéthane a été ajouté à la coumarine **121** dans le but de former la coumarine bromée **122**. Cependant, le composé n'a jamais pu être obtenu dans les différentes conditions testées : modification de la base ( $K_2CO_3$ ,  $Et_3N$ , TBAB), dans plusieurs solvants (acétone, acétonitrile ou DMF) et à différentes températures (de température ambiante jusqu'au reflux du solvant). Dans les conditions les plus douces, aucune réaction n'était observée, alors que les conditions moins douces menaient exclusivement à de la dégradation, formant notamment le produit d'élimination du brome du composé **122**, favorisé par l'effet mésomère donneur dû à l'oxygène à proximité.

Ainsi, la modification du 1,2-dibromoéthane par le 1,3-dibromopropane, a permis de limiter cette réaction d'élimination et d'obtenir une coumarine avec une chaîne bromée, le composé **124**, en présence de  $K_2CO_3$ , avec un rendement de 23 %. Pour finir, la choline **125** a été synthétisée par substitution du brome par le diméthylaminoéthanol avec un rendement de 49 %.

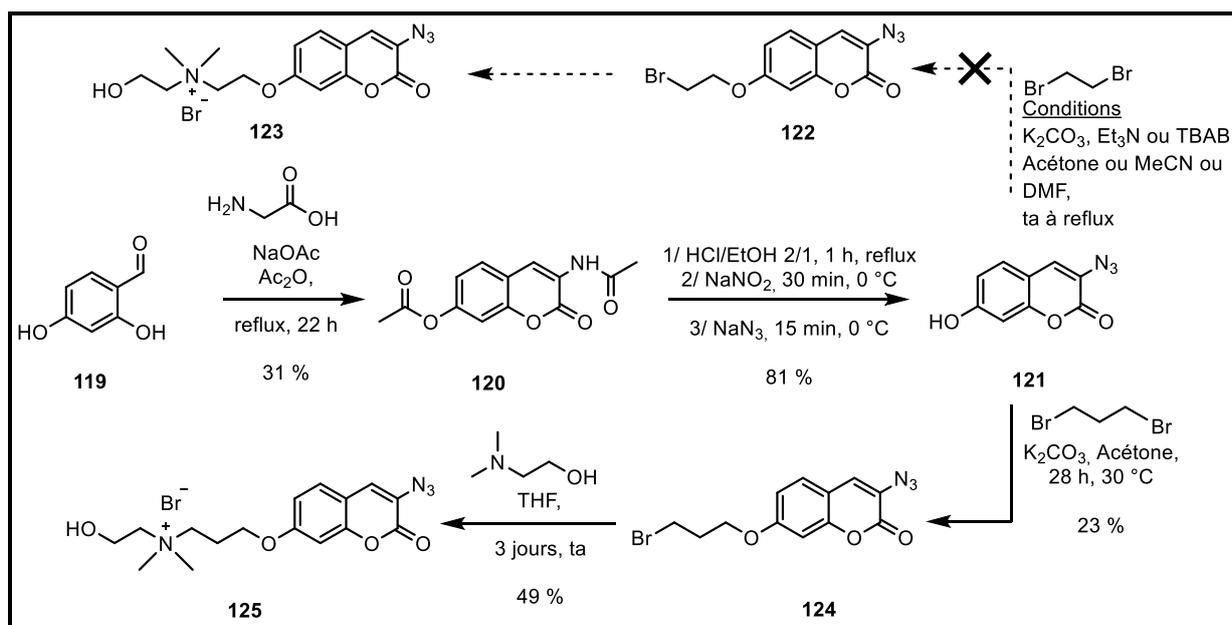


Schéma 12 : Synthèse de la choline-coumarine **125**

Pour finir, les coumarines **128** et **129** sont obtenues par la même voie de synthèse, qui est décrite dans le Schéma 13. En premier lieu, l'AlkCho **76** est synthétisée à partir de bromure de propargyle et de diméthylaminoéthanol avec un rendement de 39 %. Ensuite, les composés **128** et **129** sont formés par réaction click CuAAC, à partir de deux fluorophores, respectivement l'azido-coumarine **126** et l'azido-NBD **127**. Cette réaction est catalysée par CuI supporté sur une résine échangeuse d'ions, Amberlyst-A21 et des rendements de 89 % et 39 % ont été obtenus respectivement pour les composés **128** et **129**.

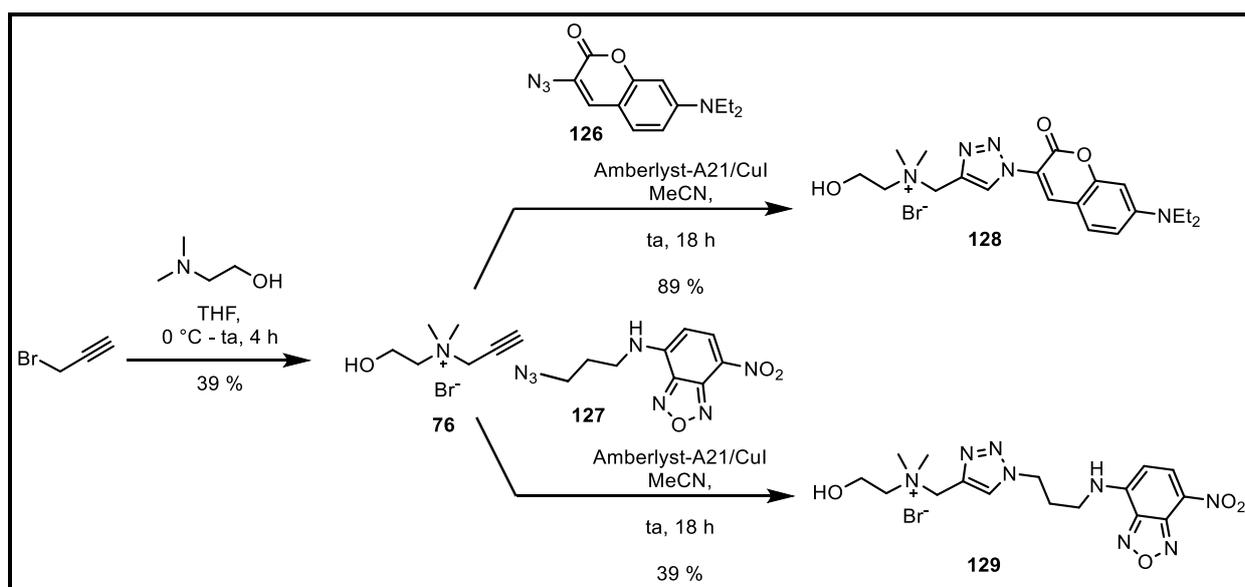


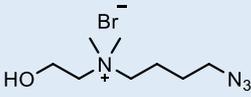
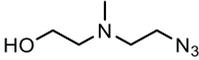
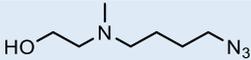
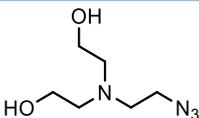
Schéma 13 : Synthèse de la choline-coumarine **128** et de la choline-NBD **129**

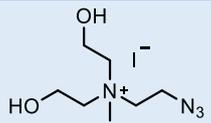
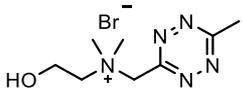
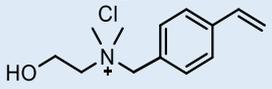
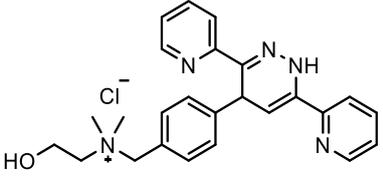
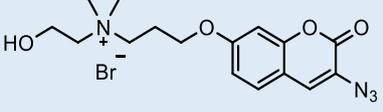
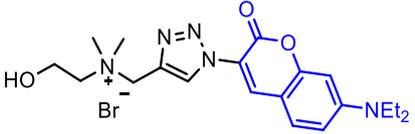
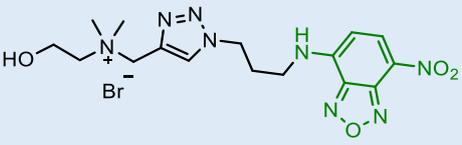
## II. Métabolisation des nouvelles cholines par *S. pneumoniae*

La métabolisation par les AT de *S. pneumoniae* de ces nouvelles cholines a été évaluée par nos collaborateurs de l'IBS. Pour toutes les azido-cholines ainsi que pour la tétrazine-choline **115**, la coumarine-choline **125** et les cholines fluorescentes **128** et **129**, le marquage fluorescent des AT a été effectué. Ainsi, l'observation d'un marquage au niveau du septum des bactéries permet de prouver la métabolisation des dérivés de cholines testés sur un temps court, de l'ordre de quelques minutes. Dans le cas des azido-cholines, un protocole de marquage en deux étapes avec réaction click SPAAC avec le fluorophore DBCO-AF488 (Alexa Fluor 488) a été suivi et dans le cas de la tétrazine-choline **115**, le marquage en deux étapes avec réaction click IEDDA a été effectué avec le fluorophore TCO-CF647 (Clear Fluor 647), les fluorophores de type AlexaFluor couplés à un TCO n'étant pas commercialement disponibles. En revanche, dans le cas des cholines fluorescentes **128** et **129**, un protocole de marquage direct a été suivi.

Par ailleurs, pour chaque choline modifiée, des expériences de croissance de *S. pneumoniae*, sur plusieurs heures, ont également été effectuées dans des conditions où la choline naturelle est absente du milieu et remplacée par la choline modifiée. Ces expériences de croissance permettent, quant à elles, de prouver la capacité, ou non, des cholines modifiées à être considérée comme de la choline naturelle, non seulement au cours de la métabolisation de cette dernière, mais également par la suite, lors de la croissance et la division des bactéries. Les résultats de ces tests de marquage fluorescent et de croissance sont décrits dans le [Tableau 2](#).

Tableau 2 : Résultats des tests de marquage fluorescent des AT et de croissance de *S. pneumoniae* pour les nouvelles cholines modifiées ; n.d. = pas de marquage fluorescent effectué ; \* voir Figure 38 ; \*\* voir Figure 39

Composé	Structure	Marquage fluorescent des AT *	Croissance de <i>S. pneumoniae</i> **
<b>101</b>		Oui	Oui
<b>105</b>		Oui	Oui
<b>107</b>		Oui	Non
<b>108</b>		Oui (Faible)	Non

<b>109</b>		Non	Non
<b>115</b>		Oui	Non
<b>117</b>		n.d.	Non
<b>118</b>		n.d.	Non
<b>125</b>		Très faible	Non
<b>128</b>		Non	Non
<b>129</b>		Non	Non

## II.1. Marquage fluorescent des AT

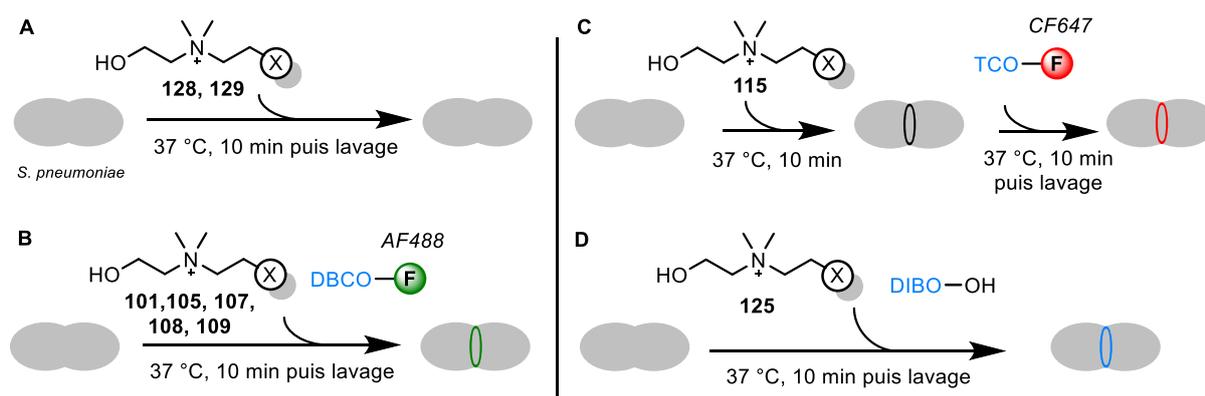


Figure 37 : Protocoles mis en œuvre pour le marquage des AT avec les différentes cholines. A – Protocole de marquage avec les cholines fluorescentes 128 et 129 / B – Protocole de marquage avec les azido-cholines 101, 105, 107, 108 et 109 / C – Protocole de marquage avec la tétrazine-choline 115 / D – Protocole de marquage avec la coumarine-choline 125

Les différents protocoles de marquage mis en œuvre pour les marquages des AT avec les nouvelles cholines sont représentés en Figure 37. Premièrement, les expériences de marquage direct,

effectuées avec les cholines **128** et **129** selon le protocole illustré sur la [Figure 37A](#), n'ont pas permis d'obtenir de marquage au septum, lieu de la biosynthèse des AT. Des concentrations en choline fluorescente de 25  $\mu\text{M}$  à 300  $\mu\text{M}$  ont été testées pour chacune de ces cholines. La taille et l'encombrement stérique induit par la présence des fluorophores expliquent que le marquage n'a pas pu être obtenu. Ces cholines ne sont pas métabolisées par les AT, probablement car elles ne sont pas reconnues par le transporteur membranaire LicB, et ne sont donc pas capables de traverser la membrane plasmique pour rentrer dans le cytoplasme.

Ensuite, le marquage fluorescent des AT a fonctionné pour toutes les azido-cholines testées, selon le protocole décrit en [Figure 37B](#), mis à part pour la diéthanol-choline **109**. En revanche, il est plus ou moins efficace, et notamment, le marquage obtenu avec la choline **108** est d'intensité bien plus faible. Les images en microscopie à fluorescence obtenues sont représentées en [Figure 38A](#).

Ensuite, le marquage obtenu avec la tétrazine-choline **115**, selon le protocole décrit en [Figure 37C](#), est très intense, comme on peut le voir sur la [Figure 38B](#). Alors que pour les autres cholines, le marquage est effectué en « one-pot » avec l'ajout simultané de la choline modifiée et du fluorophore, dans le cas de la tétrazine-choline **115**, ce marquage ne fonctionne pas avec cette stratégie et il doit être effectué en ajoutant d'abord la tétrazine-choline, puis, le fluorophore, qui est ajouté après métabolisation de la choline. La réaction click IEDDA étant très rapide, il semble qu'elle se fasse avant la métabolisation de la choline et que le conjugué choline-fluorophore formé soit trop encombrant pour être métabolisé. Il est également important de noter que les intensités de marquage ne permettent pas de comparer la métabolisation par les AT des différentes azido-cholines et de la tétrazine-choline **115**, car une réaction click différente a été mise en œuvre et un fluorophore différent a été utilisé : dans le cas des azido-cholines, le fluorophore est DBCO-AF488 et pour la tétrazine-choline, il s'agit du TCO-CF647.

Enfin, le marquage avec la coumarine-choline **125** est effectué en utilisant la propriété fluorogénique des azido-coumarines, qui sera abordée plus en détail dans la partie [Coumarines](#) du [Chapitre V](#) : d'abord, le composé **125**, non-fluorescent, est incubé pendant 10 minutes sur les bactéries, puis, la réaction click est effectuée pendant 10 minutes avec le DIBO-OH **130** (représenté par la suite, sur le [Schéma 14](#)). Après réaction click, la coumarine doit devenir fluorescente. L'image de marquage obtenue avec ce composé est montrée sur la [Figure 38C](#) : il est possible d'observer un très faible marquage au septum des bactéries. Cependant, pour obtenir cette image, les paramètres de fluorescence ont été poussés au maximum et l'image est de très faible qualité. Nous ne pouvons donc pas affirmer que le composé **125** est métabolisé de manière efficace sur les AT.

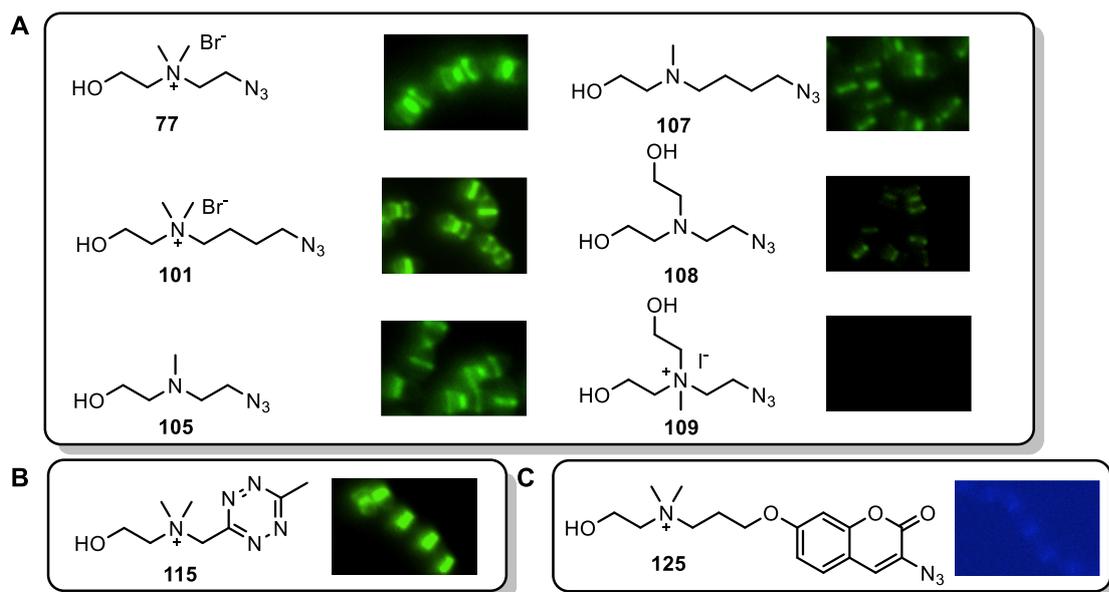


Figure 38 : Images de marquage des AT en microscopie à fluorescence en utilisant : A – Les nouvelles azido-cholines développées / B – La tétrazine-choline **115** / C – La coumarine-choline **125**

## II.2. Croissance de *S. pneumoniae* en présence des cholines modifiées

Par ailleurs, des expériences de croissance de *S. pneumoniae* ont également été effectuées en remplaçant la choline naturelle par la choline modifiée. Alors que les expériences de marquage nous prouvent la métabolisation (ou non) des cholines modifiées sur un temps court, le but des expériences de croissance est d'étudier le comportement des bactéries à long terme en présence des cholines modifiées : si ces dernières sont capables de remplacer la choline naturelle et d'en assurer les mêmes fonctions, les bactéries poussent normalement. En revanche, si la choline modifiée n'est pas capable de remplacer la choline normale pour toutes ces fonctions cellulaires, les bactéries ne peuvent pas croître et se diviser. Elles finissent donc par mourir.

Parmi toutes les cholines modifiées nouvellement synthétisées, seules l'azido-choline chargée **101** et l'azido-choline non chargée **105** ont permis la croissance de *S. pneumoniae*, avec un profil de croissance similaire à celui observé avec la choline normale. Les courbes de croissance de bactéries obtenues avec ces deux dérivés, avec l'AzCho **77** et avec la choline naturelle à une concentration de 250  $\mu\text{M}$  sont représentées en Figure 39. En ordonnée est représentée l'absorbance, mesurée à une longueur d'onde de 600 nm, permettant de quantifier la concentration en bactéries présentes dans le milieu. Les courbes sont tracées en fonction du temps d'incubation à 37 °C, en heures. La courbe de croissance des bactéries en présence du composé **108** est également représentée sur cette figure.

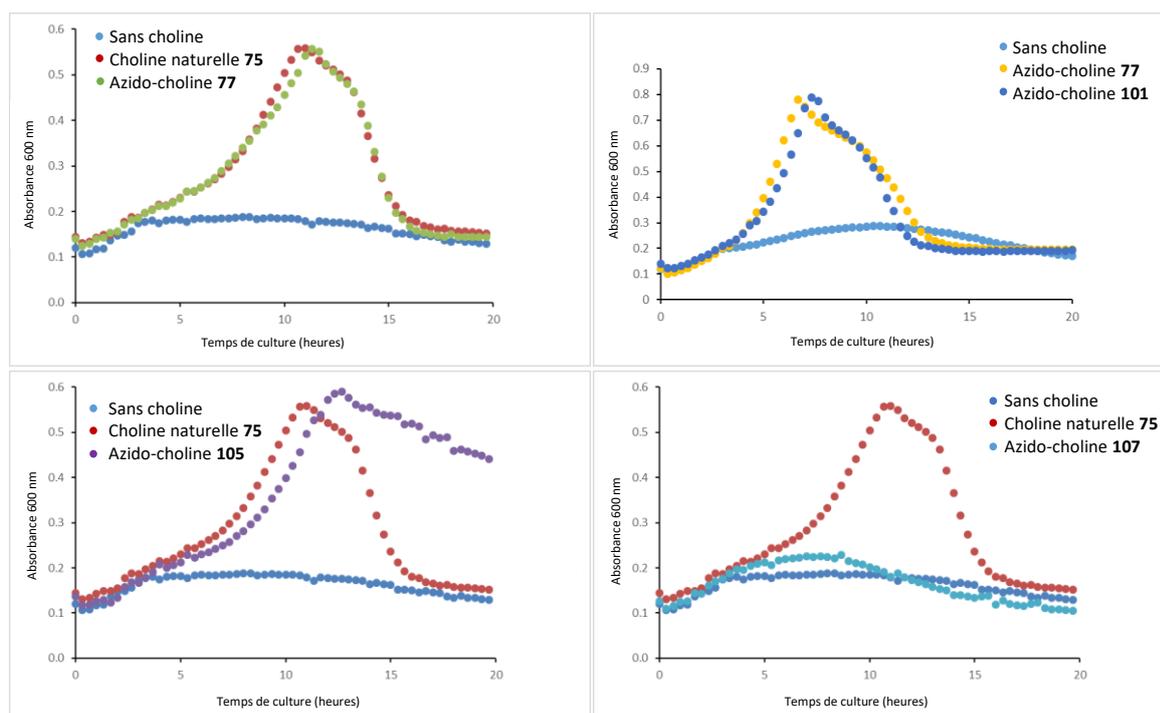


Figure 39 : Courbes de croissance de *S. pneumoniae* en présence de différentes cholines. L'absorbance à 600 nm est représentée en ordonnée, en fonction du temps, représenté en abscisse.

Lorsque la choline modifiée remplace efficacement la choline naturelle et que les bactéries poussent normalement, la courbe de croissance suit la progression suivante : pendant un temps de latence, plus ou moins long, la croissance est lente car les bactéries s'adaptent à leur milieu. Puis, lors de la phase exponentielle, les bactéries suivent une croissance exponentielle où la concentration en bactéries augmente très fortement. Par la suite, une phase linéaire est suivie, pendant laquelle il y a autant de bactéries qui meurent que de bactéries qui se divisent. Enfin, quand l'apport en nutriment devient limitant, un phénomène d'autolyse débute et conduit à une diminution de la concentration en bactéries vivantes dans le milieu, et donc à une diminution de l'absorbance. Les courbes de croissance dessinées en Figure 39 indiquent que la croissance des bactéries est similaire en présence de la choline naturelle **75** et des cholines **101** et **105**. Ces deux composés remplacent donc la choline naturelle de façon efficace et sur un temps de croissance de plusieurs heures.

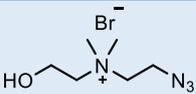
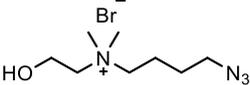
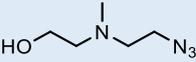
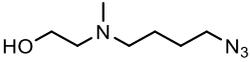
En revanche, dans le cas de la choline **108**, la concentration en bactéries n'augmente pas de façon exponentielle, signe que cette choline modifiée est incapable de remplacer la choline naturelle. Pour toutes les autres cholines testées, la courbe de croissance est similaire à celle du dérivé de choline **108**, ces cholines sont donc également incapables de remplacer efficacement la choline naturelle.

### II.3. Compétition entre la choline naturelle et les azido-cholines

Afin d'envisager par la suite d'utiliser ces nouveaux dérivés de cholines dans des systèmes plus complexes, voire *in vivo*, où la choline naturelle est présente, nous avons souhaité déterminer dans quelle mesure les azido-cholines développées peuvent être utilisées en compétition avec la choline naturelle.

La compétition entre la choline naturelle et chaque azido-choline a été évaluée par marquage fluorescent et analyse en cytométrie en flux. Les bactéries ont été incubées dans deux conditions différentes : en présence de l'azido-choline seule (250  $\mu\text{M}$ ) et en présence de l'azido-choline (250  $\mu\text{M}$ ) et de choline naturelle (31  $\mu\text{M}$ , concentration de choline présente dans le milieu de culture des bactéries *in vitro*). La diminution de la fluorescence entre ces deux conditions indique la proportion de choline naturelle qui remplace l'azido-choline sur les AT. Une diminution de la fluorescence élevée indique que l'azido-choline n'est pas assez compétitive pour se substituer à la choline naturelle sur les AT de *S. pneumoniae*. Au contraire, une diminution de la fluorescence faible ou modérée indique que l'azido-choline peut être métabolisée par la bactérie même en présence de choline naturelle. L'expérience a d'abord été effectuée dans des conditions où la concentration en choline naturelle et en choline modifiée est identique et est égale à 250  $\mu\text{M}$ . Dans ces conditions, il n'y a plus aucun marquage fluorescent des AT : seule la choline naturelle **75** est métabolisée par les AT. C'est pourquoi, les résultats présentés ici sont issus d'expériences où la concentration est supérieure en choline modifiée (250  $\mu\text{M}$ ) par rapport à la choline naturelle (31  $\mu\text{M}$ ), afin de pouvoir classer les cholines modifiées les mieux métabolisées.

Tableau 3 : Pourcentages de diminution de la fluorescence obtenus lors de l'expérience de compétition entre la choline naturelle **75** (31  $\mu\text{M}$ ) et les azido-cholines **77**, **101**, **105** et **107** (250  $\mu\text{M}$ ) en comparaison de l'intensité de fluorescence obtenue en condition de non-compétition (azido-choline, 250  $\mu\text{M}$ ).

Composé	Structure	Diminution de la fluorescence
<b>77</b>		51 %
<b>101</b>		59 %
<b>105</b>		88 %
<b>107</b>		91 %

Le Tableau 3 ci-dessus indique les pourcentages de diminution de la fluorescence pour chacune des azido-cholines **77**, **101**, **105** et **107** en compétition avec la choline naturelle **75**. Pour déterminer

ces valeurs, l'intensité de la fluorescence a d'abord été mesurée par cytométrie en flux en condition de non-compétition, quand seul l'azido-choline est présente. Il a été considéré que cette mesure correspond à une fluorescence de 100 %. L'intensité de la fluorescence a également été mesurée en conditions de compétition et elle a été comparée à la mesure effectuée sans compétition. La diminution de la fluorescence entre la condition de non-compétition et la condition de compétition permet d'obtenir le pourcentage indiqué dans le [Tableau 3](#).

Ainsi, les cholines non chargées **105** et **107** rentrent difficilement en compétition dans ces conditions avec la choline naturelle car la diminution de fluorescence est de 88 % et 91 % respectivement. En revanche, dans le cas des cholines chargées **77** et **101**, la compétition entre la choline naturelle et la choline modifiée est présente puisque la diminution de la fluorescence n'est pas totale (baisse de 51 % et 59 % respectivement).

#### [II.4. Conclusion](#)

Pour conclure, toutes ces expériences de marquages et de croissances ont permis de mettre en évidence que les AT ne sont pas très tolérants pour la métabolisation de dérivés non naturels de cholines. Parmi les expériences de marquage effectuées, seules les cholines de petite taille, les azido-cholines ainsi que la tétrazine-choline **115**, ont pu être métabolisées par les AT.

En considérant les marquages décrits sur la [Figure 38](#), les expériences de croissance de *S. pneumoniae* en présence des dérivés présentées en [Figure 39](#) ainsi que les résultats de compétition entre la choline naturelle et les dérivés de choline présentés dans le [Tableau 3](#), les azido-cholines chargées **77** et **101** apparaissent comme les plus prometteuses tant pour des applications de marquage que pour des applications thérapeutiques.

Par ailleurs, la tétrazine-choline **115** présente un marquage intense. Cette choline modifiée semble également prometteuse et ce composé est actuellement encore en cours d'évaluation par nos collaborateurs de l'IBS. De par sa fonction chimique différente, permettant de réaliser la réaction click IEDDA, ce composé est intéressant dans le but de combiner plusieurs réactions clicks simultanées dans la paroi des bactéries. Cependant, ce composé est toxique à long terme pour la bactérie, comme l'a montré l'expérience de croissance de *S. pneumoniae* avec ce composé.

## Chapitre III

Synthèse de D-Ala et D-Ala-D-Ala  
modifiées et évaluation de leur  
métabolisation par le PG



## I. Développement de nouvelles D-Ala modifiées

---

Avant ce projet, les dérivés de D-Ala utilisés dans nos équipes pour le marquage en deux étapes étaient l'AlkDA **58** et l'AzDA **59**. Cependant, la réaction click pour obtenir le marquage avec l'AlkDA **58** est la CuAAC et nécessite donc du cuivre. Elle n'est pas idéale pour les applications que l'on vise puisqu'elle n'est pas compatible avec les cellules vivantes. De plus, il est à noter que l'AzDA **59** possède un azoture, tout comme l'AzCho **77**, qui permet déjà de développer des approches de marquage sans cuivre des AT.

Dans le but de développer des applications nécessitant la métabolisation simultanée de dérivés sur les AT et sur le PG avec des fonctions clickables sans cuivre et orthogonales entre elles en réactivité, il faut donc développer de nouveaux dérivés. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les AT étaient peu tolérants pour la métabolisation de cholines modifiées et seules les cholines possédant un azoture, un alcyne ou une tétrazine peuvent être utilisées.

Ainsi, dans cette partie, nous allons chercher à développer des nouveaux dérivés de D-Ala incorporés sur le PG et permettant une réaction bioorthogonale, différente de celle avec l'azoture. Cela permet de concevoir des applications qui mêlent la métabolisation simultanée de dérivés d'AT et de PG avec des groupements clicks distincts, permettant des réactions bioorthogonales distinctes.

Nous nous sommes d'abord concentrés sur la synthèse de composés avec des cyclooctynes qui réagissent par réaction SPAAC. En 2014, Bertozzi *et al.* ont développé le composé BCN-DA **60**<sup>78</sup> pour lequel des images de marquage obtenues sont montrées dans la partie [III.4.2.2. Marquage en 2 étapes : AlkDA et AzDA, BCN-DA, NBDAC et TetDAC du Chapitre I](#). Cependant le marquage du PG d'*E. coli* obtenu ne paraît pas très visible avec ce composé. De plus, comme évoqué précédemment, le BCN n'est pas parfaitement orthogonal avec toutes les réactions clicks, avec une réactivité à la fois avec l'azoture et avec la tétrazine. Nous avons donc sélectionné d'autres cyclooctynes pour concevoir nos nouvelles D-Ala, le DIBO et le DBCO. Par ailleurs, nous avons développé deux autres dérivés possédant une tétrazine et un TCO afin de pouvoir les utiliser avec la réaction IEDDA.

### I.1. Synthèse des DIBO-DA, BCN-DA et DBCO-DA

Tout d'abord, la voie de synthèse pour le DIBO-DA est décrite en [Schéma 14](#) et le composé est synthétisé en 3 étapes à partir du DIBO **130**, réactif commercial. Afin d'explorer si l'efficacité de l'incorporation et/ou la qualité du marquage du PG est dépendant de la distance entre la cyclooctyne et le peptide, deux composés DIBO-DA, de longueurs différentes ont été synthétisés, les DIBO-DA **137** et **138**.

La première étape est l'activation du DIBO **130** par réaction du chloroformiate de *p*-nitrophényle **131** en milieu basique pour former le composé **132**, avec un rendement de 72 %. Puis, le DIBO activé **132** réagit par addition-élimination sur l'acide aminé protégé, soit l'acide  $\alpha$ -Boc-D-2,3-diaminopropionique **133**, soit la  $\alpha$ -Boc-D-lysine **134** avec des rendements respectifs de 91 % et 78 %. Enfin, une déprotection en milieu acide des composés DIBO-DA protégés avec HCl 4 M en solution dans le dioxane, permet l'obtention des composés DIBO-DA finaux **137** et **138** avec des rendements respectifs de 84 % et 69 %.

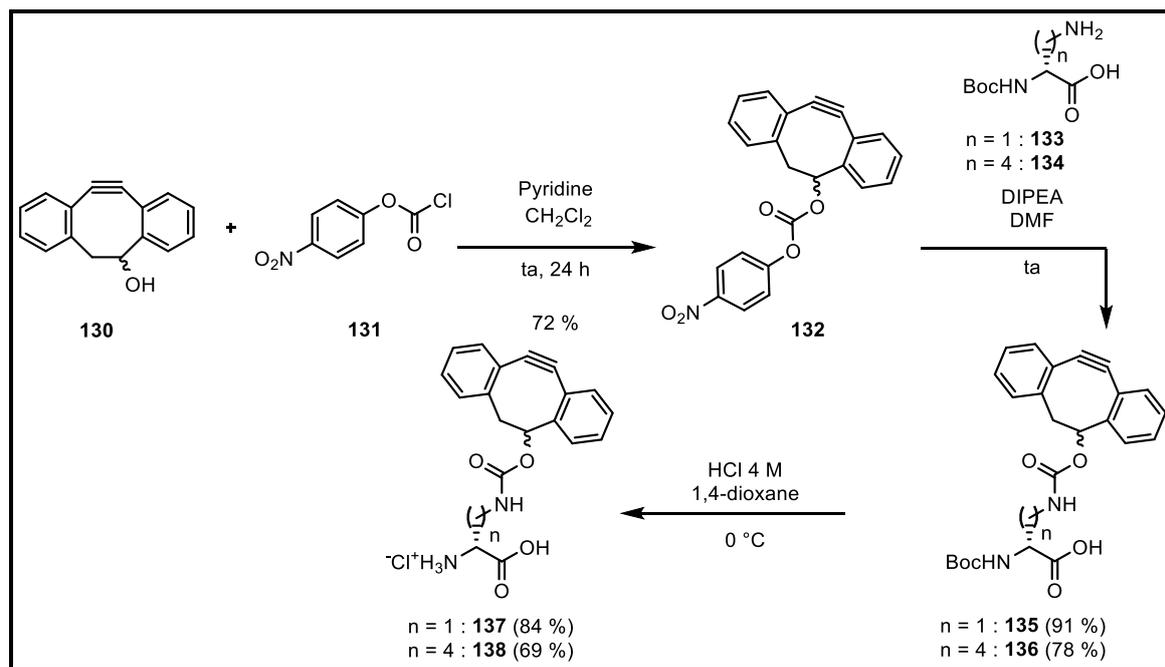


Schéma 14 : Voie de synthèse des DIBO-DA **137** et **138**

Par ailleurs, plusieurs voies de synthèse ont dû être testées afin d'aboutir à un composé DBCO-DA. Premièrement, la voie de synthèse 1, conçue pour synthétiser le DBCO-DA **145** est représentée sur le Schéma 15. La stratégie utilisée est similaire à la stratégie de synthèse du DIBO-DA. Cependant, contrairement au DIBO **130** qui possède un alcool, le DBCO **143** possède une amine primaire libre et donc, le carbamate du composé final est inversé. Il faut ainsi activer un alcool situé sur la chaîne latérale de l'acide aminé.

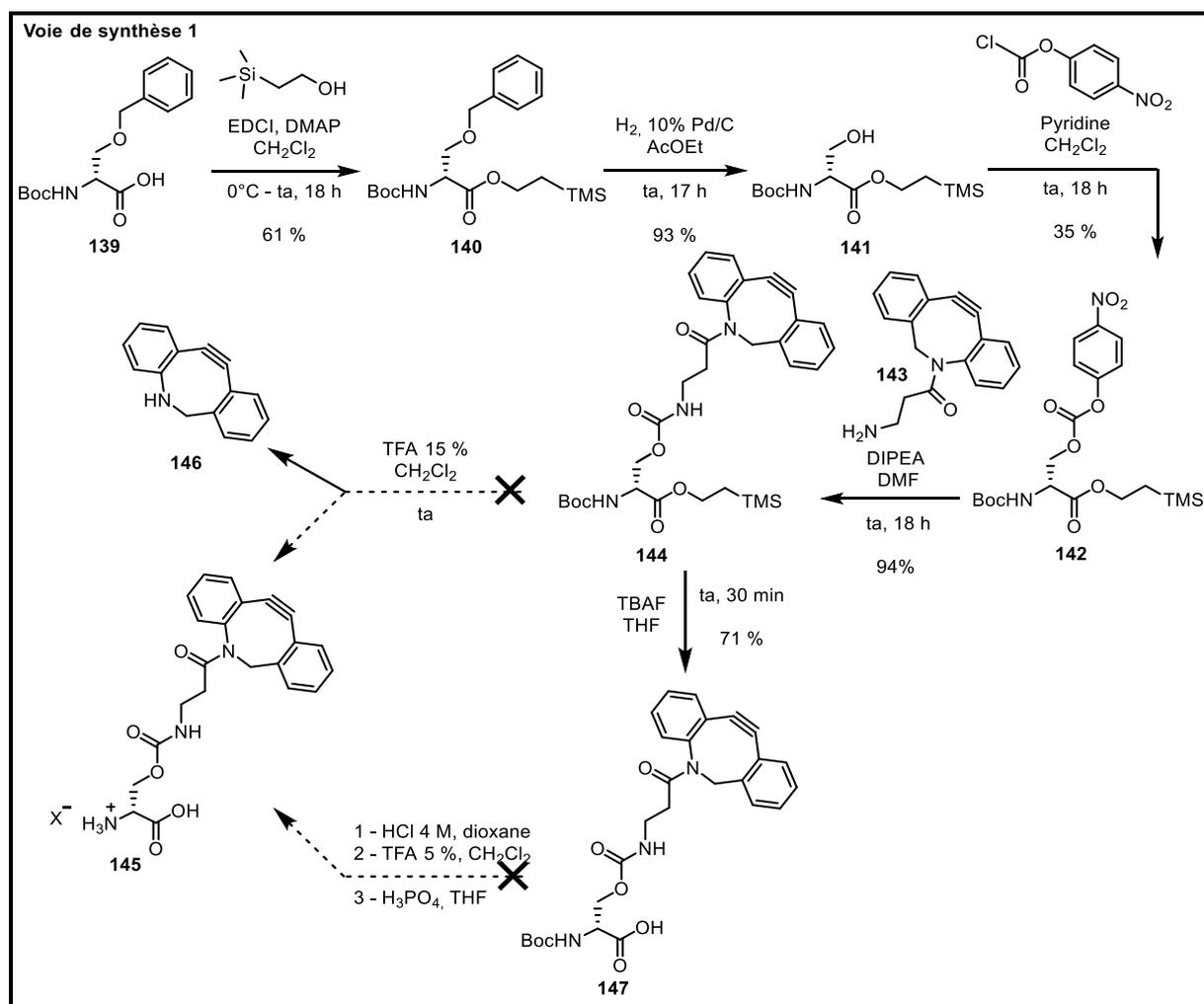


Schéma 15 : Voie de synthèse 1 mise en place pour la synthèse du DBCO-DA

La première étape de cette voie de synthèse est la protection de l'acide carboxylique, nécessaire pour éviter qu'il réagisse lors de l'étape d'activation de l'alcool de la chaîne latérale. Cette protection est effectuée sur l'acide aminé **139**, dont l'alcool de la chaîne latérale est protégé par un groupement benzyle. Le groupement protecteur triméthylsilyl éthanol (TMSE-OH) est ainsi ajouté par estérification de Steglich pour former le composé **140** avec un rendement de 61 %. La déprotection de l'alcool de la chaîne latérale est ensuite effectuée par hydrogénation catalytique pour former le composé **141** avec un rendement de 93 %. L'alcool de la chaîne latérale est ensuite activé par réaction avec du chloroformate de *p*-nitrophényle en milieu basique pour former le composé **142** avec un rendement de 35 %. Ce composé réagit ensuite par addition-élimination avec le DBCO-NH<sub>2</sub> **143** en milieu basique et forme le composé DBCO-DA protégé **144** avec un rendement de 94 %. Une déprotection de l'amine et de l'acide carboxylique en milieu acide a ensuite été tentée à l'aide de TFA concentré à 15 % dans le dichlorométhane. Cette double déprotection fonctionne normalement correctement pour retirer ces deux groupements protecteurs, mais, ici, le composé s'est dégradé au niveau de l'amide reliant le DBCO au reste de la chaîne latérale. En effet, le produit de dégradation **146**,

apolaire et fortement visible sous UV, a été isolé. Il a par la suite été tenté la déprotection de l'acide aminé en deux étapes : d'abord l'acide carboxylique est déprotégé par action du TBAF et le composé **147** est obtenu avec un rendement de 71 %. Ensuite, plusieurs conditions plus douces de déprotection de l'amine ont été testées : HCl 4 M dans le dioxane, TFA peu concentré (5 %) et H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Malheureusement, tous ses essais ont échoué et ont mené à la formation du produit de dégradation **146**.

Simultanément à ces tentatives de synthèse de DBCO-DA, Pires *et al.* ont publié une synthèse d'un autre DBCO-DA, dont la structure finale est le composé **151**.<sup>100</sup> Dans cette publication, Pires utilise une voie de synthèse sur support solide. Nous nous sommes inspirés de leur stratégie de synthèse, au départ du composé **148** pour concevoir la voie de synthèse 2, représentée sur le Schéma 16.

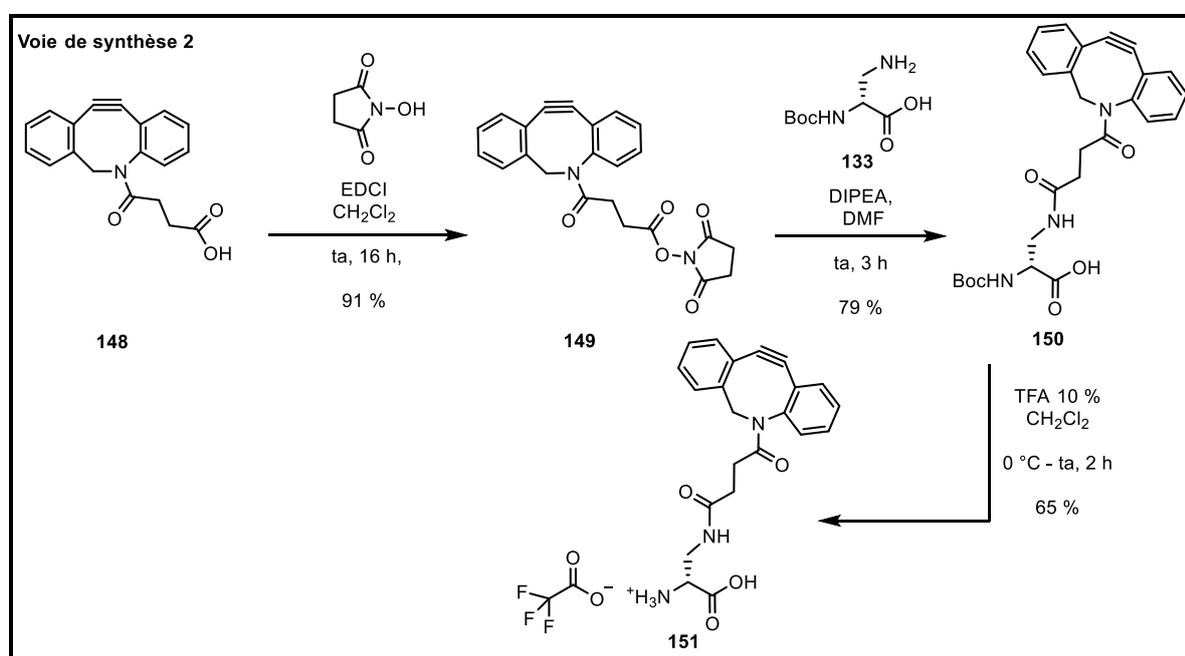


Schéma 16 : Voie de synthèse 2 pour la synthèse du DBCO-DA

Le composé DBCO-DA **151** a donc été synthétisé en 3 étapes à partir du DBCO de départ **148**. L'acide carboxylique de ce composé est tout d'abord activé par le groupement *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) pour former le composé **149** avec un rendement de 91 %. Puis, le groupement DBCO est couplé sur l'acide aminé protégé **133**, avec de la DIPEA pour former le composé **150** avec un rendement de 65 %. Enfin, la déprotection de l'amine protégée par le *tert*-butoxycarbonyle (Boc) a lieu en présence de 10 % de TFA. Cette déprotection doit être réalisée avec précautions et suivie par CCM pour limiter la formation du produit de dégradation **146**. Un rendement de 65 % a été obtenu pour la formation du composé **151**.

Une hypothèse pour expliquer que le composé **151** a pu être obtenu alors que le composé **145** n'a jamais pu être isolé serait que les effets électroniques dus à la présence du carbamate sur le composé **145** rendent l'amide reliant le DBCO au reste de la chaîne latérale, trop fragile et trop instable. Le remplacement de ce carbamate par l'amide sur le composé **151** permet sans doute de moins fragiliser l'amide instable et permet d'obtenir le composé désiré.

Pour finir, afin de comparer les marquages obtenus avec nos nouveaux composés par rapport aux marquages obtenus avec le BCN-DA, ce dernier composé a également été synthétisé par la voie de synthèse décrite par Bertozzi *et al.*<sup>78</sup> La synthèse, en 2 étapes au départ du composé **152** est décrite sur le Schéma 17. Il est connu que le BCN se dégrade en conditions acides,<sup>135</sup> une protection de l'amine par un groupement Boc n'est donc pas envisageable et un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) est utilisé à la place. Dans la première étape, le composé **152**, BCN activé par NHS, est conjugué à l'acide aminé Fmoc-protégé **153** avec un rendement de 82 %. La deuxième étape de déprotection est effectuée grâce à une résine de pipérazine et fournit le BCN-DA **155** avec un rendement de 35 %.

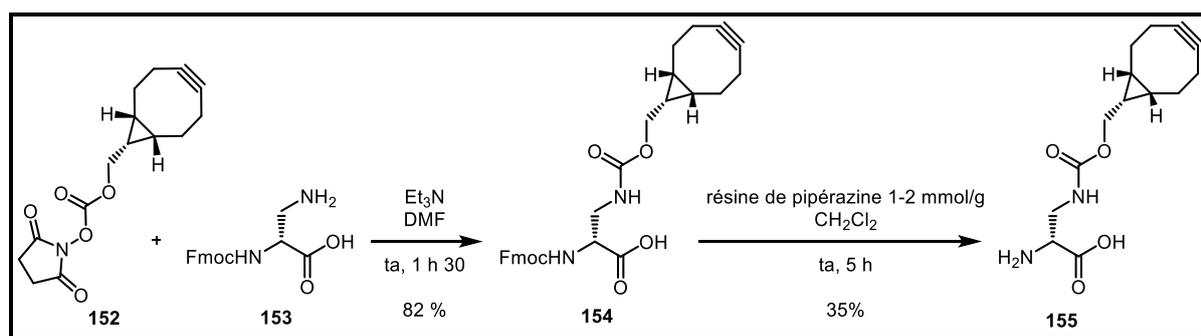


Schéma 17 : Synthèse du BCN-DA **155**

### 1.2. Synthèse des tétrazine-DA et TCO-DA

Par ailleurs, en plus de ces dérivés de D-Ala sous forme de D-Ala-cyclooctynes, deux autres dérivés ont été synthétisés : la tétrazine-DA **158** et le TCO-DA **161**. Ces dérivés permettraient un marquage du PG en utilisant la réaction click IEDDA, soit avec un fluorophore possédant une fonction TCO (pour réagir avec la tétrazine-DA), soit avec un fluorophore possédant une tétrazine (pour réagir avec le TCO-DA). Posséder des dérivés capables de marquer le PG ou les AT avec deux réactions bioorthogonales différentes offre différentes opportunités pour mettre en place des métabolisations simultanées de dérivés sur des entités différentes.

Premièrement, le composé tétrazine-DA est synthétisé selon la voie de synthèse représentée sur le Schéma 18. Cette voie de synthèse est identique à celle utilisée pour la synthèse des DIBO-DA (Schéma 14) : l'alcool de la tétrazine **113** est activé par le chloroformiate de *p*-nitrophényle **131** en milieu basique pour former le composé **156** avec un rendement de 89 %. Ensuite la tétrazine est

conjuguée à l'acide  $N\alpha$ -Boc-D-2,3-diaminopropionique **133** par réaction d'addition-élimination pour former le composé **157** avec un rendement de 98 %. Enfin, la déprotection de l'amine de ce composé avec HCl permet d'obtenir la tétrazine-DA **158** avec un rendement de 84 %.

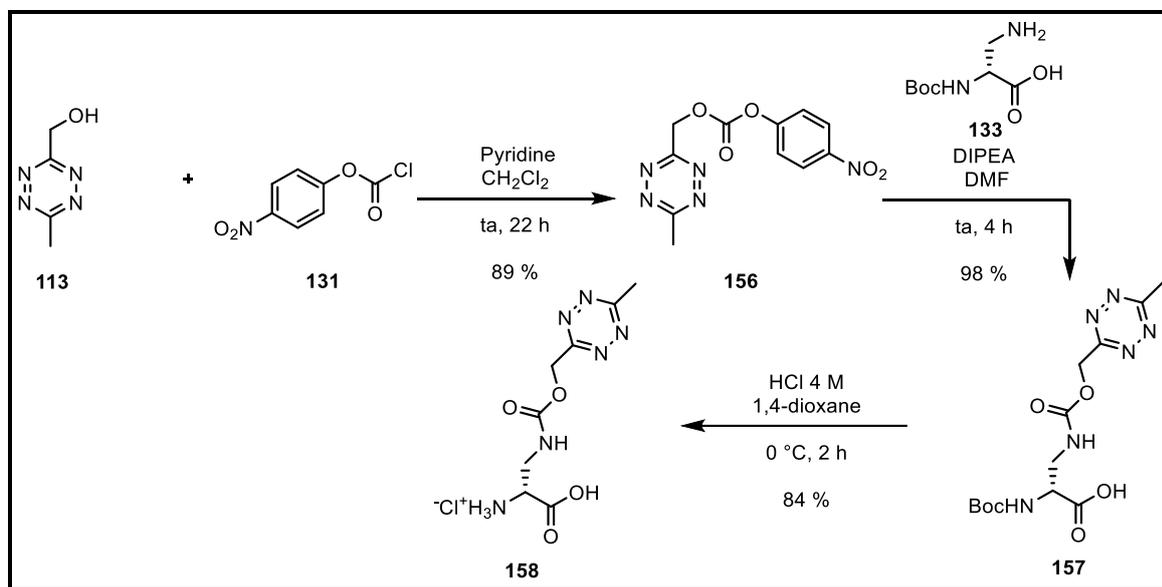


Schéma 18 : Synthèse de la tétrazine-DA **158**

Ensuite, le groupement TCO se dégradant en conditions acides,<sup>135</sup> le composé TCO-DA **161** est synthétisé selon une voie de synthèse similaire à celle utilisée pour le BCN-DA (voir Schéma 17). Cette synthèse est décrite sur le Schéma 19. Au lieu d'une activation à l'aide du groupement NHS, le TCO du composé de départ **159** est activé par le *p*-nitrophényl carbonate. Le TCO est ainsi couplé à l'acide  $N\alpha$ -Fmoc-D-2,3-diaminopropionique **153** pour former le composé **160** avec un rendement de 88 %. Enfin, la deuxième étape de déprotection est effectuée avec une résine de pipérazine et aboutit au TCO-DA **161** avec un rendement de 54 %.

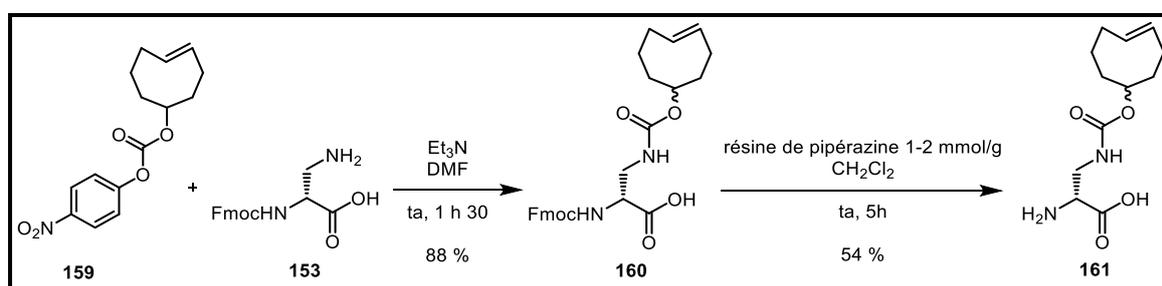


Schéma 19 : Synthèse du dérivé TCO-DA **161**

## II. Cinétiques des réactions bioorthogonales avec les cyclooctyne-D-Ala

Afin de comparer de façon pertinente les différentes cyclooctyne-DA synthétisées, les vitesses de la réaction SPAAC entre chacun de ces dérivés et le fluorophore Az-AF488 ont été déterminées dans les conditions les plus proches possibles des conditions retrouvées en milieu biologique, c'est-à-dire à 37 °C et à pH 7,4 dans un tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) (Figure 40). Ces données ont été déterminées par nos collaborateurs de l'IBS par la méthode décrite ci-dessous.

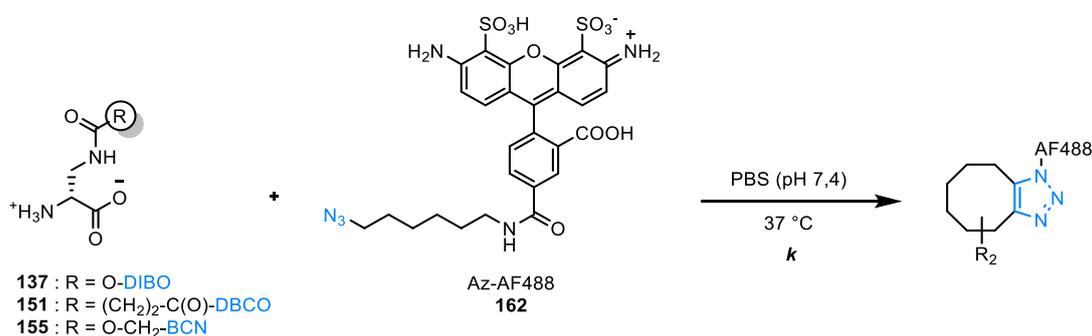


Figure 40 : Réactions SPAAC dont les constantes de vitesses  $k$  ont été calculées

### II.1. Expression des équations de réaction

La réaction SPAAC est une réaction dont la cinétique est d'ordre 2. L'équation de vitesse s'écrit donc :

Équation 1 : Expression de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en cyclooctyne-DA et en Az-AF488

$$v = k * [\text{cyclooctyne} - \text{DA}] * [\text{Az} - \text{AF488}] = - \frac{d[\text{cyclooctyne} - \text{DA}]}{dt} = - \frac{d[\text{Az} - \text{AF488}]}{dt}$$

Afin de déterminer la constante de vitesse  $k$ , la méthode de dégénérescence de l'ordre a été utilisée. Cette méthode consiste en l'introduction de l'un des réactifs en large excès par rapport à l'autre réactif, de telle sorte que l'on puisse considérer sa concentration comme constante au cours de la réaction, et donc, égale à la concentration de départ. Ici, dans chacun des cas, la cyclooctyne-DA a été placée en large excès et sa concentration peut être considérée comme constante. Nous avons donc :

Équation 2 : Expression de la vitesse de réaction avec la constante apparente  $k_{app}$

$$v = k_{app} * [\text{Az} - \text{AF488}] \text{ avec } k_{app} = k * [\text{cyclooctyne} - \text{DA}]$$

Le rassemblement des deux équations ci-dessus et l'intégration de la dérivée  $\frac{d[Az-AF488]}{[Az-AF488]}$  permettent d'aboutir à la relation ci-dessous, qui sera utile par la suite :

*Équation 3 : Expression de la concentration en Az-AF488 en fonction du temps*

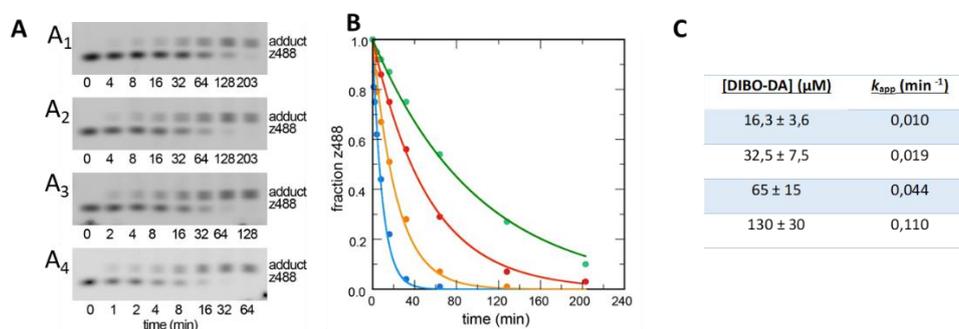
$[Az - AF488] = [Az - AF488]_0 * e^{-k_{app} * t}$  où  $[Az - AF488]_0$  est la concentration en Az-AF488 **162** au départ

## II.2. Exemple avec le DIBO-DA

La suite de la procédure pour déterminer la constante de vitesse  $k$  sera détaillée pour le DIBO-DA. Les données relatives au DBCO-DA et BCN-DA peuvent être retrouvées en [Annexe 2](#) et en [Annexe 3](#).

La réaction SPAAC est donc effectuée entre l'Az-AF488 à une concentration de 0,8  $\mu\text{M}$  et chacune des cyclooctyne-DA à plusieurs concentrations, par exemple, dans le cas du DIBO-DA : 16,3  $\mu\text{M}$ , 32,5  $\mu\text{M}$ , 65  $\mu\text{M}$  et 130  $\mu\text{M}$ .

Chacune des réactions clicks est suivie par électrophorèse et les fractions molaires relatives du réactif AzAF88 ([Figure 41A](#) : z488) et du produit de la réaction ([Figure 41A](#) : adduct) sont déterminées par l'intensité de chaque tâche grâce au logiciel ImageJ ([Figure 41A](#)). Le graphique de la [Figure 41B](#) correspond aux courbes exponentielles obtenues en traçant la fraction molaire d'Az-AF488 en fonction du temps obtenues de façon expérimentale. Chaque courbe correspond à une concentration différente en DIBO-DA. A partir de l'[Équation 3](#) et des courbes obtenues en [Figure 41B](#), il est alors possible de déterminer la valeur de la constante apparente  $k_{app}$  à chacune des concentrations en DIBO-DA. Ces valeurs de  $k_{app}$  sont représentées dans le tableau de la [Figure 41C](#).



*Figure 41 : Détermination des constantes  $k_{app}$ . A – Chromatogrammes de l'électrophorèse des différentes réactions click : concentrations en DIBO-DA à 16,3  $\mu\text{M}$  (A<sub>1</sub>), à 32,5  $\mu\text{M}$  (A<sub>2</sub>), à 65  $\mu\text{M}$  (A<sub>3</sub>) et à 130  $\mu\text{M}$  (A<sub>4</sub>) / B – Graphique des courbes exponentielles représentant la fraction molaire d'Az-AF488 **162** en fonction du temps pour des concentrations en DIBO-DA à 16,3  $\mu\text{M}$  (courbe verte), à 32,5  $\mu\text{M}$  (courbe rouge), à 65  $\mu\text{M}$  (courbe jaune) et à 130  $\mu\text{M}$  (courbe bleue). / C – Valeurs des  $k_{app}$  obtenues en fonction de la concentration en DIBO-DA*

D'après la relation linéaire entre la constante  $k_{app}$  et la concentration en DIBO-DA, indiquée dans l'Équation 2, il est alors possible de tracer la droite représentant la valeur de  $k_{app}$  en fonction de la concentration en DIBO-DA. Cette droite est représentée Figure 42 et sa pente correspond à la valeur de la constante  $k$ . Ainsi, la constante de vitesse pour la réaction SPAAC entre le DIBO-DA et l'Az-AF488 est de  $670 \pm 150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  soit  $11 \pm 3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

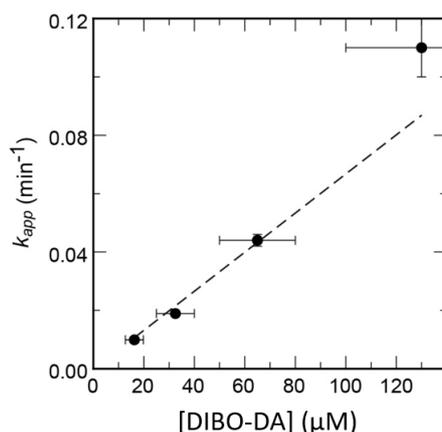
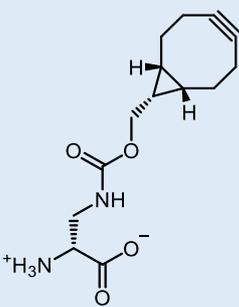
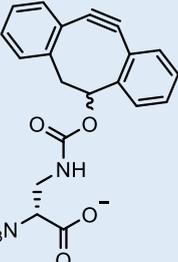
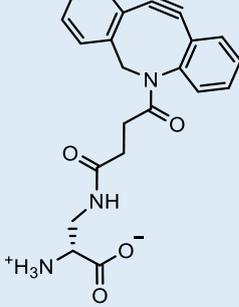


Figure 42 : Relation linéaire entre la constante  $k_{app}$  et la concentration en DIBO-DA

### II.3. Comparaison des constantes de vitesses des cyclooctyne-DA

Tableau 4 : Valeurs des constantes de vitesses pour la réaction entre le fluorophore Az-AF488 et le dérivé BCN-DA, DIBO-DA ou DBCO-DA

BCN-DA	DIBO-DA	DBCO-DA
		
155	137	151
$k = 1,2 \pm 0,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k = 11 \pm 3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k = 68 \pm 8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

En plus de la constante de vitesse de la réaction entre Az-AF488 et le DIBO-DA, les constantes de vitesses entre Az-AF488 et le BCN-DA ainsi que le DBCO-DA ont été déterminées. Les valeurs de ces constantes de vitesse sont indiquées dans le Tableau 4 et les données ayant abouti à ces valeurs sont détaillées dans l'Annexe 2 (BCN-DA) et dans l'Annexe 3 (DBCO-DA). Ainsi, pour le BCN-DA, une valeur de  $1.2 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été déterminée et pour le DBCO-DA, une valeur de  $68 \pm 8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été déterminée. Le BCN-DA est donc le composé le plus lent, suivi du DIBO-DA et enfin le DBCO-DA est le plus rapide.

Si l'on compare ces valeurs, aux valeurs données dans la littérature et décrite dans la partie [II.2. SPAAC du Chapitre I](#), le premier point à relever est que les valeurs que nous avons déterminées sont bien plus élevées. La principale explication à ce phénomène semble être que les valeurs de la littérature sont déterminées à 25 °C alors que les expériences menées ici sont à 37 °C.

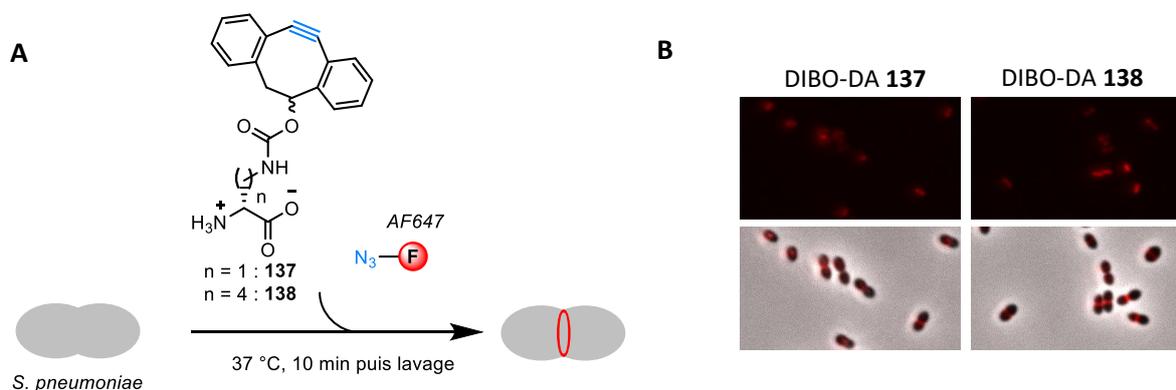
De plus, comme détaillé dans la partie [II.2. SPAAC du Chapitre I](#), la littérature indique que la vitesse de réaction du BCN avec un azoture aliphatique est située entre la vitesse de réaction entre le DIBO et l'azoture aliphatique (qui est normalement plus lent) ainsi que le DBCO et l'azoture aliphatique (qui est normalement plus rapide). Cependant, ces vitesses de réaction ont été calculées dans des solvants organiques, méthanol ou acétonitrile. Il est possible que le fait d'effectuer la réaction click dans l'eau soit la cause de la lenteur observée du BCN-DA.

### III. Incorporation des D-Ala modifiées sur le PG de *S. pneumoniae*

#### III.1. Les cyclooctyne-DA

##### III.1.1 Marquage du PG avec les DIBO-DA **137** et **138**

Dans un premier temps, l'incorporation sur le PG de *S. pneumoniae* des nouveaux dérivés de D-Ala, les composés DIBO-DA **137** et **138** a été évaluée avec un marquage fluorescent. Le marquage en deux étapes « one-pot » mis en œuvre est illustré sur la [Figure 43A](#) : le dérivé DIBO-DA est incubé pendant 10 minutes, en même temps que le fluorophore. Après lavage, qui a pour but d'éliminer les molécules de fluorophore qui n'ont pas réagi avec la cyclooctyne-DA incorporée, les bactéries marquées sont observées au microscope. Les images obtenues sont représentées sur la [Figure 43B](#). Ainsi, les deux DIBO-DA sont incorporés sur le PG de *S. pneumoniae* et un marquage du PG au septum des bactéries est observé dans chaque cas. De plus, d'après ces images, l'incorporation des deux dérivés semble équivalente : la longueur de la chaîne n'influe pas de manière significative sur le marquage du PG.



*Figure 43 : Marquage du PG de S. pneumoniae avec les DIBO-DA **137** et **138**. A – Schéma du mode opératoire utilisé pour le marquage en « one-pot » / B – Images de microscopie obtenues*

##### III.1.2. Marquage du PG en « one-pot »

Ensuite, l'incorporation sur le PG de *S. pneumoniae* des composés DIBO-DA **137**, DBCO-DA **151** et BCN-DA **155** a été évaluée et l'efficacité de ces trois dérivés pour marquer le PG a été comparée. Premièrement, des études de croissance de *S. pneumoniae* en présence de ces trois dérivés ont montré que le composé le plus toxique pour la bactérie semble être le DBCO-DA **151** et qu'une diminution significative de la croissance des bactéries n'est observée qu'à partir d'une concentration de 500  $\mu\text{M}$ . Les concentrations utilisées dans toute cette partie sont de 250  $\mu\text{M}$  pour tous les dérivés de D-Ala, ainsi, les dérivés de D-Ala ne sont donc pas toxiques pour les bactéries dans cette étude.

Tout d'abord, un marquage en « one-pot » du PG a été effectué avec ces trois dérivés, et le principe est schématisé sur la Figure 44A : le dérivé de D-Ala ainsi que le fluorophore Az-AF647 sont ajoutés en même temps et laissés pendant 5 minutes à 37 °C. Puis, après lavage, les bactéries marquées peuvent être observées au microscope et une mesure en cytométrie en flux est effectuée afin de quantifier l'intensité du marquage du PG.

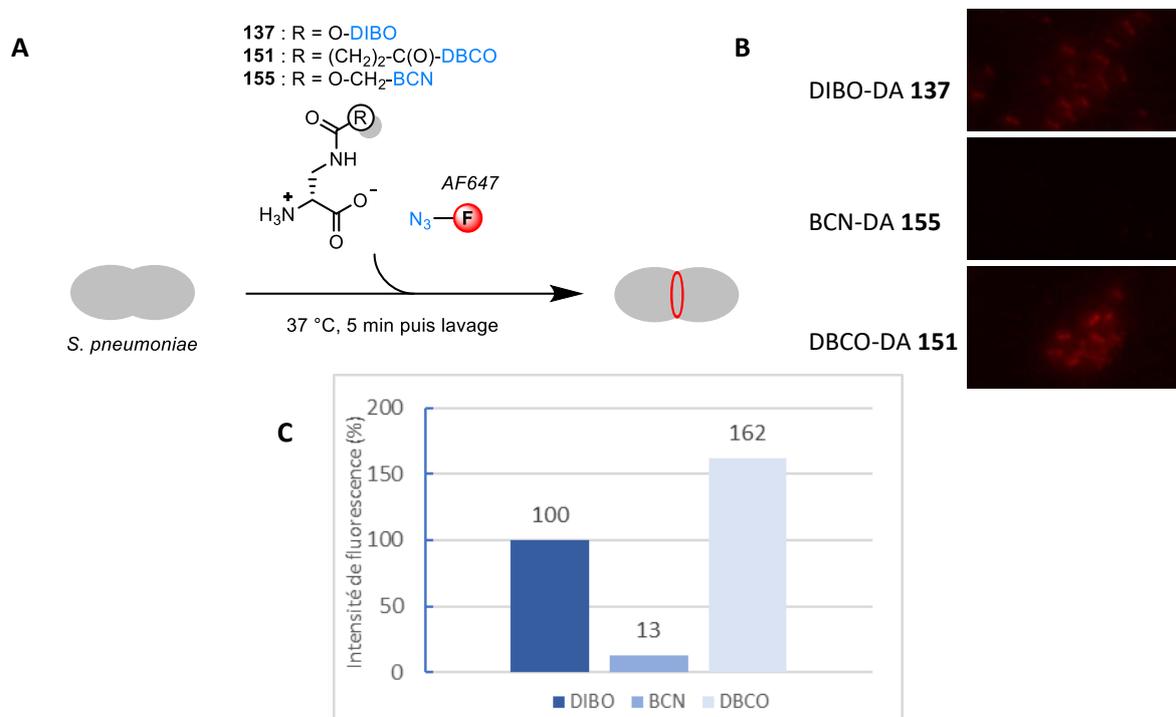


Figure 44 : Marquage du PG de *S. pneumoniae* avec les cyclooctyne-DA. A – Schéma du mode opératoire utilisé pour le marquage en « one-pot » / B – Images de microscopie obtenues / C – Graphique représentant l'intensité de fluorescence du marquage du PG comparée entre les trois cyclooctyne-DA. L'intensité de fluorescence du DIBO-DA est placée à un niveau de 100 % et les valeurs de l'intensité de fluorescence des marquages avec le BCN-DA et le DBCO-DA sont données en comparaison des 100 % du DIBO-DA.

Sur la Figure 44B, les images de microscopie sont représentées pour le marquage du PG avec chacun des trois dérivés de D-Ala étudiés. Ces images mettent en évidence le fait que le marquage avec le BCN-DA est bien moins intense que le marquage avec les deux autres dérivés. Cette observation est confirmée par la mesure d'intensité de fluorescence effectuée par cytométrie en flux et dont le résultat de la comparaison entre les trois dérivés est représenté sur la Figure 44C. L'intensité de fluorescence obtenue pour le marquage du PG avec le DIBO-DA est fixée de manière arbitraire à 100 %. Ainsi, le marquage du PG effectué avec le BCN-DA est largement inférieur au marquage du PG effectué avec le DIBO-DA (13 %). En comparaison, le marquage du PG effectué avec le DBCO-DA est plus intense que celui effectué avec le DIBO-DA (162 %).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer cette différence de marquage du PG avec chacun de ces dérivés. Premièrement, la cinétique de la réaction click, plus lente avec le BCN-DA,

comme montré dans la partie [II.3. Comparaison des constantes de vitesses des cyclooctyne-DA](#) de ce chapitre, explique-t-elle le marquage plus faible obtenu avec le BCN-DA ? Par ailleurs, la CPase PBP3, responsable de l'élimination de la D-Ala terminale, en 5<sup>ème</sup> position de la chaîne peptidique, est-elle capable d'éliminer en plus grande proportion certaines D-Ala modifiées ? En particulier, y'a-t-il une différence d'élimination entre les trois acides aminés étudiés ? Les expériences qui vont être décrites ci-après ont eu pour but de répondre à ces questions.

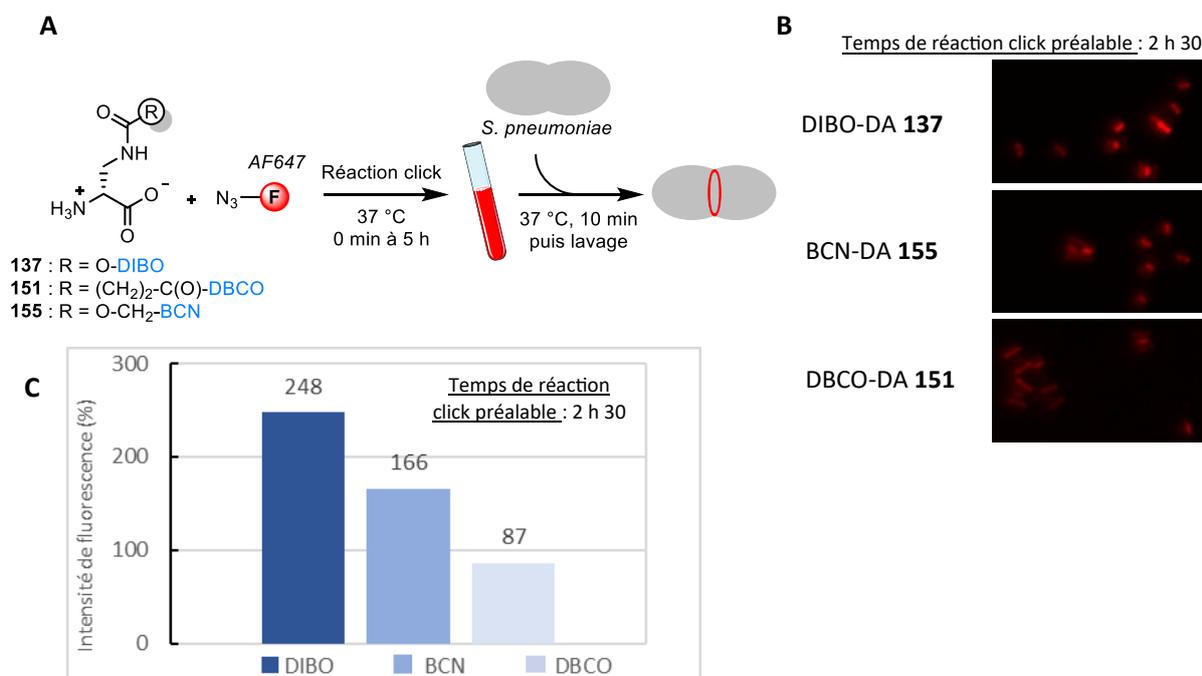
### III.1.3. Influence d'une différence de cinétiques de réaction click avec les cyclooctyne-DA dans le marquage du PG

La première hypothèse évoquée est que la différence de cinétique de la réaction click entre les dérivés cyclooctyne-DA et les fluorophores puisse expliquer le marquage moins intense avec le BCN-DA. Les constantes de vitesses de la réaction click entre chaque cyclooctyne-DA et le fluorophore Az-AF488 ont été calculées précédemment (voir [Cinétiques des réactions bioorthogonales avec les cyclooctyne-D-Ala](#) dans ce chapitre). Ainsi, à 37 °C et en milieu aqueux (PBS), le DBCO-DA réagit le plus rapidement avec Az-AF488 ( $k = 68 \pm 8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), suivi du DIBO-DA ( $k = 11 \pm 3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et du BCN-DA ( $k = 1,2 \pm 0,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). La tendance des différents marquages obtenus de façon « one-pot » ([Figure 44](#)) semble donc correspondre aux différentes constantes cinétiques calculées : plus la vitesse de réaction est lente, moins la réaction click n'a le temps de se produire pendant le temps de marquage. Ainsi, la proportion de fluorophores qui ont réagi est plus faible et le marquage est moins intense.

Afin de vérifier cette hypothèse, un nouveau marquage a été mis au point et est illustré sur la [Figure 45A](#) : le dérivé cyclooctyne-DA et le fluorophore sont mis en contact pendant un temps déterminé, allant de 0 min à 5 h. Pendant ce temps, une partie des réactifs réagit ensemble et une autre partie ne réagit pas, la proportion de réaction dépend du temps de réaction et du dérivé de cyclooctyne-DA considéré. Ensuite, ce milieu réactionnel est incubé avec les bactéries pendant un temps de 10 minutes. Ainsi, le marquage est en partie un marquage direct : la proportion de réactifs ayant réagi avant incubation est directement incorporée, par un processus similaire aux FDAA présentés dans la partie [III.4.2.1 Marquage direct avec des FDAA \(Fluorescent D-amino acids\)](#) du [chapitre I](#). La proportion de réactifs n'ayant pas réagi préalablement est, en revanche, utilisée sous forme de marquage en deux étapes, de la même façon que les marquages décrits juste au-dessus. L'intensité de fluorescence du marquage obtenu est mesurée pour chaque dérivé et pour chaque temps de réaction préalable, entre 0 min et 5 h. Il a ainsi été déterminé qu'après 2 h 30, le marquage obtenu avec chaque dérivé cyclooctyne-DA a atteint le maximum de son niveau de fluorescence.

Ensuite, les intensités de fluorescence obtenues pour le marquage du PG avec chaque dérivé ont été comparées dans les conditions de réactions clicks préalables de 2 h 30. Les images obtenues

en microscopie sont montrées sur la [Figure 45B](#) et la comparaison des intensités de fluorescence, mesurée par cytométrie en flux est illustrée sur le graphique de la [Figure 45C](#). Ainsi, dans ces conditions, le marquage du PG obtenu avec le BCN-DA n'est plus largement inférieur aux autres cyclooctynes-DA mais il a une intensité située entre le marquage obtenu avec le DIBO-DA et le marquage obtenu avec le DBCO-DA.



*Figure 45 : Marquage du PG de *S. pneumoniae* avec les cyclooctyne-DA avec réaction click préalable des deux réactifs A – Schéma du mode opératoire utilisé pour ce marquage / B – Images de microscopie obtenues dans les conditions avec la réaction click préalable de 2 h 30 / C – Graphique représentant l'intensité de fluorescence du marquage du PG, comparée entre les trois cyclooctyne-DA avec un temps de réaction click préalable de 2 h 30.*

Ce résultat confirme que, comme l'indiquent les résultats des calculs de constantes cinétiques, une raison pour laquelle le dérivé BCN-DA aboutit à un marquage moins intense est que la réaction click est plus lente avec ce dérivé. Ainsi, dans le temps imparti de quelques minutes pendant lequel le marquage en « one-pot » est réalisé, une plus faible proportion de BCN a le temps de réagir avec l'azoture du fluorophore, ce qui aboutit à un marquage moins intense.

Cependant, un autre paramètre n'a pas été pris en compte dans cette expérience et peut également influencer le marquage du PG. En effet, si les trois dérivés de D-Ala ne sont pas incorporés à la même vitesse, une proportion différente de D-Ala modifiée sera présente sur le PG après les 10 minutes, ce qui entrainera une proportion différente de réaction click avec le fluorophore et une intensité de marquage différente. Différents protocoles ont été testés afin de vérifier cette hypothèse, mais des difficultés techniques ont été rencontrées ne permettant pas d'aboutir à des conclusions.

Enfin, à l'opposé d'une proportion différente de dérivé incorporé sur le PG, il est également possible que les différents dérivés soient éliminés plus ou moins efficacement par la CPase PBP3, aboutissant à une quantité différente de dérivé présent sur le PG. Cette hypothèse est explorée dans la dernière partie de cette étude.

### III.1.5. Implication de PBP3 dans le marquage inégal du PG avec les cyclooctyne-DA

Comme il a été présenté dans le [Chapitre I](#), l'incorporation de dérivés de D-Ala simples dans le PG se produit en majorité à l'extérieur de la membrane plasmique, par échange du dernier acide aminé du peptide, catalysé par les CPases et les TPases. PBP3 (aussi appelée DacA), enzyme de la famille des CPases, est majoritairement impliquée dans l'élimination du dernier acide aminé de la chaîne peptidique.<sup>136</sup> En outre, il s'agit d'un processus dynamique : le dérivé de D-Ala est accroché au PG par échange entre une D-Ala naturelle et ce dérivé, mais le dérivé peut aussi être éliminé de la chaîne peptidique par PBP3. Ainsi, si certains dérivés sont plus facilement éliminés que d'autres par PBP3, par exemple, pour des raisons stériques, cela peut être une des explications à la différence de marquage observée avec les différentes cyclooctynes-DA.

Afin de vérifier cette hypothèse, le marquage du PG a été effectué avec une souche de *S. pneumoniae* différente et spécifique, R800 $\Delta$ DacA. Les marquages présentés précédemment ont été effectués sur la souche D39 $\Delta$ cps, une souche modifiée de *S. pneumoniae* qui ne possède pas de capsule. Ainsi, en plus de cette souche, les marquages ont également été effectués sur les souches R800 et R800 $\Delta$ DacA. R800 est une souche également dépourvue de capsule qui est utilisée en laboratoire pour réaliser des délétions de gène. R800 $\Delta$ DacA est une souche dérivée de R800, pour laquelle le gène de PBP3 a été éliminé. Ces nouveaux marquages ont été effectués dans les conditions illustrées sur la [Figure 46A](#) avec la réaction click préalable de 2 h 30, afin de s'affranchir du paramètre de la différence de cinétique entre chacun des dérivés. Les images de microscopie obtenues sont représentées sur la [Figure 46B](#) et la comparaison des intensités de fluorescence, mesurée par cytométrie en flux, est illustrée sur le graphique de la [Figure 46C](#), pour chaque souche et chaque dérivé cyclooctyne-DA.

Premièrement, pour la souche R800, l'intensité du marquage du PG suit une tendance identique au marquage obtenu avec la souche D39 $\Delta$ cps (voir [Figure 45](#)) : le DIBO-DA produit le marquage le plus intense, suivi de BCN-DA et de DBCO-DA. Ensuite, avec la souche R800 $\Delta$ DacA, l'intensité de marquage est plus forte avec chacun des dérivés, ce qui est en accord avec ce qui était prévu : la bactérie n'a plus la possibilité d'éliminer le dérivé incorporé. Une plus grande proportion est donc incorporée sur le PG au final.

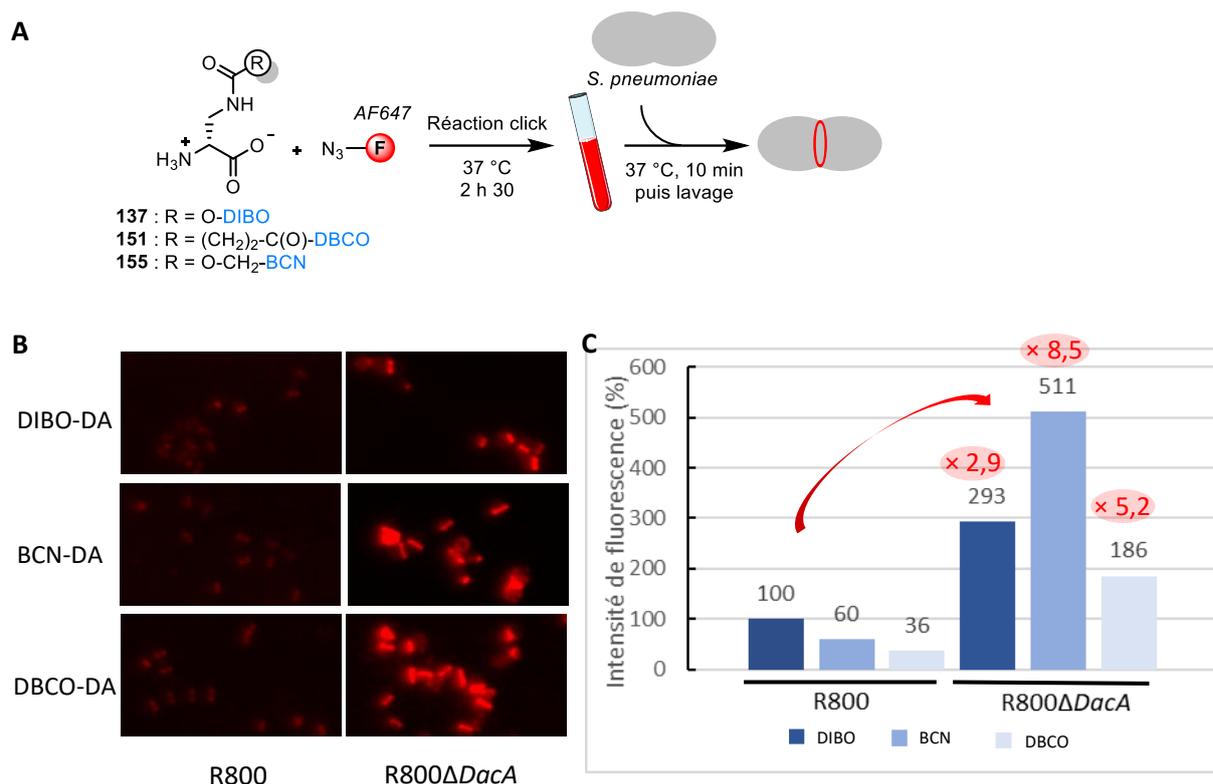


Figure 46 : Marquage du PG de *S. pneumoniae* avec les cyclooctyne-DA sur des souches différentes : R800 et R800ΔDacA. A – Schéma du mode opératoire utilisé pour ce marquage / B – Images de microscopie obtenues avec les souches R800 et R800ΔDacA / C – Graphique représentant l'intensité de fluorescence du marquage du PG comparée entre les trois cyclooctyne-DA et avec les deux souches étudiées.

En revanche, le rapport entre le marquage du PG avec R800ΔDacA et R800 est différent pour chaque cyclooctyne-DA. Alors que l'intensité de marquage est multipliée par 2,9 pour le marquage effectué avec le DIBO-DA, elle est multipliée par 5,2 pour le marquage effectué avec le DBCO-DA et par 8,5 pour le marquage effectué avec le BCN-DA. Cette différence permet de prouver que PBP3 élimine de façon non équivalente chacun des dérivés, couplé au fluorophore, c'est à dire sous forme du produit de la réaction click entre la D-Ala et le fluorophore. En particulier, elle élimine plus fortement le conjugué fluorophore-BCN-DA que le conjugué fluorophore-DBCO-DA et le conjugué fluorophore-DIBO-DA. Ainsi, il semble exister une meilleure reconnaissance par PBP3 de la séquence peptidique lorsque le BCN-DA comportant le fluorophore est incorporé en 5<sup>ème</sup> position du peptide, par rapport à la présence des deux autres analogues, DBCO-DA ou DIBO-DA, avec le fluorophore.

En se reportant à la structure chimique des dérivés, ce résultat paraît cohérent. L'encombrement stérique à proximité de la zone de reconnaissance (D-Ala) du conjugué fluorophore-BCN est en effet inférieur à l'encombrement stérique provoqué par les deux autres conjugués

fluorophore-cyclooctyne. Cependant, cette différence d'encombrement stérique est à nuancer car ce sont les produits de la réaction entre la D-Ala et le fluorophore qui sont éliminés de façon inégale.

Pour conclure, les différentes études menées visant à comparer le DIBO-DA, le BCN-DA et le DBCO-DA ont permis d'identifier deux raisons justifiant les différences de marquage observées avec chacun des dérivés. Premièrement, la vitesse de la réaction click influence l'intensité du marquage du PG : plus la réaction click est rapide, plus la quantité de fluorophore lié de façon covalente à la D-Ala est importante et donc le marquage va être plus intense. Par ailleurs, l'enzyme majoritairement responsable de l'élimination de la D-Ala terminale, PBP3, élimine, de manière inégale, les dérivés de D-Ala, dans leur forme conjuguée au fluorophore. Ainsi, il semblerait qu'un dérivé de D-Ala encombrant permette de réduire l'activité d'élimination de PBP3. Nous n'avons, cependant, pas pu obtenir d'information sur le clivage par PBP3 des dérivés non conjugués.

Il est probable que ces deux raisons ne soient pas les seules. Nous pouvons penser, par exemple, à une différence de stabilité des dérivés *in vivo* avec notamment la réactivité, plus ou moins forte, de ces dérivés avec des thiols. De plus, il est possible que ces dérivés ne soient pas incorporés à la même vitesse dans le PG. Cependant, comme évoqué précédemment, cette dernière hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

Enfin, la combinaison des différents marquages effectués et leur interprétation permet de mettre en évidence que le composé DIBO-DA **137** semble être le meilleur pour des applications de marquage ou pour des applications thérapeutiques : le marquage « one-pot » est bon, la cinétique de la réaction click avec le fluorophore est bonne, et dans le cas de marquages, il s'agit du composé pour lequel le conjugué AF647-cyclooctyne-DA est le moins éliminé par PBP3.

### III.2. TCO-DA et Tétrazine-DA

Par ailleurs, l'incorporation des dérivés tétrazine-DA **158** et TCO-DA **161** a également été évaluée. Pour cela, un marquage du PG en « one-pot » a été effectué en suivant le même mode opératoire que pour le marquage des DIBO-DA, présenté sur la [Figure 43A](#). Dans le cas de la tétrazine-DA, le fluorophore utilisé est le fluorophore TCO-CF647 et dans le cas du TCO-DA, le fluorophore pyrimidyl-tétrazine-AF647 a été utilisé ([Figure 47A](#)). Les images de microscopie obtenues sont montrées sur la [Figure 47B](#).

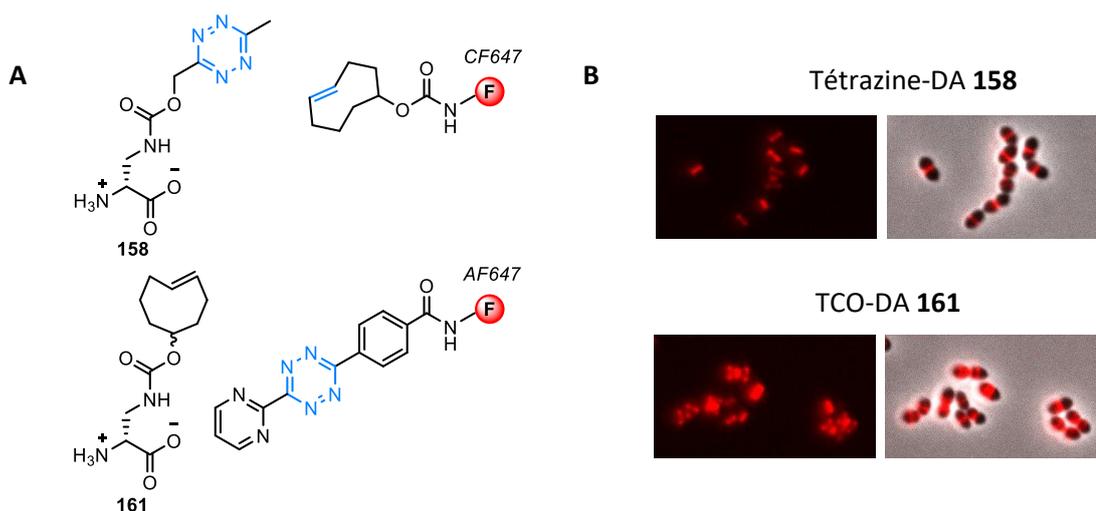


Figure 47 : Marquage du PG de *S. pneumoniae* avec la tétrazine-DA **158** et le TCO-DA **161**. Marquage réalisé en « one-pot » selon le mode opératoire présenté sur la Figure 43A. / A – Pour le marquage avec la tétrazine-DA, le fluorophore TCO-CF647 a été utilisé. Pour le marquage avec le TCO-DA, le fluorophore pyrimidyl-tétrazine-AF647 a été utilisé / B – Images de microscopie obtenues pour le marquage avec les deux dérivés testés.

Ainsi, chacun de ces dérivés de D-Ala permet de marquer le PG de *S. pneumoniae*. Un fluorophore et une tétrazine de natures différentes sont utilisés pour ces deux marquages, il n'est donc pas possible de les comparer. Cependant, le marquage est bien localisé aux sites de division des bactéries dans les deux cas.

Grâce à ces deux nouveaux composés, nous possédons maintenant des dérivés permettant de marquer le PG grâce à deux réactions clicks différentes et bioorthogonales entre elles. Cela permet d'imaginer différentes applications utilisant ces deux réactions clicks simultanément. Cela sera détaillé dans le chapitre suivant.

## IV. Développement de D-Ala-D-Ala modifiées

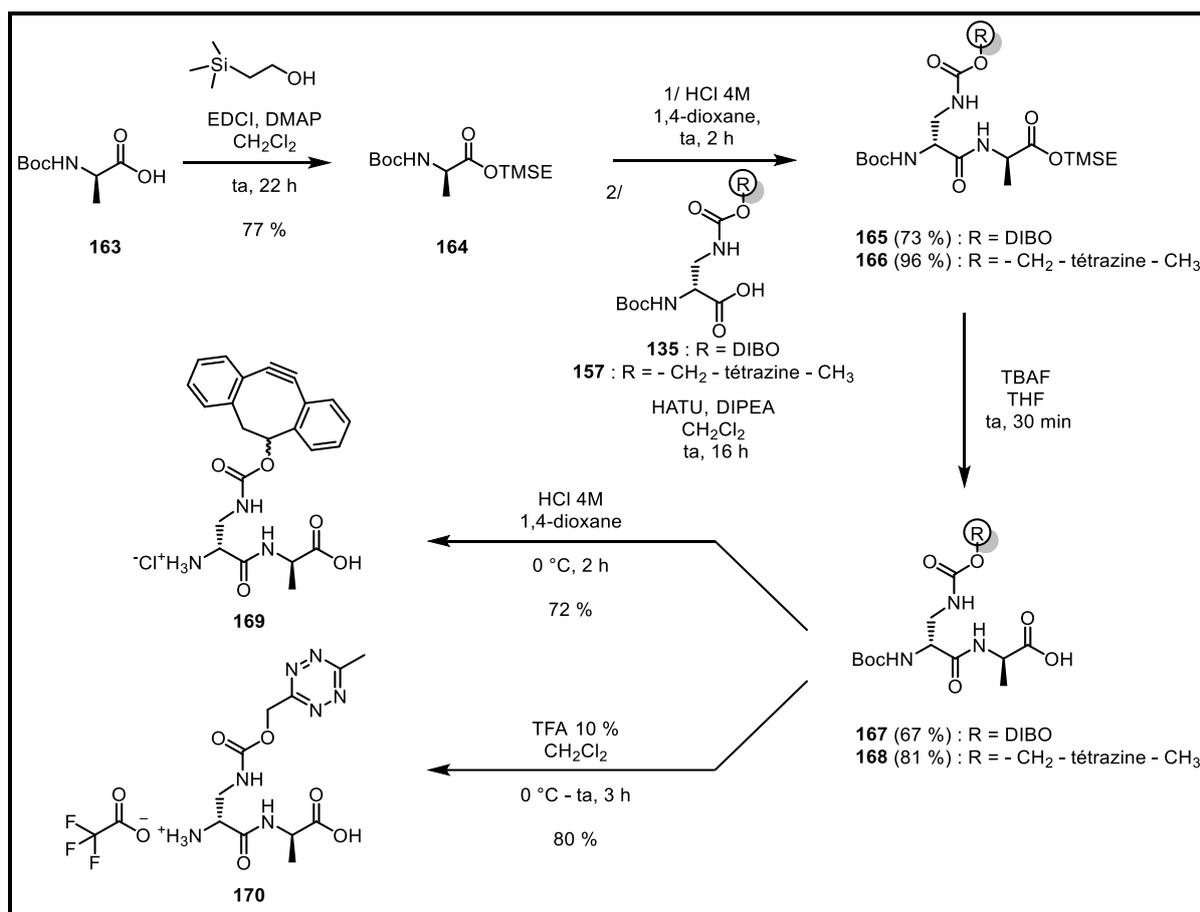
Les travaux de Brown *et al.*<sup>89</sup> décrits dans la partie III.4.3.1. AlkDADA, AzDADA, HADA-DA et NADA-DA du Chapitre I, indiquent que, contrairement à ce que nous pensions, les bactéries seraient capables de métaboliser des dérivés de D-Ala-D-Ala plus encombrants que ceux déjà développés, l'AlkDADA **65** et l'AzDADA **67**. En effet, la métabolisation des dérivés HADA-DA **69** et NADA-DA **70** a été démontré en marquant la bactérie à Gram négatif *E. coli* et la bactérie à Gram positif *B. subtilis*.

A la suite de la publication de ces travaux, nous avons donc décidé de synthétiser les composés DIBO-DADA **169** et tétrazine-DADA **170** dans le but de tester leur métabolisation par *S. pneumoniae*. Cela nous permettrait ainsi d'améliorer le marquage dans les applications que nous développons avec le DA-DIBO et avec le DA-tétrazine. Par ailleurs, le composé AzDADA **67** a également été synthétisé selon la voie de synthèse déjà développée par le laboratoire.

La voie de synthèse des composés DIBO-DADA **169** et tétrazine-DADA **170** est représentée sur le Schéma 20. La synthèse de ces composés est effectuée en 4 étapes en partant de la D-Ala **163** et du DA-DIBO **135** (ou DA-tétrazine **157**). La première étape est la protection de l'acide carboxylique de la D-Ala **163** par le groupement triméthylsilyl éthanol (TMSE-OH), ajouté par estérification de Steglich avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme agent de couplage. Le composé **164** est ainsi obtenu. Ce groupement protecteur est choisi car il permet une déprotection sélective du Boc dans l'étape suivante. Ainsi, après déprotection du Boc du composé **164**, l'acide aminé **135** (DIBO-DA-Boc) ou **157** (tétrazine-DA-Boc) est ajouté et couplé avec HATU. Les composés Boc-DIBO-DADA-TMSE **165** et Boc-tétrazine-DADA-TMSE **166** sont ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 73 % et 96 %. La déprotection directe des deux groupements protecteurs à l'aide de TFA dégrade le DIBO et la tétrazine. Une déprotection en deux étapes a donc à chaque fois été effectuée.

Dans le cas du DIBO, la déprotection de l'acide carboxylique protégé par le TMSE à l'aide de TBAF a donné le composé **167** avec un rendement de 67 %, puis, la déprotection de l'amine en milieu acide avec HCl a donné le composé **169** avec 72 % de rendement.

Pour la déprotection de la tétrazine-DADA, la première étape pour déprotéger l'acide carboxylique à l'aide de TBAF a mené au composé **168** avec un rendement de 81 %. En revanche, la déprotection de l'amine par HCl a donné un produit, différent du composé **170** désiré, qui n'a pas été identifié. Le problème a été résolu en déprotégeant de façon différente l'amine : à l'aide de TFA peu concentré (10 %) et laissé sur un temps court (3 h), afin de ne pas détruire la tétrazine. Le composé **170** a ainsi été obtenu avec un rendement de 80 %.

Schéma 20 : Voies de synthèses des composés DIBO-DADA **169** et tétrazine-DADA **170**

Enfin, la synthèse de l'AzDADA est décrite sur le Schéma 21 et le Schéma 22. Tout d'abord, la première étape de la synthèse de l'AzDADA est la formation de l'azoture par une réaction de diazotransfert à partir de l'acide  $N\alpha$ -Boc-D-2,3-diaminopropionique **133** dont le protocole est inspiré de Webb *et al.*<sup>137</sup> qui ont fait cette même réaction sur l'énantiomère L. En amont de cette réaction, l'azoture de triflyle est d'abord produit *in situ* à partir d'anhydride triflique et d'azoture de sodium (Schéma 21). Après séparation de la phase organique et de la phase aqueuse, la phase organique, contenant l'azoture de triflyle, est directement ajoutée au milieu réactionnel avec l'acide aminé **133**, CuSO<sub>4</sub>, et K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pour que la réaction de transfert de diazo se produise. L'azoture **171** est alors formé avec un rendement obtenu de 98 %. Par la suite, l'amine de l'acide aminé **171** peut être déprotégée pour former l'AzDA **59** avec un rendement de 65 % ou alors, il peut être couplé à la D-Ala dans le but de former l'AzDADA **67** avec la voie de synthèse décrite sur le Schéma 22.

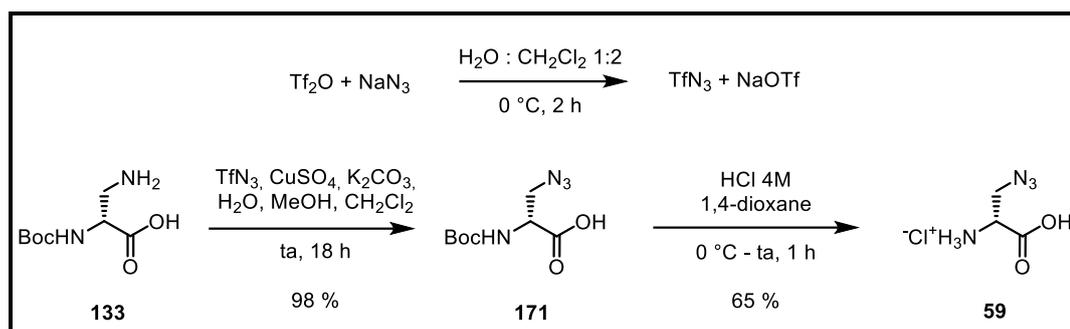


Schéma 21 : Synthèse du composé **170**, intermédiaire de la synthèse de l'AzDADA **67** et de l'AzDA **59**

Le couplage se produit de la même manière que ce qui a été décrit précédemment pour la synthèse des composés **169** et **170** : l'amine de la D-Ala **164** est déprotégée et couplée au composé Boc-AzDA **171** avec HATU comme agent de couplage. Le composé **172** est alors obtenu avec un rendement de 66 %. Enfin ce composé protégé est placé dans du TFA afin de déprotéger en même temps l'acide carboxylique et l'amine et l'AzDADA **67** a pu être obtenu avec un rendement de 61 %.

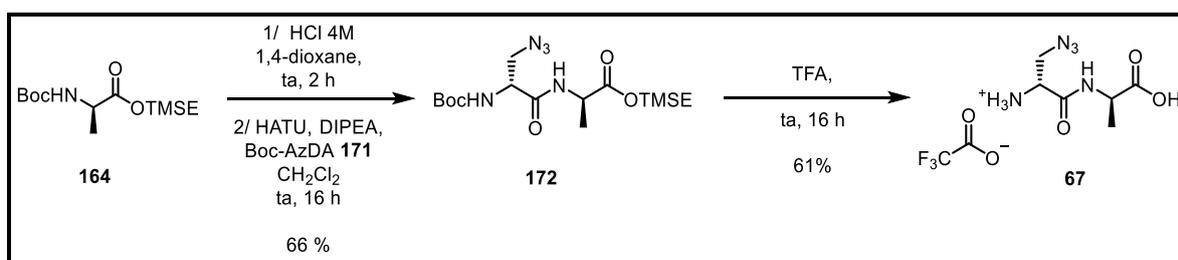


Schéma 22 : Voie de synthèse de l'AzDADA **67**

Ces deux nouveaux composés, le DIBO-DADA **169** et la tétrazine-DADA **170**, sont actuellement en cours d'évaluation à l'IBS, afin de tester si leur incorporation métabolique est possible et si un marquage du PG de *S. pneumoniae* peut être observé.

## V. Conclusions et perspectives

Pour conclure, plusieurs dérivés de D-Ala et de D-Ala-D-Ala ont été synthétisés et sont décrits dans ce chapitre (Figure 48). Les nouvelles D-Ala ont été évaluées biologiquement : elles sont toutes incorporées sur le PG et elles permettent toutes de marquer le PG de *S. pneumoniae*. Cependant, dans le cas des cyclooctynes-DA **137**, **151** et **155**, l'intensité du marquage est différente et cela est dû à plusieurs facteurs. Il a ainsi été montré que la différence de vitesse de la réaction click ainsi que l'élimination par PBP3 de la D-Ala liée à son fluorophore, inégale selon les dérivés, contribuent à ces différences de marquage. Ainsi, parmi ces trois dérivés étudiés, le DIBO-DA **137** semble posséder les meilleures propriétés, tant pour des applications de marquage que pour des applications thérapeutiques. Nous sommes donc maintenant capables d'incorporer sur le PG des dérivés de D-Ala avec des fonctions permettant de réaliser les réactions click, sans cuivre, SPAAC et IEDDA.

Enfin, les nouvelles D-Ala-D-Ala sont actuellement en cours d'évaluation par les biologistes afin de déterminer si elles peuvent être métabolisées par le PG de *S. pneumoniae*. Si c'est le cas, cela permettrait d'obtenir en plus grande proportion la fonction click DIBO ou tétrazine sur le PG car cette dernière serait positionnée en 4<sup>ème</sup> position sur la chaîne peptidique, ce qui la rendra plus persistante.

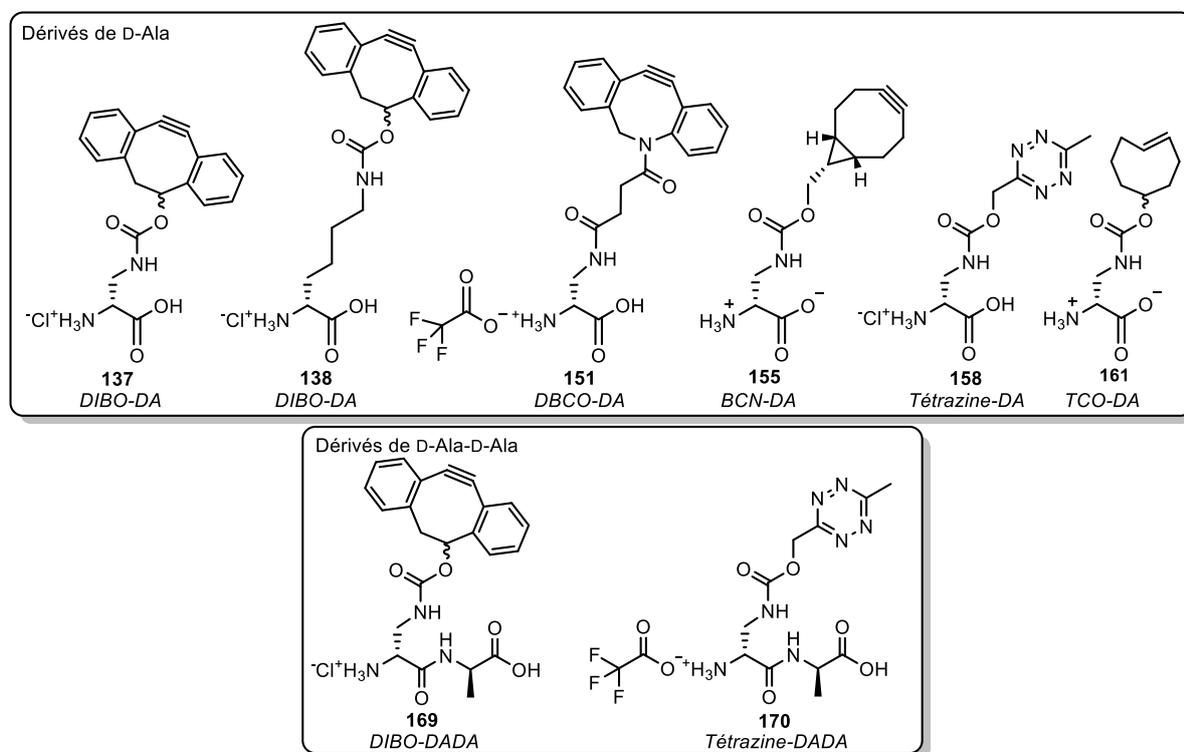


Figure 48 : Récapitulatif des D-Ala et D-Ala-D-Ala nouvellement synthétisées pendant ce projet de thèse

## Chapitre IV

### Utilisation des nouveaux outils développés pour des applications de thérapie et d'imagerie

Dans les chapitres précédents, nous avons développé de nouveaux dérivés de cholines métabolisées par les AT ([Chapitre II](#)) ainsi que de nouveaux dérivés de D-Ala incorporés sur le PG ([Chapitre III](#)). Les diverses propriétés de ces dérivés (nature des fonctions clicks, cinétiques de réaction, taille...) permettent de concevoir des applications utilisant ses dérivés de manière innovante.

Dans ce chapitre, les deux applications que nous avons explorées pendant ce projet de thèse, et pour lesquelles les expériences ont été réalisées par nos collaborateurs de l'IBS, vont être détaillées. Premièrement, les travaux qui ont été effectués pour une application à visée thérapeutique vont être décrits : la réticulation par réaction click du PG et des AT de *S. pneumoniae* dans le but de bloquer la synthèse de la paroi bactérienne. Ensuite, les dérivés développés ont permis de concevoir une application pour de l'imagerie, qui va être détaillée : l'observation par microscopie à haute résolution du PG et des AT de *S. pneumoniae* en deux couleurs.



## I. Réticulation du PG et des AT pour bloquer la biosynthèse de la paroi bactérienne

### I.1. Principe

L'étude de 2018,<sup>103</sup> en collaboration entre notre équipe et l'IBS, montre la concordance spatio-temporelle de la biosynthèse du PG et des AT. Cela a été détaillé dans la partie III.5.2. Marquage en deux couleurs des AT et du PG du Chapitre I. Le principe de ce projet est d'utiliser cette concordance spatio-temporelle afin de faire réagir ensemble, par réaction click, deux dérivés, auparavant métabolisés sur la paroi bactérienne : l'un sur le PG et l'autre sur les AT. Ainsi, si une proportion suffisante de dérivés réagit ensemble et réticulent, la biosynthèse de la paroi bactérienne pourrait être entravée et un effet bactériostatique ou bactéricide pourrait avoir lieu (Figure 49).

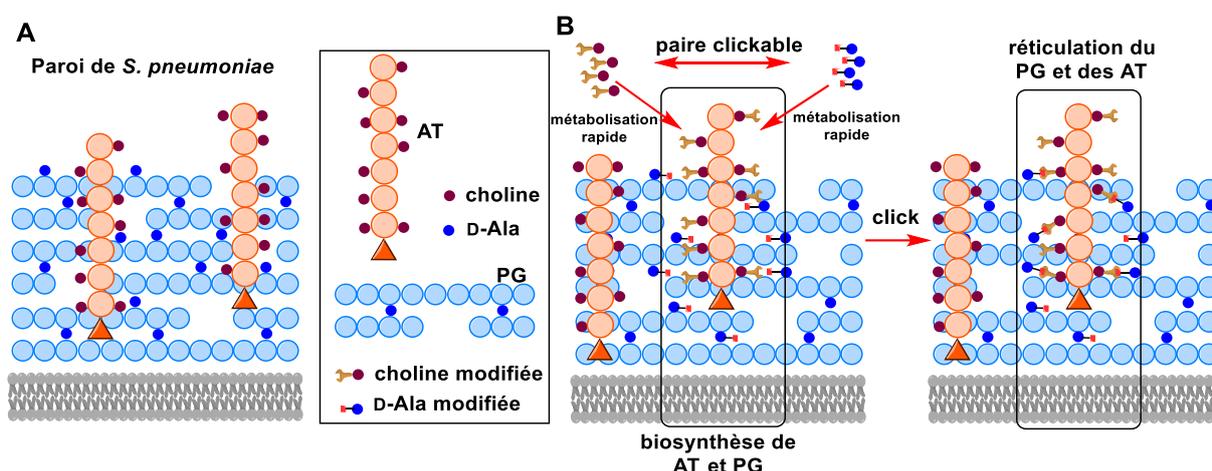


Figure 49 : Principe du projet de réticulation du PG et des AT de *S. pneumoniae*. A – Schéma de la paroi de la bactérie. Le PG est représenté en bleu et les AT sont représentés en orange. B – Stratégie employée dans ce projet. Métabolisation rapide de choline modifiée sur les AT et de D-Ala modifiée sur le PG puis réaction click entre les deux dérivés dans le but de bloquer la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Récemment, deux études sont venues conforter la possibilité d'une réticulation comme celle que nous envisageons. Ces deux études ont été présentées dans la partie III.4.2.4. Réticulation entre dérivés de D-Ala incorporés sur le PG du Chapitre I. D'abord, Schultz *et al.* ont utilisé la réaction SuFEx pour créer une réticulation non naturelle entre deux chaînes peptidiques du PG.<sup>84,85</sup> Par ailleurs, Siegrist *et al.* ont utilisé la CuAAC pour faire réticuler deux chaînes peptidiques du PG sur lesquelles ont été incorporés l'AlkDA 58 et l'AzDA 59.<sup>86</sup>

Ainsi, ces deux études montrent qu'une réticulation non naturelle est possible au niveau de la paroi bactérienne. Cependant, ces études font réticuler ensemble les chaînes peptidiques d'une même

entité, le PG. Notre défi, ici, est de produire une réticulation non naturelle entre deux entités différentes, le PG et les AT, qui ne sont normalement pas reliées à cet endroit.

Enfin, la cinétique de la réaction click est un point clé de ce projet. En effet, cette dernière doit se produire après la métabolisation simultanée des dérivés par le PG et les AT, qui est un processus rapide, de l'ordre de quelques minutes. Une réaction click trop rapide aurait donc lieu avant la métabolisation des deux dérivés, donc à l'extérieur de la paroi bactérienne. A l'inverse, une réaction click trop lente pourrait mener à une proportion insuffisante de réticulation dans la paroi bactérienne.

## 1.2. Réticulation par réaction click directe

### 1.2.1. Croissance et morphologie des bactéries avec DIBO-DA **137** et AzCho **77**

Dans un premier temps, la paire AzCho **77** et DIBO-DA **137** a été sélectionnée pour effectuer la réticulation car elle semble présenter un bon compromis de cinétique, ni trop lente, ni trop rapide. De plus, la réaction ne nécessite pas de cuivre, qui est cytotoxique. Ainsi, les deux dérivés ont été incubés à 37 °C sur *S. pneumoniae* et la croissance des bactéries a été suivie (Figure 50). La comparaison de la croissance de ces bactéries avec la croissance de bactéries sans dérivé ou avec un seul des deux dérivés a montré que la présence des deux dérivés **77** et **137** n'aboutissait pas à un effet bactériostatique ou bactéricide. De plus, la comparaison par microscopie de la morphologie des bactéries n'a montré aucun changement qui serait dû à une réticulation entre le PG et les AT. Par la suite, le DIBO-DA **138**, qui possède une chaîne plus longue a également été testé, en combinaison avec l'AzCho **77**. De la même manière, aucun changement n'a été observé sur la bactérie : ni effet bactériostatique, ni effet bactéricide, ni modification de la morphologie des bactéries.

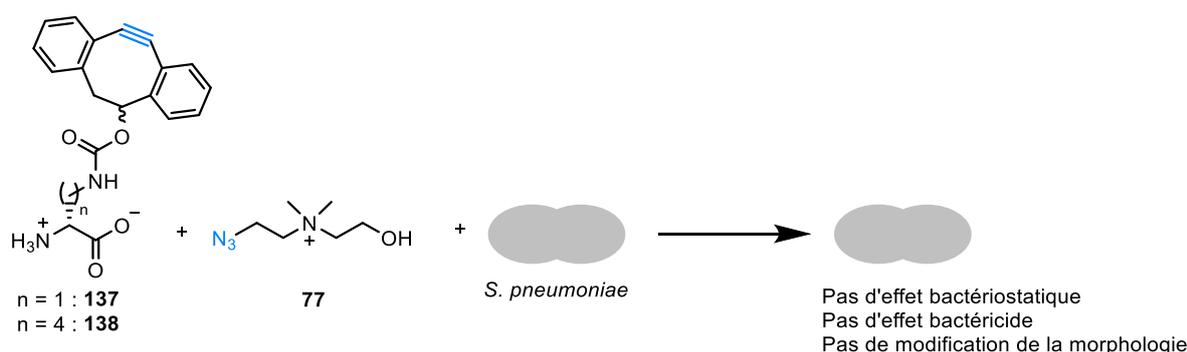


Figure 50 : Essais de réticulation directe entre le PG et les AT de *S. pneumoniae* par métabolisation de DIBO-DA **137** ou **138** et d'AzCho **77**

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'essayer d'expliquer le fait que nous n'observons pas de modification dans la croissance ou la morphologie des bactéries. Premièrement, il est possible que la réticulation ait lieu, mais que, malgré le fait que le PG et les AT aient réticulé, les bactéries continuent

de pousser normalement. En outre, nous savons que les D-Ala modifiées sont facilement éliminées par PBP3. Il est donc également possible que la réticulation puisse avoir lieu, mais que le peu de D-Ala incorporée sur le PG empêche cette réticulation d'avoir lieu en proportion suffisante ou que son élimination par PBP3 supprime cette réticulation. Enfin, il est possible que la réticulation n'ait pas du tout lieu. Une des raisons pouvant expliquer cela est que la distance entre les dérivés de D-Ala incorporés sur le PG et de cholines métabolisées par les AT soit trop grande. Ainsi, plusieurs stratégies ont été développées et testées par les biologistes de l'IBS pour tenter de répondre à ces hypothèses. Leur mise en œuvre et les conclusions que nous pouvons en tirer sont développées par la suite.

### 1.2.2. Tentative de mise en évidence de la réticulation avec marquage fluorescent : ajout simultané d'AzCho 77 et de DIBO-DA 138

Afin de tenter de prouver la réticulation en utilisant une technique de marquage fluorescent, l'expérience décrite en [Figure 51](#) a été mise au point. Le principe est d'incuber les bactéries avec les dérivés DIBO-DA 138 et AzCho 77, dans des conditions de réticulation, puis d'ajouter un fluorophore qui réagit avec l'un des deux dérivés, soit celui incorporé sur le PG soit celui métabolisé par les AT, mais qui n'a pas réticulé. L'intensité de la fluorescence obtenue dans ces conditions est alors comparée à l'intensité de fluorescence obtenue pour les expériences de contrôle, où la réticulation est absente. Ainsi, une diminution de l'intensité entre les deux expériences comparées permettrait de penser, en première intention, que la réticulation peut avoir eu lieu.

Dans l'expérience décrite ici, une diminution significative de la fluorescence du marquage du PG est bien observée : elle passe de 100 % en présence seulement de DIBO-DA 138 à 35 % en conditions de réticulation. Cependant, il est possible qu'une partie, voire la totalité de la diminution de cette fluorescence, soit due à une réaction entre le DIBO-DA incorporé et l'AzCho en solution. Ainsi, le DIBO-DA n'est plus disponible pour réagir avec le fluorophore, mais il n'y a pas pour autant réticulation entre le PG et les AT.

En revanche, aucune diminution de la fluorescence n'est observée pour le marquage des AT. Une hypothèse pouvant expliquer cela est que l'AzCho est métabolisée par les AT en proportion largement supérieure par rapport au DIBO-DA incorporé sur le PG. Ce qui nous permet de penser cela est que nous savons que le DIBO-DA est en partie éliminé par PBP3 et également que la concentration en AzCho dans cette expérience est bien supérieure à la concentration en DIBO-DA.

Cette expérience ne permet donc pas encore de conclure sur le fait qu'il y ait une réticulation entre le PG et les AT. Il faudrait modifier le principe de l'expérience, par exemple, pour empêcher la possible réaction entre le DIBO-DA incorporé et l'AzCho en solution et, ainsi, que la diminution de

fluorescence du marquage du PG correspond seulement à la proportion de réticulation entre le PG et les AT.

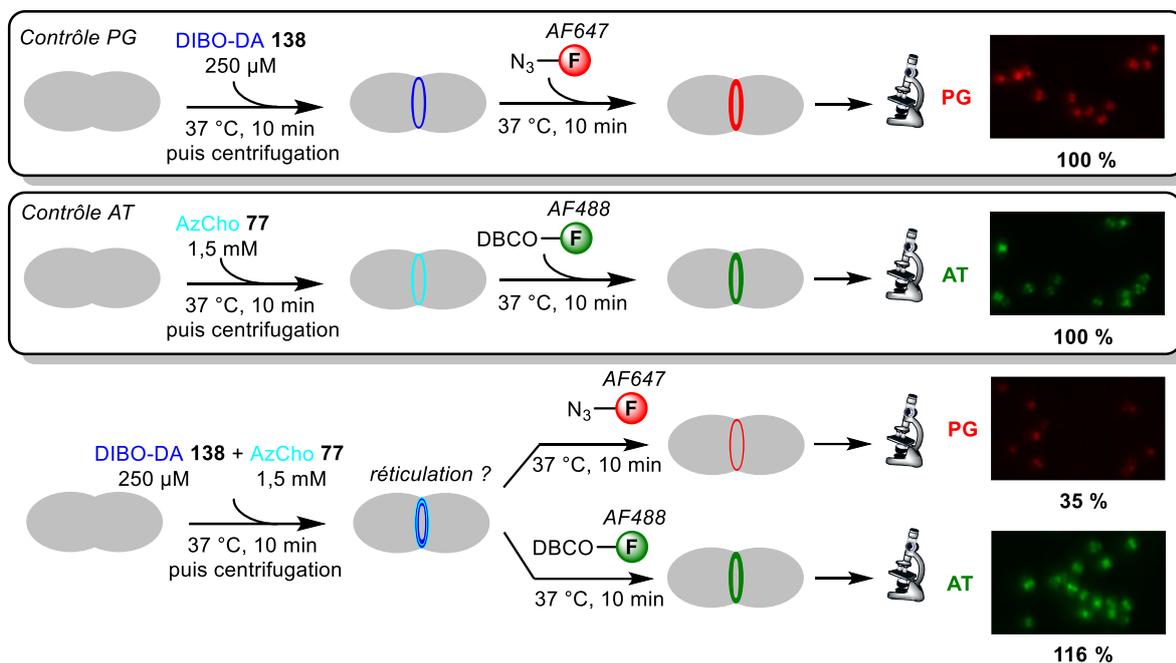


Figure 51 : Expérience de mise en évidence de la réticulation entre le PG et les AT avec marquage fluorescent, par ajout simultané de DIBO-DA **138** et d’AzCho **77** et images de microscopie obtenues. Les pourcentages indiqués en dessous de chaque image de microscopie correspondent à la mesure de l’intensité de fluorescence effectuée par cytométrie en flux, comparée à la mesure de l’intensité mesurée pour les expériences contrôles, fixée à 100 %.

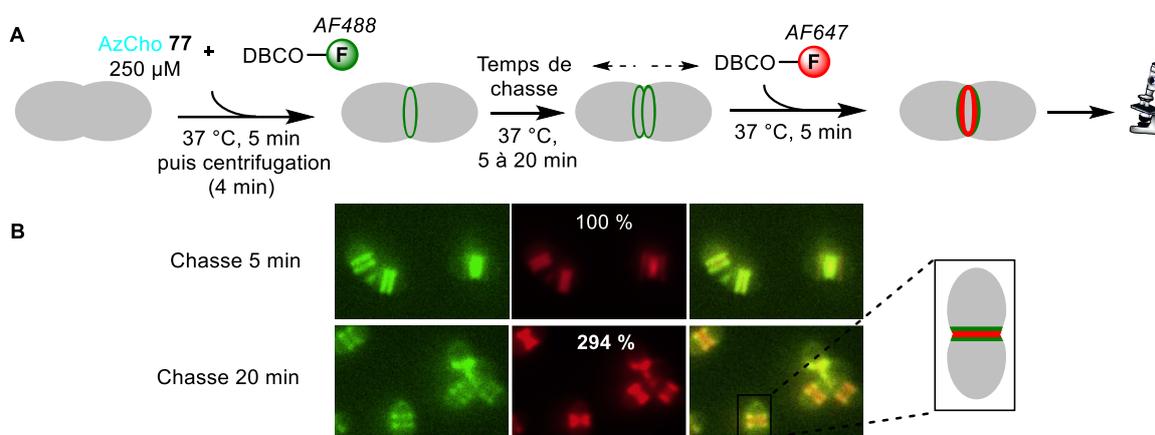
Afin d’empêcher la réaction parasite entre le DIBO-DA incorporé et l’AzCho en solution, une possibilité serait d’empêcher l’AzCho de se trouver en solution pendant que le DIBO-DA serait incorporé. Pour réaliser cela, il a d’abord été prouvé qu’un stock d’AzCho est présent dans le cytoplasme. Ainsi, cela permettra, par la suite, de modifier le protocole de l’expérience de réticulation pour ajouter de manière successive les deux dérivés : l’AzCho en premier puis le DIBO-DA après élimination du reliquat d’AzCho toujours en solution.

### 1.2.3. Stockage de choline dans le cytoplasme de *S. pneumoniae*

Tout d’abord, pour prouver que l’AzCho **77** est en partie stockée dans le cytoplasme, l’expérience décrite en Figure 52A a été conçue. Premièrement, l’AzCho est incubée pendant 5 minutes avec les bactéries à 37 °C, en présence du fluorophore DBCO-AF488. L’AzCho est ainsi métabolisée par les AT et réagit avec le fluorophore, de couleur verte. Une rapide centrifugation permet d’éliminer l’AzCho en excès puis les bactéries sont remises en culture dans un milieu neuf pendant un temps variable, de 5 à 20 minutes : les bactéries continuent alors de pousser, ce qui éloigne les AT marqués du site de division (temps de chasse). Enfin, un deuxième fluorophore, DBCO-AF647, de couleur rouge, est ajouté pendant 5 minutes pour marquer les AT qui auraient été métabolisés et présentés à la

surface pendant le temps de chasse. Les bactéries sont alors observées au microscope dans les deux longueurs d'onde.

Les images sont représentées sur la [Figure 52B](#) et montrent d'abord le marquage initial des AT synthétisés pendant les 5 premières minutes de pulse (marquage vert). Elles montrent également un marquage rouge qui n'est pas superposé au marquage vert, mais qui est situé au septum, au niveau des AT nouvellement synthétisés. Cela prouve que de l'AzCho est métabolisée après le pulse, pendant le temps de chasse. De plus, l'intensité du marquage rouge augmente avec le temps de chasse, indiquant que l'AzCho présente dans le cytoplasme peut alimenter la synthèse des AT pendant un certain temps.



*Figure 52 : Mise en évidence de stockage de choline dans les bactéries. A – Principe de l'expérience / B – Images de microscopie obtenues. Les pourcentages indiqués représentent l'intensité de fluorescence due au fluorophore AF647, mesurée par cytométrie en flux et mettant en évidence qu'une plus grande quantité d'AzCho est métabolisée pendant le temps de chasses quand il est de 20 minutes par rapport à un temps de chasse de 5 minutes.*

#### 1.2.4. Mise en évidence de la réticulation avec marquage fluorescent : ajouts successifs d'AzCho 77 puis de DIBO-DA 137

La mise en évidence de stockage de choline dans les bactéries a donc permis de concevoir une nouvelle expérience pour montrer la réticulation du PG et des AT, en ajoutant, cette fois successivement, l'AzCho 77, puis le DIBO-DA 137 ([Figure 53](#)). Juste avant l'ajout de DIBO-DA, une rapide centrifugation permet ainsi d'éliminer l'excès d'AzCho en solution avant l'ajout de DIBO-DA. Le DIBO-DA, qu'il soit en solution ou incorporé dans le PG n'a donc plus la possibilité de réagir avec de l'AzCho en solution. Il ne peut réagir qu'avec l'AzCho métabolisée par les AT, ou avec le fluorophore Az-AF647.

De la même manière que pour la première expérience, une diminution de l'intensité de fluorescence pour le marquage du PG est observée (de 100 % à 31 %). Ici, la réaction parasite entre le

DIBO-DA incorporé et l'AzCho en solution ne peut plus avoir lieu. Cette diminution correspond donc, à priori, à la proportion de DIBO-DA qui a réticulé avec l'AzCho, métabolisée par les AT.

En revanche, la diminution de fluorescence du marquage des AT n'est pas significative (de 100 % à 78 %). Nous ne pouvons pas tirer de conclusion par rapport à la réticulation ici car la réaction parasite entre l'AzCho métabolisée et le DIBO-DA en solution n'est pas empêchée et, l'hypothèse d'une quantité d'AzCho métabolisée bien supérieure à la quantité de DIBO-DA incorporé, laisse penser que la proportion d'AzCho ayant réticulé n'est pas grande par rapport à la quantité totale d'AzCho métabolisée.

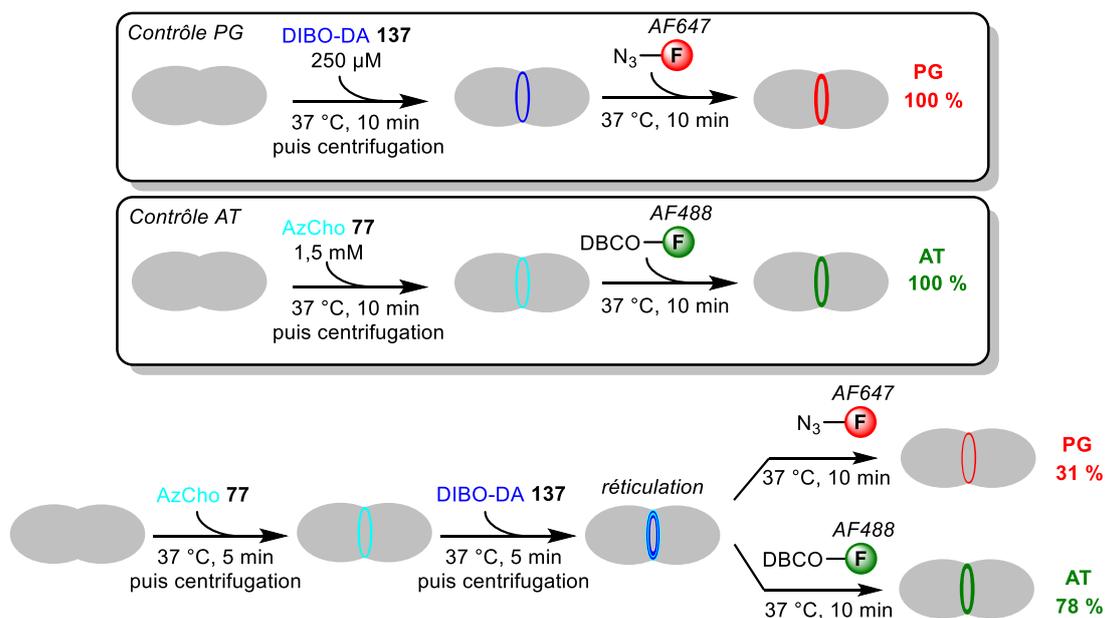


Figure 53 : Expérience de mise en évidence de la réticulation entre le PG et les AT avec un marquage fluorescent par ajout successif de l'AzCho 77 puis de DIBO-DA 137. Les pourcentages indiqués correspondent à la mesure de l'intensité de fluorescence effectuée par cytométrie en flux, comparée à la mesure de l'intensité mesurée pour les expériences contrôles, fixée à 100 %.

### 1.3. Synthèse d'un linker bifonctionnel entre le PG et les AT

Parallèlement à ces expériences qui semblent finalement montrer que la réticulation se produit, nous avons émis l'hypothèse d'une trop grande distance entre le PG et les AT nouvellement synthétisés. Pour pallier à ce problème, nous avons développé un linker bifonctionnel capable de réagir, d'un côté par réaction IEDDA sur la tétrazine-DA 158 avec un groupement TCO, et de l'autre, par réaction SPAAC sur l'AzCho 77 avec un groupement DIBO. Ce linker est représenté sur la Figure 54.

Le groupement TCO choisi est le groupement développé par Leeper *et al.*<sup>54</sup> et présenté dans la partie II.3. IEDDA du Chapitre I. Ce TCO réagit beaucoup moins vite que les TCO plus couramment utilisés, ce qui est utile pour notre application, pour laquelle nous ne souhaitons pas une réaction click

trop rapide. De plus, ce composé permet de transformer facilement un azoture en TCO. Il a donc une double fonction intéressante à explorer.

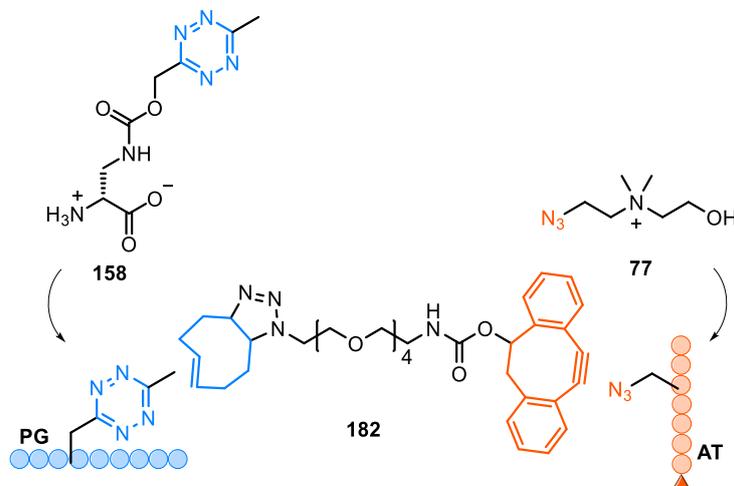


Figure 54 : Stratégie de réticulation du PG et des AT grâce au linker bifonctionnel TCO-(PEG)<sub>4</sub>-DIBO **182**

La synthèse de ce linker bifonctionnel a donc été réalisée et est décrite ci-dessous. La première étape est la synthèse du (*E,E*)-cyclooctadiène **176**, précurseur de ce TCO, qui est décrite sur le Schéma 23. Premièrement, une époxydation des deux alcènes du (1*Z*,5*Z*)-cycloocta-1,5-diène **173** à l'aide de *m*CPBA fournit le composé **174** avec un rendement de 69 %. L'ouverture de l'époxyde se fait en milieu basique et avec la diphenylphosphine. Cette étape est suivie d'une oxydation avec de l'eau oxygénée de la phosphine formée pour obtenir les oxydes de phosphine **175a** et **175b**, qui ne sont pas séparés intentionnellement. Un rendement de 78 % est obtenu avec les deux diastéréoisomères en mélange. Enfin, le (*E,E*)-cyclooctadiène **176** est formé par réaction de ces deux diastéréoisomères avec NaH qui permet l'élimination des oxydes de phosphines et des alcools et la formation des alcènes en stéréoisomérisation *trans* avec un rendement de 17 %. Ce composé est volatil et sensible à la polymérisation lorsqu'il est isolé. Il est donc obtenu en solution dans le pentane et il peut être transféré à un autre solvant organique non miscible avec l'eau par complexation avec le nitrate d'argent, AgNO<sub>3</sub>, permettant de le rendre miscible à l'eau puis réextraction dans le solvant organique souhaité après ajout d'ammoniac.

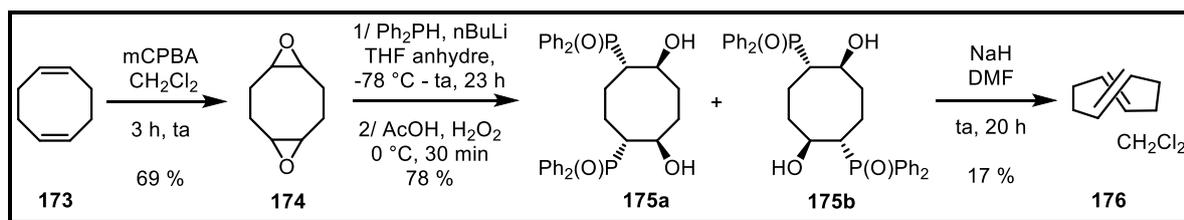


Schéma 23 : Synthèse du (*E,E*)-cyclooctadiène **176**

Ensuite, l'intermédiaire **180**, correspondant à la partie PEG du linker, est préparé en 3 étapes selon le Schéma 24. Les deux alcools du diol **177** ont d'abord été tosylés avec un rendement de 97 % puis les deux groupements tosyloxy sont substitués par des azotures pour former le composé **179** avec un rendement de 81 %. Enfin, l'un des deux azotures est réduit par une réaction de Staudinger avec 1 équivalent de triphénylphosphine en milieu acide. Le composé **180** est ainsi formé avec un rendement de 70 %.

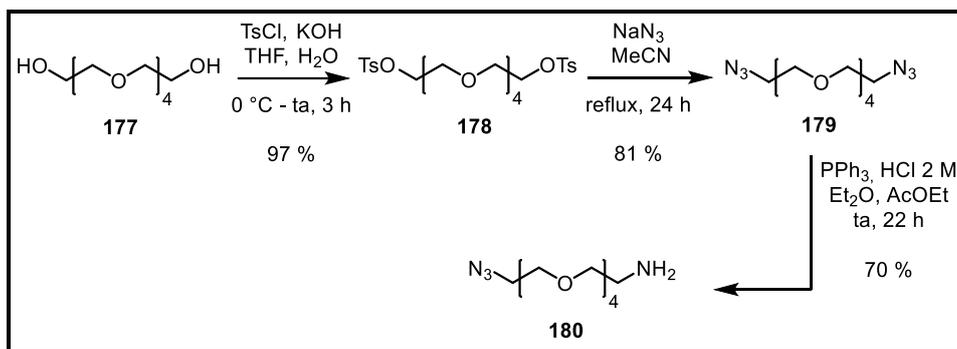


Schéma 24 : Synthèse de l'intermédiaire **180**, intermédiaire dans la synthèse du linker TCO-(PEG)<sub>4</sub>-DIBO

Enfin, les deux fonctions clicks sont ajoutées au linker en deux étapes selon le Schéma 25. Premièrement, le (*E,E*)-cyclooctadiène **176** est mis en réaction avec le composé **180** et l'azoture réagit par cycloaddition [3+2] avec l'un des alcènes tendus pour former le composé **181** avec un rendement de 69 %. Enfin, le linker bifonctionnel **182** est formé par addition-élimination entre le DIBO activé **132** et l'amine du composé **181** avec un rendement de 20 %.

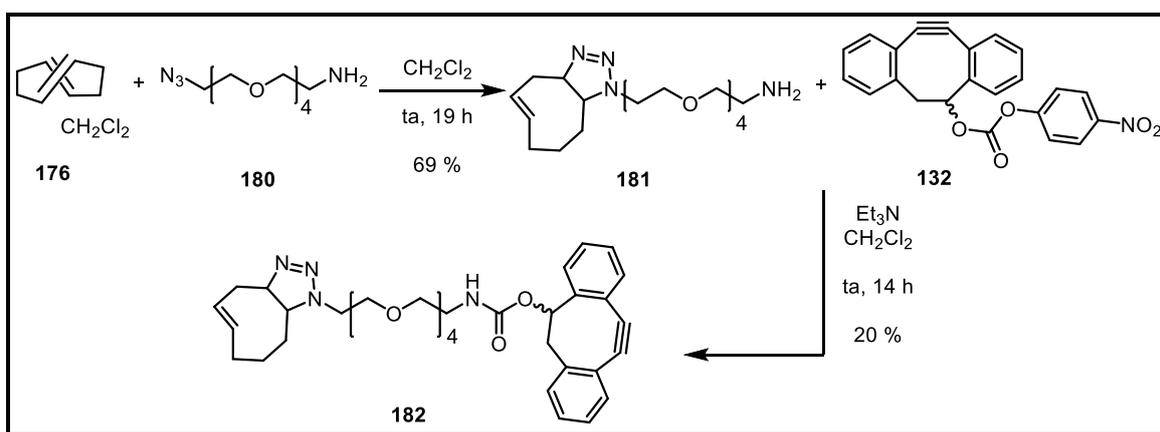


Schéma 25 : Dernières étapes de la synthèse du linker bifonctionnel **182**

Les essais de réticulation entre le PG et les AT qui utilisent ce linker sont actuellement en cours à l'IBS.

## II. *Microscopie à haute résolution pour observer le PG et les AT*

---

La concordance spatio-temporelle des biosynthèses du PG et des AT a été, d'abord, démontrée en microscopie conventionnelle.<sup>103</sup> Cependant, la résolution de cette technique de microscopie, limitée par la diffraction de la lumière, ne permet pas d'obtenir des images d'une précision maximale. La technique de microscopie à haute résolution dSTORM, détaillée dans la partie [III.4.3.2. Marquage en microscopie à haute résolution du PG avec AzDADA](#) du [Chapitre I](#), a récemment permis de décrire précisément la biosynthèse du PG chez *S. pneumoniae*.

Le but du projet présenté ici est d'utiliser certains des nouveaux outils moléculaires que nous avons développé afin de marquer en deux couleurs le PG et les AT et de décrire précisément les sites de biosynthèses du PG et des AT grâce à la microscopie à haute résolution dSTORM. Les expériences qui seront présentées ci-après ont été réalisées par nos collaborateurs de l'IBS.

### II.1. Marquages sans cuivre : DIBO-DA et AzCho

En dSTORM, les biologistes travaillent avec des cellules fixées, mortes. Il n'est donc, à priori, pas nécessaire d'utiliser spécifiquement des réactions click sans cuivre comme la SPAAC ou l'IEDDA, car la cytotoxicité du cuivre n'est plus un problème. Or, les premières tentatives effectuées avec l'AzDADA **67**, métabolisée par le PG puis marqué par le DBCO-AF647 et l'AlkCho **76**, métabolisée par les AT puis marqué par l'Az-AF532, ont montré que le cuivre n'était pas compatible avec le double marquage en deux couleurs du PG et des AT. En effet, dès que le Cu(I) est ajouté pour que le fluorophore réagisse par CuAAC avec l'AlkCho métabolisée, la qualité du marquage du PG, effectué par réaction SPAAC avec le DBCO-AF647 est fortement diminuée. Il a donc fallu utiliser une combinaison de dérivés et de fluorophores qui ne nécessite pas de cuivre pour marquer le PG et les AT en deux couleurs.

La combinaison des dérivés DIBO-DA **137** et AzCho **77** a donc été utilisée et le protocole qui a été utilisé est décrit en [Figure 55A](#) : le DIBO-DA **137** est mis en réaction en milieu aqueux pendant 5 minutes avec le fluorophore Az-AF647 puis ce milieu réactionnel est ajouté à une culture bactérienne avec l'AzCho **77**. Après 5 minutes de croissance à 37 °C, les bactéries sont fixées puis, le deuxième fluorophore, DBCO-AF532, est ajouté et le milieu de culture est laissé pendant 60 minutes supplémentaires, afin de laisser le temps aux fluorophores de réagir avec les dérivés. Après des lavages, les bactéries sont observées au microscope et les images montrées sur la [Figure 55B](#) sont obtenues. Ces images montrent avec précision les sites de biosynthèse du PG et des AT. Des études détaillées de

ces marquages et des images obtenues sont actuellement en cours et devraient permettre de conclure prochainement sur les similitudes et/ou les différences entre les sites de biosynthèse du PG et des AT.

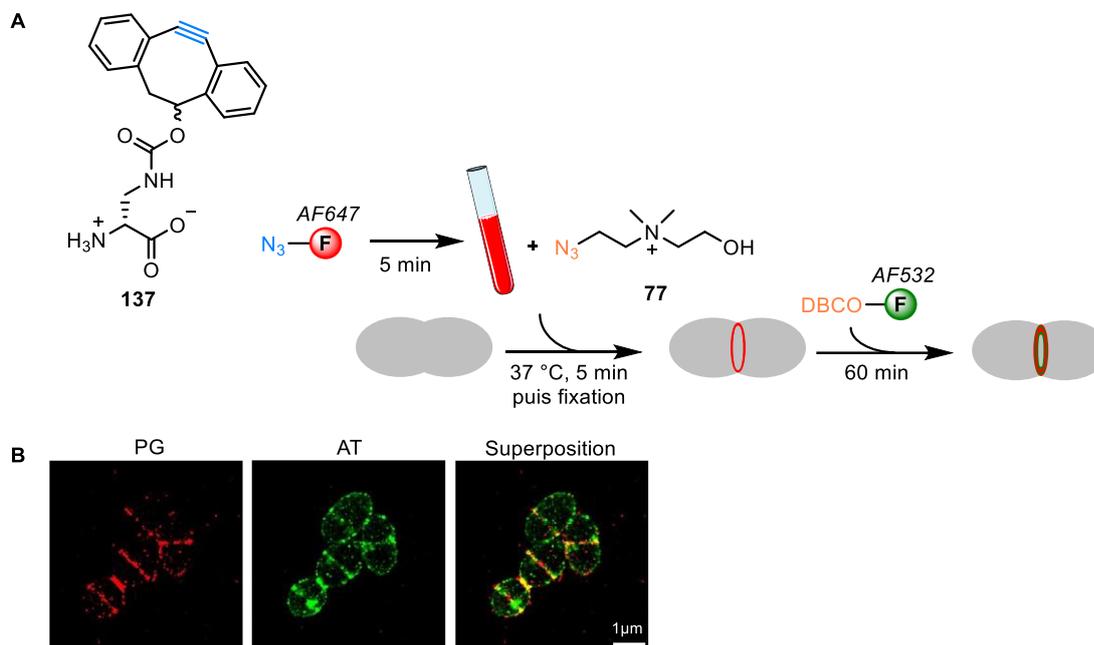


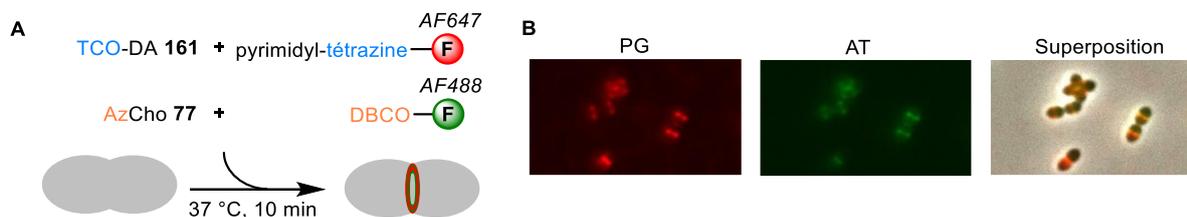
Figure 55 : Double marquage du PG et des AT avec le DIBO-DA **137** et l'AzCho **77**. A – Principe de l'expérience. / B – Images obtenues par microscopie à haute résolution dSTORM pour le marquage du PG (à gauche), des AT (au milieu) et la superposition du PG et des AT (à droite).

Cependant, ce protocole de marquage n'est pas idéal. En particulier, les deux réactions clicks mises en œuvre pour le marquage sont identiques. Il est donc probable que des réactions clicks parasites interviennent : entre les deux fluorophores, ou encore entre le DIBO-DA **137** et l'AzCho **77**. Lorsque ces réactions click interviennent en solution, avant métabolisation des dérivés, les produits formés sont éliminés par les lavages. Cependant, la réaction click entre le DIBO-DA et l'AzCho peut également se produire lorsque l'un des deux dérivés est métabolisé, voire lorsque les deux dérivés sont métabolisés. Il y a alors réticulation du PG et des AT, de la même façon que dans la partie [I.2.4. Mise en évidence de la réticulation avec marquage fluorescent : ajouts successifs d'AzCho \*\*77\*\* puis de DIBO-DA \*\*137\*\*](#) de ce chapitre. Afin d'améliorer les images en empêchant ces réactions clicks parasites, l'utilisation de réactions clicks orthogonales entre elles est plus souhaitable.

## [II.2. Tétrazine-Cho et DIBO-DA : premières images](#)

Le composé tétrazine-choline **115**, métabolisé par les AT et les composés tétrazine-DA **158** et TCO-DA **161**, incorporés sur le PG, pourraient permettre d'effectuer un double marquage du PG et des AT, en deux couleurs et avec deux réactions clicks différentes. Des tests préliminaires ont d'abord été

effectués en microscopie conventionnelle. Le protocole utilisé est décrit sur la [Figure 56A](#) et les images obtenues en microscopie conventionnelle sont montrées en [Figure 56B](#).



*Figure 56 : Double marquage du PG et des AT avec TCO-DA 161 et AzCho 77. A – Principe de l'expérience / B – Images obtenues en microscopie conventionnelle pour le marquage du PG (à gauche), des AT (au milieu) et la superposition du PG et des AT (à droite).*

Pour ce marquage, les dérivés TCO-DA **161**, AzCho **77** et les fluorophores pyrimidyl-tétrazine-AF647 et DBCO-AF488 sont ajoutés en même temps et les bactéries sont incubées pendant 10 minutes. Les marquages obtenus montrent les sites de biosynthèse du PG et des AT et, comme attendu, ces deux marquages sont superposés aux sites de division des bactéries. L'étape suivante est, maintenant, d'effectuer ce marquage avec une meilleure résolution, en utilisant la méthode dSTORM. Ce marquage sera prochainement effectué par nos collaborateurs à l'IBS.

## Conclusions et perspectives

---

Grâce aux nouveaux outils moléculaires développés pendant ce projet de thèse, deux applications principales ont été exploitées et ont été détaillées dans ce chapitre.

Premièrement, la métabolisation d'AzCho **77** par les AT et l'incorporation de DIBO-DA **137** sur le PG semblent mener, lorsqu'ils sont incorporés (respectivement métabolisés) simultanément, à une réticulation entre le PG et les AT. Cela a été démontré grâce à diverses expériences où ces composés sont mis en conditions de réticulation, suivi de diverses mesures d'intensité de fluorescence. En parallèle de ces tests, un linker bifonctionnel a été synthétisé, le composé **182**, qui pourrait permettre de relier le PG et les AT qui sont trop éloignés pour réticuler de manière directe.

Cependant, la fluorescence qui a été observée et qui nous permet d'aboutir à ces conclusions, correspond à des dérivés n'ayant pas réticulé. Nous n'avons, pour le moment, pas réussi à montrer cette réticulation de manière directe. Une méthode pour extraire et analyser les AT est en cours de développement à l'IBS, afin de prouver la modification structurale des AT, et ainsi la réticulation visée.

Par ailleurs, le comportement des bactéries n'est pas modifié par la réticulation telle qu'elle a été mise en œuvre jusqu'à présent. Nous savons que les D-Ala sont fortement éliminées par PBP3 et que les D-Ala modifiées ne persistent qu'en faible proportion sur le PG. Il est donc probable que la réticulation n'ait pas lieu en proportion suffisante afin d'observer un effet de croissance des bactéries. Pour pallier à cela, le DIBO-DADA **169** permettrait d'installer la fonction click sur le 4<sup>ème</sup> acide aminé, position non sensible à l'action d'élimination par PBP3. Ce dipeptide est en cours de tests, dans le but, d'abord, de déterminer s'il est métabolisé par *S. pneumoniae*. Si c'est le cas, il sera intéressant de le tester en conditions de réticulation en combinaison avec l'AzCho **77**.

La deuxième application développée concerne le double marquage du PG et des AT en haute-résolution obtenu par microscopie dSTORM. Ce double marquage a été effectué, en premier lieu, avec le DIBO-DA **137** et l'AzCho **77**, mais, les réactions clicks mises en œuvre ne sont pas orthogonales entre elles. Les dérivés de D-Ala ou de choline possédant une tétrazine ou un groupement TCO pourraient être utilisés pour améliorer ce double marquage. Cela a été effectué, pour l'instant en microscopie conventionnelle, avec le TCO-DA **161**.

Enfin, une autre amélioration possible est l'utilisation de dérivés de D-Ala-D-Ala, le DIBO-DADA **169** ou la tétrazine-DADA **170**. Cela permettrait d'augmenter la proportion de dérivés installés sur le PG et ainsi, probablement, d'améliorer la qualité des images.

# Chapitre V : Conception et synthèse de fluorophores

En complément des dérivés de cholines et de D-Ala synthétisés pendant ce projet de thèse, différents fluorophores ont été conçus et synthétisés pour divers objectifs de marquages. Dans ce chapitre, la conception de ces fluorophores sera détaillée et leurs synthèses seront présentées.

D'abord, une coumarine fluorogénique a été synthétisée et conjuguée à une D-Ala. Puis, plusieurs fluorophores ont été synthétisés à partir de l'hétérocycle nitrobenzosélénadiazole, dans le but de développer un système de détection de bactéries par marquage fluorogénique. Enfin, la synthèse d'une éosine avec une fonction azoture a été effectuée, dans le but de concevoir une méthode pour observer les AT de *S. pneumoniae* en microscopie électronique.



## I. Coumarines

Les coumarines sont très présentes dans la nature, notamment dans les plantes. Le cycle coumarine seul, sans substituant, ne présente pas ou peu de fluorescence. Cependant, lorsque la coumarine est substituée, notamment en position 7 par un hétéroatome à effet électrodonneur, une fluorescence, plus ou moins forte selon le substituant, est observée.<sup>138</sup>

Une grande variété de coumarines a aujourd'hui été développée, avec des longueurs d'ondes d'émission pouvant s'étaler sur tout le spectre du visible et une fluorescence allant du bleu au rouge.<sup>138-140</sup> Cependant, les coumarines les plus simples et les plus communes, notamment celles substituées par un phénol ou une amine en position 7, émettent dans le bleu, avec une longueur d'onde d'émission comprise entre 410 nm et 490 nm.

La fluorescence de chromophores peut être modulée par différents processus photophysiques qui peuvent être classés en différentes catégories : les processus de transfert d'électrons (Photo-induced Electron Transfer (PET)<sup>141</sup>), les processus de transfert de charges (Intramolecular Charge Transfer (ICT)<sup>142</sup>, Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT)<sup>143</sup> et Metal-Ligand Charge Transfer (MLCT)<sup>144</sup>) et les processus de transfert d'énergie (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)<sup>145</sup>, Through Bond Energy Transfer (TBET)<sup>146</sup>).<sup>147</sup>

Ici, nous nous concentrerons sur les processus ICT et TICT, sur lesquels nous avons basé la conception des coumarines qui seront présentées. Tout d'abord, les chromophores fonctionnant grâce au processus ICT contiennent une partie riche en électrons, qui constitue la partie donneuse, et une partie pauvre en électrons, qui constitue la partie acceptrice. L'absorption de lumière, à une longueur d'onde déterminée, permet la photoexcitation du chromophore qui se place dans un état excité, appelé état ICT, différent de l'état fondamental (Figure 57). Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'un transfert de charge de la partie donneuse à la partie acceptrice et conduit à l'émission de photons, et donc à une fluorescence à une longueur d'onde précise.<sup>148</sup>

Une variante de l'état ICT est l'état TICT. Cet état existe lorsque le chromophore est excité par un mécanisme incluant une rotation de la partie donneuse du chromophore. Par exemple, dans des conditions où la coumarine possède une amine en position 7 et que cette amine peut effectuer une rotation et se placer dans un état TICT, différent de l'état ICT, la fluorescence est grandement diminuée car le retour à l'état fondamental se produit sans émission de photon.<sup>149</sup> En particulier, dans des solvants polaires tels que l'eau, cet état TICT serait plus fortement stabilisé, expliquant la fluorescence

plus faible de ces composés dans les solvants polaires (Figure 57).<sup>148</sup> Ainsi, plusieurs stratégies ont été développées dans le but de favoriser l'état ICT et d'empêcher l'état TICT.

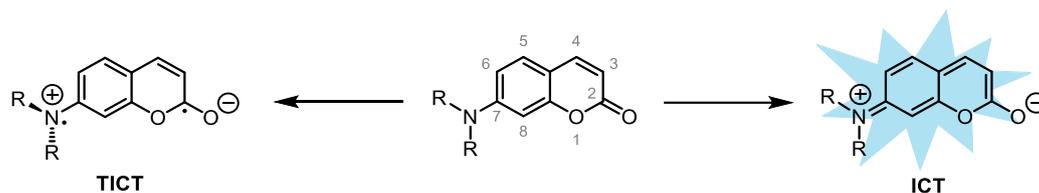


Figure 57 : 7-aminocoumarine excitée sous forme ICT (Intramolecular Charge Transfer) et TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer)

Tout d'abord, Xu *et al.* ont démontré qu'empêcher cet état TICT est possible en contraignant l'azote dans un cycle de petite taille, aziridine ou azétidine.<sup>150</sup> Par la suite, Guo *et al.* ont montré qu'il était également possible d'empêcher l'état TICT en ajoutant un groupement électroattracteur par effet inductif (-I) comme une sulfone ou un oxide de phosphine.<sup>149</sup> L'augmentation de la fluorescence émise par les coumarines avec ces deux modifications a été démontrée expérimentalement, cependant, à notre connaissance, le mécanisme exact permettant d'expliquer que l'état ICT soit favorisé en présence d'un cycle de petite taille ou d'un groupement électroattracteur n'a pas été démontré.

En outre, la présence d'un azoture en position 3 sur la coumarine rend la coumarine non-fluorescente : l'azote en  $\alpha$  du cycle est riche en électrons et vient perturber le système donneur-accepteur du fluorophore.<sup>134</sup> La réaction click entre cet azoture et une triple liaison, tendue ou non, permet donc de restaurer la fluorescence, le triazole formé étant pauvre en électrons. Les composés de ce type sont appelés des composés fluorogéniques : non-fluorescents (ou peu fluorescents) au départ, ils deviennent fluorescents après réaction click, CuAAC ou SPAAC (Figure 58).

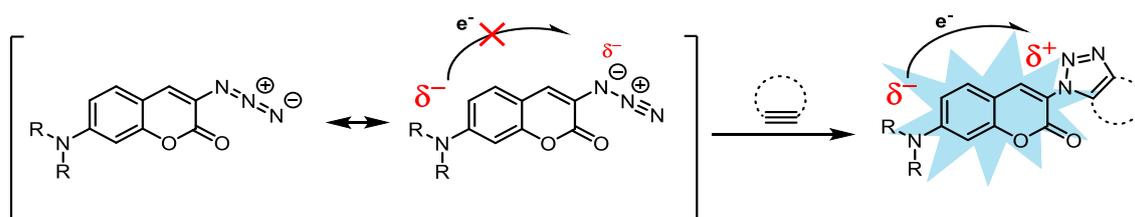


Figure 58 : Fluorogénicité de la coumarine permise par l'azoture situé en position 3

L'azido-coumarine **183** (Figure 59), décrite par Wang *et al.*<sup>134</sup> est l'azido-coumarine utilisée au laboratoire lorsque nous avons besoin d'un composé fluorogénique. Elle fluoresce de couleur bleue et sa longueur d'onde d'émission est de 489 nm.<sup>134</sup> Cependant, l'amine non contrainte en position 7 favorise l'état TICT et limite la fluorescence de ce composé. Ainsi, nous souhaitons créer un nouveau composé fluorogénique avec une plus grande fluorescence, en contraignant l'azote dans un cycle de petite taille, ou, en ajoutant un groupement électroattracteur, en l'occurrence une sulfone. De plus,

l'ajout d'une fonction ester sur ce nouveau fluorophore permettrait de le conjuguer facilement à différentes biomolécules. Ainsi, les composés **189** et **199** ont été conçus (Figure 59) et leur synthèse a été explorée.

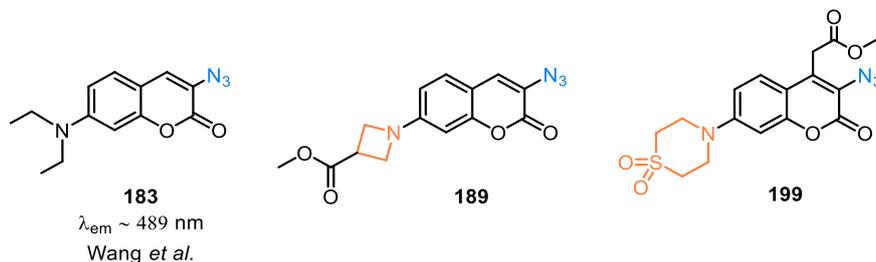


Figure 59 : Azido-coumarine **183** décrite par Wang *et al.*<sup>134</sup> et azido-coumarines **189** et **199** conçues pour avoir une plus grande fluorescence que l'azido-coumarine **183** et pouvoir être conjuguées à des biomolécules

La synthèse de la coumarine **189** a d'abord été tentée avec la voie de synthèse décrite sur le Schéma 26. L'acide carboxylique **184** est tout d'abord estérifié par le méthanol en présence de chlorure de triméthylsilyle pour former l'ester méthylique **185** qui possède un cycle azétidine, avec un rendement de 80 %. Ensuite, le composé **186** est formé par substitution nucléophile aromatique du composé **185** avec le 4-fluoro-2-hydroxybenzaldéhyde avec un rendement de 41 %. Plusieurs conditions de réaction ont été expérimentées à cette étape, sans pour autant réussir à obtenir un rendement supérieur à 41 % : plusieurs solvants ont été testés (DMSO, dioxane, DMF, pyridine), la DIPEA a été remplacée par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et des conditions de réaction au micro-ondes pendant une durée allant de 20 minutes à 1 h 30 ont été testées. Le meilleur rendement a été obtenu dans le DMSO, avec de la DIPEA, à 100 °C et pendant 2 h, sans micro-ondes.

L'étape suivante consiste en la formation de l'azido-coumarine par la condensation de Knoevenagel entre l'hydroxybenzaldéhyde **186** et le nitroacétate d'éthyle. Wang *et al.* ont décrit cette réaction pour la formation de la coumarine **183** en milieu acido-basique, avec de la pipéridine et de l'acide acétique. Cependant, lorsque ce protocole est appliqué avec l'hydroxybenzaldéhyde **186**, la coumarine n'est pas obtenue et l'ester présent sur ce composé est saponifié. La L-proline a finalement été utilisée à la place de la pipéridine et de l'acide acétique et, après recristallisation, un rendement de 86 % a pu être obtenu. La position 4 de la coumarine est un accepteur de Michael et le caractère très électroattracteur du groupement nitro en position 3 renforce l'électrophilie de cette position 4. Ainsi, sur ce type de coumarine, les colonnes de purification sur silice sont évitées au maximum car la silice, par son caractère nucléophile, dégrade la coumarine.

Ensuite, la réduction du groupement nitro en amine est effectuée. D'abord tentée en suivant le protocole de Wang *et al.* avec SnCl<sub>2</sub>,<sup>134</sup> des rendements faibles ont été obtenus car la majeure partie

du produit était saponifiée lors du traitement basique. Finalement, cette réduction a été effectuée par hydrogénation catalytique et le composé **188** a été obtenu avec un rendement de 95 %.

Enfin, la dernière étape est la formation de l'azoture pour obtenir le composé **189**. Les conditions de réactions décrites par Wang *et al.*<sup>134</sup> ont de nouveau été testées et ont formé un produit de masse différente à celle souhaitée et qui n'a pas pu être identifié. Il est probable que la fragilité de l'ester ou la présence de l'accepteur de Michael soient la cause de l'impossibilité d'obtenir ce produit.

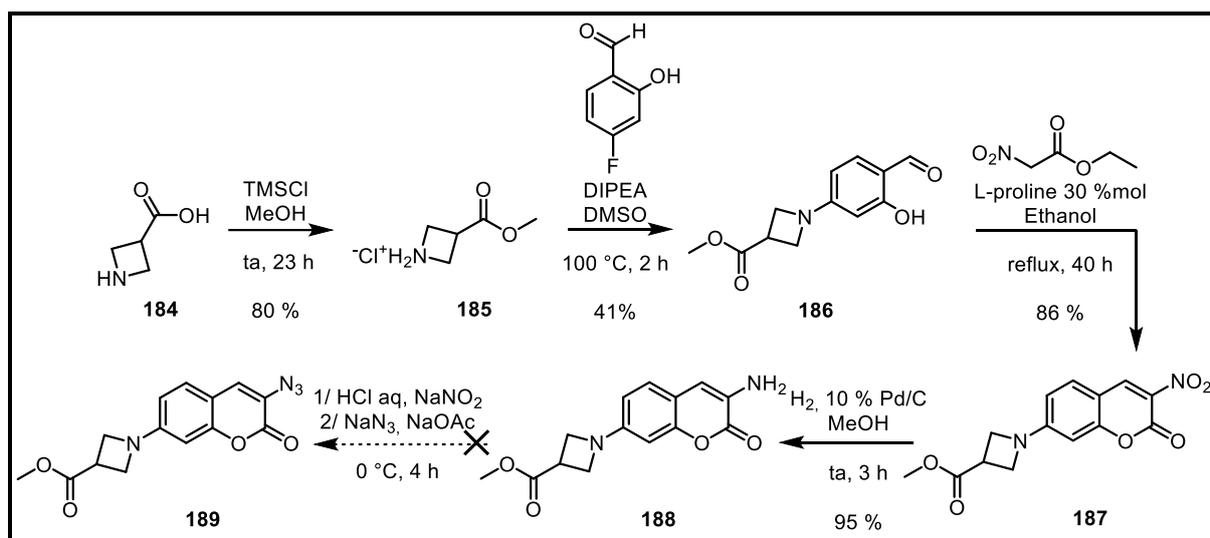


Schéma 26 : Voie de synthèse 1 pour la synthèse de l'azido-coumarine **189**

Devant les difficultés rencontrées lors de cette voie de synthèse, elle a été abandonnée et une seconde voie de synthèse a été testée et est décrite sur le Schéma 27. L'objectif est, cette fois, d'ajouter l'ester, qui peut être fragile, à la dernière étape. La coumarine **121**, dont la synthèse est déjà décrite sur le Schéma 12, est utilisée et mise en réaction avec de l'anhydride triflique pour former le triflate de la coumarine **190** avec un rendement de 82 %. Ensuite, un couplage de Buchwald-Hartwig a été tenté entre le composé **190** et le composé **185**. Ce couplage est décrit par Zhao *et al.* avec une coumarine qui ne possède pas l'azoture en position 3 et qui possède un méthyl en position 4.<sup>151</sup> Le protocole a été reproduit en remplaçant XPhos par JohnPhos, un ligand phosphine similaire disponible au laboratoire. Ce couplage n'a pas fonctionné avec la coumarine **190** et le composé **189** n'a pas été obtenu. Il semble que les conditions de couplages utilisées soient favorables à l'élimination du proton de l'azétidine situé en  $\alpha$  de l'ester.

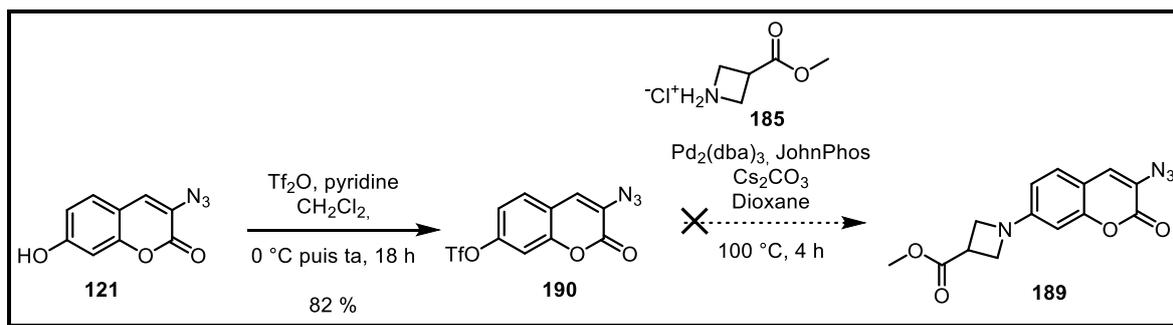


Schéma 27 : Voie de synthèse 2 pour la synthèse de l'azido-coumarine **189**

Deux problèmes majeurs se posent pour la synthèse de la coumarine **189** : l'ester est fragile, probablement dû à l'azétidine, cycle tendu, auquel il est accroché. De plus, l'accepteur de Michael en position 4 est également une source d'instabilité de cette coumarine. Pour résoudre ce problème, la coumarine **199** a été conçue. Elle possède les mêmes propriétés que la coumarine **189** : la sulfone remplace l'azétidine et permet une augmentation de la fluorescence, et l'ester est, cette fois, en position 4, ce qui élimine le problème de l'accepteur de Michael. La synthèse de cette coumarine est présentée sur le Schéma 28.

Tout d'abord, la coumarine **193** est synthétisée par la réaction de Pechmann à partir d'acide citrique **191** et de résorcinol **192**<sup>152</sup> et a été obtenue avec un rendement de 70 %. Ensuite l'estérification de l'acide carboxylique est effectuée avec du chlorure de thionyle et du méthanol<sup>153</sup> pour former la coumarine **194** avec un rendement de 87 %. L'étape suivante consiste en la bromation de la coumarine en position 3, dans le but, ensuite, de former l'azoture. Cette bromation a d'abord été tentée directement sur le composé **194** avec diverses méthodes (NBS, Br<sub>2</sub>, tribromure de pyridinium), mais le composé monobromé **195** n'a pas pu être isolé en quantité suffisante. La régiosélectivité de la bromation en position 3 n'était pas suffisante et les positions 6 et 8 se retrouvaient également bromées. Pour résoudre ce problème, le phénol a été protégé par un groupement protecteur encombrant, le triisopropylsilyle (TIPS), pour former le composé **196** avec un rendement de 90 %. Cette fois, la bromation a pu avoir lieu uniquement en position 3 et le composé **197** a été obtenu avec un rendement de 70 %. Cependant, la substitution du brome par l'azoture pour former le composé **198** n'a ensuite jamais pu être réussie.

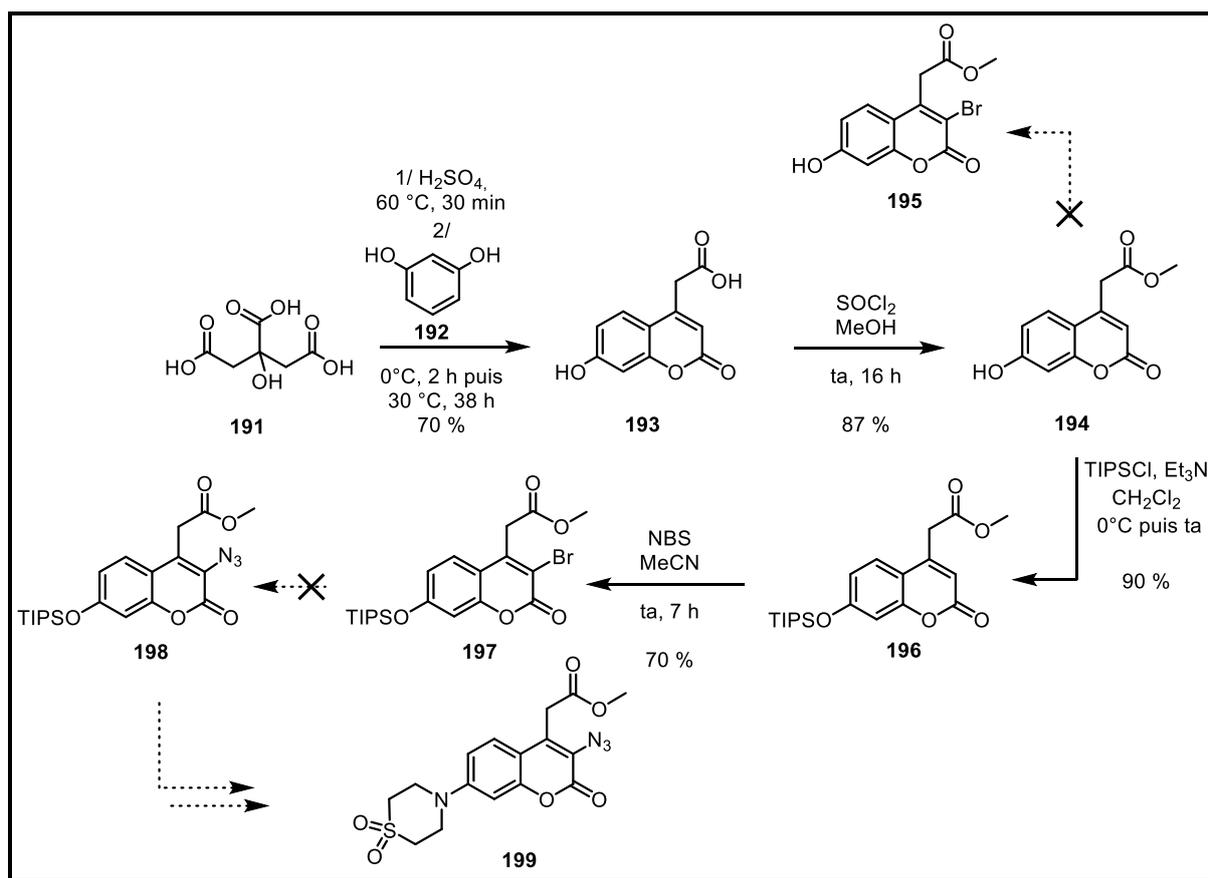


Schéma 28 : Voie de synthèse pour la synthèse de l'azido-coumarine 199

Devant ces problèmes rencontrés pour la synthèse des coumarines **189** et **199**, l'objectif d'augmenter la fluorescence en empêchant l'état TICT par ajout de l'azétidine ou d'une sulfone a été abandonné. La coumarine **202** a donc été synthétisée, avec un ester activé par le groupement NHS. Cette coumarine a ensuite été conjuguée à l'acide aminé **153** pour former la coumarine-DA **204** (Schéma 29).

Premièrement, la coumarine **200** est synthétisée selon la procédure décrite par Wong *et al.*<sup>154</sup> L'acide carboxylique est ensuite déprotégé avec du triflate de triméthylsilyle en présence de lutidine pour former le composé **201** sous forme de sel de lutidine. Le composé **201** est obtenu en mélange avec de la lutidine, encore présente en excès après purification sur colonne. L'acide carboxylique est directement activé par un groupement NHS pour former la coumarine activée **202** et un rendement de 65 % est obtenu pour la combinaison de ces deux étapes.

Cette coumarine est ensuite couplée à l'acide aminé **153**, dont l'amine est protégée par un groupement Fmoc. Le groupement Fmoc est choisi à la place du groupement Boc car la coumarine possède une amine tertiaire. Ainsi, la déprotection en milieu acide pour retirer le Boc protonerait cette amine tertiaire. Le couplage de la coumarine à l'acide aminé est effectué avec  $K_2CO_3$  et un rendement

de 96 % est obtenu. Contrairement aux réactions similaires précédentes (formation des composés **154** et **160**) qui sont effectuées avec de la triéthylamine comme base, du  $K_2CO_3$  est ici utilisé. En effet, la triéthylamine a d'abord été utilisée pour effectuer la réaction sur la nuit, mais la coumarine a été dégradée, probablement à cause de la nucléophilie de la triéthylamine.

Pour finir, la déprotection de l'amine a d'abord été tentée selon la procédure utilisée précédemment pour éliminer le groupement Fmoc, avec la résine de pipéridine. Cependant, la coumarine a été dégradée lors de cette réaction et le produit n'a pas été obtenu. Finalement, cette déprotection a été effectuée avec 2 équivalents de pipéridine et le produit **204** a été obtenu avec un rendement de 73 %. Cette coumarine-DA est actuellement en cours d'évaluation dans le but de déterminer, en premier lieu, l'efficacité de ce dérivé de D-Ala comme outil de marquage.

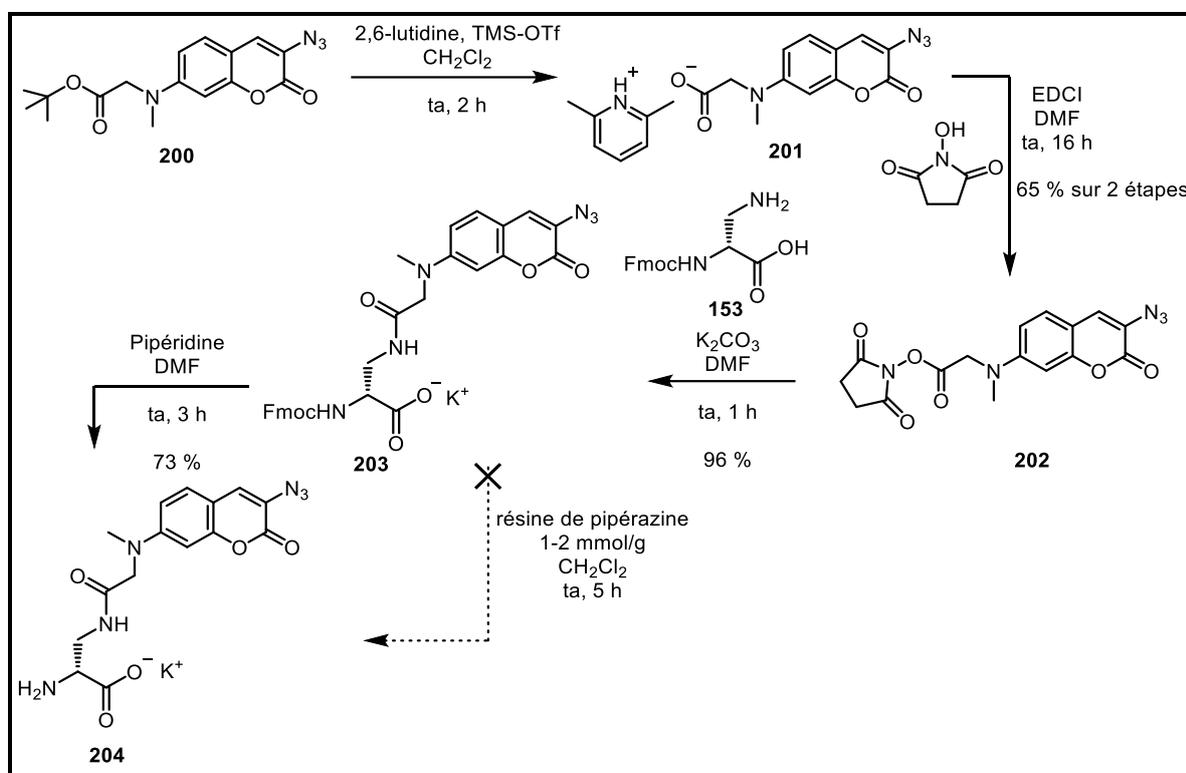


Schéma 29 : Synthèse de l'azido-coumarine **202** et de l'azido-coumarine-DA **204**

## II. Nitrobenzosélénadiazole (NBD-Se)

La fluorescence émise par le motif nitrobenzodiazole (NBD) a été décrite pour la première fois par Ghosh *et al.* en 1968.<sup>155</sup> En effet, ces chercheurs étudiaient au départ cet hétérocycle pour une activité thérapeutique (anti-leucémique), mais ils ont découvert que les dérivés possédant une amine en position 7 de l'hétérocycle étaient fortement fluorescents (Figure 60). Cela est dû à l'effet électrodonneur de l'amine, qui transfère ses électrons à la partie acceptrice, le groupement nitro. Les premières sondes fluorescentes développées par Ghosh *et al.* ont une longueur d'onde d'émission comprise entre 485 et 525 nm.<sup>155</sup> Cette longueur d'onde d'émission dépend de l'amine substituée en position 7 et du solvant considéré. Ces sondes fluorescentes sont donc principalement de couleur verte.

A la suite de la publication de ces travaux, le motif NBD a été grandement utilisé pour la conception de diverses sondes fluorescentes,<sup>156,157</sup> avec une fluorescence allant du vert au jaune.<sup>158</sup> Cette sonde possède plusieurs atouts, notamment une petite taille et une bonne perméabilité des membranes.

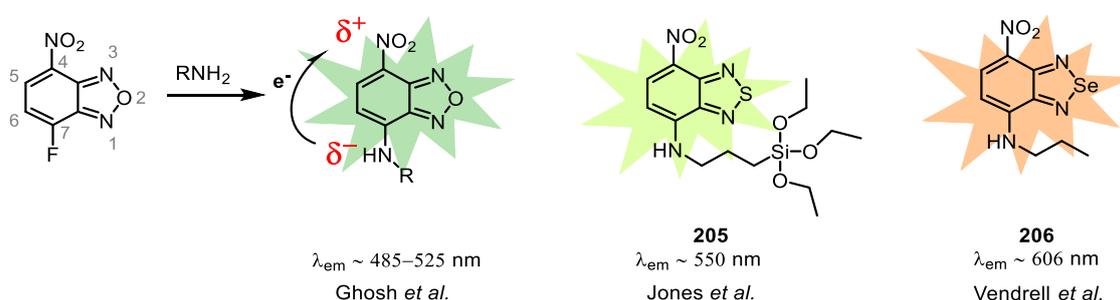


Figure 60 : Différents nitrobenzodiazoles développés comme sondes fluorescentes

Récemment, des modifications ont été apportées à cet hétérocycle, dans le but de concevoir de nouveaux fluorophores. Premièrement, Jones *et al.*<sup>159</sup> ont substitué l'atome d'oxygène en position 2 du NBD par un atome de soufre pour former le composé **205** (Figure 60) ou par un atome de sélénium (composé non représenté). Le but de ces travaux a été de concevoir un nouveau fluorophore, de petite taille et capable de scintiller, dans le but de l'utiliser pour la microscopie par super-localisation comme le STORM ou le PALM. Pour cette application, le composé soufré **205** s'est révélé plus prometteur que les autres hétérocycles, avec l'oxygène ou le sélénium à la place du soufre. Cependant, une diminution de l'intensité de fluorescence, traduite par une diminution du rendement quantique d'un facteur 4, a été observée pour ses nouvelles sondes.<sup>159</sup>

Par ailleurs, Vendrell *et al.* ont également conçu de nouvelles sondes fluorescentes dérivées du NBD, dans le but d'élargir le spectre de fluorescence de ces fluorophores.<sup>160</sup> En effet, le NBD fluoresce principalement dans le vert et est incompatible avec l'utilisation d'autres sondes qui fluorescent également dans le vert, notamment les dérivés de GFP. L'oxygène en position 2 a donc été remplacé par divers atomes ou groupes d'atomes : l'azote, le soufre, le sélénium ou encore par un groupement diméthyle géminale. Ces nouvelles sondes fluorescentes ont des longueurs d'onde d'émission comprises entre 460 et 650 nm et parcourent donc le spectre du visible, du bleu au rouge. En particulier, le composé **206** (Figure 60), où l'oxygène, substitué par le sélénium, fluoresce de couleur orange avec une longueur d'onde d'émission de 606 nm.

Par la suite, l'hétérocycle NBD-Se a été conjugué à un acide aminé pour former l'acide aminé de configuration D **207** (Figure 61) décrit par Vendrell *et al.*<sup>161</sup> Il a ainsi été démontré dans ces travaux que l'incorporation de ce composé **207** dans le PG de la bactérie *E. coli* permet son marquage et son observation par microscopie à fluorescence.

Cependant, l'effet fluorogénique de ces sondes fluorescentes n'a été décrit qu'après, dans une publication de 2023 de Vendrell *et al.*<sup>162</sup> Cette publication décrit les acides aminés de configuration L représentés sur la Figure 61B. Il a été démontré que les acides aminés pour lesquels l'atome X est un sélénium ou un soufre présentent une émission de fluorescence fortement augmentée en milieu apolaire (dioxane) par rapport à un milieu polaire (eau). De même, un dérivé spécifique du composé **208**, capable de s'insérer dans des liposomes composés de phosphatidylcholine (polaire) a été synthétisé. Ainsi, avec ce composé, la fluorescence mesurée dans le PBS en absence de ces liposomes (milieu aqueux « apolaire ») est 44 fois supérieure à la fluorescence mesurée en présence des liposomes (milieu aqueux « polaire »).<sup>162</sup>

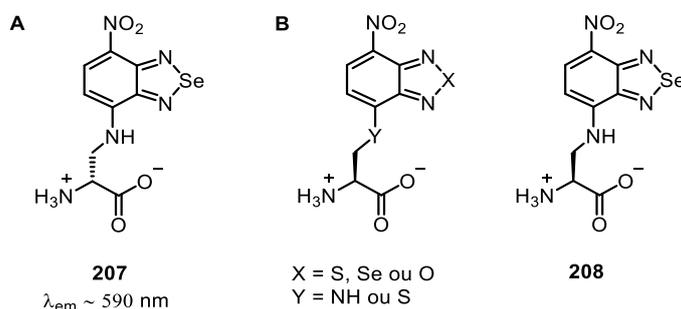


Figure 61 : A – Structure de l'acide aminé NBD-Se-D-Ala **207** / B – Structure des acides aminés fluorogéniques, en particulier NBD-Se L-Ala **208**, présentant les meilleures propriétés optiques

Basé sur ces résultats, nous nous sommes intéressés au fluorophore NBD-Se évoqué ci-dessus dans le but de synthétiser un composé fluorogénique incorporé sur le PG et un autre comportant un azoture.

Premièrement, l'acide aminé **207** a été synthétisé (Figure 61). De la même manière que Vendrell *et al.*, l'objectif est d'incorporer ce composé sur le PG de *S. pneumoniae*, un milieu encombré, restreint et moins polaire que le milieu extracellulaire. Ainsi, l'incorporation de ce composé devrait permettre une augmentation de la fluorescence. Une application de ce concept serait de développer une méthode simple et rapide de détection de bactéries par fluorescence, qui, profitant de l'effet fluorogénique du composé, ne nécessite pas de lavage.

Par ailleurs, le composé **214** a également été synthétisé (Figure 62). Ainsi, l'objectif est de contraindre ce composé à un milieu apolaire par réaction click, CuAAC ou SPAAC. Ainsi, une application similaire à celle décrite au-dessus pour le composé **207** peut être développée en utilisant un marquage en deux étapes au lieu d'un marquage direct : l'acide aminé DIBO-DA **137** est incorporé sur la bactérie, suivi de la réaction click avec le composé **214**, ce qui restreint ce composé à rester dans un milieu plus hydrophobe et permet la fluorescence. Ce composé étant très peu soluble en solvant aqueux, le composé **215**, soluble dans l'eau, a également été synthétisé.

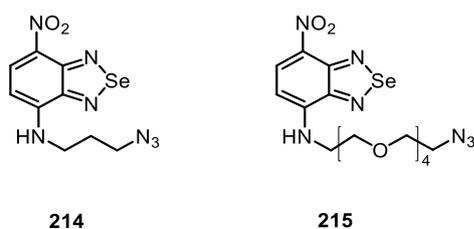


Figure 62 : Nouveaux composés, dérivés de NBD-Se, synthétisés dans ce projet

Les deux premières étapes de synthèse des composés **207**, **214** et **215** sont communes et sont représentées sur le Schéma 30. D'abord, l'hétérocycle est formé par action de dioxyde de sélénium sur le 3-fluorobenzen-1,2-diamine **209** pour former le composé **210** avec un rendement de 85 %. Ensuite, une nitration en conditions acides permet d'obtenir le composé **211** avec un rendement de 85 %.

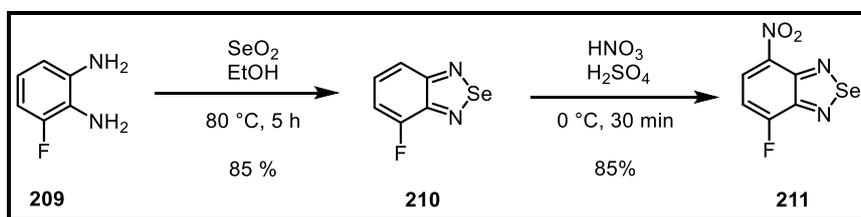
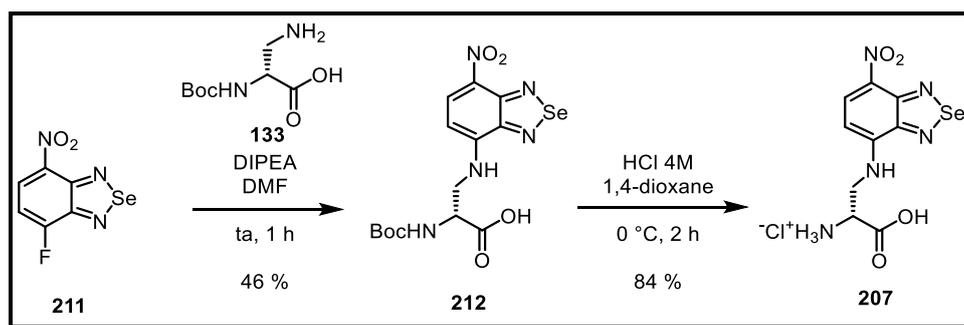
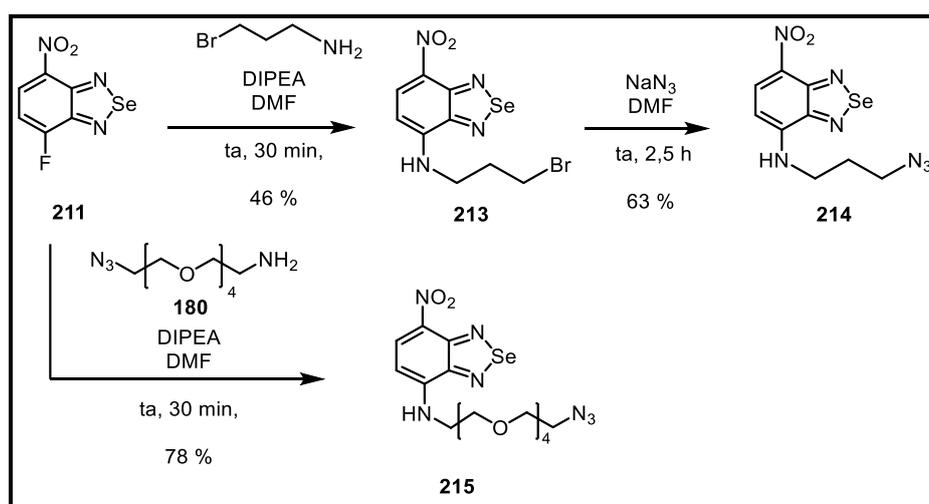


Schéma 30 : Synthèse de l'hétérocycle NBD-Se

La synthèse du composé **207** est ensuite représentée sur le Schéma 31. Premièrement, le composé **211** est couplé à l'acide N $\alpha$ -Boc-D-2,3-diaminopropionique **133** pour former le composé **212** avec un rendement de 46 % et ce composé est ensuite mis en conditions acides pour déprotéger l'amine et obtenir le composé **207** avec un rendement de 84 %.

Schéma 31 : Synthèse du composé NBD-Se-DA **207**

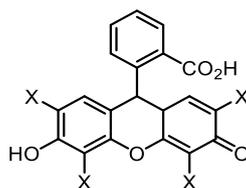
Pour finir, les composés **214** et **215** sont synthétisés selon la voie de synthèse représentée sur le Schéma 32. Tout d'abord, le composé **214** est formé en deux étapes : substitution nucléophile aromatique du fluor par la 3-bromopropanamine pour former le composé **213** avec un rendement de 46 %, puis, substitution nucléophile du brome par l'azoture pour former le composé **214** avec un rendement de 63 %. Le composé **215**, quant à lui, est formé en utilisant le linker PEG **180**, dont la synthèse est présentée antérieurement. Ainsi, l'amine de ce linker substitue le fluor du cycle aromatique avec un rendement de 78 %.

Schéma 32 : Synthèse des composés fluorogéniques **214** et **215**

Le marquage du PG de *S. pneumoniae* pour l'application de détection évoquée précédemment avec les composés fluorogéniques **207** et **215** est actuellement en cours avec des collaborateurs du DPM. Le marquage avec le composé **214** a, cependant, été abandonné, dû à la faible solubilité de ce composé dans l'eau. Un premier résultat encourageant a été obtenu avec le composé **207** par cytométrie en flux : la fluorescence d'un échantillon contenant les bactéries qui ont poussé pendant 10 minutes avec le composé **207** est plus forte que la fluorescence obtenue avec l'échantillon de contrôle, ne contenant que le composé **207**, sans bactérie. Ce résultat est cependant à confirmer par des expériences ultérieures.

### III. Eosine

L'éosine est une sonde fluorescente qui dérive de la fluorescéine (Figure 63, composé **216**) par l'ajout de bromes sur les cycles aromatiques. En particulier, l'éosine Y (Figure 63, composé **217**) est la plus utilisée, et est un dérivé tétrabromé de la fluorescéine. En plus d'être de bons fluorophores, les composés de la famille de la fluorescéine (éosine, érythrosine, rose Bengale) présentent des propriétés photocatalytiques et sont beaucoup utilisés en synthèse organique comme catalyseurs rédox activés par la lumière.<sup>163-165</sup>



**216** : X = H : Fluorescéine  
**217** : X = Br : Eosin Y

Figure 63 : Structure chimique de la fluorescéine (composé **216**) et de l'éosine Y (composé **217**)

Dans le domaine de la biologie, l'éosine peut être utilisée comme photooxydant pour permettre l'observation de phénomènes biologiques par microscopie électronique. Les techniques de fluorescence classiques, dont il a été question jusqu'à présent dans ce manuscrit, ne sont pas applicables à la microscopie électronique. Afin de contourner cela, Maranto a développé une méthode en 1982,<sup>166</sup> qui consiste à utiliser une sonde fluorescente capable d'oxyder du 3,3-diaminobenzidine (DAB) en un polymère insoluble et visible en microscopie électronique après ajout d'un agent de contraste tel qu' $\text{OsO}_4$ . Maranto a d'abord utilisé le jaune Lucifer, puis, Ellisman *et al.* ont rapporté, en 1994, l'utilisation de l'éosine pour l'observation de protéines par microscopie électronique.<sup>167</sup> L'éosine Y est capable de générer du Reactive Oxygen Species (ROS), et plus particulièrement de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  à partir d'oxygène  $\text{O}_2$ , permettant la polymérisation du DAB. Cette technique est depuis utilisée pour l'imagerie par microscopie électronique de protéines.

Le développement de la chimie click et de la chimie bioorthogonale a récemment permis d'ouvrir la microscopie électronique à l'imagerie de biomolécules non-protéiques comme les glycanes, acides nucléiques ou lipides. En particulier, Tsien *et al.*<sup>168</sup> ont modifié des sondes fluorescentes spécifiques permettant de générer du ROS, en ajoutant un groupement fonctionnel bioorthogonal. Ces sondes fluorescentes peuvent réagir par réaction click avec des dérivés de biomolécules incorporés métaboliquement par les cellules ou bactéries considérées. Les sondes fluorescentes se retrouvent alors liées de façon covalente à la biomolécule considérée et l'ajout de DAB suivi de l'irradiation à la

lumière permet la génération de ROS qui polymérise le DAB. Divers fluorophores ont été testés à cette occasion, dont l'éosine et la fluorescéine, mais aussi des dérivés de rhodamines, de cyanines, de thiazines et de phthalocyanines.<sup>168</sup> Parmi ces fluorophores, l'éosine a permis d'obtenir les meilleures images pour le marquage d'ADN en cours de répllication de cellules HeLa, effectué grâce à la réaction CuAAC entre un dérivé de thymidine, modifié avec un alcyne et incorporé dans l'ADN, et l'éosine, modifiée avec un azoture. Ainsi, cette étude a permis, entre autres, le marquage de phospholipides membranaires de cellules HeLa par métabolisation de l'AzCho **77**, ainsi que le marquage du PG de *L. monocytogenes* par incorporation d'AlkDA **58**.

Ainsi, nous souhaitons nous inspirer de ces travaux afin d'observer les AT de *S. pneumoniae* en microscopie électronique dans le but d'élargir les techniques de microscopie avec lesquelles nous sommes capables d'observer les AT. Le protocole conçu pour observer ces AT en microscopie électronique est décrit dans la Figure 64. Dans un premier temps, nous souhaitons observer la totalité des AT par un marquage long, sur plusieurs cycles de division cellulaire. Après métabolisation de la choline modifiée **76** tout le long des AT, un fluorophore N<sub>3</sub>-éosine est ajouté pour réagir par réaction CuAAC avec l'alcyne métabolisé par les AT. Puis, le DAB est ajouté et une irradiation à 510 nm permet de générer l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub> et de faire polymériser le DAB. Après traitement à l'OsO<sub>4</sub>, les bactéries peuvent être analysées en microscopie électronique pour observer les AT.

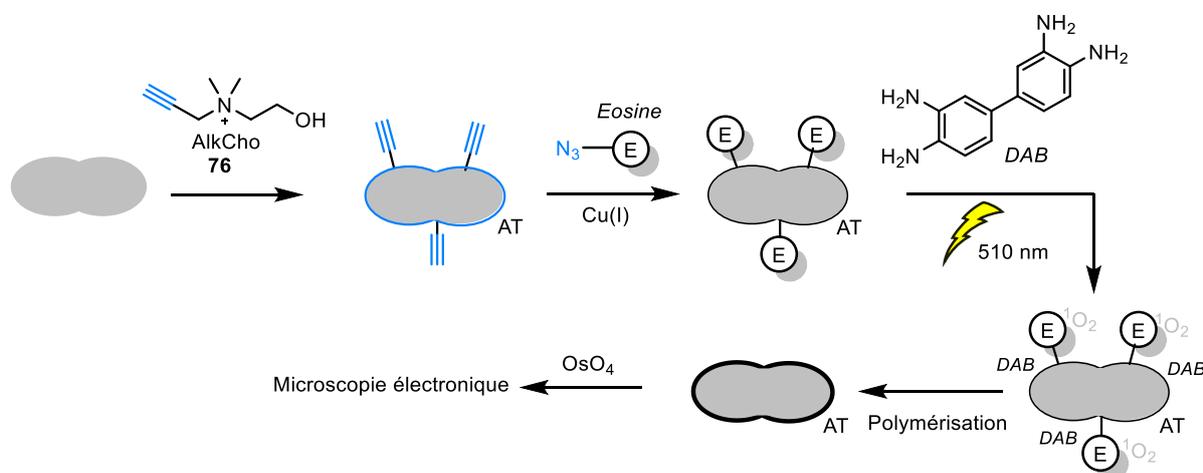


Figure 64 : Protocole utilisé pour marquer les AT et les observer en microscopie électronique

Le fluorophore utilisé par Tsien *et al.* est composé de l'éosine à laquelle l'azoture est lié par une chaîne alkyle de trois carbones.<sup>168</sup> Le fluorophore **219** que nous avons synthétisé est différent car nous avons souhaité augmenter la solubilité dans l'eau de l'éosine par l'ajout du groupement PEG.

Ainsi, la synthèse de ce fluorophore a été effectuée en une seule étape de synthèse décrite sur le Schéma 33 à partir de l'éosine **218**, commerciale. La réaction s'effectue entre le groupement

isothiocyanate du composé **218** et l'amine du composé PEG **180** pour former le composé **219** avec un rendement de 73 %.

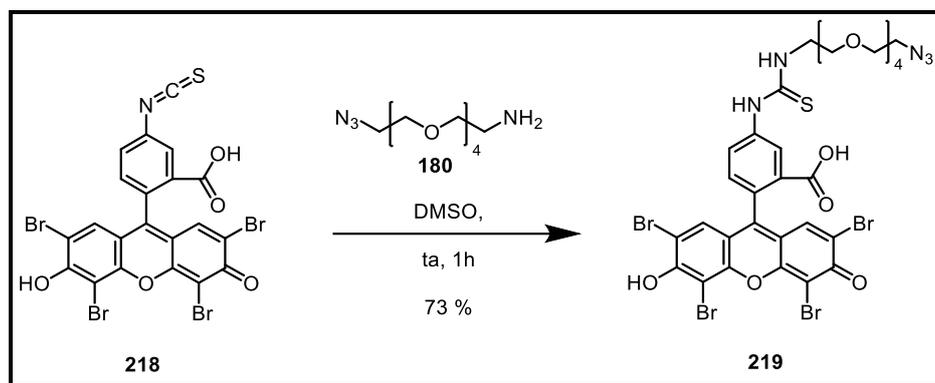


Schéma 33 : Synthèse de l'éosine-N<sub>3</sub> **219**

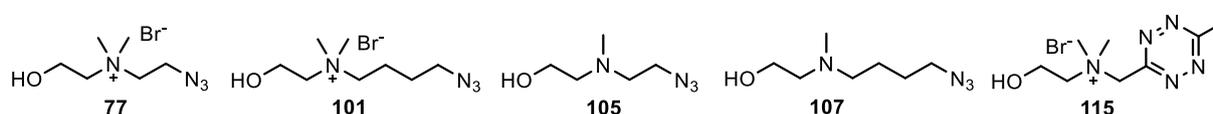
Le protocole décrit en Figure 64 et qui a pour but d'observer les AT en microscopie électronique à l'aide du fluorophore **219** est actuellement en cours de mise au point chez nos collaborateurs de l'IBS.

## Conclusion générale



Les différents projets développés pendant cette thèse ont eu pour objectif commun le développement et la synthèse de nouveaux composés métabolisés par le PG ou les AT de la bactérie *S. pneumoniae*. Ces nouveaux composés ont pris la forme de dérivés de choline, métabolisés par les AT et de dérivés de D-Ala ou de D-Ala-D-Ala, métabolisés par le PG. Les modifications apportées à ces dérivés ont eu pour but principal d'ajouter sur ces dérivés une fonction chimique réactive dans le milieu vivant, par réaction bioorthogonale SPAAC ou IEDDA.

Tout d'abord, la métabolisation de choline par les AT de *S. pneumoniae* constitue, à ce jour, en 2023, la seule méthode qui existe pour marquer, de façon fluorescente, les AT de bactéries. De plus, la présence de choline sur les AT est spécifique de la bactérie *S. pneumoniae*. La métabolisation de dérivés de cholines par les AT permet donc un marquage spécifique de la bactérie *S. pneumoniae*. La tolérance des AT pour métaboliser des dérivés de cholines a été explorée et, pour cela, une librairie de 11 cholines, aux propriétés différentes et notamment, à l'encombrement stérique plus ou moins important, ont été synthétisées. Des tests de marquage des AT avec ces nouvelles cholines ont été effectués, en deux étapes, par la métabolisation des dérivés suivi de la réaction click avec un fluorophore. Ces tests ont montré que seules les cholines représentées sur la [Figure 65](#) permettaient d'obtenir un marquage fluorescent des AT. Parmi ces cholines, seules les azido-cholines **77**, **101** et **105** sont capables de remplacer efficacement à long terme la choline naturelle, permettant la croissance des bactéries.



*Figure 65 : Dérivés de cholines, métabolisées par les AT de *S. pneumoniae*.*

Ensuite, de nouveaux dérivés, incorporés sur le PG de *S. pneumoniae* ont été développés. Ces nouveaux dérivés possèdent soit une cyclooctyne (DIBO, DBCO ou BCN) pour réagir par réaction SPAAC, soit une tétrazine ou un TCO, pour réagir par réaction IEDDA. L'incorporation sur le PG de ces dérivés a été prouvée par marquage fluorescent. Le marquage est d'une intensité plus faible pour le BCN-DA, et deux raisons ont été identifiées. Premièrement, la vitesse de la réaction click avec l'azoture d'un fluorophore, est plus lente avec le BCN-DA qu'avec le DIBO-DA et le DBCO-DA. Ensuite, l'enzyme PBP3 qui a pour rôle d'éliminer le dernier acide aminé du peptide du PG, élimine de façon plus importante l'acide aminé BCN-DA, conjugué avec le fluorophore Az-AF647, que les acides aminés DIBO-DA et DBCO-DA, conjugués avec ce même fluorophore. Les dérivés de D-Ala **137**, **151**, **158** et **161** ([Figure 66](#)) apparaissent comme les plus prometteurs pour développer des applications impliquant le marquage du PG ou pour des applications à visées thérapeutiques.

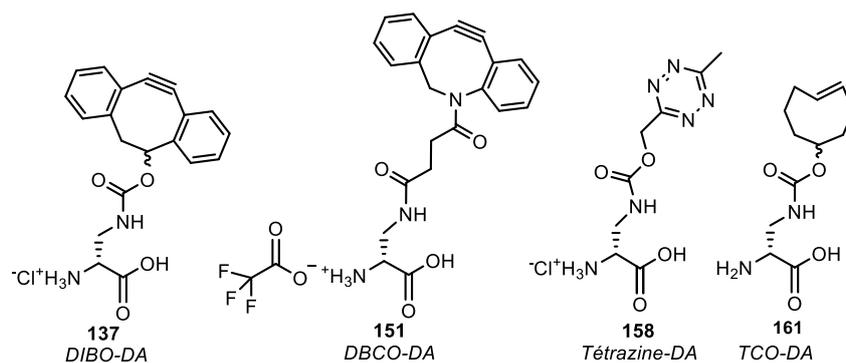


Figure 66 : Dérivés de D-Ala incorporés sur le PG de *S. pneumoniae* développés pendant ce projet de thèse

Une perspective pour améliorer ces marquages est d'utiliser des dérivés de D-Ala-D-Ala, métabolisés par le PG par un processus différent des dérivés de D-Ala. Cela permet d'avoir une plus grande proportion de dérivés métabolisés par le PG de façon plus persistante, car non éliminés par PBP3. Dans cet objectif, les dipeptides DIBO-DADA **169** et tétrazine-DADA **170** ont été synthétisés et sont actuellement en cours d'évaluation chez nos partenaires biologistes.

Deux applications principales ont été développées avec ces nouveaux dérivés de cholines et de D-Ala. Premièrement, nous avons souhaité faire réticuler le PG et les AT, qui, d'après des images de microscopie obtenues antérieurement à ce projet de thèse, sont synthétisés de façon simultanée et au même endroit, au septum des bactéries. Cette réticulation a pu être mise en évidence avec les composés AzCho **77** et DIBO-DA **137**. Cependant, le but premier de cette réticulation était d'observer un effet sur les bactéries, idéalement, un effet bactériostatique ou bactéricide. Or, dans les conditions de nos expériences, la croissance et la morphologie des bactéries n'a pas été perturbée. Nous supposons que la proportion de réticulation est trop faible pour perturber les bactéries. Les perspectives pour remédier à ce problème sont l'utilisation de dipeptides D-Ala-D-Ala, qui, comme évoqué plus haut, permettraient d'installer la fonction chimique réactive en plus grande proportion sur le PG, ainsi que l'utilisation d'un linker qui relierait les dérivés de D-Ala et de choline qui seraient trop éloignés pour réticuler directement.

Ensuite, les dérivés de D-Ala et de cholines synthétisés sont utilisés dans le but de marquer le PG et les AT et d'utiliser la méthode de microscopie à haute résolution dSTORM pour les observer. L'objectif est de comparer, de façon précise, les sites de biosynthèse du PG et des AT ainsi que l'évolution du PG et des AT tout au long du cycle cellulaire. Des résultats de marquage préliminaires ont été obtenus dans des conditions qui n'étaient pas idéales puisque des réactions parasites pouvaient se produire. Une perspective d'amélioration est notamment d'effectuer ces marquages en mettant en œuvre deux réactions bioorthogonales différentes pour éviter ces réactions parasites.

En parallèle du développement de ces dérivés de choline, de D-Ala et de D-Ala-D-Ala, différents fluorophores ont été conçus et synthétisés (Figure 66). Premièrement, la synthèse de fluorophores de type coumarines a été explorée et la coumarine-DA fluorogénique **204** a été synthétisée. Grâce à cette coumarine, un marquage fluorogénique du PG pourrait être possible. Ensuite, il a été démontré récemment que l'hétérocycle NBD-Se est fluorogénique : suivant la polarité du milieu dans lequel il se trouve, l'intensité de sa fluorescence est différente. Ainsi, les composés **207** et **215** ont été synthétisés dans le but de marquer le PG, soit de façon directe, avec le composé **207**, soit de façon indirecte, avec le composé **215**. Le PG étant un milieu moins polaire que le milieu aqueux, la présence du NBD-Se dans le PG devrait permettre d'observer une fluorescence. Le but de ce projet est de concevoir une méthode de détection de bactéries, ne nécessitant pas de lavage. Enfin, la microscopie électronique n'est pas compatible avec l'utilisation de fluorophores classiques. Une possibilité pour observer un milieu biologique spécifique par microscopie électronique est la polymérisation de DAB, rendue possible par la génération de ROS, notamment d' $^1\text{O}_2$ . Le fluorophore éosine a la particularité d'être capable de générer du ROS. Ainsi, l'éosine **219** a été synthétisée dans le but de réagir par réaction click CuAAC avec l'AlkCho **76** et d'observer les AT par microscopie électronique. Tous ces fluorophores sont actuellement en cours d'évaluation par nos partenaires.

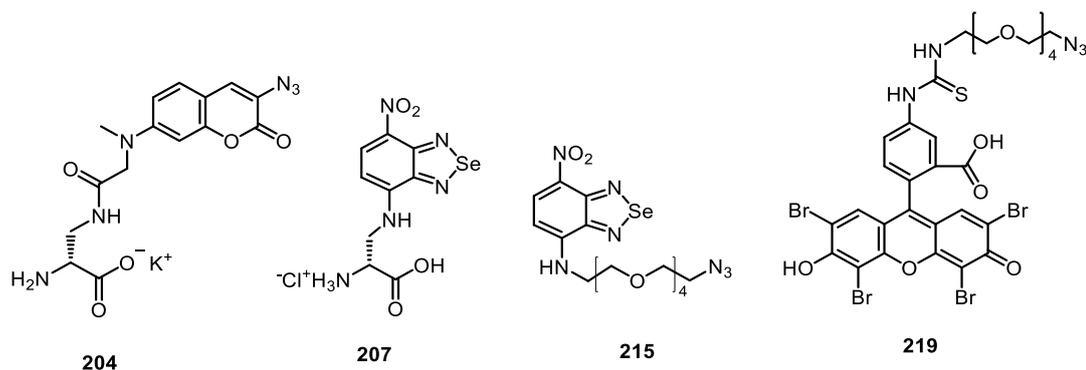


Figure 67 : Fluorophores synthétisés pendant ce projet de thèse



Chapitre VI :  
Partie expérimentale



---

## I. *Material and methods*

---

Chemicals and solvents used for reactions were purchased from ABCR, Acros Chemicals, Alpha Aesar, BLD-Pharm, Fluorochem, Merck and Sigma-Aldrich and were used without any other purification.

The reactions were controlled by thin-layer chromatography (TLC) on Macherey-Nagel silica gel 60. UV at 254 nm was used for detection and, when needed, TLC plates were stained using Hanessian's stain ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4·H<sub>2</sub>O (25 g), Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (5 g) and of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mL) in H<sub>2</sub>O (450 mL)), ninhydrin (ninhydrin (600 mg)), AcOH (2 mL) and EtOH (300 mL) or KMnO<sub>4</sub> (KMNO<sub>4</sub> (1.5 g), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 g) and NaOH 10 % (1.25 mL) in H<sub>2</sub>O (200 mL)). Flash column chromatographies (FCC) were performed using Macherey-Nagel silica gel 60 M.

HPLC analyses were performed on an Agilent 1100 Series equipped with a column Macherey-Nagel EC 250/ 4.6 Nucleodur C18 Isis (5 μm, 250 × 4.6 mm). The retention time (t<sub>R</sub>) is expressed in minutes with a flow rate of 1 mL/min.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded either on a Brüker Avance III (400 MHz for <sup>1</sup>H, 100 MHz for <sup>13</sup>C), on a Brüker Avance Neo (400 MHz for <sup>1</sup>H, 100 MHz for <sup>13</sup>C) or on a Brüker Avance III (500 MHz for <sup>1</sup>H, 126 MHz for <sup>13</sup>C). Deuterated solvents (CDCl<sub>3</sub>, MeOD, DMSO-*d*<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO and DMF-*d*<sub>7</sub>) were purchased from Deutero GmbH (Kastellaun, Germany). Chemical shifts (δ) are expressed in ppm (parts per million) with the following references: CDCl<sub>3</sub> with tetramethyl silane as internal standard (0.00 ppm for <sup>1</sup>H and 77.23 for <sup>13</sup>C), MeOD (3.30 ppm for <sup>1</sup>H and 49.15 ppm for <sup>13</sup>C), DMSO-*d*<sub>6</sub> (2.50 ppm for <sup>1</sup>H and 39.52 ppm for <sup>13</sup>C), D<sub>2</sub>O (4.79 ppm for <sup>1</sup>H), (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (2.05 ppm for <sup>1</sup>H and 29.84 ppm for <sup>13</sup>C) and DMF-*d*<sub>7</sub> (2.75 ppm and 2.92 ppm for <sup>1</sup>H and 29.76 ppm and 34.89 ppm for <sup>13</sup>C). Peaks were assigned as much as possible with the use, when needed, of COSY experiments (<sup>1</sup>H assignments) and HSQC and/or HMBC experiments (<sup>13</sup>C assignments). The following abbreviations were used: s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublets of doublets), dt (doublet of triplets), t (triplet), td (triplet of doublets), tt (triplet of triplets), q (quartet), m (multiplet). When two signals are observed for protons on the same carbon atom close to a stereocenter, they are differentiated with the letters a and b. In presence of rotamers or diastereoisomers, when two signals are observed for the same proton or carbon, the second signal is labeled with a \*.

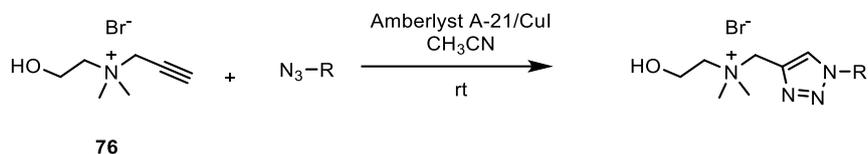
Low resolution mass spectrometry (LRMS) and high resolution mass spectrometry (HRMS) spectra were recorded by the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG). HRMS spectra were

recorded on a LTQ Orbitrap XL Thermo Scientific with ElectroSpray Ionization (ESI). LRMS spectra were recorded on a Bruker amaZon speed with ElectroSpray Ionization. Gas chromatography – Mass spectrometry (GC-MS) spectra were recorded on an Agilent 5977-7890B with Electron Impact (EI).

Optical rotations were recorded on a Perkin Elmer Polarimeter 341 (wavelength 589 nm) on a sodium lamp using a cuvette with a path length of 10 mm. Specific optical rotations are expressed in  $\text{deg}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$  and reported without unit. The associated concentration is given in  $\text{g}/(100\text{ mL})$ .

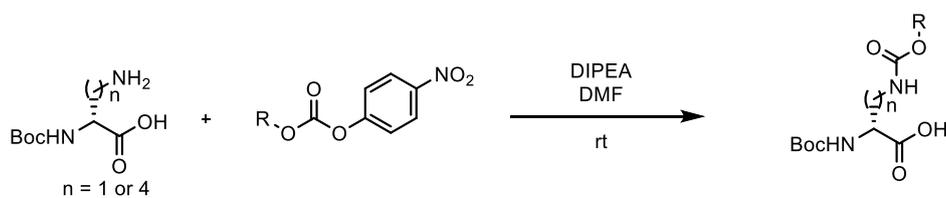
## II. General procedures

### General procedure A



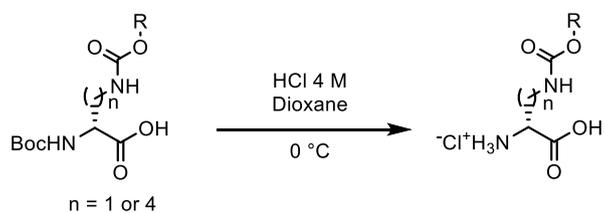
Propargyl-choline **76** (1 equiv.) and the azide (1.1 equiv.) were diluted in dry CH<sub>3</sub>CN and the polymer supported Amberlyst-A21/CuI<sup>169</sup> catalyst was added in one portion. After stirring overnight, the black solution was filtered to remove the catalyst and CH<sub>3</sub>CN was evaporated under reduced pressure. Purification by FCC (10-20 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) afforded the desired choline.

### General procedure B



To a solution of the carbonate (1 equiv.) in DMF (5 mL) was added DIPEA (10 equiv.) and Boc-D-2,3-diaminopropionic acid or Boc-D-lysine (1.1 equiv.) at room temperature. Upon completion of the reaction, DMF was removed under vacuum and an aqueous solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in water) was added. The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (AcOH/ MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the desired protected amino acid.

### General procedure C



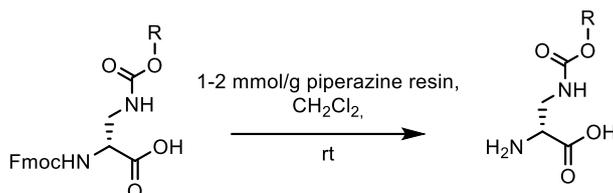
The protected amino acid was dissolved in HCl (4 M solution in dioxane) and left under stirring during 1 or 2 h at 0 °C. The solvent was evaporated under vacuum and allowed to dry under high vacuum (oil pump). The resulting mixture was triturated in diethyl ether overnight. Then, the product was filtered and dried under vacuum to obtain the desired deprotected amino acid.

## General procedure D



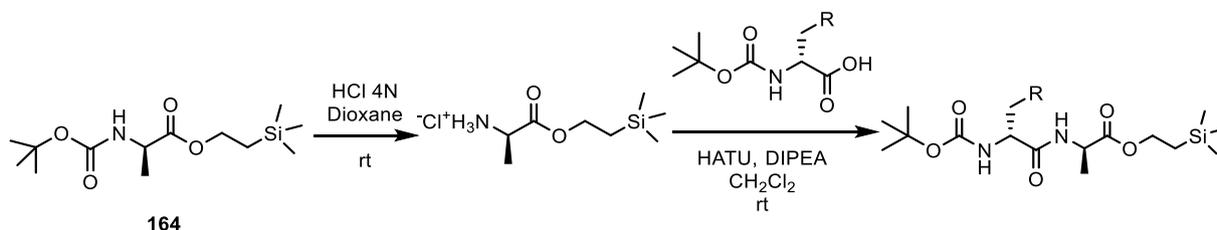
Fmoc-D-2,3-diaminopropionic acid (1.3 equiv.) was dissolved in anhydrous DMF. Under argon, the carbonate compound (1 equiv.) and Et<sub>3</sub>N (3 equiv.) were added at room temperature. The yellow solution was stirred during 1.5 h. DMF was then evaporated and the crude product was dissolved in EtOAc before adding 50 % brine and a few drops of AcOH. The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (AcOH/ MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the desired protected amino acid.

## General procedure E



The Fmoc protected amino acid and 1-2 mmol/g piperazine resin were placed in a flask with anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The yellow solution was stirred during 6 h. The precipitate was then filtered and washed with 10 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The product was eluted with 30 mL 2:1 CHCl<sub>3</sub>/ MeOH and concentrated under reduced pressure. The solid was then triturated in Et<sub>2</sub>O overnight. Then, it was filtered and dried under vacuum to obtain the desired deprotected amino acid.

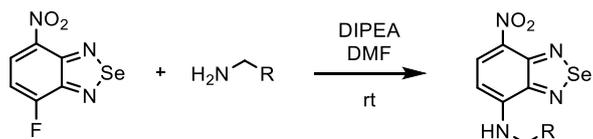
## General procedure F



The protected D-Ala **164** (1.4 equiv.) was diluted in HCl (4 M solution in dioxane) and left under stirring during 2 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the crude was allowed to dry under high vacuum (oil pump) for 5 h and the deprotected product was used as such for

the next step. This compound and the Boc-protected D-Ala derivative (1 equiv.) were dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . HATU (1.1 equiv.) and DIPEA (2.2 equiv.) were successively added and the mixture was stirred during 16 h at room temperature. The solvent was then removed, and EtOAc was added. It was then washed with an aqueous solution of 10 % citric acid followed by 5 %  $\text{NaHCO}_3$ . The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The crude product was purified by FCC (Acetone/ Cyclohexane or EtOAc/ Cyclohexane) to afford the desired dipeptide.

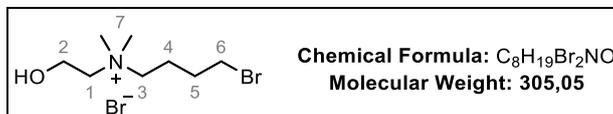
#### General procedure G



The corresponding amine (1.2 equiv.) and DIPEA (1.2 equiv.) were added dropwise to a solution of **210** (1 equiv.) in DMF. Then, the red mixture was stirred at room temperature for 15 min, diluted with EtOAc and poured in saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The aqueous layer was extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with water, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to afford the desired NBD-Se compound.

### III. Synthesis of cholines

#### 4-Bromo-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylbutan-1-aminium bromide



#### 100

2-(Dimethylamino)ethan-1-ol (1.0 g, 11.2 mmol, 1 equiv.) and 1,4-dibromobutane (16.96 g, 78.5 mmol, 7 equiv.) were diluted in 10 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature during 21 h. Then, the white precipitate was filtered, washed with THF and dried under vacuum to afford the choline **100** as a white solid (2.93 g, 86 %).

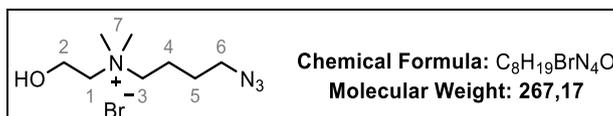
R<sub>f</sub> = 0.10 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 % / Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1.87-2.00 (m, 4H, H4-H5), 3.19 (s, 6H, H7), 3.45-3.58 (m, 6H, H1-H3-H6), 4.00 (m, 2H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 22.7 (CH<sub>2</sub>, C5), 30.7 (t, J = 1.7 Hz, CH<sub>2</sub>, C4), 33.2 (CH<sub>2</sub>, C6), 52.5 (t, J = 3.9 Hz, 2×CH<sub>3</sub>, 2×C7), 57.0 (CH<sub>2</sub>, C2), 65.8 (t, J = 2.9 Hz, CH<sub>2</sub>, C3), 66.7 (t, J = 2.9 Hz, CH<sub>2</sub>, C1)

HRMS (ESI): m/z calc. for C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>ONBr [M-Br]<sup>+</sup> 224.0645, found 224.0646

**NB:** The triplets observed in the <sup>13</sup>C spectra of the cholines **100**, **101**, **117** and **118** are due to coupling between the <sup>13</sup>C and the <sup>14</sup>N nuclei. It is observed in symmetrical molecules like cholines<sup>170</sup> for which the quadrupolar coupling constant is smaller than in non-symmetrical ammoniums. Then, the relaxation is slower and each of the three Zeeman states is apparent, constituting a triplet on the spectrum.

#### 4-Azido-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylbutan-1-aminium bromide



#### 101

The brominated choline **100** (500 mg, 1.64 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a mixture of acetone (7.5 mL) / H<sub>2</sub>O (2.5 mL). Sodium azide (1.066 g, 16.4 mmol, 10 equiv.) was added in several portions and allowed to react at 30 °C during 30 h. Water and acetone were evaporated under reduced

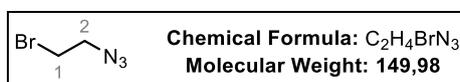
pressure and the product was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ EtOH (10:1). After evaporation and drying under vacuum, the pure choline **101** was obtained as a colourless oil (233 mg, 53 %).

$R_f = 0.14$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 1.64 (m, 2H, H5), 1.89 (m, 2H, H4), 3.19 (s, 6H, H7), 3.40-3.55 (m, 6H, H1-H3-H6), 4.00 (m, 2H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 21.2 (CH<sub>2</sub>, C5), 26.9 (t,  $J = 1.7$  Hz, CH<sub>2</sub>, C4), 51.8 (CH<sub>2</sub>, C6), 52.4 (t,  $J = 3.9$  Hz, 2×CH<sub>3</sub>, 2×C7), 57.0 (CH<sub>2</sub>, C2), 66.2 (t,  $J = 2.8$  Hz, CH<sub>2</sub>, C3), 66.7 (t,  $J = 2.9$  Hz, CH<sub>2</sub>, C1)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>ON<sub>4</sub> [M-Br]<sup>+</sup> 187.1553, found 187.1551

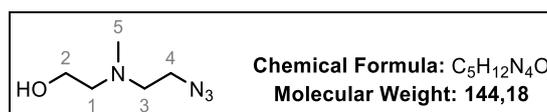
### 1-Azido-2-bromoethane



### **104**

1,2-Dibromoethane (2.64 mL, 30.72 mmol, 2 equiv.) was diluted in 8 mL of DMF. Sodium azide (1.0 g, 15.36 mmol, 1 equiv.) was added in several portions and the reaction mixture was heated at 80 °C during 18 h. Then, the reaction mixture was poured into brine and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and carefully concentrated under reduced pressure to afford 5.92 g of crude product containing a mixture of the compound **104**, 1,2-diazidoethane and 1,2-dibromoethane. It was used afterwards without any further purification.

### 2-((2-Azidoethyl)(methyl)amino)ethan-1-ol



### **105**

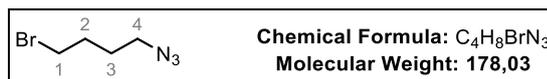
The crude product containing the compound **104** (1.48 g) was diluted in 8 mL of DMF and *N*-methylethanolamine (1.58 mL, 19.75 mmol) and NaHCO<sub>3</sub> (1.66 g, 19.75 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 75 °C during 4 h. EtOAc and H<sub>2</sub>O were added to the reaction mixture which was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (10-20 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) afforded **105** as a yellow oil (144 mg, 25 % over two steps).

$R_f = 0.26$  (MeOH 10 % / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 90 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.27 (s, 3H, H5), 2.54 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H1), 2.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H3), 3.30 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H4), 3.55 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 41.8 (CH<sub>3</sub>, C5), 49.1 (CH<sub>2</sub>, C4), 56.8 (CH<sub>2</sub>, C3), 58.8 (CH<sub>2</sub>, C2), 59.3 (CH<sub>2</sub>, C1)

HRMS (ESI): *m/z* calc. for C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>ON<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 145.1084, found 145.1077

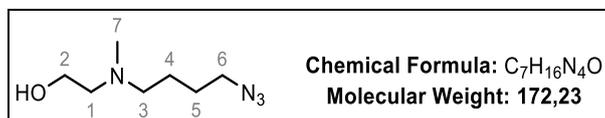
#### 1-Azido-4-bromobutane



#### **106**

1,4-Dibromobutane (459 μL, 3.85 mmol, 2 equiv.) was diluted in 1 mL of DMF. Sodium azide (125 mg, 1.92 mmol, 1 equiv.) was added in several portions and the reaction mixture was heated at 80 °C during 18 h. Then, the reaction mixture was poured into brine and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and carefully concentrated under reduced pressure to afford 548 mg of crude product containing a mixture of the compound **106**, 1,4-diazidobutane and 1,4-dibromobutane. It was used afterwards without any further purification.

#### 2-((4-Azidobutyl)(methyl)amino)ethan-1-ol



#### **107**

The crude product containing 1-azido-4-bromobutane (548 mg) was diluted in 4 mL of DMF and *N*-methylethanolamine (493 μL, 6.16 mmol) and NaHCO<sub>3</sub> (518 mg, 6.16 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 75 °C during 4 h. EtOAc and H<sub>2</sub>O were added to the reaction mixture which was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> and the product extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (10-20 % MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) afforded **107** as a yellow oil (92 mg, 28 % over two steps).

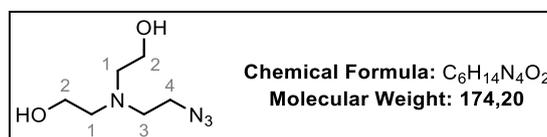
$R_f = 0.30$  (MeOH 10 % / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 90 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.58-1.65 (m, 4H, H4-H5), 2.31 (s, 3H, H7), 2.51 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H3), 2.60 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H1), 3.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H6), 3.63 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,

$\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm) 24.4 ( $\text{CH}_2$ , C4), 26.8 ( $\text{CH}_2$ , C5), 41.7 ( $\text{CH}_3$ , C7), 51.5 ( $\text{CH}_2$ , C6), 57.3 ( $\text{CH}_2$ , C3), 58.3 ( $\text{CH}_2$ , C2), 59.1 ( $\text{CH}_2$ , C1)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{ON}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  173.1397, found 173.1395

2,2'-((2-Azidoethyl)azanediyl)bis(ethan-1-ol)



**108**

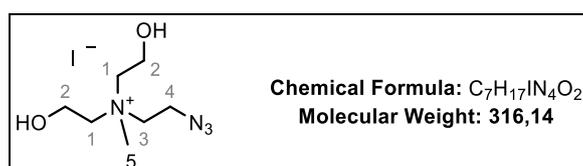
The crude product containing the compound **104** (1.48 g) was diluted in 15 mL of THF and diethanolamine (4.15 g, 39.5 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 50 °C during 18 h. After cooling to room temperature, the supernatant was collected and the remaining viscous layer (diethanolamine) was rinsed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solvents from the supernatant were evaporated and purification by FCC (5 % MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afforded **108** as a light-yellow oil (259 mg, 39 % over two steps).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>171</sup>

$R_f$  = 0.36 (MeOH 5 %/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.74 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 4H, H1), 2.80 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, H3), 3.43 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, H4), 3.66 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 4H, H2);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 50.0 ( $\text{CH}_2$ , C4), 54.1 ( $\text{CH}_2$ , C3), 56.8 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C1}$ ), 60.1 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C2}$ )

2-Azido-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-*N*-methylethan-1-aminium bromide



**109**

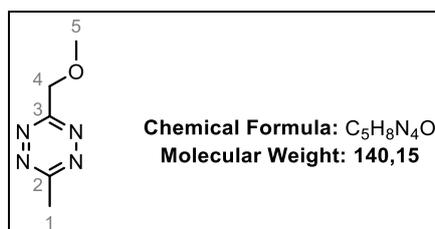
The compound **108** (50 mg, 0.287 mmol, 1 equiv.) and MeI (108  $\mu\text{L}$ , 1.72 mmol, 6 equiv.) were diluted in THF (1 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature over 3 days. Then, THF was evaporated and purification by FCC (10-15 % MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (v/v)) afforded **109** as a light-yellow oil (58 mg, 64 %).

$R_f$  = 0.14 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 3.29 (s, 3H, H5), 3.69 (m, 4H, H1), 3.78 (m, 2H, H3), 3.98 (m, 2H, H4), 4.02 (m, 4H, H2);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 46.3 ( $\text{CH}_2$ , C4), 51.3 ( $\text{CH}_3$ , C5), 57.0 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C2}$ ), 63.4 ( $\text{CH}_2$ , C3), 66.3 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C1}$ )

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_4$   $[\text{M}-\text{I}]^+$  189.1346, found 189.1341

### 3-(Methoxymethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine



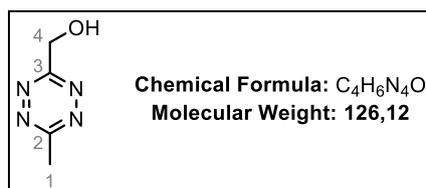
## 112

Methoxyacetonitrile (1.0 g, 1.046 mL, 14 mmol, 1 equiv.), acetonitrile (5.75 g, 7.3 mL, 140 mmol, 10 equiv.) and hydrazine monohydrate (35.0 g, 34 mL, 700 mmol, 50 equiv.) were mixed under argon and  $\text{Ni}(\text{OTf})_2$  (2.5 g, 7 mmol, 0.5 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C during 18 h and the color of the solution turned violet to black over time. After cooling to room temperature, the product was extracted using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  until the pink color almost disappeared from the organic layer. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and carefully concentrated under reduced pressure. The crude product was then diluted with 5 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and PIDA (4.5 g, 14 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred during 2 h and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was evaporated. The crude product was purified by FCC (10-40 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)), the fractions containing the product were carefully evaporated. The product, in solution with a small volume of EtOAc and cyclohexane, was absorbed on a small silica plug which was dried to eliminate the solvents. The product was then eluted with  $\text{Et}_2\text{O}$  and was carefully evaporated to afford **112** as a red liquid (512 mg, 26 % yield).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>133</sup>

$R_f$  = 0.27 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.10 (s, 3H, H1), 3.61 (s, 3H, H5), 5.05 (s, 2H, H4);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.5 ( $\text{CH}_3$ , C1), 59.8 ( $\text{CH}_3$ , C5), 72.3 ( $\text{CH}_2$ , C4), 166.3 (C, C2), 168.8 (C, C3)

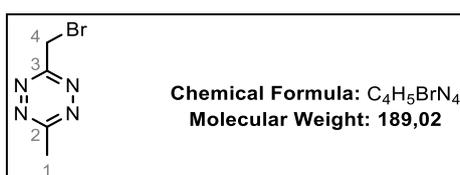
(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methanol**113**

The tetrazine **112** (100 mg, 0.71 mmol, 1 equiv.) was diluted in 10 mL of anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the solution was cooled to -78 °C. BBr<sub>3</sub> (2.85 mL of a 1 M solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2.85 mmol, 4 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at -78°C during 1 h and then warmed to room temperature over 30 min. 10 mL of MeOH was added dropwise and the solution turned from a yellow emulsion to a red solution. Then, distilled water was added (2 mL) and the product was extracted using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> until the pink color almost disappeared from the organic phase. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and carefully concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (20-40 % Et<sub>2</sub>O/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) to afford **113** as pink crystals (58 mg, 64 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>133</sup>

R<sub>f</sub> = 0.18 (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.11 (s, 3H, H1), 5.28 (s, 2H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 21.5 (CH<sub>3</sub>, C1), 62.9 (CH<sub>2</sub>, C4), 167.5 (C, C2), 169.1 (C, C3)

3-(Bromomethyl)-6-methyl-1,2,4,5-tetrazine**114**

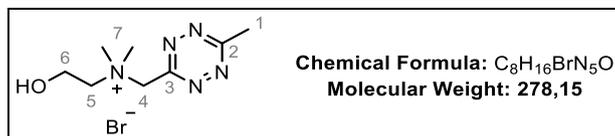
PPh<sub>3</sub> (349 mg, 1.33 mmol, 3 equiv.) was dissolved in 2.5 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and cooled to 0 °C. CBr<sub>4</sub> (295 mg, 0.89 mmol, 2 equiv.) was diluted in 0.5 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and added dropwise. Then, the tetrazine **113** (56 mg, 0.44 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 0.5 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and added dropwise to the reaction mixture. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature during 2 h. After completion of the reaction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was partially evaporated and purification by FCC with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as eluant afforded **114** as a red liquid (52 mg, 62 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>133</sup>

$R_f = 0.24$  (EtOAc 10 %/ Cyclohexane 90 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.11 (s, 3H, H1), 4.94 (s, 2H, H4);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.5 ( $\text{CH}_3$ , C1), 27.7 ( $\text{CH}_2$ , C4), 167.1 (C, C2 or C3), 167.6 (C, C2 or C3)

2-Hydroxy-*N,N*-dimethyl-*N*-((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl)ethan-1-aminium bromide



**115**

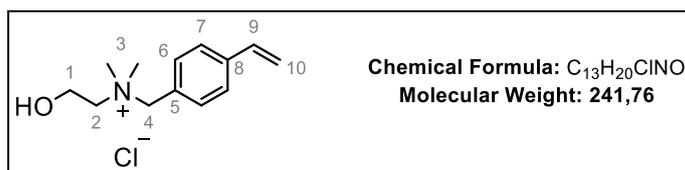
The tetrazine **114** (23 mg, 0.12 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 1 mL of THF and 2-(dimethylamino)ethan-1-ol (14  $\mu\text{L}$ , 0.13 mmol, 1.1 equiv.) was added. After 17 h, filtration on a sintered-glass and washing of the solid with  $\text{Et}_2\text{O}$  afforded the choline **115** as a pink solid (24 mg, 71 %).

$R_f = 0.12$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 3.11 (s, 3H, H1), 3.38 (s, 6H, H7), 3.73 (m, 2H, H5), 4.14 (m, 2H, H6), 5.30 (s, 2H, H4);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C1), 53.1 ( $2 \times \text{CH}_3$ ,  $2 \times \text{C7}$ ), 57.2 ( $\text{CH}_2$ , C6), 67.3 ( $\text{CH}_2$ , C4), 68.2 ( $\text{CH}_2$ , C5), 163.0 (C, C3), 170.5 (C, C2)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{ON}_5$   $[\text{M}-\text{Br}]^+$  198.1349, found 198.1346

2-Hydroxy-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-vinylbenzyl)ethan-1-aminium chloride



**117**

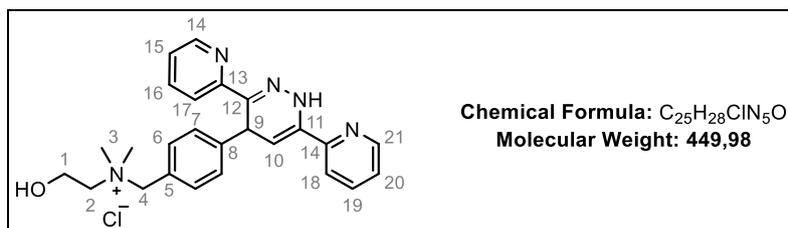
1-(Chloromethyl)-4-vinylbenzene (1.71 g, 11.23 mmol, 1 equiv.) and 2-(dimethylamino)ethan-1-ol (1.0 g, 11.23 mmol, 1 equiv.) were dissolved in THF at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 days. Then, the white precipitate was filtered, washed with THF and dried under vacuum to afford the choline **117** as a white solid (1.96 g, 72 %).

$R_f = 0.19$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 %/ Cyclohexane 80 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 3.11 (s, 6H, H3), 3.47 (m, 2H, H2), 4.06 (m, 2H, H1), 4.61 (s, 2H, H4), 5.36 (dd,  $J = 11.0$  Hz, 0.6 Hz, 1H, H10a), 5.90 (dd,  $J = 17.6$  Hz, 0.6 Hz, 1H, H10b), 6.80 (dd,  $J = 17.6$  Hz, 11.0 Hz, 1H, H9), 7.53-7.61 (m, 4H, H6-H7); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 51.3 (t,  $J = 2.9$  Hz, 2 $\times$ CH<sub>3</sub>, 2 $\times$ C3), 57.1 (CH<sub>2</sub>, C1), 66.8 (CH<sub>2</sub>, C2), 70.1 (CH<sub>2</sub>, C4), 116.6 (CH<sub>2</sub>, C10), 128.0 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C7), 128.4 (C, C5), 134.8 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C6), 137.2 (CH, C9), 141.5 (C, C8)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>ON [M-Cl]<sup>+</sup> 206.1539, found 206.1532

*N*-(4-(3,6-Di(pyridin-2-yl)-1,4-dihydropyridazin-4-yl)benzyl)-2-hydroxy-*N,N*-dimethylethan-1-aminium chloride



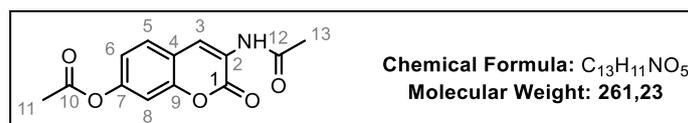
### 118

To a solution of the choline **117** (142 mg, 0.587 mmol, 1 equiv.) in 12 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH (1:1) was added 3,6-diphenyl-1,2,4,5-tetrazine (139 mg, 0.587 mmol, 1 equiv.) at room temperature and the reaction mixture was stirred overnight. Then, THF was evaporated and purification by FCC (15-20 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded **118** as an orange solid (45.7 mg, 17 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 3.03 (s, 6H, H3), 3.40 (m, 2H, H2), 4.00 (m, 2H, H1), 4.52 (s, 2H, H4), 5.53 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H9 or H10), 5.88 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H9 or H10), 7.24 (ddd,  $J = 7.5$  Hz, 4.9 Hz, 1.2 Hz, 1H, H15 or H20), 7.33 (ddd,  $J = 6.7$  Hz, 4.9 Hz, 1.6 Hz, 1H, H15 or H20), 7.44 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H7), 7.49 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H6), 7.72 (td,  $J = 7.5$  Hz, 1.5 Hz, 1H, H16 or H19), 7.75-7.82 (m, 2H, H17 or H18-H16 or H19), 8.11 (dt,  $J = 8.1$  Hz, 1.2 Hz, 1H, H17 or H18), 8.46 (dt,  $J = 4.9$  Hz, 1.5 Hz, 1H, H14 or H21), 8.57 (dt,  $J = 4.9$  Hz, 1.5 Hz, 1H, H14 or H21); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 38.1 (CH, C9), 51.3 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2 $\times$ CH<sub>3</sub>, 2 $\times$ C3), 57.0 (CH<sub>2</sub>, C1), 66.7 (CH<sub>2</sub>, C2), 70.2 (CH<sub>2</sub>, C4), 99.5 (CH, C10), 120.6 (CH, C15 or C17 or C18 or C20), 122.3 (CH, C15 or C17 or C18 or C20), 124.3 (CH, C15 or C17 or C18 or C20), 124.8 (CH, C15 or C17 or C18 or C20), 127.2 (C, C5), 129.8 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C7), 134.7 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C6), 137.8 (CH, C16 or C19), 138.1 (C, C11), 138.4 (CH, C16 or C19), 141.8 (C, C8), 148.4 (C, C12), 149.6 (CH, C14 or C21), 149.9 (CH, C14 or C21), 152.0 (C, C15 or C16), 156.3 (C, C15 or C16)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>ON<sub>5</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 414.2288, found 414.2281 (13 %), C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>ON<sub>5</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 412.2132, found 412.2128 (100 %)

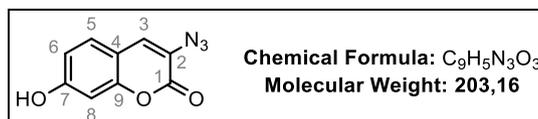
3-Acetamido-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate**120**

A mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (2.0 g, 14.5 mmol, 1 equiv.), glycine (1.09 g, 14.5 mmol, 1 equiv.) and anhydrous sodium acetate (1.19 g, 14.5 mmol, 1 equiv.) was refluxed in acetic anhydride (18 mL) during 22 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and 30 mL of cold distilled water was added. Filtration on a sintered-glass and washing of the solid with EtOAc afforded **120** as a yellow solid (1.17 g, 31 %).

The spectroscopic data were consistent with the literature.<sup>172</sup>

R<sub>f</sub> = 0.23 (Acetone 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.25 (s, 3H, H13), 2.34 (s, 3H, H11), 7.07 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H6), 7.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H8), 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H5), 8.04 (s, 1H, H3); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 21.3 (CH<sub>3</sub>, C13), 24.9 (CH<sub>3</sub>, C11), 110.3 (CH, C8), 117.9 (C, C4), 119.3 (CH, C6), 123.0 (CH, C3), 123.8 (C, C2), 128.6 (CH, C5), 150.4 (C, C7), 151.6 (C, C9), 158.7 (C, C1), 169.1 (C, C10), 169.6 (C, C12)

3-Azido-7-hydroxy-2H-chromen-2-one**121**

The coumarin **120** (1.17 g, 4.5 mmol, 1 equiv.) was refluxed in 30 mL of HCl 37 %/ EtOH (2:1). After 1 h, the reaction mixture was cooled in an ice bath and 15 mL of cold distilled water was added followed by the addition of NaNO<sub>2</sub> (620 mg, 9 mmol, 2 equiv.). After 15 min, NaN<sub>3</sub> (876 mg, 13.5 mmol, 3 equiv.) was added at 0 °C in portions. After stirring for 15 min, filtration on a sintered-glass and washing of the solid with distilled water afforded **121** as a brown solid (738 mg, 81 %).

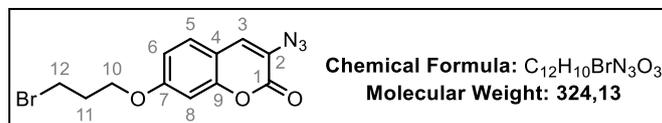
The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>134</sup>

R<sub>f</sub> = 0.27 (Acetone 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 6.75 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.80 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.3 Hz, 1H, H6), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H5), 7.57 (s, 1H, H3); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 102.1 (CH, C8),

111.3 (C, C4), 113.8 (CH, C6), 121.1 (C, C2), 127.9 (C, C3), 129.1 (CH, C5), 152.8 (C, C9), 157.3 (C, C1), 160.3 (C, C7)

3-Azido-7-(3-bromopropoxy)-2H-chromen-2-one



**124**

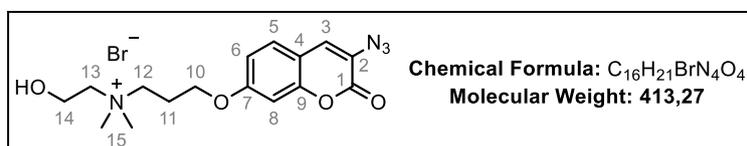
The hydroxycoumarin **121** (200 mg, 0.98 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 3 mL of acetone followed by the addition of 1,3-dibromopropane (299 mg, 5.88 mmol, 6 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (272 mg, 1.97 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was heated at 30 °C. After 30 h, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added to the reaction mixture which was then washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (8-10 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) to afford **124** as an orange solid (72 mg, 23 %).

R<sub>f</sub> = 0.32 (EtOAc 10 %/ Cyclohexane 90 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.36 (tt, *J* = 6.2 Hz, 2H, H11), 3.61 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H12), 4.17 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H10), 6.84-6.90 (m, 2H, H6-H8), 7.17 (s, 1H, H3), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 29.8 (CH<sub>2</sub>, C12), 32.2 (CH<sub>2</sub>, C11), 66.1 (CH<sub>2</sub>, C10), 101.6 (CH, C8), 113.0 (C, C4), 113.7 (CH, C6), 123.6 (C, C2), 126.5 (CH, C3), 128.4 (CH, C5), 153.1 (C, C9), 157.9 (C, C1), 161.0 (C, C7)

LRMS (ESI): *m/z* calc. for C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 324.00 (<sup>79</sup>Br)/326.00 (<sup>81</sup>Br), found 324.07 (<sup>79</sup>Br)/326.07 (<sup>81</sup>Br) (24 %), 296.02 (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub><sup>79</sup>BrNO<sub>3</sub>)/298.02 (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub><sup>81</sup>BrNO<sub>3</sub>) (100 %)

3-((3-Azido-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylpropan-1-aminium bromide



**125**

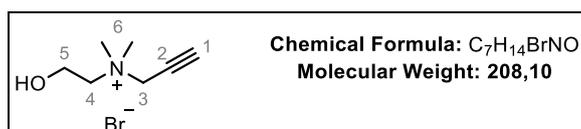
The coumarin **124** (21 mg, 0.06 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 0.5 mL of THF and N,N-dimethylaminoethan-1-ol (46 μL, 0.45 mmol, 7 equiv.) was added. After 22 h, filtration on a sintered-glass and washing of the solid with Et<sub>2</sub>O afforded the choline **125** as a yellow solid (13 mg, 49 %).

R<sub>f</sub> = 0.10 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 2.34 (m, 2H, H11), 3.23 (s, 6H, H15), 3.53 (m, 2H, H13), 3.66 (m, 2H, H12), 4.02 (m, 2H, H14), 4.19 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H10), 6.94-6.98 (m, 2H, H6-H8), 7.41 (s, 1H, H3), 7.49 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 24.1 (CH<sub>2</sub>, C11), 52.6 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C15), 57.0 (CH<sub>2</sub>, C14), 64.2 (CH<sub>2</sub>, C12), 66.7 (CH<sub>2</sub>, C10), 66.8 (CH<sub>2</sub>, C13), 102.5 (CH, C8), 114.6 (CH, C6), 114.8 (C, C4), 124.8 (C, C2), 128.2 (CH, C3), 130.1 (CH, C5), 154.5 (C, C9), 159.4 (C, C1), 162.2 (C, C7)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 333.1557, found 333.1551

*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N,N*-dimethylprop-2-yn-1-aminium bromide



**76**

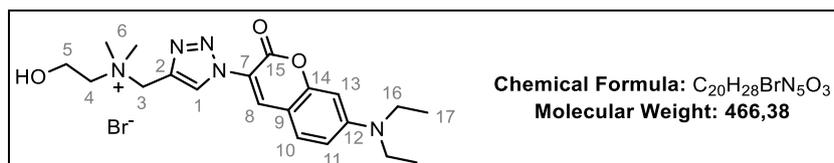
2-(Dimethylamino)ethan-1-ol (932  $\mu$ L, 9.3 mmol, 1.1 equiv.) was diluted in 3 mL of THF and the solution was cooled to 0°C. Propargyl bromide (80 % in solution in toluene, 936  $\mu$ L, 8.4 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After a few minutes, a yellow sticky oil was formed. After 4 h, the reaction mixture was put in the freezer and 2 days after, a precipitate was formed. Filtration on a sintered glass afforded the choline **76** as a white solid (673 mg, 39 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>109</sup>

$R_f = 0.14$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 3.28 (s, 6H, H6), 3.54 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H1), 3.61 (m, 2H, H4), 4.02 (m, 2H, H5), 4.46 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2H, H3); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 52.2 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C6), 56.6 (CH<sub>2</sub>, C3), 57.1 (CH<sub>2</sub>, C5), 66.8 (CH<sub>2</sub>, C4), 72.7 (CH, C1), 83.1 (C, C2)

*N*-((1-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-hydroxy-*N,N*-dimethylethan-1-aminium bromide



**128**

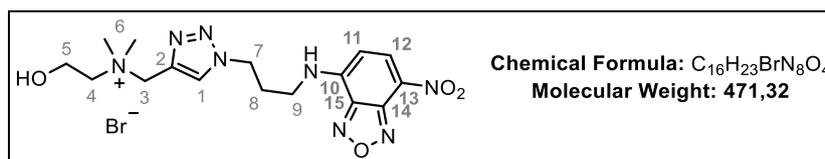
The choline **128** (yellow solid, 99 mg, 89 %) was prepared according to the **procedure A** starting from the propargyl-choline **76** (50 mg, 0.24 mmol) and the azido-coumarin **126** (69 mg, 0.27 mmol) in 0.6 mL of CH<sub>3</sub>CN with 17 mg of the polymer supported Amberlyst-A21/CuI catalyst.

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>21</sup>

$R_f = 0.21$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 1.19 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H, H17), 3.28 (s, 6H, H6), 3.46 (q,  $J = 7.0$  Hz, 4H, H16), 3.63 (m, 2H, H4), 4.15 (m, 2H, H5), 4.93 (m, 2H, H3), 6.47 (d,  $J = 2.4$  Hz 1H, H13), 6.73 (dd,  $J = 9.0$  Hz, 2.4 Hz, 1H, H11), 7.45 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H10), 8.31 (s, 1H, H8), 8.91 (s, 1H, H1); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 12.9 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C17), 46.0 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C16), 52.2 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C6), 57.2 (CH<sub>2</sub>, C5), 60.8 (CH<sub>2</sub>, C3), 66.7 (CH<sub>2</sub>, C4), 97.7 (CH, C13), 108.1 (C, C9), 111.7 (CH, C11), 117.2 (C, C7), 130.4 (CH, C1), 131.9 (CH, C10), 136.9 (C, C2), 138.3 (CH, C8), 153.6 (C, C14), 157.5 (C, C12), 158.7 (C, C15)

2-Hydroxy-*N,N*-dimethyl-*N*-((1-(3-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)propyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ethan-1-aminium bromide



## 129

The choline **129** (orange solid, 22 mg, 39 %) was prepared according to the **procedure F** starting from the propargyl-choline **76** (25 mg, 0.12 mmol) and the NBD compound **127** (35 mg, 0.13 mmol) in 0.3 mL of CH<sub>3</sub>CN with 9 mg of the polymer supported Amberlyst-A21/CuI catalyst.

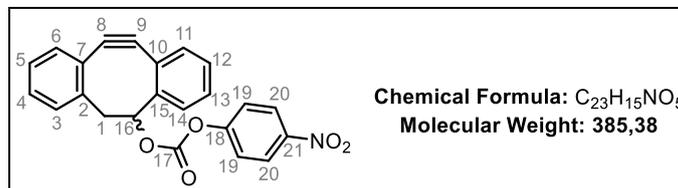
$R_f = 0.10$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 2.45 (tt,  $J = 6.9$  Hz, 6.9 Hz, 2H, H8), 3.19 (s, 6H, H6), 3.51 (m, 2H, H9), 3.65 (m, 2H, H4), 4.08 (m, 2H, H5), 4.67 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H7), 4.78 (s, 2H, H3), 6.35 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H11), 8.44-8.48 (m, 2H, H1-H12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 28.1 (CH<sub>2</sub>, C8), 40.6 (CH<sub>2</sub>, C4), 47.5 (CH<sub>2</sub>, C7), 50.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C6), 55.0 (CH<sub>2</sub>, C5), 58.4 (CH<sub>2</sub>, C3), 64.5 (CH<sub>2</sub>, C9), 99.4 (CH, C11), 121.0 (C, C13), 128.5 (CH, C1), 135.3 (C, C1), 137.9 (CH, C12), 144.1 (C, C10 or C14 or C15), 144.5 (C, C10 or C14 or C15), 145.1 (C, C10 or C14 or C15)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>8</sub> [M-Br]<sup>+</sup> 391.1837, found 391.1831

#### IV. Synthesis of D-Ala and D-Ala-D-Ala

##### 11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulen-5-yl 4-nitrophenyl carbonate



### 132

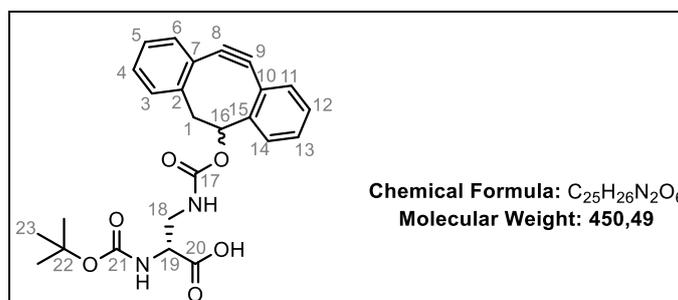
To a solution of DIBO-OH (100 mg, 0.45 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) was added *p*-nitrophenyl chloroformate (183 mg, 0.91 mmol, 2 equiv.) and pyridine dropwise (183 μL, 2.3 mmol, 5 equiv.) at room temperature. After 24 h, the reaction mixture was washed with brine, the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (0-10 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) afforded **132** as a white solid (127 mg, 72 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>173</sup>

**R<sub>f</sub>** = 0.62 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.04 (dd, *J* = 15.3 Hz, 4.0 Hz, 1H, H1a), 3.34 (dd, *J* = 15.3, 2.2 Hz, 1H, H1b), 5.59 (m, 1H, H16), 7.30-7.44 (m, 9H, H<sub>Arom</sub>), 7.62 (d, 1H, H<sub>Arom</sub>), 8.27 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H20); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 46.0 (CH<sub>2</sub>, C1), 81.8 (CH, C16), 109.7 (C, C9), 113.4 (C, C8), 121.4 (C, C10), 121.9 (CH, C19), 123.7 (CH, C<sub>Arom</sub>), 123.8 (C, C7), 125.5 (CH, C20), 126.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 126.7 (CH, C<sub>Arom</sub>), 127.7 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.0 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.6 (CH, C<sub>Arom</sub>), 130.2 (CH, C<sub>Arom</sub>), 145.6 (C, C<sub>Arom</sub>), 150.0 (C, C<sub>Arom</sub>), 150.4 (C, C<sub>Arom</sub>), 151.92 (C, C17), 155.7 (C, C18)

##### (*R*)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulen-5-ylloxycarbonyl)amino)propanoic acid



### 135

The protected amino acid **135** (white solid, 90 mg, 91 %) was prepared according to the **procedure B** starting from DIBO-(4-nitrophenyl) carbonate **132** (84 mg, 0.22 mmol), DIPEA (380  $\mu$ L, 2.2 mmol) and Boc-D-2,3-diaminopropionic acid (49 mg, 0.24 mmol) in DMF (5 mL). Purification by FCC (0.3 % AcOH/ 2.7 % MeOH/ 97 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to 0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

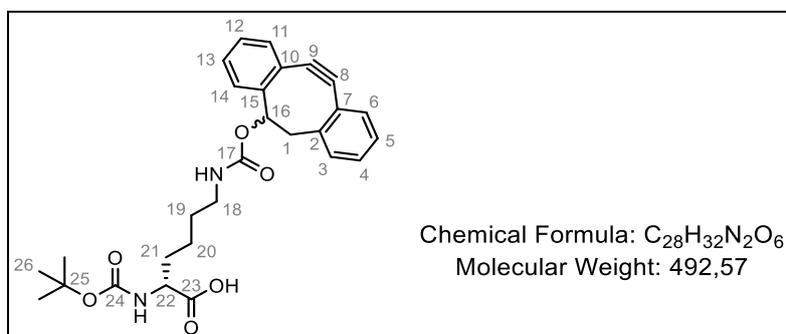
$R_f$  = 0.21 (MeOH 6 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 94 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  (ppm) 1.42 (br s, 9H, H<sub>23</sub>), 2.84 (m, 1H, H<sub>1a</sub>), 3.24 (m, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.54 (m, 1H, H<sub>18a</sub>), 3.65 (m, 1H, H<sub>18b</sub>), 4.39 (m, 1H, H<sub>19</sub>), 5.46 (m, 1H, H<sub>16</sub>), 7.32-7.52 (m, 7H, H<sub>Arom</sub>), 7.63 (m, 1H, H<sub>Arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  (ppm) 28.6 (3 $\times$ CH<sub>3</sub>, 3 $\times$ C<sub>23</sub>), 43.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>18</sub>), 47.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 55.1 (CH, C<sub>19</sub>), 77.3 (CH, C<sub>16</sub>), 79.5 (C, C<sub>22</sub>), 110.7 (C, C<sub>9</sub>), 113.4 (C, C<sub>8</sub>), 121.8 (C, C<sub>10</sub>), 124.4 (C, C<sub>7</sub>), 125.1 (CH, C<sub>Arom</sub>), 126.6 (CH, C<sub>Arom</sub>), 126.9 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.0 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.1 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.1 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.2 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.3 (CH, C<sub>Arom</sub>), 152.2 (C, C<sub>2</sub>), 153.3 (C, C<sub>15</sub>), 156.5 (C, C<sub>17</sub> or C<sub>21</sub>), 156.9 (C, C<sub>17</sub> or C<sub>21</sub>), 172.4 (C, C<sub>20</sub>)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M-H]<sup>+</sup> 449.1718, found 449.1713

$[\alpha]_D^{20}$  = + 6.86 (c = 0.91, MeOH)

(R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-6-((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo[a,e][8]annulen-5-ylloxycarbonyl)amino)hexanoic acid



### 136

The protected amino acid **136** (white solid, 49 mg, 78 %) was prepared according to the **procedure B** starting from DIBO-(4-nitrophenyl) carbonate **132** (40 mg, 0.10 mmol), DIPEA (181  $\mu$ L, 1.1 mmol) and Boc-D-lysine (28 mg, 0.11 mmol) in DMF (3 mL). Purification by FCC (0.3 % AcOH/ 2.7 % MeOH/ 97 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to 0.4 % AcOH/ 3.6 % MeOH/ 96 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

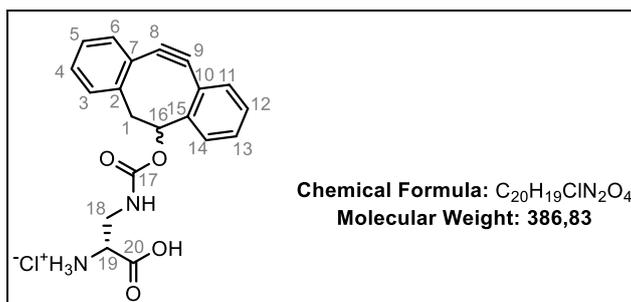
$R_f$  = 0.24 (AcOH 0.6 %/ MeOH 5.4 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 94 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm) 1.40 (br s, 9H, H26), 1.43-1.63 (m, 4H, H19-H20), 1.72 (m, 1H, H21a), 1.85 (m, 1H, H21b), 2.82 (dd,  $J = 14.9$  Hz, 4.0 Hz, 1H, H1a), 3.12-3.24 (m, 3H, H1b- H18), 4.15 (m, 1H, H22), 5.47 (m, 1H, H16), 7.32-7.46 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ ), 7.60 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm) 23.8 ( $\text{CH}_2$ , C20), 28.6 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C26}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ , C19), 32.3 ( $\text{CH}_2$ , C21), 41.4 ( $\text{CH}_2$ , C18), 47.0 ( $\text{CH}_2$ , C1), 54.3 (CH, C22), 76.7 (CH, C16), 79.2 (C, C25), 110.8 (C, C9), 113.5 (C, C8), 121.9 (C, C10), 124.4 (C, C7), 124.9 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.6 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.9 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.0 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 129.1 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 131.1 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 152.2 (C, C2), 153.8 (C, C15), 156.3 (C, C17 or C24), 156.6 (C, C17 or C24), 174.3 (C, C23)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  493.2333, found 493.2323

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 5.61$  ( $c = 0.65$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

(R)-2-Amino-3-((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulen-5-yloxy)carbonyl)amino  
propanoic acid



### 137

The deprotected amino acid **137** (white solid, 59 mg, 84 %) was prepared according to the **procedure C** starting with the protected amino acid **135** (80 mg, 0.18 mmol) in 1.5 mL of HCl 4 M in dioxane and reacted during 1 h.

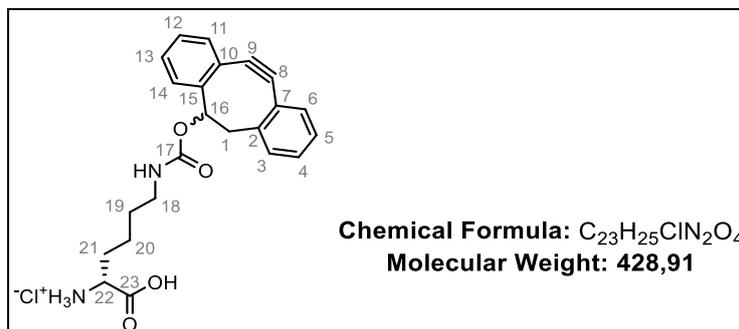
**HPLC:**  $t_{\text{R}} = 13.7$  min (MeCN 30 %/  $\text{H}_2\text{O}$  70 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 2.83 (m, 1H, H1a), 3.23 (m, 1H, H1b), 3.63 (m, 1H, H18a), 3.74 (m, 1H, H18b), 4.09 (m, 1H, H19), 5.45 (m, 1H, H16), 7.27-7.43 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ ), 7.53-7.63 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 42.1 ( $\text{CH}_2$ , C18), 47.1 ( $\text{CH}_2$ , C1), 47.4 ( $\text{CH}_2$ , C1\*), 55.1 (CH, C19), 78.9 (CH, C16), 110.1 (C, C9), 114.0 (C, C8), 122.5 (C, C10), 125.1 (C, C7), 125.2 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 125.3 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.0 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.3 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.4 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.5 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 129.4 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 131.4 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 152.5 (C, C2), 153.2 (C, C15), 158.9 (C, C17), 170.1 (C, C20)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$  351.1339, found 351.1339

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 11.71$  ( $c = 0.85$ , MeOH)

(R)-2-Amino-6-((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulen-5-yloxy)carbonyl)amino  
hexanoic acid

**138**

The deprotected amino acid **138** (white solid, 24 mg, 69 %) was prepared according to the **procedure C** starting with the protected amino acid **136** (40 mg, 0.08 mmol) in 0.5 mL of HCl 4 M in dioxane and reacted during 2 h.

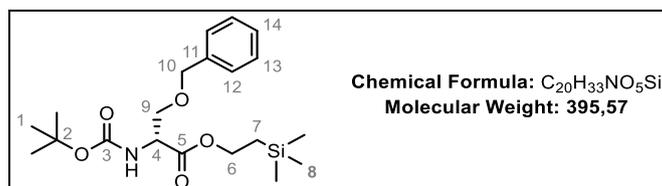
**HPLC:**  $t_R$  = 15.0 min (MeCN 30 %/ H<sub>2</sub>O 70 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 1.40-1.63 (m, 4H, H19-H20), 1.81-2.00 (m, 2H, H21a-H21b), 2.83 (dd,  $J$  = 14.9 Hz, 3.9 Hz, 1H, H1a), 3.11-3.24 (m, 3H, H1b-H18), 3.90 (m, 1H, H22), 5.41 (m, 1H, H16), 7.27-7.42 (m, 7H, H<sub>Arom</sub>), 7.55 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H<sub>Arom</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 23.4 (CH<sub>2</sub>, C20), 30.7 (CH<sub>2</sub>, C19), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C21), 41.5 (CH<sub>2</sub>, C18), 47.4 (CH<sub>2</sub>, C1), 54.2 (CH, C22), 78.1 (CH, C16), 111.1 (C, C9), 114.0 (C, C8), 122.6 (C, C10), 125.0 (CH, C<sub>Arom</sub>), 125.1 (C, C7), 127.1 (CH, C<sub>Arom</sub>), 127.3 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.2 (CH, C<sub>Arom</sub>), 152.6 (C, C2), 153.8 (C, C15), 158.3 (C, C17), 172.3 (C, C23)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 393.1808, found 393.1805

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 7.11 ( $c$  = 0.26, MeOH)

2-(Trimethylsilyl)ethyl O-benzyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-D-serinate

**140**

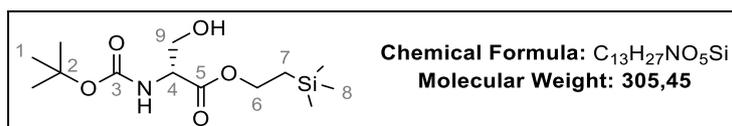
Commercially available Boc-D-Ser(Bzl)-OH (2.0 g, 6.8 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 16 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. EDCI (1.56 g, 8.13 mmol, 1.2 equiv.) was added at 0 °C, followed by the addition of 2-

(trimethylsilyl)ethanol (801 mg, 6.78 mmol, 1 equiv.) and DMAP (99 mg, 0.813 mmol, 0.12 equiv.). After stirring 18 h at room temperature, the reaction mixture was washed with HCl 0.5 M and extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Then, the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (5-10 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) to afford the compound **140** as a colourless oil (1.63 g, 61 %).

$R_f$  = 0.38 (EtOAc 10 %/ Cyclohexane 90 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.04 (s, 9H, H8), 0.97 (m, 2H, H7), 1.45 (m, 9H, H1), 3.68 (dd,  $J$  = 9.5 Hz, 3.3 Hz, 1H, H9a), 3.87 (dd,  $J$  = 9.5 Hz, 3.3 Hz, 1H, H9b), 4.23 (m, 2H, H6), 4.40 (m, 1H, H4), 4.48 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, H10a), 4.55 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, H10b), 7.26-7.36 (m, 5H, 2×H12-2×H13-H14); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) – 1.3 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C8), 17.5 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.5 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C1), 54.3 (CH, C4), 64.1 (CH<sub>2</sub>, C6), 70.3 (CH<sub>2</sub>, C9), 73.4 (CH<sub>2</sub>, C10), 80.1 (C, C2), 127.8 (2×CH, 2×C12), 128.0 (CH, C14), 128.6 (CH, 2×C13), 137.8 (C, C11), 155.7 (C, C3), 171.0 (C, C5)

#### 2-(Trimethylsilyl)ethyl (tert-butoxycarbonyl)-D-serinate

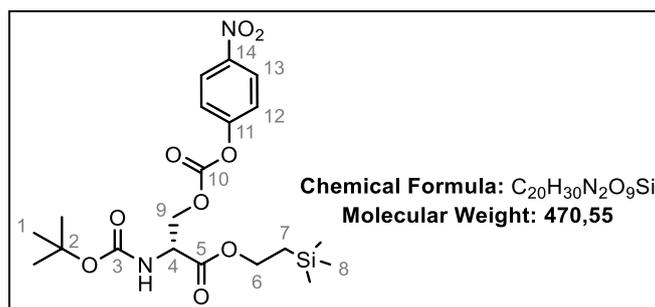


#### **141**

The protected serine **140** (1 629 mg, 4.12 mmol, 1 equiv.) was diluted in 50 mL of EtOAc and 10 % Pd/C (438 mg, 0.1 equiv. of Pd) was added at room temperature under argon. The flask was evacuated and backfilled with H<sub>2</sub> gas three times and two balloons of H<sub>2</sub> were left continuously. The reaction mixture was stirred 17 h, then filtered through a pad of celite and washed with MeOH. Solvents from the filtrate were evaporated and purification by FCC (20 % EtOAc/ Cyclohexane) afforded the compound **141** as a colourless oil (1.17 g, 93 %).

$R_f$  = 0.35 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

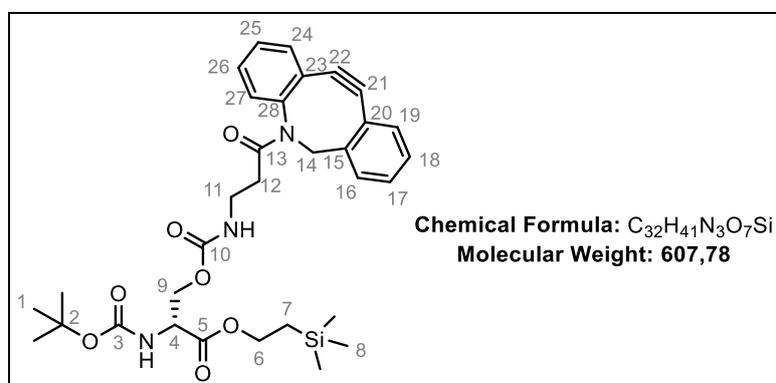
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.05 (s, 9H, H8), 1.03 (m, 2H, H7), 1.46 (s, 9H, H1), 3.93 (m, 2H, H9), 4.27 (m, 2H, H6), 4.35 (m, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) – 1.3 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C8), 17.6 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.5 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C1), 56.1 (CH, C4), 64.0 (CH<sub>2</sub>, C9), 64.5 (CH<sub>2</sub>, C6), 80.5 (C, C2), 156.0 (C, C3), 171.0 (C, C5)

(R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-oxo-3-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)propyl 4-nitrobenzoate**142**

To a solution of the serine **141** (300 mg, 0.758 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) was added *p*-nitrophenyl chloroformate (306 mg, 1.52 mmol, 2 equiv.) and pyridine dropwise (306 μL, 3.8 mmol, 5 equiv.) at room temperature. After 18 h, the reaction mixture was washed with brine, the product was extracted three times with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (10-15 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) to afford **142** as a colourless oil (125 mg, 35 %).

R<sub>f</sub> = 0.24 (EtOAc 10 %/ Cyclohexane 90 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.06 (s, 9H, H8), 1.04 (m, 2H, H7), 1.47 (s, 9H, H1), 4.30 (m, 2H, H6), 4.60 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, H9), 4.65 (m, 1H, H4), 7.39 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H12), 8.28 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H13);  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) – 1.3 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C8), 17.6 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.5 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C1), 53.1 (CH, C4), 65.0 (CH<sub>2</sub>, C6), 69.0 (CH<sub>2</sub>, C9), 80.8 (C, C2), 121.9 (2×CH, 2×C12), 125.5 (2×CH, 2×C13), 145.7 (C, C15), 152.4 (C, C10), 155.3 (C, C3 or C11), 155.6 (C, C3 or C11), 169.4 (C, C5)

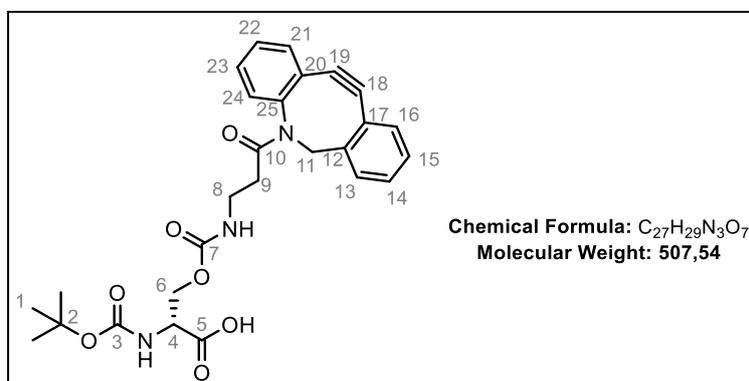
(R)-2-(Trimethylsilyl)ethyl N-(tert-butoxycarbonyl)-O-((3-(11,12-didehydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-3-oxopropyl)carbamoyl)-D-serinate**144**

To a solution of the amino acid **142** (37 mg, 0.0786 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (2 mL) was added DIPEA (125  $\mu$ L, 0.715 mmol, 10 equiv.) and the commercially available DBCO-amine **143** (19.8 mg, 0.0715 mmol, 1 equiv.) at room temperature. The reaction mixture was stirred during 18 h, DMF was removed under vacuum and an aqueous solution of  $H_3PO_4$  (5 %  $H_3PO_4$  in water) was added. The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (30 % EtOAc/ Cyclohexane) to afford **144** as a white solid (41 mg, 94 %).

$R_f$  = 0.31 (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 0.05 (s, 18H, H8-H8\*), 1.00 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 4H, H7-H7\*), 1.45 (br s, 18H, H1-H1\*), 1.94 (m, 2H, H12), 2.50 (m, 2H, H12\*), 3.08-3.32 (m, 4H, H11-H11\*), 3.70 (d,  $J$  = 13.9 Hz, 2H, H14), 4.17-4.40 (m, 8H, H6-H6\*-H9-H9\*), 4.42-4.47 (m, 2H, H4-H4\*), 5.13 (d,  $J$  = 13.9 Hz, 2H, H14\*), 7.27-7.43 (m, 14H,  $7 \times H_{Arom} - 7 \times H_{Arom}^*$ ), 7.67 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $H_{Arom} - H_{Arom}^*$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) – 1.3 ( $6 \times CH_3$ ,  $3 \times C8 - 3 \times C8^*$ ), 17.5 ( $2 \times CH_2$ , C7-C7\*), 28.5 ( $6 \times CH_3$ ,  $3 \times C1 - 3 \times C1^*$ ), 34.96 ( $CH_2$ , C12), 34.99 ( $CH_2$ , C12\*), 37.14 ( $CH_2$ , C11), 37.23 ( $CH_2$ , C11\*), 53.4 ( $2 \times CH$ , C4-C4\*), 55.73 ( $CH_2$ , C14), 55.75 ( $CH_2$ , C14\*), 64.35 ( $CH_2$ , C6), 64.39 ( $CH_2$ , C6\*), 64.88 ( $CH_2$ , C9), 64.96 ( $CH_2$ , C9\*), 80.29 ( $2 \times C$ , C2-C2\*), 107.71 (C, C22), 107.74 (C, C22\*), 115.2 (C, C21), 115.8 (C, C21\*), 122.9 ( $2 \times C$ , C23-C23\*), 123.1 ( $2 \times C$ , C20-C20\*), 125.87 ( $2 \times CH$ ,  $C_{Arom} - C_{Arom}^*$ ), 127.38 (CH,  $C_{Arom}$ ), 127.41 (CH,  $C_{Arom}^*$ ), 128.06 (CH,  $C_{Arom}$ ), 128.08 (CH,  $C_{Arom}^*$ ), 128.56 ( $2 \times CH$ ,  $2 \times C_{Arom}$ ), 128.59 ( $2 \times CH$ ,  $2 \times C_{Arom}^*$ ), 128.73 (CH,  $C_{Arom}$ ), 128.77 (CH,  $C_{Arom}^*$ ), 129.27 (CH,  $C_{Arom}$ ), 129.33 (CH,  $C_{Arom}^*$ ), 132.18 (CH,  $C_{Arom}$ ), 132.22 (CH,  $C_{Arom}^*$ ), 148.11 (C, C15), 148.13 (C, C15\*), 151.19 (C, C28), 151.23 (C, C28\*), 155.46 ( $2 \times C$ , C3-C3\*), 155.79 (C, C10), 155.87 (C, C10\*), 170.16 (C, C5 or C13), 170.24 (C, C5\* or C13\*), 172.14 (C, C5 or C13), 172.18 (C, C5\* or C13\*)

(R)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-O-((3-(11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-3-oxopropyl) carbamoyl)-D-serine

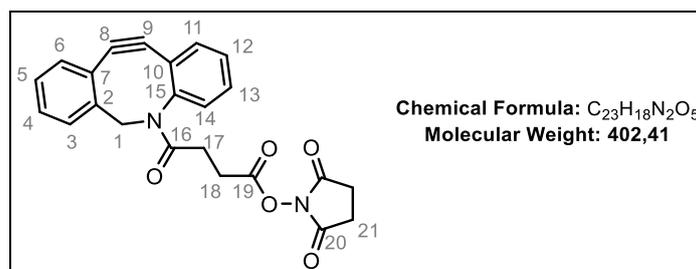


The protected amino acid **144** (19 mg, 0.031 mmol, 1 equiv.) was diluted in 0.3 mL of THF and TBAF (1 M in THF, 93  $\mu$ L, 0.093 mmol, 3 equiv.) was added at room temperature. After stirring during 30 min, the reaction mixture was washed with HCl 1 M and extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Then, the combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (0.3 % AcOH/ 2.7 % MeOH/ 97 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afforded **147** as a white solid (11.2 mg, 71 %).

$R_f = 0.25$  (AcOH 0.4 %/ MeOH 3.6 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  96 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 1.46 (s, 18H, H1-H1\*), 1.93 (m, 2H, H9), 2.50 (m, 2H, H9\*), 3.12 (m, 2H, H8), 3.25 (m, 2H, H8\*), 3.70 (dd,  $J = 13.9$  Hz, 3.7 Hz, 2H, H11), 4.26-4.47 (m, 4H, H6-H6\*), 4.56 (m, 2H, H4-H4\*), 5.11 (dd,  $J = 13.9$  Hz, 2.9 Hz, 2H, H11\*), 7.27-7.43 (m, 14H, 7 $\times$ H<sub>Arom</sub>-7 $\times$ H<sub>Arom</sub>\*), 7.63 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>Arom</sub>-H<sub>Arom</sub>\*);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 28.6 (6 $\times$ CH<sub>3</sub>, 3 $\times$ C1-3 $\times$ C1\*), 35.0 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C9-C9\*), 37.0 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C8-C8\*), 53.19 (CH, C4), 53.38 (CH, C4\*), 56.0 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C11-C11\*), 65.11 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C6-C6\*), 80.6 (2 $\times$ C, C2-C2\*), 107.6 (2 $\times$ C, C19-19\*), 115.2 (2 $\times$ C, C18-C18\*), 122.8 (2 $\times$ C, C20-C20\*), 123.0 (2 $\times$ C, C23-C23\*), 125.9 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 127.4 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.2 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.6 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.8 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.9 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 129.3 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 132.29 (CH, C<sub>Arom</sub>), 132.33 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 147.8 (2 $\times$ C, C12-C12\*), 150.9 (2 $\times$ C, C25-C25\*), 155.8 (2 $\times$ C, C3-C3\*), 156.2 (2 $\times$ C, C7-C7\*), 172.3 (2 $\times$ C, C5 or C10-C5\* or C10\*), 172.9 (2 $\times$ C, C5 or C10-C5\* or C10\*)

Succinimidyl 4-(11,12-didehydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutanoate



**149**

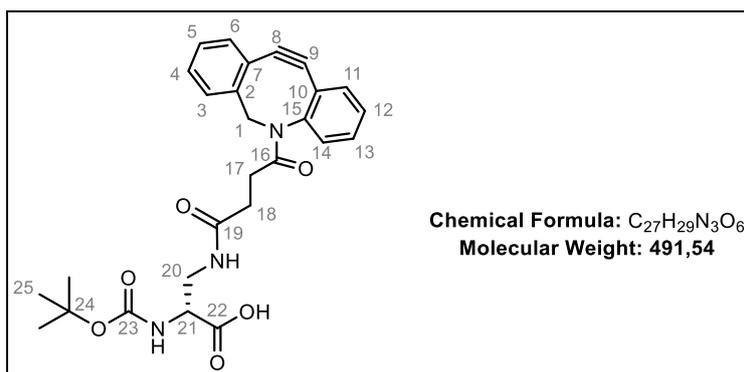
Commercially available DBCO-COOH **148** (100 mg, 0.328 mmol, 1 equiv.) was suspended in 5 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . *N*-hydroxysuccinimide (45 mg, 0.394 mmol, 1.2 equiv.) and EDCI (76 mg, 0.394 mmol, 1.2 equiv.) were successively added and the solution was stirred during 16 h. Then, the reaction mixture was washed with brine and the product was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (1 % MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to afford the compound **149** as a white solid (121 mg, 91 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>174</sup>

$R_f = 0.32$  (Acetone 30 %/ Cyclohexane 70 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 2.08 (m, 2H, H17), 2.64 (m, 2H, H18), 2.74-2.87 (m, 10H, 4 $\times$ H21-4 $\times$ H21\*-2 $\times$ H17\*), 2.97 (m, 2H, H18\*), 3.68 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2H, H1), 5.17 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2H, H1\*), 7.24-7.44 (m, 14H, 7 $\times$ H<sub>Arom</sub>-7 $\times$ H<sub>Arom</sub>\*), 7.69 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H<sub>Arom</sub>-H<sub>Arom</sub>\*);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 25.7 (4 $\times$ CH<sub>2</sub>, 2 $\times$ C21-2 $\times$ C21\*), 26.6 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C18-C18\*), 29.4 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C17-C17\*), 55.8 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C1-C1\*), 107.7 (2 $\times$ C, C9-C9\*), 115.2 (2 $\times$ C, C8-C8\*) 122.9 (2 $\times$ C, C10-C10\*), 123.2 (2 $\times$ C, C7-C7\*), 125.7 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 127.4 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.0 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.5 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.6 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.8 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 129.3 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 132.5 (2 $\times$ CH, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 148.0 (2 $\times$ CH, C2-C2\*), 151.2 (2 $\times$ CH, C15-C15\*), 168.5 (2 $\times$ C, C19-C19\*), 169.1 (4 $\times$ C, 2 $\times$ C20, 2 $\times$ C20\*), 170.5 (2 $\times$ C, C16-C16\*)

(R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanamido)propanoic acid



### 150

To a solution of the activated DBCO **149** (60 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) in DMF (4 mL) was added Boc-D-2,3-diaminopropionic acid (34 mg, 0.16 mmol, 1.1 equiv.) and DIPEA (114  $\mu\text{L}$ , 0.66 mmol, 4.4 equiv.) at room temperature. After 3 h, DMF was removed under vacuum and an aqueous solution of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in water) was added. The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (0.3 % AcOH/ 2.7 % MeOH/ 97 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to afford the protected amino acid **150** as a white solid (58 mg, 79 %).

$R_f = 0.23$  (AcOH 0.5 %/ MeOH 4.5 %/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95 %)

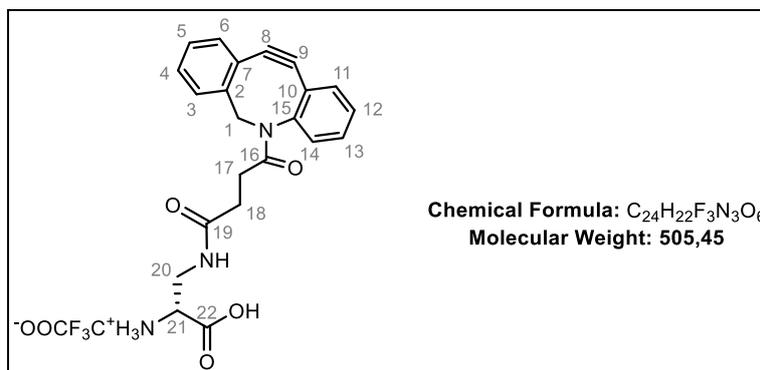
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 1.39 (s, 18H, 9 $\times$ H25-9 $\times$ H25\*), 1.87 (m, 2H, H17), 2.09 (m, 2H, H18), 2.39 (m, 2H, H18\*), 2.76 (m, 2H, H17\*), 3.40-3.60 (m, 4H, H20a-H20a\*-H20b-

H20b\*), 3.63 (d,  $J = 13.9$  Hz, 2H, H1), 4.17-4.26 (m, 2H, H21-H21\*), 5.14 (d,  $J = 13.9$  Hz, 2H, H1\*), 7.22-7.52 (m, 14H,  $7 \times \text{H}_{\text{Arom}} - 7 \times \text{H}_{\text{Arom}}^*$ ), 7.64-7.71 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{Arom}} - \text{H}_{\text{Arom}}^* - \text{NH} - \text{NH}^*$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 28.6 ( $6 \times \text{CH}_3$ ,  $3 \times \text{C}_{25} - 3 \times \text{C}_{25}^*$ ), 30.8 ( $2 \times \text{CH}_2$ , C17-C17\*), 31.46 ( $\text{CH}_2$ , C18), 31.51 ( $\text{CH}_2$ , C18\*), 41.3 ( $2 \times \text{CH}_2$ , C20-C20\*), 55.1 ( $2 \times \text{CH}$ , C21-C21\*), 56.0 ( $2 \times \text{CH}_2$ , C1-C1\*), 79.4 ( $2 \times \text{C}$ , C24-C24\*), 108.9 ( $2 \times \text{C}$ , C9-C9\*), 115.1 ( $2 \times \text{C}$ , C8-C8\*), 123.0 ( $2 \times \text{C}$ , C10-C10\*), 124.1 ( $2 \times \text{C}$ , C7-C7\*), 126.0 ( $2 \times \text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}} - \text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 127.67 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.69 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 128.4 ( $2 \times \text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}} - \text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 128.74 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.77 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 128.89 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.91 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 129.7 ( $2 \times \text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}} - \text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 130.55 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 130.59 (CH,  $\text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 133.5 ( $2 \times \text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}} - \text{C}_{\text{Arom}}^*$ ), 149.5 ( $2 \times \text{C}$ , C2-C2\*), 152.82 (C, C15), 152.86 (C, C15\*), 156.4 ( $2 \times \text{C}$ , C23-C23\*), 172.26 ( $2 \times \text{C}$ , C16 or C19 or C22- C16\* or C19\* or C22\*), 172.34 ( $2 \times \text{C}$ , C16 or C19 or C22- C16\* or C19\* or C22\*), 173.6 ( $2 \times \text{C}$ , C16 or C19 or C22- C16\* or C19\* or C22\*)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  492.2129, found 492.2125

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 5.2$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

(R)-1-Carboxy-2-(4-(11,12-didehydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutanamido)ethan-1-aminium 2,2,2-trifluoroacetate



### 151

To a solution of protected D-Ala-DBCO **150** (27.5 mg, 0.056 mmol) in 1.2 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added TFA (300  $\mu\text{L}$ ) at 0 °C. After 1 h at 0 °C followed by 1 h at room temperature,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and TFA were evaporated under vacuum and allowed to dry under high vacuum (oil pump). The resulting mixture was triturated in diethyl ether overnight and the product was filtered and dried under vacuum to obtain the amino acid **151** as an off-white solid (18.4 mg, 65 %).

**HPLC:**  $t_{\text{R}} = 5.7$  min (MeCN 30 %/  $\text{H}_2\text{O}$  70 %)

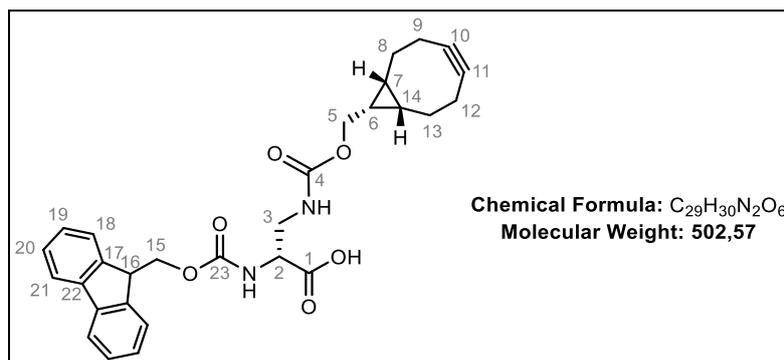
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, **DMSO-*d*<sub>6</sub>**, mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 1.82 (m, 2H, H17), 2.05 (m, 2H, H18), 2.26 (m, 2H, H18\*), 2.61 (m, 2H, H17\*), 3.18-3.28 (m, 2H, H20a-H20b), 3.39-3.52 (m, 4H, H21-H21\*-H20a\*-

H20b\*), 3.63 (d,  $J = 14.0$  Hz, 2H, H1), 5.04 (d,  $J = 14.0$  Hz, 2H, H1\*), 7.29-7.41 (m, 6H,  $3 \times H_{\text{Arom}} - 3 \times H_{\text{Arom}}^*$ ), 7.45-7.53 (m, 6H,  $3 \times H_{\text{Arom}} - 3 \times H_{\text{Arom}}^*$ ), 7.62-7.70 (m, 4H,  $2 \times H_{\text{Arom}} - 2 \times H_{\text{Arom}}^*$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, **DMSO- $d_6$** , mixture of rotamers)  $\delta$  (ppm) 9.52 (CH<sub>2</sub>, C17), 29.57 (CH<sub>2</sub>, C17\*), 30.33 (CH<sub>2</sub>, C18), 30.37 (CH<sub>2</sub>, C18\*), 39.2 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C20-C20\*), 53.5 (2 $\times$ CH, C21-C21\*), 54.9 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C1-C1\*), 108.1 (2 $\times$ C, C9-C9\*), 114.2 (2 $\times$ C, C8-C8\*), 121.4 (2 $\times$ C, C10-C10\*), 122.5 (2 $\times$ C, C7-C7\*), 125.2 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 126.8 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 127.7 (C, 2 $\times$ C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.0 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 128.2 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 129.0 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 129.6 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 132.4 (2 $\times$ C, C<sub>Arom</sub>-C<sub>Arom</sub>\*), 148.4 (2 $\times$ C, C2-C2\*), 151.5 (2 $\times$ C, C15-C15\*), 168.3 (2 $\times$ C, C19-C19\*), 171.13 (C, C16), 171.17 (C, C16\*), 172.3 (2 $\times$ C, C22-C22\*)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub> [M-C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 392.1605, found 392.1609

$[\alpha]_D^{20} = -1.15$  ( $c = 0.54$ , MeOH)

(R)-2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-((((1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanoic acid



#### 154

The protected amino acid **154** (white solid, 37 mg, 82 %) was prepared according to the **procedure D** starting from commercially available BCN-succinimidyl ester **152** (26 mg, 0.089 mmol), Et<sub>3</sub>N (37  $\mu$ L, 0.267 mmol) and Fmoc-D-2,3-diaminopropionic acid (38 mg, 0.116 mmol) in DMF (2 mL). Purification by FCC (0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

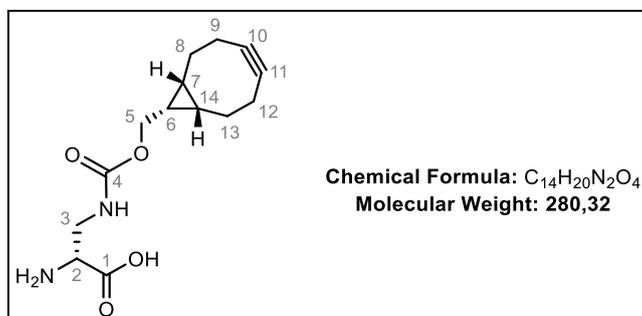
The spectroscopic data were consistent with the literature.<sup>78</sup>

$R_f = 0.19$  (AcOH 0.4 %/ MeOH 3.6 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 96 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 0.81-0.86 (m, 2H, H7-H14), 1.30 (m, 1H, H6), 1.43-1.49 (m, 2H, H8a-H13a), 1.98-2.15 (m, 6H, H8b-H13b-H9-H12), 3.44 (dd,  $J = 14.1$  Hz, 8.1 Hz, 1H, H3a), 3.59 (dd,  $J = 14.1$  Hz, 4.6 Hz, 1H, H3b), 4.04-4.37 (m, 6H, H2-H5-H15-H16), 7.30 (m, 2H, H19), 7.37 (m, 2H, H20), 7.66 (m, 2H, H18), 7.78 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H21);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, **CD<sub>3</sub>OD**)  $\delta$  (ppm) 18.9 (CH, C6), 21.5 (2 $\times$ CH, C7-C14), 22.0 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C9-C12), 30.2 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, C8-C13), 43.3 (CH<sub>2</sub>, C3), 48.5 (CH, C16) 55.9 (CH,

C2), 64.2 (CH<sub>2</sub>, C5), 68.4 (CH<sub>2</sub>, C15), 99.61 (2×C, C10-C11), 121.1 (2×CH, 2×C21), 126.4 (2×CH, 2×C18), 128.3 (2×CH, 2×C19), 129.0 (2×CH, 2×C20), 142.7 (2×C, 2×C22), 145.4 (2×C, 2×C17), 158.7 (C, C23 or C4), 159.6 (C, C23 or C4), 173.8 (C, C1)

(R)-2-Amino-3-((((1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanoic acid



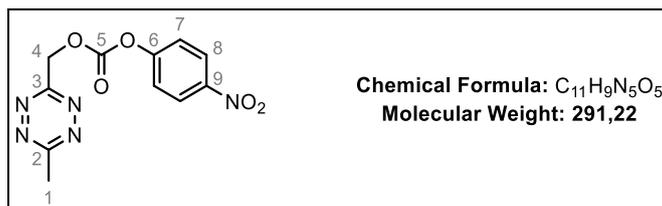
**155**

The deprotected amino acid **155** (white solid, 12 mg, 35 %) was prepared according to the **procedure E** starting with the protected amino acid **154** (61 mg, 0.121 mmol), 486 mg of 1-2 mmol/g piperazine resin in 4.2 mL of anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

The spectroscopic data were consistent with the literature.<sup>78</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 0.63-0.79 (m, 3H, H7-H14-H6), 1.30-1.44 (m, 2H, H8a-H13a), 2.04-2.41 (m, 6H, H8b-H13b-H9-H12), 3.49 (m, 1H, H3a), 3.60-3.68 (m, 2H, H2-H3b), 3.90-4.01 (m, 2H, H5)

(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate



**156**

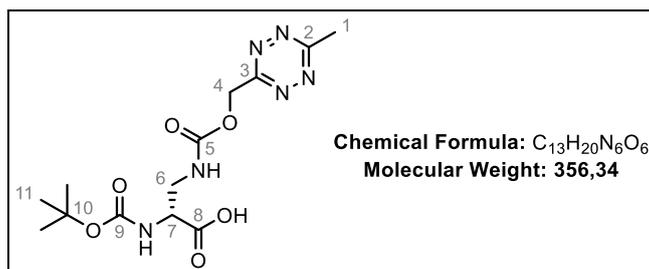
To a solution of the tetrazine **113** (120 mg, 0.95 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) was added *p*-nitrophenyl chloroformate (383 mg, 1.9 mmol, 2 equiv.) and pyridine dropwise (382 μL, 4.75 mmol, 5 equiv.) at room temperature. After 17h, the reaction mixture was washed with HCl 1 M and extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Then, the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (10-20 % EtOAc/ Cyclohexane) afforded **156** as a pink solid (246 mg, 89 %).

R<sub>f</sub> = 0.23 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.14 (s, 3H, H1), 5.87 (s, 2H, H4), 7.45 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H, H7), 8.30 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H, H8);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C1), 66.8 ( $\text{CH}_2$ , C4), 122.0 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C7}$ ), 125.6 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C8}$ ), 145.9 (C, C9), 152.6 (C, C5), 155.5 (C, C6), 164.2 (C, C2), 169.4 (C, C3)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  292.0676, found 292.0677

(R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-(((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy)carbonyl)amino) propanoic acid



### 157

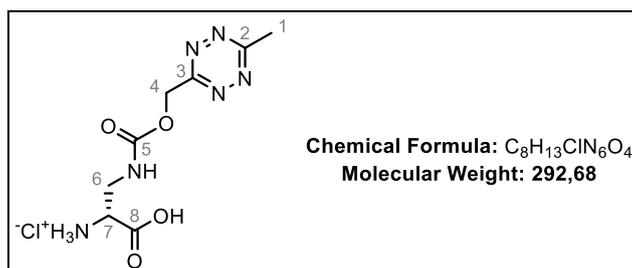
The protected amino acid **157** (pink solid, 180 mg, 98 %) was prepared according to the **procedure B** starting from tetrazine-(4-nitrophenyl) carbonate **157** (150 mg, 0.515 mmol), DIPEA (897  $\mu\text{L}$ , 5.15 mmol) and Boc-D-2,3-diaminopropionic acid (116 mg, 0.57 mmol) in DMF (10 mL). Purification by FCC (0.2 % AcOH/ 1.8 % MeOH/ 98 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to 0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afforded the desired compound.

$R_f = 0.24$  (AcOH 0.5 %/ MeOH 4.5 %/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.43 (s, 9H, H11), 3.01 (s, 3H, H1), 3.42 (dd,  $J = 14.0$  Hz, 7.3 Hz, 1H, H6a), 3.58 (dd,  $J = 14.0$  Hz, 4.8 Hz, 1H, H6b), 4.25 (m, 1H, H7), 5.60 (s, 2H, H4);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 21.3 ( $\text{CH}_3$ , C1), 28.8 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C11}$ ), 43.4 ( $\text{CH}_2$ , C6), 55.4 ( $\text{CH}$ , C7), 64.9 ( $\text{CH}_2$ , C4), 80.9 (C, C10), 158.0 (C, C5 or C9), 158.5 (C, C5 or C9), 167.1 (C, C3), 170.1 (C, C2), 174.0 (C, C8)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  357.1517, found 357.1512

$[\alpha]_D^{20} = + 8.59$  (c = 0.30,  $\text{CHCl}_3$ )

(R)-1-Carboxy-2-((((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethan-1-aminium chloride**158**

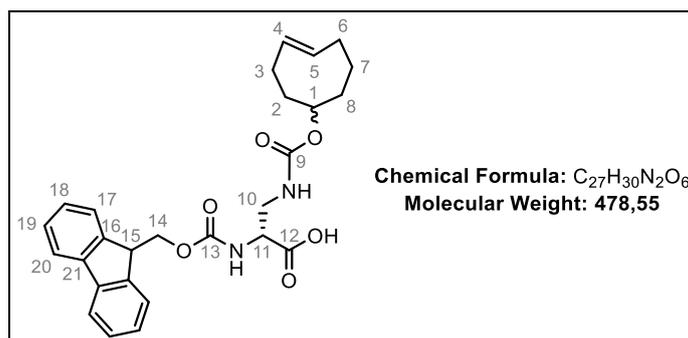
The deprotected amino acid **158** (pink solid, 13.8 mg, 84 %) was prepared according to the **procedure C** starting with the protected amino acid **157** (20 mg, 0.056 mmol) in 0.5 mL of HCl 4 M in dioxane and reacted during 2 h.

**HPLC:**  $t_R$  = 2.5 min (MeCN 30 %/ H<sub>2</sub>O 70 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, **DMSO-*d*<sub>6</sub>**)  $\delta$  (ppm) 3.00 (s, 3H, H1), 3.46-3.58 (m, 2H, H6a-H6b), 3.94 (m, 1H, H7), 5.58 (s, 2H, H4); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, **DMSO-*d*<sub>6</sub>**)  $\delta$  (ppm) 20.9 (CH<sub>3</sub>, C1), 40.6 (CH<sub>2</sub>, C6), 52.4 (CH, C7), 63.4 (CH<sub>2</sub>, C4), 155.8 (C, C5), 165.8 (C, C3), 168.2 (C, C2), 169.0 (C, C8)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 257.0993, found 257.0990

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 13.7 (c = 0.23, MeOH)

(R)-2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-((((E)-cyclooct-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino)propanoic acid**160**

The protected amino acid **160** (white solid, 36 mg, 88 %) was prepared according to the **procedure D** starting from the commercially available TCO-*p*-nitrophenyl ester **159** (25 mg, 0.086 mmol), Et<sub>3</sub>N (36  $\mu$ L, 0.257 mmol) and Fmoc-D-2,3-diaminopropionic acid (36 mg, 0.112 mmol) in DMF (2 mL). Purification by FCC (0.4 % AcOH/ 3.6 % MeOH/ 96 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

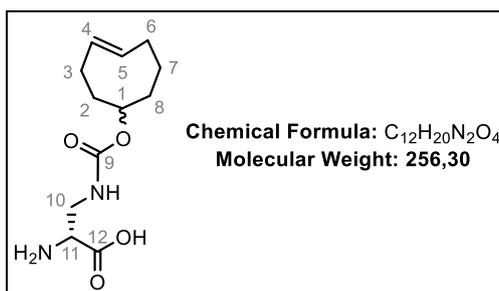
$R_f = 0.27$  (AcOH 0.4 % / MeOH 3.6 % /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  96 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.53 (m, 1H, H8a), 1.60-1.76 (m, 2H, H7a-H8b), 1.77-2.04 (m, 4H, H2-H6a-H7b), 2.13-2.34 (m, 3H, H3-H6b), 3.42 (m, 1H, H10a), 3.56 (m, 1H, H10b), 4.16-4.38 (m, 5H, H1-H11-H14-H15), 5.39 (m, 1H, H4 or H5), 5.52 (m, 1H, H4 or H5), 7.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H18), 7.37 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H19), 7.65 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H17), 7.77 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H20);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 32.18 ( $\text{CH}_2$ , C7), 32.21 ( $\text{CH}_2$ , C7\*), 33.5 ( $\text{CH}_2$ , C3), 33.6 ( $\text{CH}_2$ , C3\*), 35.3 ( $\text{CH}_2$ , C6), 39.7 ( $\text{CH}_2$ , C8), 42.3 ( $\text{CH}_2$ , C2), 43.1 ( $\text{CH}_2$ , C10), 48.5 (CH, C15) 56.0 (CH, C11), 68.3 ( $\text{CH}_2$ , C14), 82.2 (CH, C1), 121.1 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}20$ ), 126.4 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}17$ ), 128.3 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}18$ ), 129.0 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}19$ ), 133.9 (CH, C4 or C5), 136.2 (CH, C4 or C5), 142.7 ( $2\times\text{C}$ ,  $2\times\text{C}21$ ), 145.4 ( $2\times\text{C}$ ,  $2\times\text{C}16$ ), 158.6 (C, C9 or C13), 159.0 (C, C9 or C13), 173.9 (C, C12)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{N}_2$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  477.2031, found 477.2029

$[\alpha]_D^{20} = -3.78$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

(R)-2-Amino-3-((((E)-cyclooct-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino)propanoic acid



### 161

The deprotected amino acid **161** (white solid, 5 mg, 54 %) was prepared according to the **procedure E** starting with the protected amino acid **160** (17.1 mg, 0.036 mmol), 150 mg of 1-2 mmol/g piperazine resin in 1.5 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

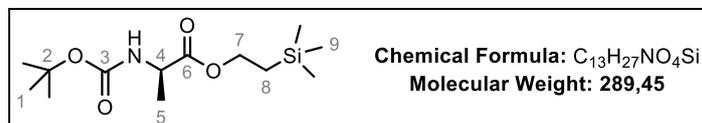
**HPLC:**  $t_R = 5.2$  min (MeCN 40 % /  $\text{H}_2\text{O}$  60 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.58 (m, 1H, H8a), 1.67-1.80 (m, 2H, H7a-H8b), 1.85-2.05 (m, 4H, H2-H7b-H6a), 2.27-2.36 (m, 3H, H3-H6b), 3.48 (m, 1H, H10a), 3.58-3.66 (m, 2H, H10b-H11), 4.33 (m, 1H, H1), 5.46 (ddd,  $J = 15.0$  Hz, 10.8 Hz, 3.5 Hz, 1H, H5), 5.59 (ddd,  $J = 15.0$  Hz, 9.5 Hz, 4.9 Hz, 1H, H4);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 32.24 ( $\text{CH}_2$ , C7), 32.27 ( $\text{CH}_2$ , C7\*), 33.62 ( $\text{CH}_2$ , C3), 33.63 ( $\text{CH}_2$ , C3\*), 35.3 ( $\text{CH}_2$ , C6), 39.6 ( $\text{CH}_2$ , C8), 39.7 ( $\text{CH}_2$ , C8\*), 42.26 ( $\text{CH}_2$ , C2), 42.3 ( $\text{CH}_2$ , C2\*), 42.9 ( $\text{CH}_2$ , C10), 57.3 (CH, C11), 82.5 (CH, C1), 133.90 (CH, C5), 133.94 (CH, C5\*), 136.25 (CH, C4), 136.58 (CH, C4\*), 159.7 (C, C9), 172.3 (C, C12)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $C_{12}H_{21}O_4N_2$   $[M+H]^+$  257.1496, found 257.1498

$[\alpha]_D^{20} = + 35.8$  ( $c = 0.50$ , MeOH)

2-(Trimethylsilyl)ethyl (*tert*-butoxycarbonyl)-D-alaninate



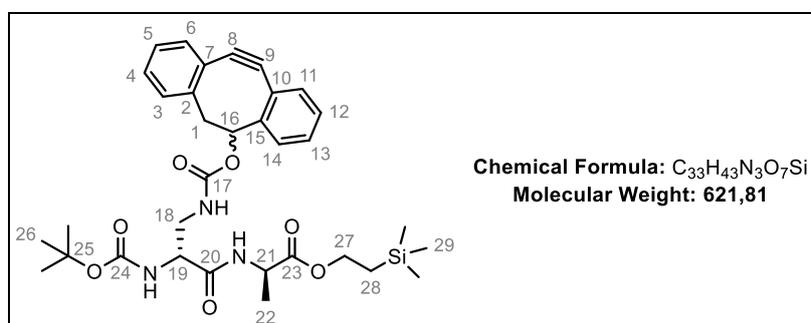
**164**

Commercially available Boc-D-Ala (2.0 g, 10.6 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 20 mL of  $CH_2Cl_2$ . EDCI (2.43 g, 12.7 mmol, 1.2 equiv.) was added at 0 °C, followed by the addition of 2-(trimethylsilyl)ethanol (1.25 g, 10.6 mmol, 1 equiv.) and DMAP (155 mg, 1.27 mmol, 0.12 equiv.). After 22 h, the reaction mixture was washed with HCl 0.5 M and extracted three times with  $CH_2Cl_2$ . Then, the combined organic layers were washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (10 % EtOAc/ Cyclohexane) to afford the compound **164** as a colourless oil (2.35 g, 77 %).

$R_f = 0.43$  (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.05 (s, 9H, H9), 0.98-1.04 (m, 2H, H8), 1.37 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H, H5), 1.45 (s, 9H, H1), 4.19-4.31 (m, 3H, H4-H7);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) – 1.5 ( $3 \times CH_3$ ,  $3 \times C9$ ), 17.4 ( $CH_2$ , C8), 18.5 ( $CH_3$ , C5), 28.3 ( $3 \times CH_3$ ,  $3 \times C1$ ), 49.3 (CH, C4), 63.9 ( $CH_2$ , C7), 80.0 (C, C2), 155.5 (C, C3), 173.8 (C, C6)

2-(Trimethylsilyl)ethyl(((*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo [ $\alpha$ , $e$ ][8]annulen-5-yloxy)carbonyl)amino)propanoyl)-D-alaninate



**165**

The protected dipeptide **165** (white powder, 40 mg, 73 %) was prepared according to the **procedure F** starting from the protected D-Ala **164** (36 mg, 0.124 mmol) in 1 mL of HCl 4 M in dioxane.

The second step was performed using the Boc protected derivative **135** (40 mg, 0.089 mmol), HATU (37 mg, 0.098 mmol), DIPEA (34  $\mu$ L, 0.20 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL). Purification by FCC (20 % EtOAc/ Cyclohexane) afforded the desired compound.

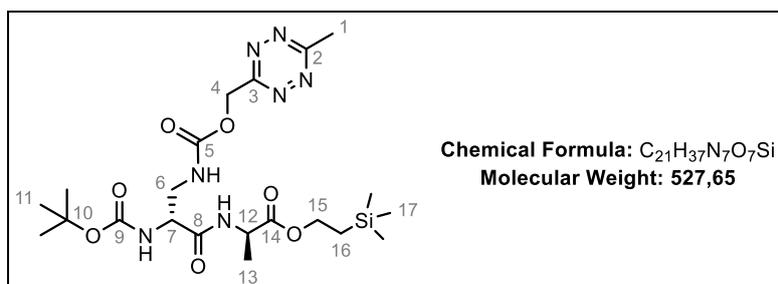
$R_f = 0.31$  (EtOAc 30 %/ Cyclohexane 70 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.02-0.05 (m, 9H, H29), 1.00 (m, 2H, H28), 1.38 (dd,  $J = 7.2$  Hz, 2.8 Hz, 3H, H22), 1.43 (br s, 9H, H26), 2.90 (m, 1H, H1a), 3.16 (m, 1H, H1b), 3.50-3.63 (m, 2H, H18a-H18b), 4.22 (m, 2H, H27), 4.28 (m, 1H, H19), 4.49 (m, 1H, H21), 5.48 (m, 1H, H16), 7.26-7.40 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ ), 7.50 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) – 1.3 ( $3 \times \text{CH}_3$ ,  $3 \times \text{C29}$ ), 17.5 ( $\text{CH}_2$ , C28), 18.2 ( $\text{CH}_3$ , C22), 28.5 ( $3 \times \text{CH}_3$ ,  $3 \times \text{C26}$ ), 43.2 ( $\text{CH}_2$ , C18), 46.4 ( $\text{CH}_2$ , C1), 48.6 ( $\text{CH}$ , C21), 55.3 ( $\text{CH}$ , C19), 64.2 ( $\text{CH}_2$ , C27), 77.4 ( $\text{CH}$ , C16), 80.6 (C, C25), 110.04 (C, C9), 110.08 (C, C9\*), 113.1 (C, C8), 121.40 (C, C10), 121.44 (C, C10\*), 123.9 (C, C7), 124.0 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.1 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.4 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.25 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.31 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.2 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 130.23 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 130.26 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 151.12 (C, C15), 151.20 (C, C15\*), 151.9 (C, C2), 156.2 (C, C17 or C24), 156.8 (C, C17 or C24), 170.39 (C, C20), 170.42 (C, C20\*), 172.8 (C, C23)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  622.2943, found 622.2935

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 20.1$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

2-(Trimethylsilyl)ethyl-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanoyl)-D-alaninate



### 166

The protected dipeptide **166** (pink oil, 129 mg, 96 %) was prepared according to the **procedure F** starting from the protected D-Ala **164** (102 mg, 0.22 mmol) in 2.5 mL of HCl 4 M in dioxane. The second step was performed using the Boc protected derivative **157** (90 mg, 0.25 mmol), HATU (105 mg, 0.28 mmol), DIPEA (96  $\mu$ L, 0.55 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL). Purification by FCC (30 % Acetone/ Cyclohexane) afforded the desired compound.

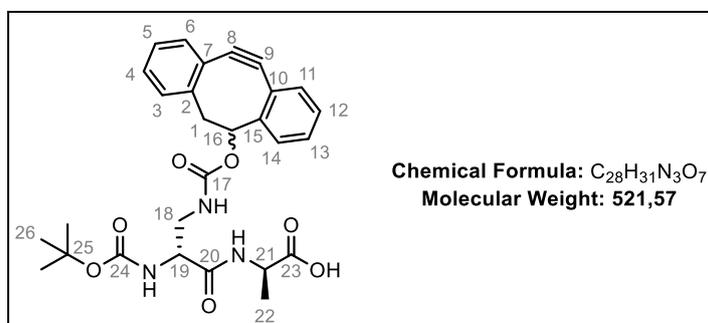
$R_f = 0.19$  (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.04 (s, 9H, H17), 1.01 (m, 2H, H16), 1.40-1.44 (m, 12H, H11-H13), 3.08 (s, 3H, H1), 3.42 (m, 1H, H6a), 3.66 (m, 1H, H6b), 4.17-4.32 (m, 3H, H15-H7), 4.52 (m, 1H, H12), 5.61 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, H4a), 5.78 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, H4b);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) – 1.4 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C17}$ ), 17.5 ( $\text{CH}_2$ , C16), 17.8 ( $\text{CH}_3$ , C13), 21.4 ( $\text{CH}_3$ , C1), 28.4 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C11}$ ), 43.5 ( $\text{CH}_2$ , C6), 48.7 (CH, C12), 54.3 (CH, C7), 63.4 ( $\text{CH}_2$ , C4), 64.3 ( $\text{CH}_2$ , C15), 80.5 (C, C10), 155.8 (C5 or C9), 156.6 (C5 or C9), 165.6 (C, C3), 168.8 (C, C2), 170.6 (C, C8), 173.2 (C, C14)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_7\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  528.2597, found 528.2592

$[\alpha]_D^{20} = -5.0$  ( $c = 0.68$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

*((R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo [ $\alpha$ , $e$ ][8]annulen-5-yloxy)carbonyl)amino) propanoyl)-D-alanine*



## 167

The protected dipeptide **165** (19 mg, 0.031 mmol, 1 equiv.) was diluted 0.8 mL of THF and TBAF (1 M in THF, 61  $\mu\text{L}$ , 0.062 mmol, 2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred during 30 min and THF was evaporated. The crude product was washed with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and the product was extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. Purification by FCC (0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afforded the compound **167** as a white solid (10.8 mg, 67 %).

$R_f = 0.25$  (AcOH 0.5 %/ MeOH 4.5%/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95 %)

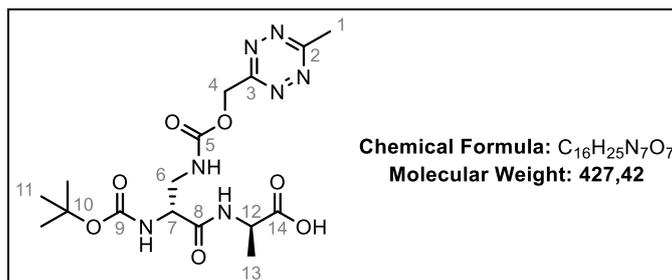
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm) 1.37-1.45 (m, 12H, H22-H26), 2.82 (m, 1H, H1a), 3.24 (m, 1H, H1b), 3.44 (m, 1H, H18a), 3.54 (m, 1H, H18b), 4.31 (m, 1H, H19), 4.47 (m, 1H, H21), 5.45 (m, 1H, H16), 7.32-7.54 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ ), 7.63 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Arom}}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm) 17.8 ( $\text{CH}_3$ , C22), 28.6 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C26}$ ), 43.6 ( $\text{CH}_2$ , C18), 43.7 ( $\text{CH}_2$ , C18\*), 46.9 ( $\text{CH}_2$ , C1), 47.1 ( $\text{CH}_2$ , C1\*), 48.7 (CH, C21), 48.8 (CH, C21\*), 55.4 (CH, C19), 77.1 (CH, C16), 77.2 (CH, C16\*), 79.6 (C, C25), 110.6 (C, C9), 110.7 (C, C9\*), 113.4 (C, C8), 113.5 (C, C8\*), 121.8 (C, C10), 121.9 (C, C10\*), 124.3 (C, C7), 124.4 (C, C7\*), 125.2 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.5 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 126.6 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ \*), 126.9 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 127.9 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ ), 128.0 (C,  $\text{C}_{\text{Arom}}$ \*), 128.1 (C,

$C_{Arom}$ ), 129.1 (C,  $C_{Arom}$ ), 129.2 (C,  $C_{Arom}$ ), 129.2 (C,  $C_{Arom}^*$ ), 131.3 (C,  $C_{Arom}$ ), 152.2 (C, C15), 152.3 (C, C15\*), 153.3 (C, C2), 156.6 (C, C17 or C24), 156.8 (C, C17 or C24), 170.9 (C, C20), 174.5 (C, C23)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $C_{29}H_{30}O_7N_3$   $[M-H]^+$  520.2089, found 520.2082

$[\alpha]_D^{20} = + 5.6$  ( $c = 0.78$ , MeOH)

((R)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-(((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanoyl)-D-alanine



### 168

The protected dipeptide **166** (34 mg, 0.064 mmol, 1 equiv.) was diluted in 1.2 mL of THF and TBAF (1 M in THF, 129  $\mu$ L, 0.129 mmol, 2 equiv.) was added. The yellow solution was stirred during 30 min and THF was evaporated. The yellow crude product was purified by FCC (0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 %  $CH_2Cl_2$ ) to afford the compound **168** as a pink solid (22 mg, 81 %).

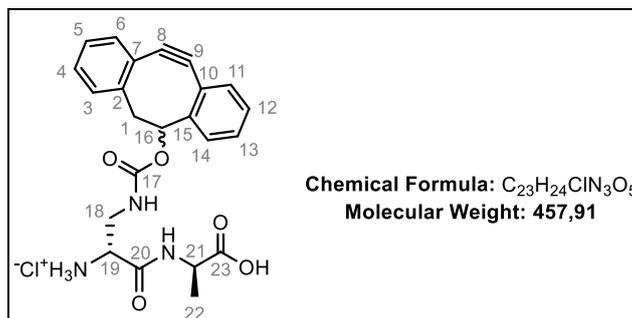
$R_f = 0.14$  (AcOH 0.4 %/ MeOH 3.6 %/  $CH_2Cl_2$  96 %)

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm) 1.39-1.44 (m, 12H, H11-H13), 3.02 (s, 3H, H1), 3.38 (dd,  $J = 14.1$  Hz, 7.2 Hz, 1H, H6a), 3.48 (dd,  $J = 14.1$  Hz, 5.5 Hz, 1H, H6b), 4.21 (m, 1H, H7), 4.39 (m, 1H, H12), 5.62 (m, 2H, H4);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm) 17.7 ( $CH_3$ , C13), 21.3 ( $CH_3$ , C1), 28.8 ( $3 \times CH_3$ , C11), 43.9 ( $CH_2$ , C6), 49.7 (CH, C12), 56.0 (CH, C7), 64.9 ( $CH_2$ , C4), 81.0 (C, C10), 157.7 (C, C5 or C9), 158.5 (C, C5 or C9), 167.1 (C, C3), 170.1 (C, C2), 172.7 (C, C8), 175.9 (C, C14)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $C_{16}H_{21}O_7N_7$   $[M+H]^+$  426.1888, found 426.1891

$[\alpha]_D^{20} = + 4.4$  ( $c = 0.44$ , MeOH)

(R)-1-(((R)-1-Carboxyethyl)amino)-3-(((11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenzo [a,e][8]annulen-5-yl)oxy)carbonyl)amino)-1-oxopropan-2-aminium chloride



**169**

The protected dipeptide **167** (9 mg, 0.017 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a solution of HCl (0.4 mL of a 4 M solution in dioxane) and left under stirring during 2 h at 0 °C. The solvent was evaporated under vacuum and the resulting solid was triturated in diethyl ether overnight. Then, the product was filtered and dried under vacuum to obtain the amino acid **169** as a white solid (5.6 mg, 72 %).

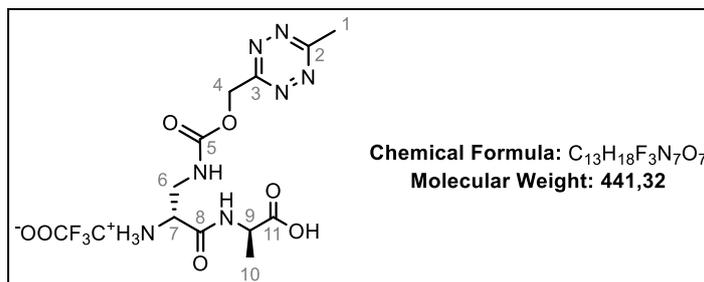
**HPLC:**  $t_R = 7.9$  min (MeCN 30 %/ H<sub>2</sub>O 70 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 1.46 (dd,  $J = 7.3$  Hz, 3.6 Hz, 3H, H<sub>22</sub>), 2.83 (m, 1H, H<sub>1a</sub>), 3.26 (m, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.62 (m, 1H, H<sub>18a</sub>), 3.70 (m, 1H, H<sub>18b</sub>), 4.04 (m, 1H, H<sub>19</sub>), 4.48 (m, 1H, H<sub>21</sub>), 5.45 (m, 1H, H<sub>16</sub>), 7.29-7.35 (m, 5H, H<sub>Arom</sub>), 7.37-7.44 (m, 2H, H<sub>Arom</sub>), 7.60 (m, 1H, H<sub>Arom</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 17.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>22</sub>), 17.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>22</sub>\*), 43.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>18</sub>), 47.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 47.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>\*), 49.9 (CH, C<sub>21</sub>), 54.8 (CH, C<sub>19</sub>), 54.9 (CH, C<sub>19</sub>\*), 78.9 (CH, C<sub>16</sub>), 110.9 (C, C<sub>9</sub>), 111.0 (C, C<sub>9</sub>\*), 114.0 (C, C<sub>8</sub>), 122.4 (C, C<sub>10</sub>), 122.5 (C, C<sub>10</sub>\*), 125.1 (CH, C<sub>Arom</sub>), 125.2 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 125.4 (C, C<sub>7</sub>), 127.0 (CH, C<sub>Arom</sub>), 127.3 (CH, C<sub>Arom</sub>), 127.4 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 128.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 128.6 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 129.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.4 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 129.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.5 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 131.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.5 (CH, C<sub>Arom</sub>\*), 152.6 (C, C<sub>15</sub>), 152.6 (C, C<sub>15</sub>\*), 153.2 (C, C<sub>2</sub>), 153.3 (C, C<sub>2</sub>\*), 158.7 (C, C<sub>17</sub>), 168.1 (C, C<sub>20</sub>), 168.2 (C, C<sub>20</sub>\*), 175.9 (C, C<sub>23</sub>)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 422.1711, found 422.1713

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 4.2 (c = 0.56, MeOH)

(R)-1-(((R)-1-Carboxyethyl)amino)-3-((((6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)methoxy)carbonyl)amino)-1-oxopropan-2-aminium 2,2,2-trifluoroacetate



**170**

The dipeptide **168** (22.4 mg, 0.052 mmol, 1 equiv.) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.35 mL) at 0 °C. TFA (150 μL) was added and the reaction mixture was stirred during 3 h at room temperature. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and TFA were evaporated under vacuum and the resulting solid was triturated in diethyl ether overnight. Then, the product was filtered and dried under vacuum to obtain the dipeptide **170** as a pink solid (18.4 mg, 80 %).

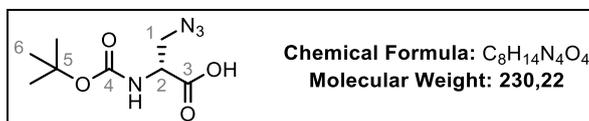
**HPLC:** t<sub>R</sub> = 2.6 min (MeCN 20 %/ H<sub>2</sub>O 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H10), 2.99 (s, 3H, H1), 3.16 (m, 1H, H6a), 3.35 (m, 1H, H6b), 3.48 (m, 1H, H7), 4.17 (m, 1H, H9), 5.56 (s, 2H, H4); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 17.5 (CH<sub>3</sub>, C10), 20.9 (CH<sub>3</sub>, C1), 43.9 (CH<sub>2</sub>, C6), 47.8 (CH, C9), 53.8 (CH, C7), 63.1 (CH<sub>2</sub>, C4), 155.8 (C, C5), 165.4 (C, C3), 168.2 (C, C2), 170.4 (C, C8), 174.0 (C, C11)

**HRMS (ESI):** *m/z* calc. for C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>N<sub>7</sub> [M-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 328.1364, found 328.1361

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 4.5 (c = 0.44, H<sub>2</sub>O)

(R)-3-Azido-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid



**171**

The product **171** was obtained according to the Webb's process for the synthesis of the L enantiomer.<sup>137</sup>

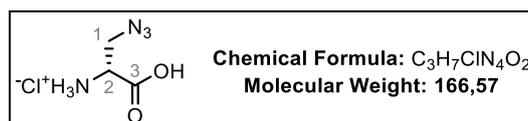
To a solution of sodium azide (5.76 g, 88.6 mmol, 9.7 equiv.) in H<sub>2</sub>O (15 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) was added Tf<sub>2</sub>O (5.02 g, 17.8 mmol, 1.95 equiv.) under argon at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted two times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and

added dropwise to a stirred solution of commercially available Boc-D-2,3-diaminopropionic acid **133** (1.86 g, 9.11 mg, 1 equiv.), CuSO<sub>4</sub> (22 mg, 0.088 mmol, 0.01 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.84 mg, 13.3 mmol, 1.46 equiv.) in H<sub>2</sub>O (30 mL) and MeOH (45 mL). After stirring the reaction mixture during 18 h at room temperature, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH were evaporated under reduced pressure. The remaining aqueous layer was acidified to pH = 2 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5 %. The compound was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (0.3 % AcOH/ 2.7 % MeOH/ 97 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the product **171** as a light-yellow oil (2.05 g, 98 %).

R<sub>f</sub> = 0.38 (AcOH 0.4 %/ MeOH 3.6 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 96 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.47 (s, 9H, H6), 3.75-3.83 (m, 2H, H1), 4.53 (m, 1H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 28.4 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C6), 52.6 (CH<sub>2</sub>, C1), 53.5 (CH, C2), 81.3 (C, C5), 155.6 (C, C4), 174.2 (C, C3)

(R)-2-Azido-1-carboxyethan-1-aminium chloride



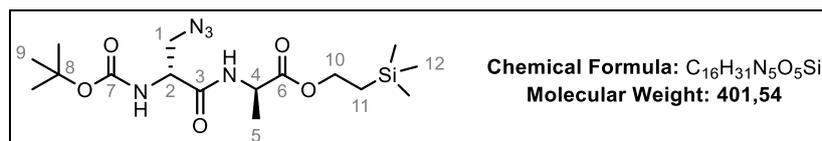
**59**

The deprotected amino acid **59** (white solid, 101 mg, 65 %) was prepared according to the **procedure C** starting with the protected amino acid (213 mg, 0.925 mmol) in 4 mL of HCl 4 M in dioxane and reacted during 1 h.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 3.80 (m, 1H, H1a), 3.89 (dd, *J* = 13.6 Hz, 5.3 Hz, 1H, H1b), 4.05 (dd, *J* = 5.3 Hz, 3.7 Hz, 1H, H2); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 51.6 (CH<sub>2</sub>, C1), 53.7 (CH, C2), 169.6 (C, C3)

HRMS (ESI): *m/z* calc. for C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 131.0564, found 131.0562

2-(Trimethylsilyl)ethyl ((R)-3-azido-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-D-alaninate



**172**

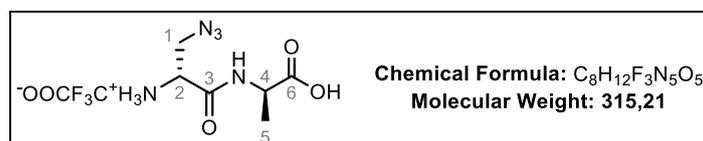
The compound **164** (80 mg, 0.27 mmol, 1 equiv.) was diluted in a solution of HCl (2 mL of a 4 M solution in dioxane) and the mixture was stirred for 2.5 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and allowed to dry under high vacuum (oil pump) for 4 h and the deprotected product was used as such for the next step. This compound and the compound **171** (64 mg, 0.37 mmol, 1.4 equiv.) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). HATU (115 mg, 0.30 mmol, 1.1 equiv.) and DIPEA (78.3 mg, 0.61 mmol, 2.3 equiv., diluted in 0.3 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) were successively added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was then removed, and EtOAc was added. After it was washed with an aqueous solution of 10 % citric acid followed by 5 % NaHCO<sub>3</sub>, the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude product was purified by FCC (15 % EtOAc/ Cyclohexane) to afford the compound **172** as a colourless oil (73 mg, 66 %).

$R_f = 0.32$  (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 0.05 (s, 9H, H12), 1.02 (m, 2H, H1), 1.42 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H5), 1.47 (s, 9H, H9), 3.54 (dd,  $J = 12.4, 5.5$  Hz, 1H, H1a), 3.82 (dd,  $J = 12.4, 4.9$  Hz, 1H, H1b), 4.24 (m, 2H, H10), 4.35 (m, 1H, H2), 4.54 (m, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) – 1.4 (3×CH<sub>3</sub>, C12), 17.4 (CH<sub>2</sub>, C11), 18.4 (CH<sub>3</sub>, C5), 28.4 (3×CH<sub>3</sub>, C9), 48.6 (CH, C4), 52.4 (CH<sub>2</sub>, C1), 53.9 (CH, C2), 64.2 (CH<sub>2</sub>, C10), 80.9 (C, C8), 155.5 (C, C7), 169.1 (C, C3), 172.7 (C, C6)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 424.1987, found 424.198

((R)-2-ammonio-3-azidopropanoyl)-D-alaninate 2,2,2-trifluoroacetate



## 67

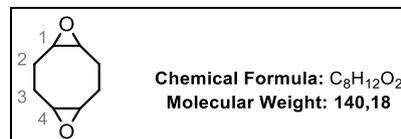
The compound **172** (312 mg, 0.78 mmol) was diluted in 5 mL of TFA at 0 °C and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum, dried under high vacuum (oil pump) and the resulting solid was triturated in diethyl ether overnight. Then, the product was filtered and dried under vacuum to obtain the amino acid **67** as a white solid (150.4 mg, 61 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 1.41 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H, H5), 3.73 (dd,  $J = 13.4, 7.5$  Hz, 1H, H1a), 3.92 (dd,  $J = 13.4, 4.0$  Hz, 1H, H1b), 4.00 (dd,  $J = 7.5, 4.0$  Hz, 1H, H2), 4.37 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 18.1 (CH<sub>3</sub>, C5), 50.6 (CH, C4), 52.6 (CH<sub>2</sub>, C1), 54.0 (CH, C2), 118.2 (q,  $J = 292.0$  Hz, CF<sub>3</sub>), 167.6 (C, C3), 176.6 (C, C6)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub> [M-C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 202.0935, found 202.0933

## V. Synthesis of the linker TCO-(PEG)<sub>4</sub>-DIBO

### 5,10-Dioxatricyclo[7.1.0.0<sup>4,6</sup>]decane



### 174

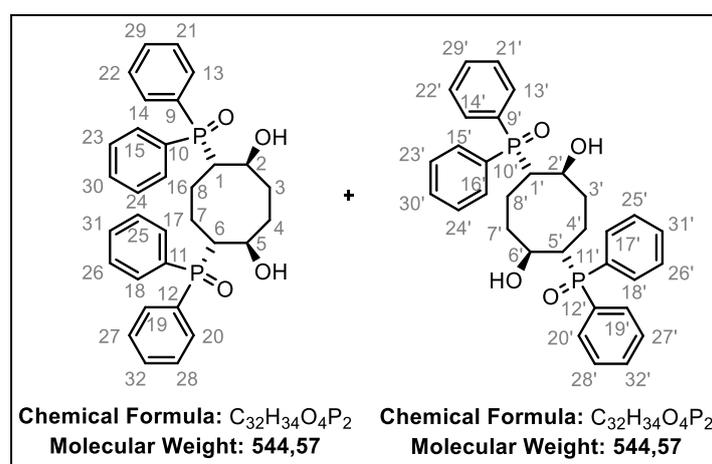
(1Z, 5Z)-Cycloocta-1,5-diene (3.0 g, 27.7 mmol, 1 equiv.) was diluted in 120 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and *m*CPBA (10.5 g, 61 mmol, 2.2 equiv.) was added in portions. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h then washed with saturated Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. The product was extracted 3 times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by FCC (10-30 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) afforded **174** as a colourless oil (2.55 g, 66 %) which crystallized upon standing.

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>175</sup>

R<sub>f</sub> = 0.24 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.80-2.06 (m, 8H, H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>), 2.97-3.02 (m, 4H, H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 22.3 (4×CH<sub>2</sub>, 2×C<sub>2</sub>-2×C<sub>3</sub>), 56.3 (4×CH, 2×C<sub>1</sub>-2×C<sub>4</sub>)

((1R,4S,5R,8S)-5,8-Dihydroxycyclooctane-1,4-diyl)bis(diphenylphosphine oxide) and ((1R,2S,5R,6S)-2,6-dihydroxycyclooctane-1,5-diyl)bis(diphenylphosphine oxide)



### 175a

### 175b

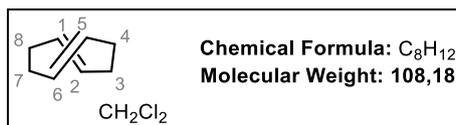
The epoxide **174** (1.5 g, 10.7 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 1.5 mL of anhydrous THF and diphenylphosphine (4.18 g, 22.5 mmol, 2.1 equiv.) was added. The reaction mixture was cooled down to -78 °C and *n*BuLi (2.5 M in hexanes, 9.4 mL, 23.5 mmol, 2.2 equiv.) was added dropwise under argon atmosphere. After 30 min at -78 °C, the reaction mixture was stirred 22 h at room temperature. The brown solution was cooled to 0 °C and diluted with 30 mL of THF. Then, AcOH (1.8 mL, 32.1 mmol, 3 equiv.) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 %, 1.8 mL, 32.1 mmol, 3 equiv.) were added, forming a white precipitate. After stirring for 30 min, THF was evaporated and purification by FCC (3-8 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) afforded a mixture of **175a** and **175b** as a white solid (4.52 g, 78 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>175</sup>

**R<sub>f</sub>** = 0.32 (**175a**) and 0.45 (**175b**) (MeOH 5 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1.50-2.09 (m, 16H, H3-H4-H7-H8-H3'-H4'-H7'-H8'), 3.02 (m, 1.4H, H1'-H5'), 3.16 (m, 2.6H, H1-H6), 4.05 (m, 1.4H, H2'-H6'), 4.15 (m, 2.6H, H2-H5), 7.44-7.58 (m, 24H, H21-H32, H21'-H32'), 7.69-7.89 (m, 16H, H13-H20, H13'-H20'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 21.7 (2×CH<sub>2</sub>, C3-C4, **175a**), 24.4 (d, *J* = 13.8 Hz, 2×CH<sub>2</sub>, C4'-C8', **175b**), 32.5 (d, *J* = 9.2 Hz, 2×CH<sub>2</sub>, C3'-C7', **175b**), 34.9 (t, *J* = 9.7 Hz, 2×CH<sub>2</sub>, C7-C8, **175a**), 42.4 (d, *J* = 71.1 Hz, 2×CH, C1'-C5', **175b**), 44.2 (d, *J* = 70.0 Hz, 2×CH, C1-C6, **175a**), 70.8 (d, *J* = 2.8 Hz, 2×CH, C2-C5, **175a**), 71.3 (d, *J* = 3.3 Hz, 2×CH, C2'-C6', **175b**), 129.7 (d, *J* = 12.1 Hz, 4×CH, C13' to C20', **175b**), 129.7 (d, *J* = 11.9 Hz, 4×CH, C13 to C20, **175a**), 130.0 (d, *J* = 11.6 Hz, 4×CH, C13 to C20, **175a**), 130.1 (d, *J* = 11.5 Hz, 4×CH, C13' to C20', **175b**), 132.0 (d, *J* = 9.3 Hz, 4×CH, C21' to C28', **175b**), 132.1 (d, *J* = 8.5 Hz, 4×CH, C21' to C28', **175b**), 132.2 (d, *J* = 9.5 Hz, 4×CH, C21 to C28, **175a**), 132.5 (d, *J* = 8.8 Hz, 4×CH, C21 to C28, **175a**), 132.7 (d, *J* = 2.7 Hz, 2×CH, C29' or C30' or C31' or C32', **175b**), 132.9 (d, *J* = 2.8 Hz, 2×CH, C29 or C30 or C31 or C32, **175a**), 133.0 (d, *J* = 2.6 Hz, 2×CH, C29' or C30' or C31' or C32', **175b**), 133.2 (d, *J* = 2.8 Hz, 2×CH, C29 or C30 or C31 or C32, **175a**), 133.5 (d, *J* = 97.0 Hz, 2×C, C9 or C10 or C11 or C12, **175a**), 133.9 (d, *J* = 97.0 Hz, 2×C, C9' or C10' or C11' or C12', **175b**), 134.5 (d, *J* = 98.6 Hz, 2×C, C9 or C10 or C11 or C12, **175a**), 134.9 (d, *J* = 100.2 Hz, 2×C, C9' or C10' or C11' or C12', **175b**)

(1*E*,5*E*)-Cycloocta-1,5-diene



**176**

The mixture of phosphines **175a** and **175b** (1.73 g, 3.17 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 18 mL of DMF with stirring under argon atmosphere. The clear solution became cloudy and NaH (60 % in mineral oils,

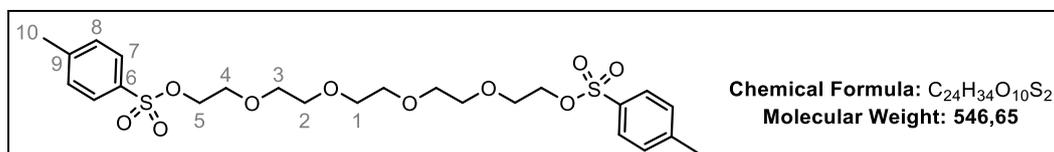
381 mg, 9.5 mmol, 3 equiv.) was added in portions at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred for 22 h, cooled to 0 °C, diluted with pentane (20 mL) and quenched by slow addition of saturated NH<sub>4</sub>Cl (15 mL). The product was extracted twice with pentane and the combined organic layers were washed with brine. The product in solution in pentane was extracted with a freshly prepared solution of AgNO<sub>3</sub> 0.1 M. The pentane layer was discarded, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added followed by the addition of NH<sub>3</sub> (25 %, 15 mL) and vigorous shaking. The organic layer was then washed with water, brine and dried over MgSO<sub>4</sub> to afford **176** in solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (32 mL of 17 mM of **176** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 17 %).

Quantification of the concentration of (*E,E*)-COD **176** was performed by adding 1 mL of a solution in D<sub>2</sub>O of 0.06 M of glycine + 0.1 M AgNO<sub>3</sub> to 1 mL of the solution of **176** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After shaking, the D<sub>2</sub>O phase containing the silver-complex of (*E,E*)-COD and glycine as internal standard was analyzed by NMR.

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>54,175</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 2.51 (m, 4H, H3a-H4a-H7a-H8a), 2.78 (m, 4H, H3b-H4b-H7b-H8b), 5.33 (m, 4H, H1-H2-H5-H6); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 32.0 (4×CH<sub>2</sub>, C3-C4-C7-C8), 125.0 (4×CH, C1-C2-C5-C6).

#### 3,6,9,12-Tetraoxatetradecane-1,14-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate)



#### **178**

Pentaethyleneglycol (1.0 g, 4.2 mmol, 1 equiv.) was diluted in 8 mL of THF at 0 °C. TsCl (1.76 g, 9.23 mmol, 2.2 equiv.), KOH (1.89 g, 33.6 mmol, 8 equiv.) and 5 mL of H<sub>2</sub>O were added. The reaction mixture was stirred at 0 °C during 4 h and EtOAc was added to the reaction mixture. It was washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl and the product was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **178** as a colourless oil (2.23 g, 97 %).

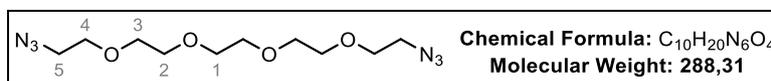
The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>176</sup>

R<sub>f</sub> = 0.23 (MeOH 2 % / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 98 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.45 (s, 6H, H10), 3.59 (m, 12H, H1-H2-H3), 3.68 (m, 4H, H4), 4.15 (m, 4H, H5), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H8), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H7); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)

21.8 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C10), 68.9 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C4), 69.5 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C5), 70.7 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C1 or 2×C2 or 2×C3), 70.8 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C1 or 2×C2 or 2×C3), 71.0 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C1 or 2×C2 or 2×C3), 128.2 (4×CH, 4×C7), 130.0 (4×CH, 2×C8), 133.3 (2×C, 2×C6), 145.0 (2×C, 2×C9)

1,14-Diazido-3,6,9,12-tetraoxatetradecane



**179**

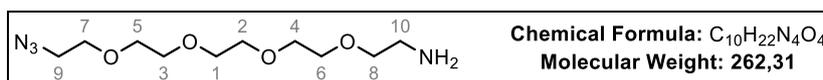
The tosylated compound **178** (2.23 g, 4.08 mmol, 1 equiv.) was diluted in 10 mL of CH<sub>3</sub>CN. Sodium azide (1.33 g, 20.4 mmol, 5 equiv.) was added in portions and the reaction mixture was refluxed during 15 h. Then, the insoluble salt was filtered off and the filtrate was evaporated under reduced pressure. Purification by FCC (40-50 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) afforded **179** as a colourless oil (951 mg, 81 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>176</sup>

R<sub>f</sub> = 0.26 (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H5), 3.66-3.69 (m, 16H, H1-H2-H3-H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 51.0 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C5), 70.3 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C4), 70.9 (6×CH<sub>2</sub>, 2×C1-2×C2-2×C3)

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amine



**180**

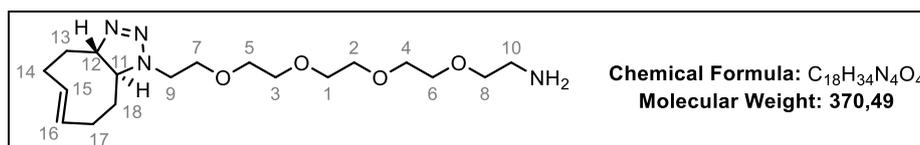
The compound **179** (500 mg, 1.73 mmol, 1.1 equiv.) was diluted in 2 mL of EtOAc/ Et<sub>2</sub>O (1:1), 1.7 mL of HCl 2 M and PPh<sub>3</sub> (412 mg, 1.57 mmol, 1 equiv.) were added at room temperature. After stirring during 22 h at room temperature, H<sub>2</sub>O was added to the reaction mixture and it was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×15 mL). The aqueous phase was then basified with KOH 10 % until pH 12. The product was extracted 10 times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **180** as a colourless oil (288 mg, 70 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>177</sup>

R<sub>f</sub> = 0.32 (Et<sub>3</sub>N 0.5 %/ MeOH 4.5 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.87 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H10), 3.39 (m, 2H, H9), 3.51 (m, 2H, H8), 3.62-3.69 (m, 14H, H1 to H7);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 42.3 ( $\text{CH}_2$ , C10), 50.9 ( $\text{CH}_2$ , C9), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.5 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.80 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.83 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.86 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.91 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.94 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 73.7 ( $\text{CH}_2$ , C8)

(E)-14-(3a,4,5,8,9,9a-Hexahydro-1H-cycloocta[d][1,2,3]triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amine



### 181

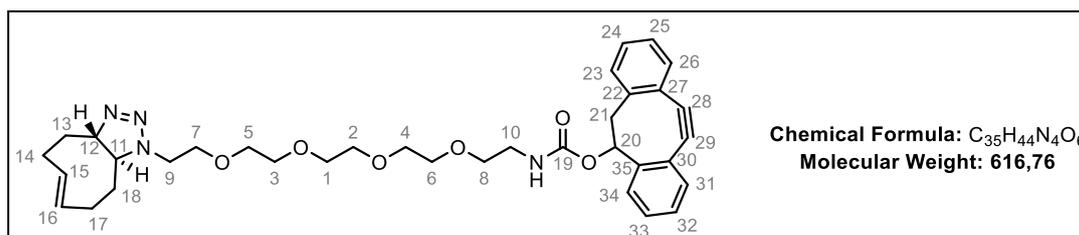
The cyclooctadiene **176** (6.8 mg, 0.063 mmol, 1.1 equiv., 3.7 mL of a solution at 17 mM in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was mixed with the azide **180** (15 mg, 0.057 mmol, 1 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature. After 19 h,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was evaporated and purification by FCC (0.5 %  $\text{Et}_3\text{N}$ / 4.5 % MeOH/ 95 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) afforded **181** as a colourless oil (14.5 mg, 69 %).

$R_f = 0.32$  ( $\text{Et}_3\text{N}$  0.5 % / MeOH 4.5 % /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1.56-1.72 (m, 2H, H13a-H18a), 2.16-2.53 (m, 7H, H14-H17-H18b-NH<sub>2</sub>), 2.72 (m, 1H, H13b), 2.90 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H10), 2.99 (td,  $J = 11.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H, H11), 3.48-3.56 (m, 3H, H8-H9a), 3.59-3.78 (m, 15H, H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H9b), 3.87 (td,  $J = 11.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H, H12), 5.43-5.57 (m, 2H, H15-H16);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 32.7 ( $\text{CH}_2$ , C17), 33.6 ( $\text{CH}_2$ , C14), 36.2 ( $\text{CH}_2$ , C18), 37.9 ( $\text{CH}_2$ , C13), 41.8 ( $\text{CH}_2$ , C10), 48.2 ( $\text{CH}_2$ , C9), 67.5 (CH, C11), 69.6 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.4 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.6 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.70 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.73 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.74 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 70.75 ( $\text{CH}_2$ , C1 to C7), 73.0 ( $\text{CH}_2$ , C8), 86.8 (CH, C12), 134.5 (CH, C15 or C16), 135.8 (CH, C15 or C16)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  371.2653, found 371.2642

11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulenyyl (E)-(14-(3a,4,5,8,9,9a-hexahydro-1H-cycloocta[d][1,2,3] triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamate



### 182

The primary amine **181** (26 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.) was diluted in 2.5 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> followed by the addition of the activated DIBO compound **132** (27 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.) and Et<sub>3</sub>N (49 μL, 0.35 mmol, 5 equiv.). After stirring during 14 h, distilled water was added and the product was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated under reduced pressure and purification by FCC (2-3 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) afforded **182** as a colourless oil (8.2 mg, 20 %).

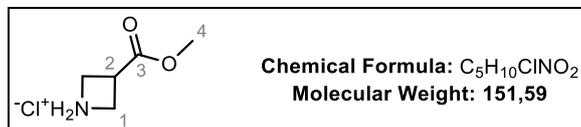
R<sub>f</sub> = 0.31 (MeOH 2 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 98 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.56-1.70 (m, 2H, H13a-H18a), 2.15-2.24 (m, 2H, H17a-H18b), 2.31-2.52 (m, 3H, H14-H17b), 2.72 (m, 1H, H13b), 2.90 (dd, *J* = 15.1 Hz, 4.0 Hz, 1H, H21a), 2.98 (td, *J* = 11.1 Hz, 1.7 Hz, 1H, H11), 3.17 (dd, *J* = 15.1 Hz, 2.3 Hz, 1H, H21b), 3.40 (m, 2H, H10), 3.51-3.76 (m, 18H, H1 to H9), 3.86 (td, *J* = 11.1 Hz, 1.7 Hz, 1H, H12), 5.44-5.53 (m, 2H, H15-H16), 5.59 (m, 1H, H20), 7.27-7.39 (m, 7H, H<sub>arom</sub>), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 32.8 (CH<sub>2</sub>, C17), 33.6 (CH<sub>2</sub>, C14), 36.2 (CH<sub>2</sub>, C18), 38.0 (CH<sub>2</sub>, C13), 41.2 (CH<sub>2</sub>, C10), 46.4 (CH<sub>2</sub>, C21), 48.2 (CH<sub>2</sub>, C9), 67.5 (CH, C11), 69.7 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.3 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.5 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.6 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.80 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.84 (CH<sub>2</sub>, C1 to C8), 70.9 (2xCH<sub>2</sub>, 2xC1 to C8), 77.4 (CH, C20), 86.9 (CH, C12), 110.2 (C, C29), 113.1 (C, C28), 121.5 (C, C30), 124.0 (CH, C<sub>arom</sub>), 124.1 (C, C27), 126.2 (CH, C<sub>arom</sub>), 126.4 (CH, C<sub>arom</sub>), 127.3 (2xCH, 2xC<sub>arom</sub>), 128.1 (CH, C<sub>arom</sub>), 128.3 (CH, C<sub>arom</sub>), 130.1 (CH, C<sub>arom</sub>), 134.6 (CH, C15 or C16), 135.8 (CH, C15 or C16), 151.2 (C, C22 or C35), 152.4 (C, C22 or C35), 155.7 (C, C19)

HRMS (ESI): *m/z* calc. for C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 617.3334, found 617.3336

## VI. Synthesis of fluorophores

### Methyl azetidine-3-carboxylate hydrochloride



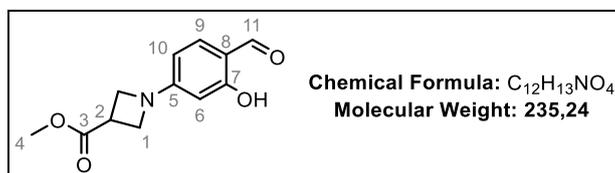
### **185**

3-Azetidinecarboxylic acid (3.0 g, 29.7 mmol, 1 equiv.) was suspended in anhydrous MeOH (60 mL) before adding TMSCl (7.5 mL, 59 mmol, 2 equiv.) at room temperature. After stirring for 23 h at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was triturated in diethyl ether. Then, the product was filtered and dried under vacuum to obtain the compound **185** as a white solid (3.6 g, 80 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 3.77 (s, 3H, H4), 3.83 (m, 1H, H2), 4.28 (m, 4H, H1); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 36.2 (CH, C2), 49.6 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C1), 53.4 (CH<sub>3</sub>, C4), 172.8 (C, C3)

**HRMS (ESI):** *m/z* calc. for C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 116.0706, found 116.0702

### Methyl 1-(4-formyl-3-hydroxyphenyl)azetidine-3-carboxylate



### **186**

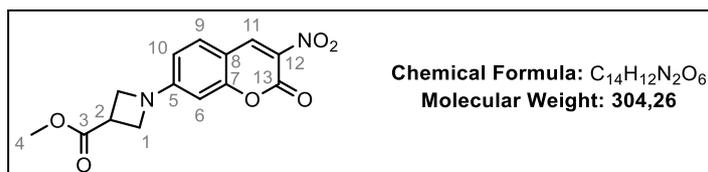
4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (1.0 g, 7.14 mmol, 1.0 equiv.) and the azetidine derivative hydrochloric salt **185** (1.3 g, 8.57 mmol, 1.2 equiv.) were dissolved in DMSO (30 mL). DIPEA (2.91 mL, 17.1 mmol, 2.4 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred at 100 °C during 2 h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and poured into saturated NaCl (100 mL). The resultant mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (20-40 % EtOAc/ Cyclohexane (v/v)) to afford the aldehyde **186** as light brown solid (689 mg, 41 %).

R<sub>f</sub> = 0.21 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.59 (m, 1H, H2), 3.78 (s, 3H, H4), 4.20 (m, 4H, H1), 5.80 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H6), 5.98 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 2.2 Hz, 1H, H10), 7.29 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H9), 9.54 (br s, 1H, H11);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 33.0 (CH, C2), 52.7 (CH<sub>3</sub>, C4), 53.7 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, 2 $\times$ C1), 96.4 (CH, C6), 103.5 (C, C8), 112.9 (CH, C10), 135.7 (CH, C9), 156.2 (C, C5), 164.4 (C, C7), 172.8 (C, C3), 193.1 (C, C11)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  236.0917, found 236.0919

Methyl 1-(3-nitro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)azetidine-3-carboxylate



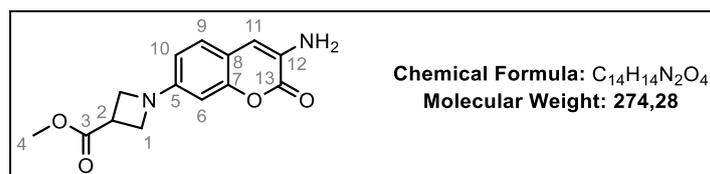
**187**

L-Proline (7.4 mg, 0.0639 mmol, 0.3 equiv.) was added to a solution of the aldehyde **186** (50 mg, 0.213 mmol, 1.0 equiv.) and ethyl nitroacetate (56.6 mg, 0.425 mmol, 2.0 equiv.) in EtOH (1 mL). The reaction mixture was stirred at 80 °C and monitored by TLC. After 23 h, ethyl nitroacetate (28 mg, 0.213 mmol, 1.0 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred and heated at 80 °C for 17 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was diluted  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) and washed with brine (10 mL). The product was then extracted from the aqueous layer with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was recrystallized in a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Cyclohexane mixture to obtain the coumarin **187** as a red powder (55 mg, 86 %)

$R_f = 0.17$  (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3.70 (s, 3H, H4), 3.74 (m, 1H, H2), 4.21 (m, 2H, H1a), 4.34 (m, 2H, H1b), 6.39 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H6), 6.58 (m, 1H, H10), 7.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H9), 9.06 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H, H11);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 32.0 (CH, C2), 52.1 (CH<sub>3</sub>, C4), 53.7 (2 $\times$ CH<sub>2</sub>, 2 $\times$ C1), 95.1 (CH, C6), 106.9 (C, C8), 109.9 (CH, C10), 126.7 (C, C12), 133.3 (CH, C9), 144.6 (CH, C11), 152.7 (C, C5), 155.7 (C, C7), 157.8 (C, C13), 172.5 (C, C3)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  305.0768, found 305.0769

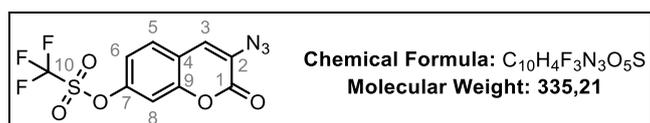
Methyl 1-(3-amino-2-oxo-2H-chromen-7-yl)azetidine-3-carboxylate**188**

The coumarin **187** (50 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) was dissolved in MeOH (2 mL) and 10 % Pd/C (17 mg, 0.1 equiv. of Pd) was added at room temperature under argon. The flask was evacuated and backfilled with H<sub>2</sub> gas three times and a balloon of H<sub>2</sub> was left continuously. The reaction mixture was stirred for 4 h, then filtered through a pad of celite and washed with MeOH. Solvents from the filtrate were evaporated and the compound **188** was obtained as a yellow solid (43 mg, 95 %).

R<sub>f</sub> = 0.29 (EtOAc 40 %/ Cyclohexane 60 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.59 (m, 1H, H2), 3.76 (s, 3H, H4), 4.10 (m, 4H, H1), 6.30-6.36 (m, 2H, H6-H10), 6.68 (s, 1H, H11), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H9); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 33.5 (CH, C2), 52.5 (CH<sub>3</sub>, C4), 54.6 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C1), 98.4 (CH, C6), 109.2 (CH, C10), 112.2 (CH, C11), 114.0 (C, C8), 126.1 (CH, C9), 128.6 (C, C12), 150.7 (C, C5), 151.0 (C, C7), 160.1 (C, C13), 173.2 (C, C3)

**GC-MS (EI):** *m/z* calc. for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> 274.10, found 274.10

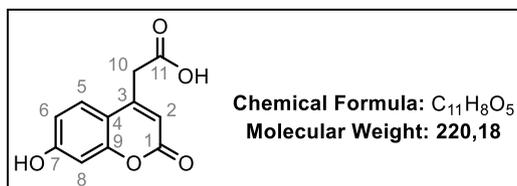
3-Azido-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate**190**

The coumarin **121** (100 mg, 0.49 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 3 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in a round-bottom flask and cooled down to 0 °C. Pyridine (79 μL, 0.98 mmol, 2 equiv.) and Tf<sub>2</sub>O (214 μL, 1.23 mmol, 2.5 equiv.) were successively added. After 45 min at 0 °C, the reaction mixture was left at room temperature during 15 min. Then, 15 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and the reaction mixture was washed with HCl (1 M), H<sub>2</sub>O and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (20 % AcOEt/ Cyclohexane) to afford the product **190** as a yellow solid (135 mg, 82 %).

R<sub>f</sub> = 0.40 (Acetone 20 %/ Cyclohexane 80 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.21 (s, 1H, H3), 7.23 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 7.30 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H8), 7.52 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H5);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 110.5 (CH, C8), 119.2 (q,  $J = 95$  Hz, C, C10), 118.5 (CH, C6), 119.5 (C, C4), 124.0 (CH, C5), 127.7 (C, C2), 128.6 (CH, C3), 149.5 (C, C7), 151.4 (C, C9), 156.4 (C, C1)

2-(7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)acetic acid



**193**

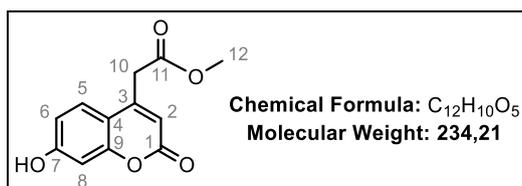
Citric acid (5.0 g, 26 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 7 mL of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and the reaction mixture was heated up to 60 °C during 30 min in order to remove carbon monoxide. Then, the reaction mixture was cooled down to 0 °C in an ice bath and resorcinol (3.15 g, 28.6 mmol, 1.1 equiv.) was added in small portions. After 2 h at 0 °C, the reaction mixture was heated up to 30 °C. After 38 h, it was poured into ice water and a yellow precipitate appeared after a few minutes stirring. The precipitate was filtered and the product was dissolved in saturated sodium bicarbonate solution. Solid impurities were filtered off and the filtrate was acidified with HCl 2 M until precipitation of the compound. It was then filtered off to obtain the coumarin **193** as a white powder (3.40 g, 70 %)

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>152</sup>

$R_f = 0.15$  (AcOH 0.4 %/ MeOH 3.6 %/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  96 %)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.82 (s, 2H, H10), 6.20 (s, 1H, H2), 6.71 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H8), 6.80 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 7.56 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H5);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 38.7 (CH<sub>2</sub>, C10), 103.8 (CH, C8), 113.2 (C, C4), 113.3 (CH, C2), 114.5 (CH, C6), 127.7 (CH, C5), 152.1 (C, C3), 157.0 (C, C9), 163.2 (C, C1 or C7), 163.7 (C, C1 or C7), 172.9 (C, C11)

Methyl 2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)acetate



**194**

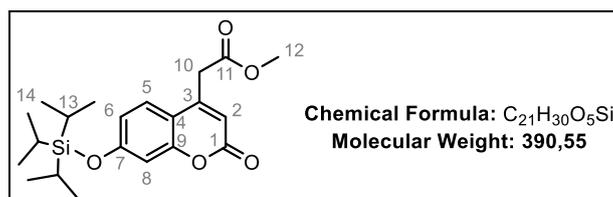
The coumarin **193** (3.63 g, 16.47 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 70 mL of MeOH and SOCl<sub>2</sub> (3.584 mL, 49.41 mmol, 3 equiv.) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at room temperature for 19 h. Then, MeOH was evaporated and the crude product was suspended in EtOAc (80 mL) and stirred during 2 h. The precipitate was filtered off to obtain the coumarin **194** as a white powder (3.34 g, 87 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>153</sup>

$R_f = 0.28$  (AcOEt 40 %/ Cyclohexane 60 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 3.71 (s, 3H, H12), 3.88 (m, 2H, H10), 6.19 (m, 1H, H2), 6.72 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H8), 6.80 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 7.53 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 38.4 (CH<sub>2</sub>, C10), 53.11 (CH<sub>3</sub>, C12), 103.8 (CH, C8), 113.1 (C, C4), 113.4 (CH, C2), 114.6 (CH, C6), 127.7 (CH, C5), 151.6 (C, C3), 157.0 (C, C9), 163.3 (C, C1 or C7), 163.5 (C, C1 or C7), 171.5 (C, C11)

Methyl 2-(2-oxo-7-((triisopropylsilyl)oxy)-2H-chromen-4-yl)acetate

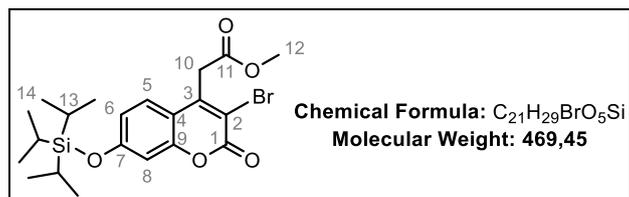


### 196

The hydroxycoumarin **194** (859 mg, 3.67 mmol, 1 equiv.) was suspended in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL) and cooled down to 0 °C. Then, Et<sub>3</sub>N (1.52 mL, 11.0 mmol, 3 equiv.) and TIPSCl (1.02 mL, 4.76 mmol, 1.3 equiv.) were successively added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After 17 h, the reaction mixture was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) and the product was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (10-20 % AcOEt/ Cyclohexane (v/v)) to afford the protected coumarin **196** as a white solid (1.29 g, 90 %).

$R_f = 0.28$  (AcOEt 20 %/ Cyclohexane 80 %)

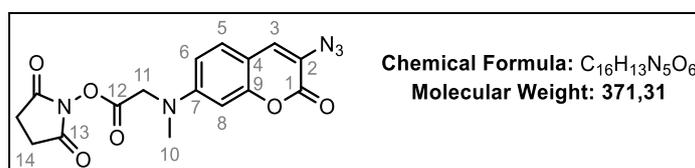
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.11 (d,  $J = 7.3$  Hz, 18H, H14), 1.29 (m, 3H, H13), 3.73 (br s, 2H, H10), 3.74 (s, 3H, H12), 6.23 (s, 1H, H2), 6.80-6.85 (m, 2H, H6-H8), 7.44 (m, 1H, H5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 12.9 (3×CH, 3×C13), 18.0 (6×CH<sub>3</sub>, 6×C14), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C10), 52.9 (CH<sub>3</sub>, C12), 108.0 (CH, C8), 113.1 (C, C4), 114.2 (CH, C2), 117.5 (CH, C6), 125.6 (CH, C5), 148.1 (C, C3), 155.5 (C, C9), 160.1 (C, C7), 161.1 (C, C1), 169.4 (C, C11)

Methyl 2-(3-bromo-2-oxo-7-((triisopropylsilyl)oxy)-2H-chromen-4-yl)acetate**197**

The protected coumarin **196** (1.29 g, 3.30 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 15 mL of MeCN. Then, a solution of NBS (587 mg, 3.30 mmol, 1 equiv.) in 8 mL of MeCN was added at room temperature. The reaction mixture was stirred during 7 h at room temperature. After completion of the reaction, MeCN was evaporated, the crude product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> (30 mL). Then, the product was extracted three times from the aqueous layer with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (5-10 % AcOEt/ Cyclohexane (v/v)) to afford the brominated coumarin **197** as a white solid (1.08 g, 70 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.40 (AcOEt 10 %/ Cyclohexane 90 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.11 (d, *J* = 7.4 Hz, 18H, H14), 1.29 (m, 3H, H13), 3.74 (s, 3H, H12), 4.09 (s, 2H, H10), 6.83-6.88 (m, 2H, H6-H8), 7.44 (m, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 12.8 (3×CH, 3×C13), 18.0 (6×CH<sub>3</sub>, 6×C14), 38.8 (CH<sub>2</sub>, C10), 53.0 (CH<sub>3</sub>, C12), 107.8 (CH, C8), 112.4 (C, C2), 113.4 (C, C4), 118.2 (CH, C6), 126.0 (CH, C5), 146.9 (C, C3), 153.8 (C, C9), 157.4 (C, C1), 160.2 (C, C7), 168.4 (C, C11)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl *N*-(3-azido-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-*N*-methylglycinate**202**

The coumarin **200** was synthesized according to the procedure described by Wong *et al.*<sup>154</sup>

The coumarin **200** (639 mg, 1.93 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 19 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. 2,6-lutidine (2.24 mL, 19.3 mmol, 10 equiv.) and TMS-OTf (1.75 mL, 9.65 mmol, 5 equiv.) were added successively at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred during 2 h and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 2,6-lutidine were evaporated. The crude product was purified by FCC (0-7 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v)) to afford the brominated coumarin **201** contaminated with 2,6-lutidine.

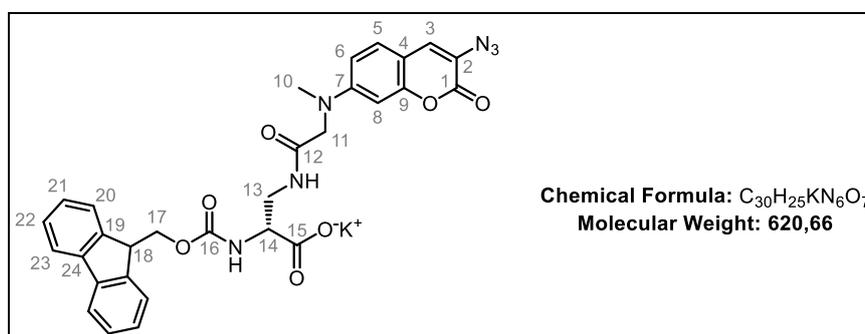
The contaminated coumarin **201** (920 mg, 2.4 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 30 mL of DMF. *N*-hydroxysuccinimide (333 mg, 2.9 mmol, 1.2 equiv.) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred during 16 h. DMF was evaporated, the crude product was dissolved in EtOAc and it was washed with H<sub>2</sub>O. Then, the product was extracted three times from the aqueous layer with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (20-40 % AcOEt/ Cyclohexane (v/v)) to afford the activated coumarin **202** as a brown solid (465 mg, 65 % over two steps).

$R_f$  = 0.48 (Acetone 40 %/ Cyclohexane 60 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 2.84 (s, 4H, H14), 3.17 (s, 3H, H10), 4.48 (s, 2H, H11), 6.64-6.69 (m, 2H, H6-H8), 7.12 (s, 1H, H3), 7.29 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 25.8 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C14), 39.8 (CH<sub>3</sub>, C10), 52.0 (CH<sub>2</sub>, C11), 99.6 (CH, C8), 110.4 (CH, C6), 110.6 (C, C4), 122.1 (C, C2), 127.0 (CH, C3), 128.5 (CH, C5), 150.4 (C, C4), 153.6 (C, C9), 158.2 (C, C1), 165.6 (C, C12), 168.8 (2×C, 2×C13)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 372.0939, found 372.0625

Potassium (*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(2-((3-azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)(methyl)amino)acetamido)propanoate



### 203

The activated coumarin **202** (50 mg, 0.134 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 4 mL of DMF. Fmoc-D-2,3-diaminopropionic acid (57 mg, 0.175 mmol, 1.3 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (37 mg, 0.270 mmol, 2 equiv.) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred for 1 h, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was filtered off and DMF was evaporated. The crude product was purified by FCC (0.5 % Et<sub>3</sub>N/ 4.5 % MeOH/ 95 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the activated coumarin **202** as a brown solid (81 mg, 96 % over two steps).

$R_f$  = 0.33 (Et<sub>3</sub>N 0.5 %/ MeOH 4.5 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95 %)

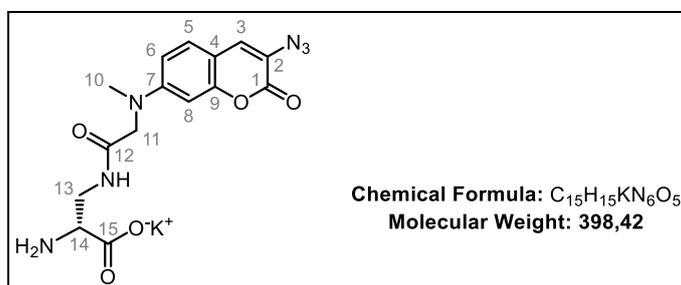
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  (ppm) 3.19 (s, 3H, H10), 3.55 (m, 2H, H13), 3.97-4.32 (m, 6H, H11-H13-H17-H18), 6.58 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H8), 6.70 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, H6), 7.17 (s, 1H, H3), 7.27 (d,  $J$  =

8.8 Hz 1H, H5), 7.33 (m, 2H, H21), 7.42 (m, 2H, H22), 7.65 (m, 2H, H20), 7.85 (m, 2H, H23);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm) 39.9 (CH<sub>3</sub>, C10), 43.6 (CH<sub>2</sub>, C13), 47.9 (CH, C18), 55.6 (CH, C14), 57.3 (CH<sub>2</sub>, C11), 67.2 (CH<sub>2</sub>, C17), 98.9 (CH, C8), 110.1 (C, C4), 111.1 (CH, C6), 120.7 (C, C2), 120.8 (2×CH, 2×CH<sub>Fmoc</sub>), 126.1 (2×CH, 2×CH<sub>Fmoc</sub>), 127.9 (2×CH, 2×CH<sub>Fmoc</sub>), 128.4 (CH, C3), 128.5 (2×CH, 2×CH<sub>Fmoc</sub>), 129.3 (CH, C5), 142.0 (C, C<sub>Fmoc</sub>), 142.1 (C, C<sub>Fmoc</sub>), 145.1 (C, C<sub>Fmoc</sub>), 145.2 (C, C<sub>Fmoc</sub>), 152.7 (C, C7), 154.5 (C, C9), 157.1 (C, C16), 158.4 (C, C1), 169.5 (C, C12), 174.0 (C, C15)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>30</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>N<sub>6</sub> [M-K]<sup>-</sup> 581.1790, found 581.1774

$[\alpha]_D^{20} = + 26.3$  (c = 0.17, DMSO)

Potassium (*R*)-2-amino-3-(2-((3-azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl))(methyl)amino)acetamido)propanoate



## 204

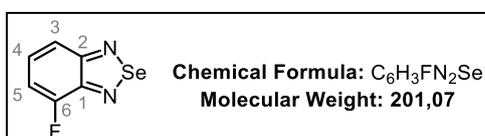
The coumarin **203** (15 mg, 0.024 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 0.3 mL of DMF and piperidine (4.7  $\mu\text{L}$ , 0.048 mmol, 2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 h and DMF was evaporated. The resulting mixture was triturated in diethyl ether overnight and the product was filtered and dried under vacuum to obtain the coumarin **204** as a brown solid (7 mg, 73 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3.15 (s, 3H, H10), 3.20-3.51 (m, 3H, H13-H14 + H<sub>2</sub>O), 4.07 (m, 2H, H11), 6.63 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H8), 6.72 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 7.42 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H5), 7.55 (s, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 39.8 (CH<sub>3</sub>, C10), 43.7 (CH<sub>2</sub>, C13), 53.9 (CH, C14), 55.00 (CH<sub>2</sub>, C11) 97.6 (CH, C8), 108.5 (C, C4), 110.1 (CH, C6), 118.9 (C, C2), 128.4 (2×CH, C3-C5), 151.6 (C, C7), 153.3 (C, C9), 157.6 (C, C1) 167.8 (C, C12), 169.4 (C, C15)

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>N<sub>6</sub> [M-K]<sup>-</sup> 359.1109, found 359.1108

$[\alpha]_D^{20} = + 2.9$  (c = 0.1, DMSO)

4-Fluorobenzo[*c*][1,2,5]selenadiazole

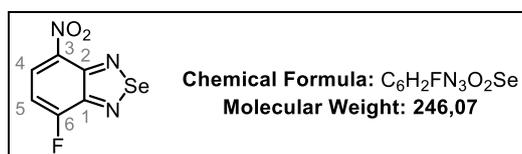


**210**

3-fluorobenzen-1,2-diamine (1.0 g, 7.9 mmol, 1 equiv.) and SeO<sub>2</sub> (930 mg, 8.4 mmol, 1.2 equiv.) were dissolved in 30 mL of EtOH. The reaction mixture was refluxed for 5 h. The solvent was then removed and purification by FCC (10 % EtOAc/ Cyclohexane) afforded the compound **210** as a white solid (1.36 g, 85 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>160</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 7.15 (m, 1H, H4), 7.50 (m, 1H, H5), 7.65 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H3)

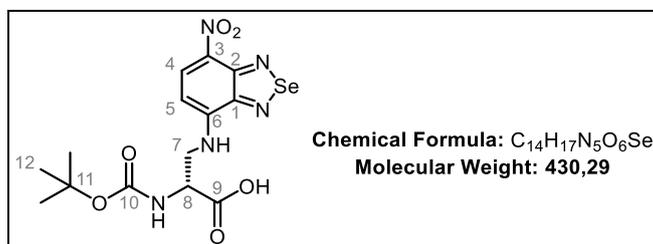
4-Fluoro-7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]selenadiazole**211**

The compound **210** (1.36 g, 67.7 mmol, 1 equiv.) was dissolved in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14.5 mL) at 0 °C and HNO<sub>3</sub> (70 % solution, 2.83 mL, 67.7 mmol, 10 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. Then, distilled water (250 mL) was added to form a yellow precipitate, which was collected by filtration. After drying under reduced pressure, the compound **211** was obtained as a yellow solid (1.12 g, 85 %).

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>160</sup>

R<sub>f</sub> = 0.34 (EtOAc 20 %/ Cyclohexane 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 7.39 (dd, *J* = 9.3, 8.4 Hz, 1H, H5), 8.56 (dd, *J* = 8.4, 4.7 Hz, 1H, H4).

(*R*)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]selenadiazol-4-yl)amino)propanoic acid**212**

Boc-D-2,3-diaminopropionic acid (72 mg, 0.353 mmol, 1.7 equiv.) and DIPEA (51 μL, 294 mmol, 1.5 equiv.) were added to a solution of **211** (50 mg, 0.203 mmol, 1 equiv.) in DMF (1 mL). Then, the red

mixture was stirred at room temperature for 1 h, diluted with EtOAc and washed with an aqueous solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in water). The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (0.6 % AcOH/ 5.4 % MeOH/ 94 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the protected amino acid **212** as an orange solid (40 mg, 46 %).

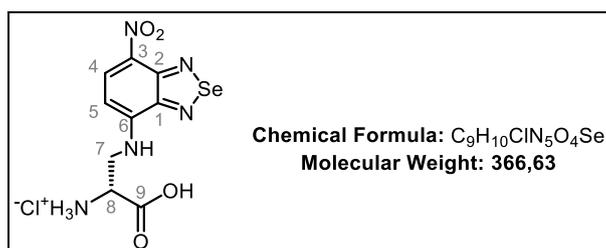
$R_f = 0.22$  (AcOH 0.7 %/ MeOH 6.3 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 93 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 1.30 (s, 9H, H12), 3.78 (m, 2H, H7), 4.32 (m, 1H, H8), 6.45 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H5), 8.58 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 28.1 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C12), 43.7 (CH<sub>2</sub>, C7), 52.8 (CH, C8), 78.4 (C, C11), 97.6 (CH, C5), 128.5 (C, C3), 135.0 (CH, C4), 148.1 (C, C6), 151.8 (C, C1 or C2), 151.9 (C, C1 or C2), 155.4 (C, C10), 171.9 (C, C9)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>Se [M-H]<sup>-</sup> 430.0272, found 430.0271

$[\alpha]_D^{20} = +51.4$  (c = 3.0, DMSO)

(R)-1-Carboxy-2-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]selenadiazol-4-yl)amino)ethan-1-aminium chloride



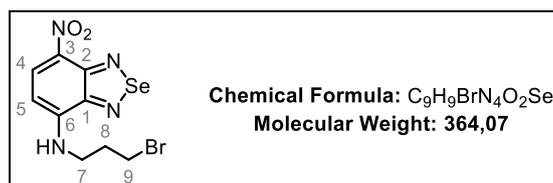
## 207

The deprotected amino acid **207** (red solid, 11.4 mg, 84 %) was prepared according to the **procedure B** starting with the protected amino acid (16 mg, 0.037 mmol) in 0.5 mL of HCl 4 M in dioxane and reacted during 2 h.

The spectroscopic data were in accordance with the literature.<sup>161</sup>

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 3.94 (m, 1H, H7a), 4.01 (m, 1H, H7b), 4.28 (m, 1H, H8), 6.55 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H5), 8.61 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 42.6 (CH<sub>2</sub>, C7), 51.1 (CH, C8), 98.0 (CH, C5), 129.2 (C, C3), 134.8 (CH, C4), 147.7 (C, C6), 151.7 (C, C1 or C2), 152.0 (C, C1 or C2), 169.1 (C, C9)

HRMS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>Se [M-H]<sup>-</sup> 329.9747, found 329.9743

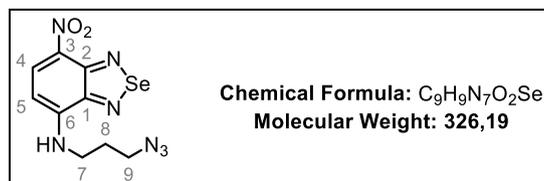
N-(3-Bromopropyl)-7-nitrobenzo[c][1,2,5]selenadiazol-4-amine**213**

The compound **213** (red solid, 223 mg, 46 %) was prepared according to the **procedure G** starting from 3-bromopropanamine hydrochloride (350 mg, 1.6 mmol), DIPEA (280  $\mu$ L, 1.6 mmol) and the 4-fluoro-nitrobenzoselenadiazole **211** (332 mg, 1.3 mmol) in DMF (4 mL). Purification by FCC (0-2 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

$R_f$  = 0.41 (MeOH 2 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 98 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  (ppm) 2.39 (tt,  $J$  = 6.7 Hz, 6.7 Hz, 2H, H8), 3.70-3.79 (m, 4H, H7-H9), 6.52 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, H5), 8.66 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  (ppm) 31.9 (CH<sub>2</sub>, C9), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C8), 42.1 (CH<sub>2</sub>, C7), 97.5 (CH, C5), 129.4 (C, C3), 135.4 (CH, C4), 148.9 (C, C6), 152.8 (C, C1 or C2), 152.9 (C, C1 or C2).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc. for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 364.9143, found 364.9136

N-(3-Azidopropyl)-7-nitrobenzo[c][1,2,5]selenadiazol-4-amine**214**

Sodium azide (43 mg, 0.66 mmol, 1.2 equiv.) was added to a solution of the compound **213** (200 mg, 0.55 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Water was added and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (0-2 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the compound **214** as a red solid (122 mg, 63 %).

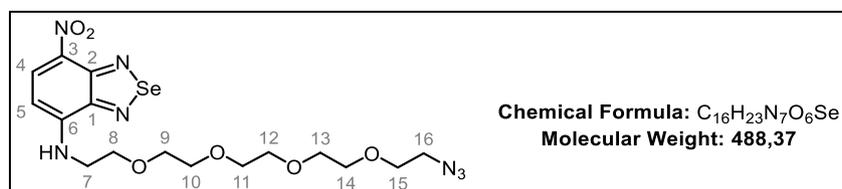
$R_f$  = 0.41 (MeOH 2 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 98 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  (ppm) 2.10 (tt,  $J$  = 6.7 Hz, 6.7 Hz, 2H, H8), 3.56-3.72 (m, 4H, H7-H9), 6.50 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, H5), 8.65 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  (ppm) 27.9 (CH<sub>2</sub>, C8),

40.9 (CH<sub>2</sub>, C7), 49.2 (CH<sub>2</sub>, C9), 97.5 (CH, C5), 129.2 (C, C3), 135.4 (CH, C4), 148.9 (C, C6), 152.7 (C, C1 or C2), 152.9 (C, C1 or C2).

**HRMS (ESI):** *m/z* calc. for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>7</sub>Se [M-H]<sup>-</sup> 325.9910, found 325.9913.

N-(14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-7-nitrobenzo[c][1,2,5]selenadiazol-4-amine



**215**

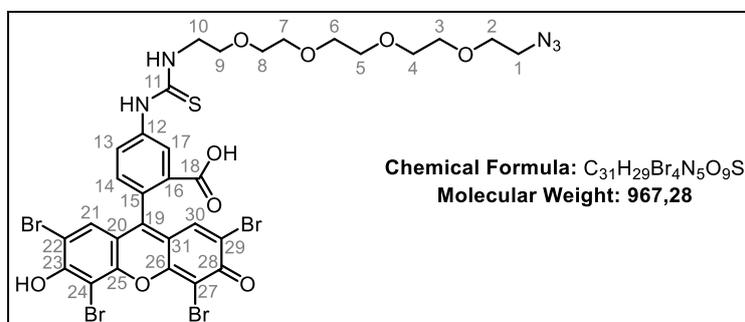
The compound **215** (red solid, 31 mg, 78 %) was prepared according to the **procedure G** starting from H<sub>2</sub>N-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> **180** (20 mg, 0.081 mmol), DIPEA (17 μL, 0.098 mmol) and the 4-fluoro-nitrobenzoselenadiazole **211** (20 mg, 0.081 mmol) in DMF (0.4 mL). Purification by FCC (0-1 % MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded the desired compound.

**R<sub>f</sub>** = 0.19 (MeOH 1 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 99 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3.38 (m, 2H, H16), 3.61-3.74 (m, 16H, H7-H9-H10-H11-H12-H13-H14-H15), 3.86 (m, 2H, H8), 6.22 (m, 1H, H5), 8.66 (m, 1H, H4); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 43.4 (CH<sub>2</sub>, C7), 50.9 (CH<sub>2</sub>, C16), 68.7 (CH<sub>2</sub>, C8), 70.2 (CH<sub>2</sub>, C9 to C15), 70.8 (3×CH<sub>2</sub>, 3×C9 to C15), 70.9 (CH<sub>2</sub>, C9 to C15), 70.9 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C9 to C15), 97.6 (CH, C5), 130.3 (C, C3), 135.6 (CH, C4), 147.6 (C, C6), 152.7 (C, C1 or C2), 152.8 (C, C1 or C2)

**HRMS (ESI):** *m/z* calc. for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>N<sub>7</sub>Se [M-H]<sup>-</sup> 488.0803, found 488.0799

5-(3-(14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)thioureido)-2-(2,4,5,7-tetrabromo-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid



**219**

The commercially available eosin **118** (10 mg, 0.0142 mmol, 1 equiv.) and H<sub>2</sub>N-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> **180** (37 mg, 0.142 mmol, 10 equiv.) were dissolved in 0.2 mL of DMSO and the reaction mixture was stirred for 1 h. EtOAc and H<sub>2</sub>O were added and the mixture was extracted three times with EtOAc. The organic layer dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (0.5 % AcOH/ 4.5 % MeOH/ 95 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford the compound **219** as an orange-pink solid (10 mg, 73 %).

R<sub>f</sub> = 0.13 (AcOH 0.5 %/ MeOH 4.5 %/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 3.34-3.44 (m, 2H + H<sub>2</sub>O, H1), 3.50-3.64 (m, 18H, H2 to H10), 6.95 (s, 1H, H30), 7.06 (s, 1H, H21), 7.37 (m, 1H, H13), 7.59 (m, 1H, H14), 8.33 (m, 1H, H17); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 43.7 (CH<sub>2</sub>, C10), 50.0 (CH<sub>2</sub>, C1), 69.2 (CH<sub>2</sub>, C2 to C9), 69.7 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C2 to C9), 69.78 (4×CH<sub>2</sub>, 4×C2 to C9), 69.82 (CH<sub>2</sub>, C2 to C9), 99.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 100.6 (C, C<sub>Arom</sub>), 107.1 (C, C<sub>Arom</sub>), 110.3 (C, C<sub>Arom</sub>), 113.0 (C, C<sub>Arom</sub>), 118.2 (C, C<sub>Arom</sub>), 128.7 (C, C<sub>Arom</sub>), 128.8 (C, C<sub>Arom</sub>), 129.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 129.6 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.4 (CH, C<sub>Arom</sub>), 131.5 (CH, C<sub>Arom</sub>), 132.0 (C, C<sub>Arom</sub>), 147.8 (C, C<sub>Arom</sub>), 151.7 (C, C<sub>Arom</sub>), 152.8 (C, C<sub>Arom</sub>), 153.3 (C, C<sub>Arom</sub>), 166.3 (C, C11 or C18 or C<sub>Arom</sub>), 167.75 (C, C11 or C18 or C<sub>Arom</sub>), 167.8 (C, C11 or C18 or C<sub>Arom</sub>), 180.4 (C, C28)

HRMS (ESI): *m/z* calc. for C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>Br<sub>4</sub>S [M-H]<sup>-</sup> 961.8347, found 961.8333

---

*Biological procedures for labeling and growth curves measurements*

---

Experiments focused on teichoic acids (Chapter II)

All the following experiments were carried out on the strain D39 $\Delta$ *cps*<sup>178</sup> of the bacteria *S. pneumoniae*.

Growth experiments with choline derivatives

Bacteria were grown in BHI medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until the optical density at 600 nm reaches 0.3-0.5. Bacteria were centrifuged for 15 min at 3.500 *g* and washed three times in choline free C-medium. Then, cells were inoculated in a 24-well plate at an OD<sub>600nm</sub> equals to 0.03 in the presence of each choline derivative at a suitable concentration (25 μM, 100 μM or 300 μM). The growth of the bacteria was monitored on a Fluostar microplate reader in anaerobic conditions at 37 °C. Absorbance at 600 nm was measured every 20 minutes.

Labeling of TA with azido-choline derivatives

Bacteria were grown in BHI medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until the optical density at 600 nm reaches 0.3-0.5. Bacteria were centrifuged for 15 min at 3.500 *g* and washed three times in choline free C-medium. Cells were then incubated for 10 min at 37 °C in choline free C-medium after the addition in rapid succession (delay < 5 s) of the choline derivative (250 μM) and DBCO-AF488 (40 μM). Bacteria were washed three times with PBS and analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

Labeling of TA with tetrazine-choline **115**

Bacteria were grown in BHI medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until the optical density at 600 nm reaches 0.3-0.5. Bacteria were centrifuged for 15 min at 3.500 *g* and washed three times in choline free C-medium. Cells were then incubated for 5 min at 37 °C in choline free C-medium after the addition of the tetrazine-choline **115** (250 μM). Then, TCO-CF647 (40 μM) was added and the bacteria were incubated for 5 min at 37 °C. Bacteria were washed three times with PBS and analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

Labeling of TA with an azido-choline in competition with choline chloride **75**

Bacteria D39 $\Delta$ *cps* were grown as described above and for each choline derivative, 2 conditions were tested. In the first condition, bacteria were incubated after addition in rapid succession (delay < 5 s) of the choline derivative (250 μM) and DBCO-AF488 (40 μM). In the second condition, bacteria

were incubated after addition in rapid succession of the same concentrations of choline derivative and DBCO-AF488 to which was added 31  $\mu\text{M}$  of choline chloride **75**.

### Experiments focused on peptidoglycan (Chapter III)

The experiment with DIBO-DA **137** and **138** shown in the [Figure 43](#) was carried out on the strain R6.<sup>178</sup> The experiments with DIBO-DA **137**, DBCO-DA **151**, BCN-DA **155**, tetrazine-DA **158** and TCO-DA **161** showed in the [Figure 44](#), [Figure 45](#) and [Figure 47](#) were carried out on the strain D39 $\Delta$ *cps*.<sup>178</sup> The experiment with DIBO-DA **137**, DBCO-DA **151** and BCN-DA **155** shown on the [Figure 46](#) was carried out on the strains R800<sup>179</sup> and R800 $\Delta$ DacA. R800 $\Delta$ DacA is the strain R800 to which had been removed the gene coding for PBP3, also named DacA, responsible for the elimination of the 5<sup>th</sup> residue in the pentapeptide of PG.

#### “One-pot” two-steps labeling of PG with D-Ala derivatives

Bacteria were grown in BHI medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until the optical density at 600 nm reaches 0.3-0.5. Bacteria were centrifuged for 15 min at 3.500 *g* and then incubated for 5 or 10 min at 37 °C in BHI after the addition in rapid succession (delay < 5 s) of the D-Ala derivatives (250  $\mu\text{M}$ ) and the corresponding fluorophore, Azido-AF647 or pyrimidyl-tetrazine-AF647 or TCO-CF647 (40  $\mu\text{M}$ ). Bacteria were washed three times with PBS and analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

#### Two-steps labeling of PG after preliminary reaction between the D-Ala derivative and the fluorophore

The D-Ala derivative (250  $\mu\text{M}$ ) and the fluorophore Azido-AF647 (40  $\mu\text{M}$ ) were mixed in a tube for 0 minutes to 5 h. Simultaneously, bacteria were grown in BHI medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until the optical density at 600 nm reaches 0.3-0.5 after which they were centrifuged for 15 min at 3.500 *g*. Then, the bacteria were incubated for 10 min at 37 °C in BHI after the addition of the solution containing the D-Ala derivative and the fluorophore, which reacted for the suitable time. Bacteria were washed three times with PBS and analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry.



# Annexes



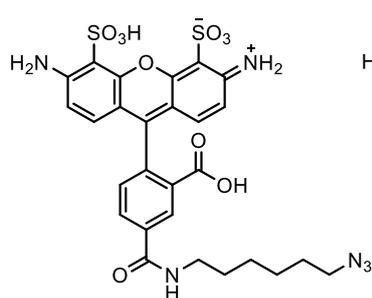
*Annexe 1 : Structure chimique des fluorophores utilisés en biologie dans ce manuscrit*

**Série AF488**

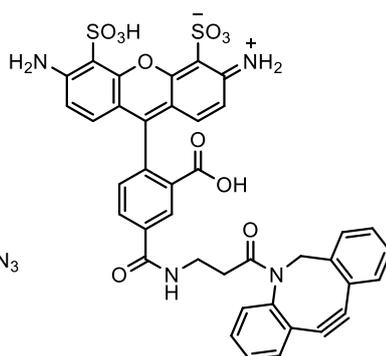
$\lambda_{exc} = 494 \text{ nm}$

$\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$

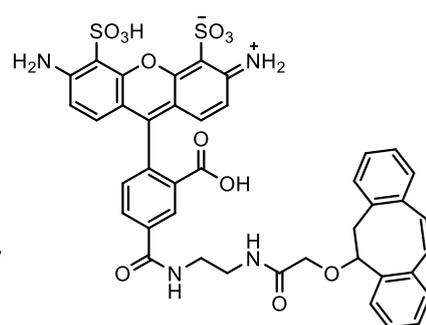
**Azido-AF488**



**DBCO-AF488**



**DIBO-AF488**

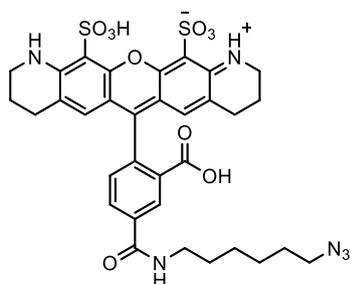


**Série AF532**

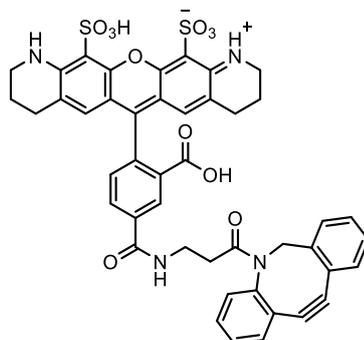
$\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$

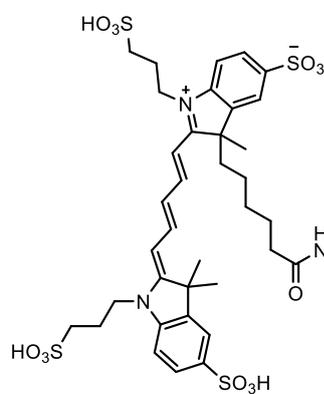
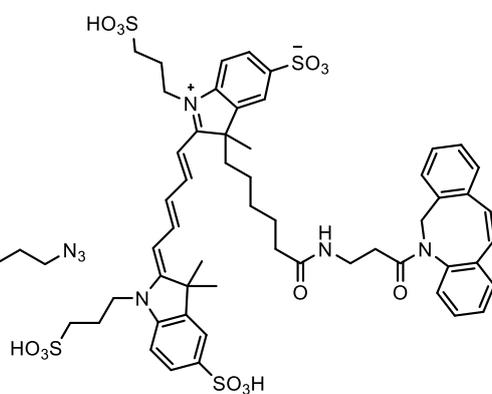
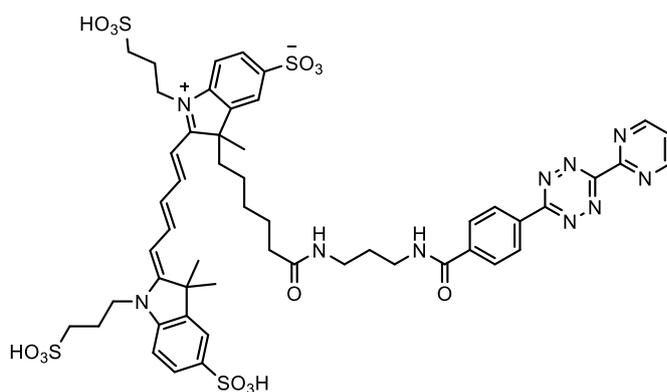
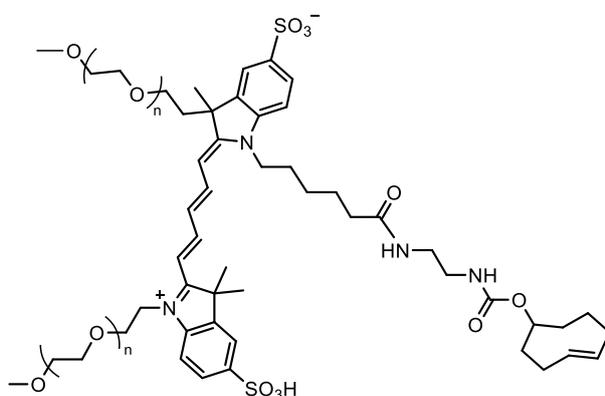
$\lambda_{em} = 554 \text{ nm}$

**Azido-AF532**



**DBCO-AF532**



**Série AF647** $\lambda_{\text{exc}} = 648 \text{ nm}$  $\lambda_{\text{em}} = 671 \text{ nm}$ **Azido-AF647****DBCO-AF647****Pyrimidyl-tétrazine-AF647****Série CF647** $\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$  $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$ **TCO-CF647**

## Annexe 2 : Données pour la détermination de la constante $k$ avec le BCN-DA

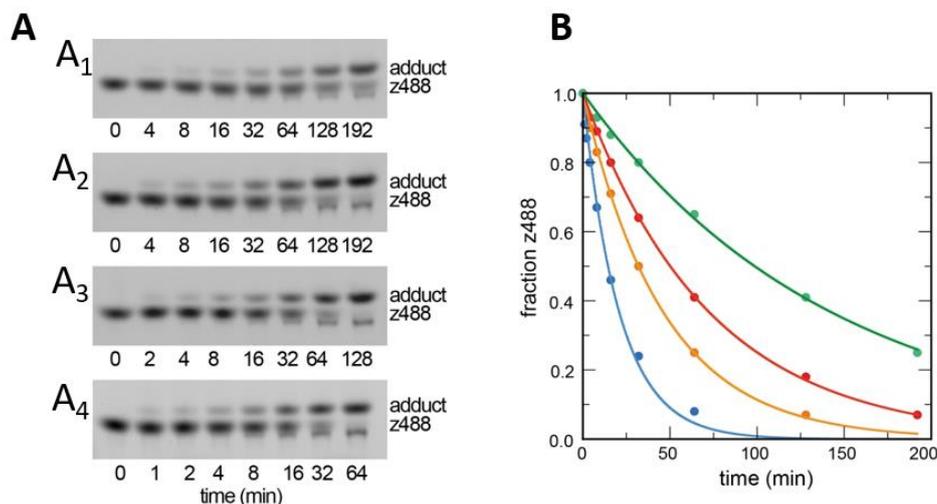


Figure 68 : Détermination des constantes  $k_{app}$  pour la SPAAC entre le BCN-DA et l'Az-AF488 **162** A – Chromatogrammes de l'électrophorèse des différentes réactions click : concentrations en BCN-DA à 85  $\mu\text{M}$  ( $A_1$ ), à 170  $\mu\text{M}$  ( $A_2$ ), à 340  $\mu\text{M}$  ( $A_3$ ) et à 680  $\mu\text{M}$  ( $A_4$ ) / B – Graphique des courbes exponentielles représentant la fraction molaire d'Az-AF488 **162** en fonction du temps pour des concentrations en DIBO-DA à 85  $\mu\text{M}$  (courbe verte), à 170  $\mu\text{M}$  (courbe rouge), à 340  $\mu\text{M}$  (courbe jaune) et à 680  $\mu\text{M}$  (courbe bleue).

<b>[BCN-DA] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>k_{app}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>
85 $\pm$ 15	0,007
170 $\pm$ 30	0,014
340 $\pm$ 60	0,022
680 $\pm$ 120	0,048

Figure 69 : Valeurs des  $k_{app}$  obtenues en fonction de la concentration en BCN-DA

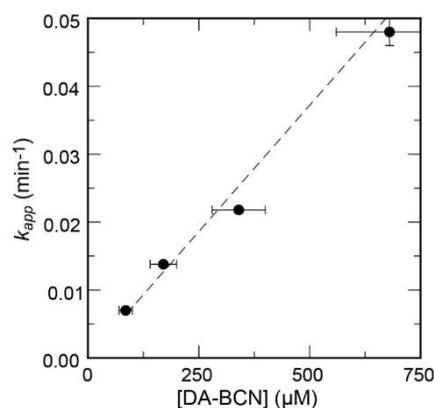


Figure 70 : Relation linéaire entre la constante  $k_{app}$  et la concentration en BCN-DA

### Annexe 3 : Données pour la détermination de la constante $k$ avec le DBCO-DA

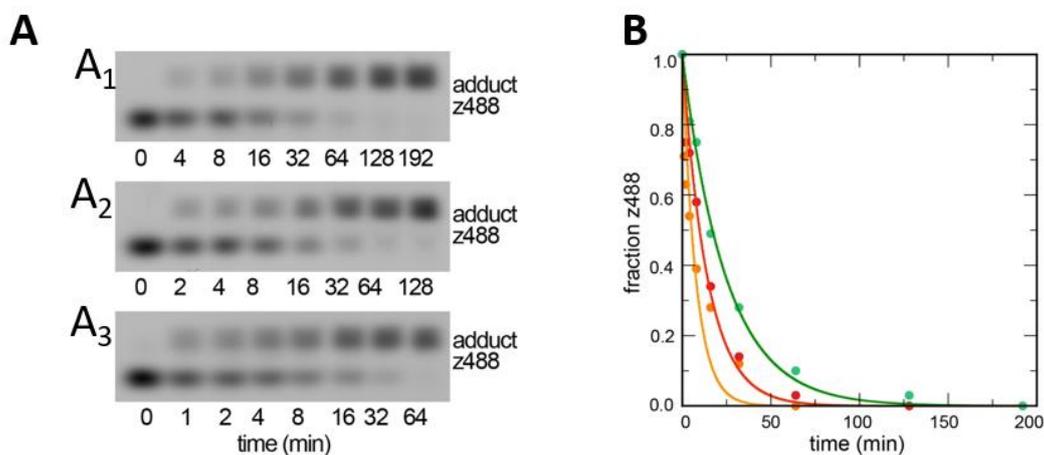


Figure 71 : Détermination des constantes  $k_{app}$  pour la SPAAC entre le DBCO-DA et l'Az-AF488 **162** A – Chromatogrammes de l'électrophorèse des différentes réactions click : concentrations en DBCO-DA à 9,9  $\mu\text{M}$  (A<sub>1</sub>), à 19,8  $\mu\text{M}$  (A<sub>2</sub>) et à 39,5  $\mu\text{M}$  (A<sub>3</sub>) / B – Graphique des courbes exponentielles représentant la fraction molaire d'Az-AF488 **162** en fonction du temps pour des concentrations en DBCO-DA à 9,9  $\mu\text{M}$  (courbe verte), à 19,8  $\mu\text{M}$  (courbe rouge) et à 39,5  $\mu\text{M}$  (courbe jaune).

[DBCO-DA] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{app}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
9,9 $\pm$ 0,7	0,041
19,8 $\pm$ 1,4	0,071
39,5 $\pm$ 2,8	0,13

Figure 72 : Valeurs des  $k_{app}$  obtenues en fonction de la concentration en DBCO-DA

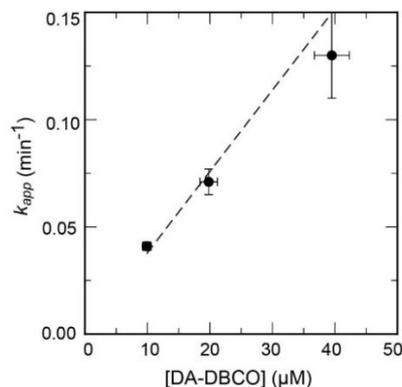


Figure 73 : Relation linéaire entre la constante  $k_{app}$  et la concentration en DBCO-DA

## Références



- (1) Patrick, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*, Third ed.; Oxford Univ. Press, 2005.
- (2) *Observations, communicated to the publisher by Mr. Antony van Leewenhoeck, in a dutch letter of the 9th Octob. 1676. here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea- and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused.* <https://doi.org/10.1098/rstl.1677.0003>.
- (3) Best, M.; Neuhauser, D. Ignaz Semmelweis and the Birth of Infection Control. *BMJ Qual. Saf.* **2004**, *13* (3), 233–234. <https://doi.org/10.1136/qshc.2004.010918>.
- (4) Smith, K. Louis Pasteur, the Father of Immunology? *Front. Immunol.* **2012**, *3*.
- (5) Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (6) Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G. PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. *The Lancet* **1940**, *236* (6104), 226–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1).
- (7) Coates, A. R.; Halls, G.; Hu, Y. Novel Classes of Antibiotics or More of the Same?: New Antibiotic Classes Are Urgently Needed. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163* (1), 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>.
- (8) *L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques.* <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 2021-07-22).
- (9) Vilchèze, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (7), 2278. <https://doi.org/10.3390/app10072278>.
- (10) Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 168–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x>.
- (11) Banahene, N.; Kavunja, H. W.; Swarts, B. M. Chemical Reporters for Bacterial Glycans: Development and Applications. *Chem. Rev.* **2021**, *acs.chemrev.1c00729*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00729>.
- (12) Batah, J.; Varon, E. *CNRP Rapport d'activité 2018.* <http://cnpneumo.com/docs/rapports/CNRP2017.pdf> (accessed 2021-07-22).
- (13) Bridy-Pappas, A. E.; Margolis, M. B.; Center, K. J.; Isaacman, D. J. Streptococcus Pneumoniae: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **2005**, *25* (9), 1193–1212. <https://doi.org/10.1592/phco.2005.25.9.1193>.
- (14) Zapun, A.; Vernet, T.; Pinho, M. G. The Different Shapes of Cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 345–360. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>.
- (15) Brooks, L. R. K.; Mias, G. I. Streptococcus Pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01366>.
- (16) Gisch, N.; Kohler, T.; Ulmer, A. J.; Müthing, J.; Pribyl, T.; Fischer, K.; Lindner, B.; Hammerschmidt, S.; Zähringer, U. Structural Reevaluation of Streptococcus Pneumoniae Lipoteichoic Acid and New Insights into Its Immunostimulatory Potency. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (22), 15654–15667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446963>.

- (17) Swoboda, J. G.; Campbell, J.; Meredith, T. C.; Walker, S. Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2010**, *11* (1), 35–45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>.
- (18) Brown, S.; Santa Maria, J. P.; Walker, S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67* (1), 313–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>.
- (19) Percy, M. G.; Gründling, A. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2014**, *68* (1), 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-112949>.
- (20) Badger, E. THE STRUCTURAL SPECIFICITY OF CHOLINE FOR THE GROWTH OF TYPE III PNEUMOCOCCUS. 9.
- (21) Di Guilmi, A. M.; Bonnet, J.; Peiert, S.; Durmort, C.; Gallet, B.; Vernet, T.; Gisch, N.; Wong, Y.-S. Specific and Spatial Labeling of Choline-Containing Teichoic Acids in Streptococcus Pneumoniae by Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (76), 10572–10575. <https://doi.org/10.1039/C7CC05646J>.
- (22) Walsh, C. Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature* **2000**, *406* (6797), 775–781. <https://doi.org/10.1038/35021219>.
- (23) Reynolds, P. E. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1989**, *8* (11), 943–950. <https://doi.org/10.1007/BF01967563>.
- (24) Sarkar, P.; Yarlagadda, V.; Ghosh, C.; Haldar, J. A Review on Cell Wall Synthesis Inhibitors with an Emphasis on Glycopeptide Antibiotics. *MedChemComm* **2017**, *8* (3), 516–533. <https://doi.org/10.1039/C6MD00585C>.
- (25) Huang, S.; Liu, Y.; Liu, W.-Q.; Neubauer, P.; Li, J. The Nonribosomal Peptide Valinomycin: From Discovery to Bioactivity and Biosynthesis. *Microorganisms* **2021**, *9* (4), 780. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040780>.
- (26) Hamley, I. W. Lipopeptides: From Self-Assembly to Bioactivity. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (41), 8574–8583. <https://doi.org/10.1039/C5CC01535A>.
- (27) Connor, E. E. Sulfonamide Antibiotics. *Prim. Care Update OBGYNS* **1998**, *5* (1), 32–35. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(97\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(97)00121-2).
- (28) Hendershot, E. F. FLUOROQUINOLONES. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **1995**, *9* (3), 715–730. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(20\)30693-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(20)30693-0).
- (29) Sabolova, D.; Kristian, P.; Kozurkova, M. Proflavine/Acridine Derivatives with Versatile Biological Activities. *J. Appl. Toxicol. JAT* **2020**, *40* (1), 64–71. <https://doi.org/10.1002/jat.3818>.
- (30) Foti, C.; Piperno, A.; Scala, A.; Giuffr, O. Oxazolidinone Antibiotics: Chemical, Biological and Analytical Aspects. *Molecules* **2021**, *26* (14), 4280. <https://doi.org/10.3390/molecules26144280>.
- (31) Krause, K. M.; Serio, A. W.; Kane, T. R.; Connolly, L. E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>.
- (32) Jardetzky, O. Studies on the Mechanism of Action of Chloramphenicol. I. The Conformation of Chloramphenicol in Solution. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2498–2508.
- (33) O’Neill, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. *Review on Antimicrobial Resistance* **2014**.
- (34) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).

- (35) Christian W. Tornøe; Caspar Christensen, and; Meldal\*, M. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (36) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (37) Yi, W.; Xiao, P.; Liu, X.; Zhao, Z.; Sun, X.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, G.; Cao, H.; Wang, D.; Li, Y. Recent Advances in Developing Active Targeting and Multi-Functional Drug Delivery Systems via Bioorthogonal Chemistry. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01250-1>.
- (38) Miranda, R. R.; Parthasarathy, A.; Hudson, A. O. Exploration of Chemical Biology Approaches to Facilitate the Discovery and Development of Novel Antibiotics. *Front. Trop. Dis.* **2022**, *3*.
- (39) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633–645. <https://doi.org/10.1002/anie.196306331>.
- (40) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (41) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- (42) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- (43) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- (44) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 16. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
- (45) Dommerholt, J.; van Rooijen, O.; Borrmann, A.; Guerra, C. F.; Bickelhaupt, F. M.; van Delft, F. L. Highly Accelerated Inverse Electron-Demand Cycloaddition of Electron-Deficient Azides with Aliphatic Cycloalkynes. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 5378. <https://doi.org/10.1038/ncomms6378>.
- (46) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299. <https://doi.org/10.1021/bc8004446>.
- (47) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
- (48) Knall, A.-C.; Slugovc, C. Inverse Electron Demand Diels–Alder (IEDDA)-Initiated Conjugation: A (High) Potential Click Chemistry Scheme. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (12), 5131. <https://doi.org/10.1039/c3cs60049a>.
- (49) Wu, H.; Devaraj, N. K. Inverse Electron-Demand Diels–Alder Bioorthogonal Reactions. In *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*; Vrabel, M., Carell, T., Eds.; Topics in Current Chemistry Collections; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 109–130. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-29686-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29686-9_6).

- (50) Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Dmitrenko, O.; Fox, J. M. Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine–Trans-Cyclooctene Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (25), 9646–9649. <https://doi.org/10.1021/ja201844c>.
- (51) Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M. Conformationally Strained Trans-Cyclooctene with Improved Stability and Excellent Reactivity in Tetrazine Ligation. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (10), 3770–3776. <https://doi.org/10.1039/C4SC01348D>.
- (52) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Xie, B.; Kamber, D. N.; Prescher, J. A. Functionalized Cyclopropenes As Bioorthogonal Chemical Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18638–18643. <https://doi.org/10.1021/ja3060436>.
- (53) Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Live-Cell Imaging of Cyclopropene Tags with Fluorogenic Tetrazine Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (30), 7476–7479. <https://doi.org/10.1002/anie.201202122>.
- (54) Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Day, H. A.; Stairs, S.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. (E,E)-1,5-Cyclooctadiene: A Small and Fast Click-Chemistry Multitalent. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (25), 7203. <https://doi.org/10.1039/c1cc12161h>.
- (55) van Geel, R.; Pruijn, G. J. M.; van Delft, F. L.; Boelens, W. C. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (3), 392–398. <https://doi.org/10.1021/bc200365k>.
- (56) Kim, E.; Koo, H. Biomedical Applications of Copper-Free Click Chemistry: In Vitro, in Vivo, and Ex Vivo. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (34), 7835–7851. <https://doi.org/10.1039/C9SC03368H>.
- (57) Handula, M.; Chen, K.-T.; Seimbille, Y. IEDDA: An Attractive Bioorthogonal Reaction for Biomedical Applications. *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26* (15), 4640. <https://doi.org/10.3390/molecules26154640>.
- (58) van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8806–8827. <https://doi.org/10.1002/anie.201008102>.
- (59) Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-Triazole Ring as a Bioisostere in Medicinal Chemistry. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572–1581. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>.
- (60) Koropatkin, N. M.; Cameron, E. A.; Martens, E. C. How Glycan Metabolism Shapes the Human Gut Microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10* (5), 323–335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>.
- (61) Lee, A. S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2018**, *4* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.
- (62) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59* (3), 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- (63) Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, *263* (5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>.
- (64) Cegelski, L.; Kim, S. J.; Hing, A. W.; Studelska, D. R.; O'Connor, R. D.; Mehta, A. K.; Schaefer, J. Rotational-Echo Double Resonance Characterization of the Effects of Vancomycin on Cell Wall Synthesis in *Staphylococcus Aureus*. *Biochemistry* **2002**, *41* (43), 13053–13058. <https://doi.org/10.1021/bi0202326>.

- (65) Brown, A. R.; Gordon, R. A.; Hyland, S. N.; Siegrist, M. S.; Grimes, C. L. Chemical Biology Tools for Examining the Bacterial Cell Wall. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (8), 1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.024>.
- (66) Lark, C.; Bradley, D.; Lark, K. G. Further Studies on the Incorporation of D-Methionine into the Bacterial Cell Wall: Its Incorporation into the R-Layer and the Structural Consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *78* (2), 278–288. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91638-X](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91638-X).
- (67) Caparrós, M.; Pisabarro, A. G.; de Pedro, M. A. Effect of D-Amino Acids on Structure and Synthesis of Peptidoglycan in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1992**, *174* (17), 5549–5559. <https://doi.org/10.1128/jb.174.17.5549-5559.1992>.
- (68) Sadamoto, R.; Niikura, K.; Sears, P. S.; Liu, H.; Wong, C.-H.; Suksomcheep, A.; Tomita, F.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. Cell-Wall Engineering of Living Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (31), 9018–9019. <https://doi.org/10.1021/ja026133x>.
- (69) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* **1997**, *276* (5315), 1125–1128. <https://doi.org/10.1126/science.276.5315.1125>.
- (70) Amro, N. A.; Kotra, L. P.; Wadu-Mesthrige, K.; Bulychev, A.; Mobashery, S.; Liu, G. High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the Escherichia Coli Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* **2000**, *16* (6), 2789–2796. <https://doi.org/10.1021/la991013x>.
- (71) Sadamoto, R.; Niikura, K.; Ueda, T.; Monde, K.; Fukuhara, N.; Nishimura, S.-I. Control of Bacteria Adhesion by Cell-Wall Engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (12), 3755–3761. <https://doi.org/10.1021/ja039391i>.
- (72) de Pedro, M. A.; Quintela, J. C.; Höltje, J. V.; Schwarz, H. Murein Segregation in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (9), 2823–2834. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.2823-2834.1997>.
- (73) Kuru, E.; Hughes, H. V.; Brown, P. J.; Hall, E.; Tekkam, S.; Cava, F.; de Pedro, M. A.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S. In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D-Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (50), 12519–12523. <https://doi.org/10.1002/anie.201206749>.
- (74) Kuru, E.; Tekkam, S.; Hall, E.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S. Synthesis of Fluorescent D-Amino Acids (FDAAs) and Their Use for Probing Peptidoglycan Synthesis and Bacterial Growth in Situ. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (1), 33–52. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.197>.
- (75) Hsu, Y.-P.; Rittichier, J.; Kuru, E.; Yablonowski, J.; Pasciak, E.; Tekkam, S.; Hall, E.; Murphy, B.; Lee, T. K.; Garner, E. C.; Huang, K. C.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S. Full Color Palette of Fluorescent D-Amino Acids for in Situ Labeling of Bacterial Cell Walls. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (9), 6313–6321. <https://doi.org/10.1039/C7SC01800B>.
- (76) Zhang, C.; Reymond, L.; Rutschmann, O.; Meyer, M. A.; Denereaz, J.; Qiao, J.; Ryckebusch, F.; Griffié, J.; Stepp, W. L.; Manley, S. Fluorescent D-Amino Acids for Super-Resolution Microscopy of the Bacterial Cell Wall. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (9), 2418–2424. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00496>.
- (77) Siegrist, M. S.; Whiteside, S.; Jewett, J. C.; Aditham, A.; Cava, F.; Bertozzi, C. R. D-Amino Acid Chemical Reporters Reveal Peptidoglycan Dynamics of an Intracellular Pathogen. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (3), 500–505. <https://doi.org/10.1021/cb3004995>.
- (78) Shieh, P.; Siegrist, M. S.; Cullen, A. J.; Bertozzi, C. R. Imaging Bacterial Peptidoglycan with Near-Infrared Fluorogenic Azide Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (15), 5456–5461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322727111>.

- (79) Pidgeon, S. E.; Pires, M. M. Metabolic Remodeling of Bacterial Surfaces via Tetrazine Ligations. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (51), 10330–10333. <https://doi.org/10.1039/C5CC01693B>.
- (80) Pidgeon, S. E.; Pires, M. M. Cell Wall Remodeling of Staphylococcus Aureus in Live Caenorhabditis Elegans. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (9), 2310–2315. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00363>.
- (81) Lebar, M. D.; May, J. M.; Meeske, A. J.; Leiman, S. A.; Lupoli, T. J.; Tsukamoto, H.; Losick, R.; Rudner, D. Z.; Walker, S.; Kahne, D. Reconstitution of Peptidoglycan Cross-Linking Leads to Improved Fluorescent Probes of Cell Wall Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (31), 10874–10877. <https://doi.org/10.1021/ja505668f>.
- (82) Hsu, Y.-P.; Hall, E.; Booher, G.; Murphy, B.; Radkov, A. D.; Yablonowski, J.; Mulcahey, C.; Alvarez, L.; Cava, F.; Brun, Y. V.; Kuru, E.; VanNieuwenhze, M. S. Fluorogenic D-Amino Acids Enable Real-Time Monitoring of Peptidoglycan Biosynthesis and High-Throughput Transpeptidation Assays. *Nat. Chem.* **2019**, 11 (4), 335–341. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0217-x>.
- (83) Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. Environment-Sensitive Behavior of Fluorescent Molecular Rotors. *J. Biol. Eng.* **2010**, 4 (1), 11. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-11>.
- (84) Dik, D. A.; Zhang, N.; Chen, J. S.; Webb, B.; Schultz, P. G. Semisynthesis of a Bacterium with Non-Canonical Cell-Wall Cross-Links. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142 (25), 10910–10913. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02956>.
- (85) Dik, D. A.; Zhang, N.; Sturgell, E. J.; Sanchez, B. B.; Chen, J. S.; Webb, B.; Vanderpool, K. G.; Schultz, P. G. A Synthetic 5,3-Cross-Link in the Cell Wall of Rod-Shaped Gram-Positive Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, 118 (11), e2100137118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100137118>.
- (86) Rivera, S. L.; Espaillet, A.; Aditham, A. K.; Shieh, P.; Muriel-Mundo, C.; Kim, J.; Cava, F.; Siegrist, M. S. Chemically Induced Cell Wall Stapling in Bacteria. *Cell Chem. Biol.* **2021**, 28 (2), 213–220.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.11.006>.
- (87) Dong, J.; Krasnova, L.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Sulfur(VI) Fluoride Exchange (SuFEx): Another Good Reaction for Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2014**, 53 (36), 9430–9448. <https://doi.org/10.1002/anie.201309399>.
- (88) Liechti, G. W.; Kuru, E.; Hall, E.; Kalinda, A.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M.; Maurelli, A. T. A New Metabolic Cell-Wall Labelling Method Reveals Peptidoglycan in Chlamydia Trachomatis. *Nature* **2014**, 506 (7489), 507–510. <https://doi.org/10.1038/nature12892>.
- (89) Williams, M. A.; Aliashkevich, A.; Krol, E.; Kuru, E.; Bouchier, J. M.; Rittichier, J.; Brun, Y. V.; VanNieuwenhze, M. S.; Becker, A.; Cava, F.; Brown, P. J. B. Unipolar Peptidoglycan Synthesis in the Rhizobiales Requires an Essential Class A Penicillin-Binding Protein. *mBio* 12 (5), e02346-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02346-21>.
- (90) Moreau, M.; Cochard, P. De la microscopie à la nanoscopie : une révolution en résolution - Prix Nobel de Chimie 2014 : Stefan W. Hell, Eric Betzig et William E. Moerner. *médecine/sciences* **2014**, 30 (12), 1169–1176. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143012021>.
- (91) Klar, T. A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S. W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97 (15), 8206–8210. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8206>.
- (92) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* **2006**, 313 (5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.

- (93) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods* **2006**, *3* (10), 793–796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>.
- (94) Hell, S. W. Microscopy and Its Focal Switch. *Nat. Methods* **2009**, *6* (1), 24–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1291>.
- (95) van de Linde, S.; Löschberger, A.; Klein, T.; Heidebreder, M.; Wolter, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy with Standard Fluorescent Probes. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (7), 991–1009. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.336>.
- (96) Trouve, J.; Zapun, A.; Arthaud, C.; Durmort, C.; Di Guilmi, A. M.; Söderström, B.; Pelletier, A.; Grangeasse, C.; Bourgeois, D.; Wong, Y.-S.; Morlot, C. Nanoscale Dynamics of Peptidoglycan Assembly during the Cell Cycle of *Streptococcus Pneumoniae*. *Curr. Biol.* **2021**, *31* (13), 2844–2856.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.041>.
- (97) den Blaauwen, T.; de Pedro, M. A.; Nguyen-Distèche, M.; Ayala, J. A. Morphogenesis of Rod-Shaped Sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 321–344. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00090.x>.
- (98) Orlachs, N. K.; Aarsman, M. E. G.; Verheul, J.; Arnusch, C. J.; Martin, N. I.; Hervé, M.; Vollmer, W.; de Kruijff, B.; Breukink, E.; den Blaauwen, T. A Novel in Vivo Cell-Wall Labeling Approach Sheds New Light on Peptidoglycan Synthesis in *Escherichia Coli*. *ChemBioChem* **2011**, *12* (7), 1124–1133. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000552>.
- (99) Gautam, S.; Kim, T.; Shoda, T.; Sen, S.; Deep, D.; Luthra, R.; Ferreira, M. T.; Pinho, M. G.; Spiegel, D. A. An Activity-Based Probe for Studying Crosslinking in Live Bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, *54* (36), 10492–10496. <https://doi.org/10.1002/anie.201503869>.
- (100) Liu, Z.; Lepori, I.; Chordia, M. D.; Dalesandro, B. E.; Guo, T.; Dong, J.; Siegrist, M. S.; Pires, M. M. A Metabolic-Tag-Based Method for Assessing the Permeation of Small Molecules Across the Mycomembrane in Live Mycobacteria\*\*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (20), e202217777. <https://doi.org/10.1002/anie.202217777>.
- (101) Rane, L.; Subbarow, Y. Nutritional Requirements of the Pneumococcus: I. Growth Factors for Types I, II, V, VII, VIII. *J. Bacteriol.* **1940**, *40* (5), 695–704. <https://doi.org/10.1128/jb.40.5.695-704.1940>.
- (102) Geiger, O.; López-Lara, I. M.; Sohlenkamp, C. Phosphatidylcholine Biosynthesis and Function in Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831* (3), 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009>.
- (103) Bonnet, J.; Wong, Y.-S.; Vernet, T.; Di Guilmi, A. M.; Zapun, A.; Durmort, C. One-Pot Two-Step Metabolic Labeling of Teichoic Acids and Direct Labeling of Peptidoglycan Reveals Tight Coordination of Both Polymers Inserted into *Pneumococcus* Cell Wall. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (8), 2010–2015. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00559>.
- (104) Gibellini, F.; Smith, T. K. The Kennedy Pathway—De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **2010**, *62* (6), 414–428. <https://doi.org/10.1002/iub.337>.
- (105) Kennedy, E. P.; Weiss, S. B. The Function of Cytidine Coenzymes in the Biosynthesis of Phospholipides. *J. Biol. Chem.* **1956**, *222* (1), 193–214.
- (106) Lands, W. E. Metabolism of Glycerolipides; a Comparison of Lecithin and Triglyceride Synthesis. *J. Biol. Chem.* **1958**, *231* (2), 883–888.
- (107) Joyce, L. R.; Guan, Z.; Palmer, K. L. Phosphatidylcholine Biosynthesis in Mitis Group *Streptococci* via Host Metabolite Scavenging. *J. Bacteriol.* **2019**, *201* (22), e00495-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00495-19>.

- (108) López-Lara, I. M.; Geiger, O. Bacterial Lipid Diversity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862* (11), 1287–1299. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.007>.
- (109) Jao, C. Y.; Roth, M.; Welti, R.; Salic, A. Metabolic Labeling and Direct Imaging of Choline Phospholipids in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (36), 15332–15337. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907864106>.
- (110) Dixit, A.; Jose, G. P.; Shanbhag, C.; Tagad, N.; Kalia, J. Metabolic Labeling-Based Chemoproteomics Establishes Choline Metabolites as Protein Function Modulators. *ACS Chem. Biol.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00400>.
- (111) Bumpus, T. W.; Baskin, J. M. A Chemoenzymatic Strategy for Imaging Cellular Phosphatidic Acid Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2016**, *55* (42), 13155–13158. <https://doi.org/10.1002/anie.201607443>.
- (112) Bumpus, T. W.; Baskin, J. M. Clickable Substrate Mimics Enable Imaging of Phospholipase D Activity. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (10), 1070–1077. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00222>.
- (113) Liang, D.; Wu, K.; Tei, R.; Bumpus, T. W.; Ye, J.; Baskin, J. M. A Real-Time, Click Chemistry Imaging Approach Reveals Stimulus-Specific Subcellular Locations of Phospholipase D Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (31), 15453–15462. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903949116>.
- (114) Gilormini, P.-A.; Batt, A. R.; Pratt, M. R.; Biot, C. Asking More from Metabolic Oligosaccharide Engineering. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (39), 7585–7595. <https://doi.org/10.1039/C8SC02241K>.
- (115) Dumont, A.; Malleron, A.; Awwad, M.; Dukan, S.; Vauzeilles, B. Click-Mediated Labeling of Bacterial Membranes through Metabolic Modification of the Lipopolysaccharide Inner Core. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (13), 3143–3146. <https://doi.org/10.1002/anie.201108127>.
- (116) Yi, W.; Liu, X.; Li, Y.; Li, J.; Xia, C.; Zhou, G.; Zhang, W.; Zhao, W.; Chen, X.; Wang, P. G. Remodeling Bacterial Polysaccharides by Metabolic Pathway Engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (11), 4207–4212. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812432106>.
- (117) Mas Pons, J.; Dumont, A.; Sautejeau, G.; Fugier, E.; Baron, A.; Dukan, S.; Vauzeilles, B. Identification of Living *Legionella Pneumophila* Using Species-Specific Metabolic Lipopolysaccharide Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (5), 1275–1278. <https://doi.org/10.1002/anie.201309072>.
- (118) Huang, Y.; Chen, W.; Chung, J.; Yin, J.; Yoon, J. Recent Progress in Fluorescent Probes for Bacteria. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (13), 7725–7744. <https://doi.org/10.1039/D0CS01340D>.
- (119) Azoulay, M.; Tuffin, G.; Sallem, W.; Florent, J.-C. A New Drug-Release Method Using the Staudinger Ligation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (12), 3147–3149. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.03.073>.
- (120) Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. Click to Release: Instantaneous Doxorubicin Elimination upon Tetrazine Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14112–14116. <https://doi.org/10.1002/anie.201305969>.
- (121) Rossin, R.; van Duijnhoven, S. M. J.; Ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Kleijn, L. H. J.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Robillard, M. S. Triggered Drug Release from an Antibody-Drug Conjugate Using Fast “Click-to-Release” Chemistry in Mice. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (7), 1697–1706. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00231>.
- (122) Polakis, P. Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68* (1), 3–19. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009373>.
- (123) Wu, K.; Yee, N. A.; Srinivasan, S.; Mahmoodi, A.; Zakharian, M.; Oneto, J. M. M.; Royzen, M. Click Activated Prodrugs against Cancer Increase the Therapeutic Potential of Chemotherapy

- through Local Capture and Activation. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (4), 1259–1271. <https://doi.org/10.1039/D0SC06099B>.
- (124) Shasqi, Inc. *A Multicenter Phase 1/2a, Open-Label Study of SQ3370 in Patients With Advanced Solid Tumors*; Clinical trial registration NCT04106492; [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2023. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04106492> (accessed 2023-05-10).
- (125) Ursuegui, S.; Recher, M.; Krężel, W.; Wagner, A. An in Vivo Strategy to Counteract Post-Administration Anticoagulant Activity of Azido-Warfarin. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 15242. <https://doi.org/10.1038/ncomms15242>.
- (126) Hanley, J. P. Warfarin Reversal. *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57* (11), 1132–1139. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.008904>.
- (127) Czuban, M.; Srinivasan, S.; Yee, N. A.; Agustin, E.; Koliszak, A.; Miller, E.; Khan, I.; Quinones, I.; Noory, H.; Motola, C.; Volkmer, R.; Di Luca, M.; Trampuz, A.; Royzen, M.; Mejia Oneto, J. M. Bio-Orthogonal Chemistry and Reloadable Biomaterial Enable Local Activation of Antibiotic Prodrugs and Enhance Treatments against Staphylococcus Aureus Infections. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (12), 1624–1632. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00344>.
- (128) Mao, D.; Hu, F.; Kenry, J.; Ji, S.; Wu, W.; Ding, D.; Kong, D.; Liu, B. Metal–Organic-Framework-Assisted In Vivo Bacterial Metabolic Labeling and Precise Antibacterial Therapy. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (18), 1706831. <https://doi.org/10.1002/adma.201706831>.
- (129) Zhang, P.; Dong, B.; Zeng, E.; Wang, F.; Jiang, Y.; Li, D.; Liu, D. In Vivo Tracking of Multiple Tumor Exosomes Labeled by Phospholipid-Based Bioorthogonal Conjugation. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (19), 11273–11279. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01506>.
- (130) Paper, J. M.; Mukherjee, T.; Schrick, K. Bioorthogonal Click Chemistry for Fluorescence Imaging of Choline Phospholipids in Plants. *Plant Methods* **2018**, *14* (1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0299-2>.
- (131) Badger, E. THE STRUCTURAL SPECIFICITY OF CHOLINE FOR THE GROWTH OF TYPE III PNEUMOCOCCUS. *J. Biol. Chem.* **1944**, *153* (1), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51225-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51225-4).
- (132) Shang, X.; Song, X.; Faller, C.; Lai, R.; Li, H.; Cerny, R.; Niu, W.; Guo, J. Fluorogenic Protein Labeling Using a Genetically Encoded Unstrained Alkene. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1141–1145. <https://doi.org/10.1039/C6SC03635J>.
- (133) Werther, P.; Yserentant, K.; Braun, F.; Großmayer, K.; Navikas, V.; Yu, M.; Zhang, Z.; Ziegler, M. J.; Mayer, C.; Gralak, A. J.; Busch, M.; Chi, W.; Rominger, F.; Radenovic, A.; Liu, X.; Lemke, E. A.; Buckup, T.; Herten, D.-P.; Wombacher, R. Bio-Orthogonal Red and Far-Red Fluorogenic Probes for Wash-Free Live-Cell and Super-Resolution Microscopy. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *acscentsci.1c00703*. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00703>.
- (134) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603–4606. <https://doi.org/10.1021/ol047955x>.
- (135) La–Venía, A.; Dzijak, R.; Rampmaier, R.; Vrabel, M. An Optimized Protocol for the Synthesis of Peptides Containing Trans-Cyclooctene and Bicyclononyne Dienophiles as Useful Multifunctional Bioorthogonal Probes. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (54), 13632–13641. <https://doi.org/10.1002/chem.202102042>.
- (136) Morlot, C.; Pernot, L.; Gouellec, A. L.; Guilmi, A. M. D.; Vernet, T.; Dideberg, O.; Dessen, A. Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus Pneumoniae*\*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (16), 15984–15991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408446200>.

- (137) McAllister, T. E.; Nix, M. G.; Webb, M. E. Fmoc-Chemistry of a Stable Phosphohistidine Analogue. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (4), 1297–1299. <https://doi.org/10.1039/C0CC04238B>.
- (138) Cao, D.; Liu, Z.; Verwilst, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Kim, J. S.; Lin, W. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (18), 10403–10519. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00145>.
- (139) Sun, X.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X. Synthesis and Application of Coumarin Fluorescence Probes. *RSC Adv.* **2020**, 10 (18), 10826–10847. <https://doi.org/10.1039/C9RA10290F>.
- (140) Breidenbach, J.; Bartz, U.; Gütschow, M. Coumarin as a Structural Component of Substrates and Probes for Serine and Cysteine Proteases. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2020**, 1868 (9), 140445. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140445>.
- (141) Daly, B.; Ling, J.; Silva, A. P. de. Current Developments in Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) Sensors and Switches. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (13), 4203–4211. <https://doi.org/10.1039/C4CS00334A>.
- (142) Li, Y.; Liu, T.; Liu, H.; Tian, M.-Z.; Li, Y. Self-Assembly of Intramolecular Charge-Transfer Compounds into Functional Molecular Systems. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (4), 1186–1198. <https://doi.org/10.1021/ar400264e>.
- (143) Wang, C.; Chi, W.; Qiao, Q.; Tan, D.; Xu, Z.; Liu, X. Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) and Twists beyond TICT: From Mechanisms to Rational Designs of Bright and Sensitive Fluorophores. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50 (22), 12656–12678. <https://doi.org/10.1039/D1CS00239B>.
- (144) Zhao, Q.; Li, F.; Huang, C. Phosphorescent Chemosensors Based on Heavy-Metal Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (8), 3007–3030. <https://doi.org/10.1039/B915340C>.
- (145) Fang, C.; Huang, Y.; Zhao, Y. Review of FRET Biosensing and Its Application in Biomolecular Detection. *Am. J. Transl. Res.* **2023**, 15 (2), 694–709.
- (146) Cao, D.; Zhu, L.; Liu, Z.; Lin, W. Through Bond Energy Transfer (TBET)-Based Fluorescent Chemosensors. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2020**, 44, 100371. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100371>.
- (147) Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. New Sensing Mechanisms for Design of Fluorescent Chemosensors Emerging in Recent Years. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (7), 3483–3495. <https://doi.org/10.1039/C0CS00224K>.
- (148) Misra, R.; Bhattacharyya, S. *Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications*; 2018. <https://doi.org/10.1002/9783527801916>.
- (149) Lv, X.; Gao, C.; Han, T.; Shi, H.; Guo, W. Improving the Quantum Yields of Fluorophores by Inhibiting Twisted Intramolecular Charge Transfer Using Electron-Withdrawing Group-Functionalized Piperidine Auxochromes. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (5), 715–718. <https://doi.org/10.1039/C9CC09138F>.
- (150) Liu, X.; Qiao, Q.; Tian, W.; Liu, W.; Chen, J.; Lang, M. J.; Xu, Z. Aziridinyl Fluorophores Demonstrate Bright Fluorescence and Superior Photostability by Effectively Inhibiting Twisted Intramolecular Charge Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (22), 6960–6963. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03924>.
- (151) Zhou, J.; Lin, X.; Ji, X.; Xu, S.; Liu, C.; Dong, X.; Zhao, W. Azetidine-Containing Heterospirocycles Enhance the Performance of Fluorophores. *Org. Lett.* **2020**, 22 (11), 4413–4417. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01414>.
- (152) García-Beltrán, O.; Mena, N.; Berríos, T. A.; Castro, E. A.; Cassels, B. K.; Núñez, M. T.; Aliaga, M. E. A Selective Fluorescent Probe for the Detection of Mercury (II) in Aqueous Media and Its

- Applications in Living Cells. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (48), 6598–6601. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.09.111>.
- (153) Zhu, Q.; Uttamchandani, M.; Li, D.; Lesaichere, M. L.; Yao, S. Q. Enzymatic Profiling System in a Small-Molecule Microarray. *Org. Lett.* **2003**, *5* (8), 1257–1260. <https://doi.org/10.1021/ol034233h>.
- (154) Tsai, C.-S.; Liu, P.-Y.; Yen, H.-Y.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H. Development of Trifunctional Probes for Glycoproteomic Analysis. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5575. <https://doi.org/10.1039/c0cc00345j>.
- (155) Ghosh, P. B.; Whitehouse, M. W. 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole: A New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and Other Amines. *Biochem. J.* **1968**, *108* (1), 155–156. <https://doi.org/10.1042/bj1080155>.
- (156) Oliveira, E.; Bértolo, E.; Núñez, C.; Pilla, V.; Santos, H. M.; Fernández-Lodeiro, J.; Fernández-Lodeiro, A.; Djafari, J.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. Green and Red Fluorescent Dyes for Translational Applications in Imaging and Sensing Analytes: A Dual-Color Flag. *ChemistryOpen* **2018**, *7* (1), 9–52. <https://doi.org/10.1002/open.201700135>.
- (157) Jiang, C.; Huang, H.; Kang, X.; Yang, L.; Xi, Z.; Sun, H.; Pluth, M. D.; Yi, L. NBD-Based Synthetic Probes for Sensing Small Molecules and Proteins: Design, Sensing Mechanisms and Biological Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (13), 7436–7495. <https://doi.org/10.1039/D0CS01096K>.
- (158) Su, D.; Teoh, C. L.; Wang, L.; Liu, X.; Chang, Y.-T. Motion-Induced Change in Emission (MICE) for Developing Fluorescent Probes. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4833–4844. <https://doi.org/10.1039/C7CS00018A>.
- (159) Jenkinson, D. R.; Cadby, A. J.; Jones, S. The Synthesis and Photophysical Analysis of a Series of 4-Nitrobenzochalcogenadiazoles for Super-Resolution Microscopy. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2017**, *23* (51), 12585–12592. <https://doi.org/10.1002/chem.201702289>.
- (160) Benson, S.; Fernandez, A.; Barth, N. D.; de Moliner, F.; Horrocks, M. H.; Herrington, C. S.; Abad, J. L.; Delgado, A.; Kelly, L.; Chang, Z.; Feng, Y.; Nishiura, M.; Hori, Y.; Kikuchi, K.; Vendrell, M. SCOTfluors: Small, Conjugatable, Orthogonal, and Tunable Fluorophores for In Vivo Imaging of Cell Metabolism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (21), 6911–6915. <https://doi.org/10.1002/anie.201900465>.
- (161) Benson, S.; de Moliner, F.; Fernandez, A.; Kuru, E.; Asiimwe, N. L.; Lee, J.-S.; Hamilton, L.; Sieger, D.; Bravo, I. R.; Elliot, A. M.; Feng, Y.; Vendrell, M. Photoactivatable Metabolic Warheads Enable Precise and Safe Ablation of Target Cells in Vivo. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22578-2>.
- (162) de Moliner, F.; Konieczna, Z.; Mendive-Tapia, L.; Saleeb, R. S.; Morris, K.; Gonzalez-Vera, J. A.; Kaizuka, T.; Grant, S. G. N.; Horrocks, M. H.; Vendrell, M. Small Fluorogenic Amino Acids for Peptide-Guided Background-Free Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (4), e202216231. <https://doi.org/10.1002/anie.202216231>.
- (163) Bosveli, A.; Montagnon, T.; Kalaitzakis, D.; Vassilikogiannakis, G. Eosin: A Versatile Organic Dye Whose Synthetic Uses Keep Expanding. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19* (15), 3303–3317. <https://doi.org/10.1039/D1OB00301A>.
- (164) Hari, D. P.; König, B. Synthetic Applications of Eosin Y in Photoredox Catalysis. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (51), 6688–6699. <https://doi.org/10.1039/C4CC00751D>.
- (165) Romero, N. A.; Nicewicz, D. A. Organic Photoredox Catalysis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (17), 10075–10166. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00057>.

- (166) Maranto, A. R. Neuronal Mapping: A Photooxidation Reaction Makes Lucifer Yellow Useful for Electron Microscopy. *Science* **1982**, *217* (4563), 953–955. <https://doi.org/10.1126/science.7112109>.
- (167) Deerinck, T. J.; Martone, M. E.; Lev-Ram, V.; Green, D. P.; Tsien, R. Y.; Spector, D. L.; Huang, S.; Ellisman, M. H. Fluorescence Photooxidation with Eosin: A Method for High Resolution Immunolocalization and in Situ Hybridization Detection for Light and Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* **1994**, *126* (4), 901–910. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.901>.
- (168) Ngo, J. T.; Adams, S. R.; Deerinck, T. J.; Boassa, D.; Rodriguez-Rivera, F.; Palida, S. F.; Bertozzi, C. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. Click-EM for Imaging Metabolically Tagged Nonprotein Biomolecules. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (6), 459–465. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2076>.
- (169) Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J. Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols. *Org. Lett.* **2006**, *8* (8), 1689–1692. <https://doi.org/10.1021/ol060283l>.
- (170) Murari, R.; Baumann, W. J. *Quadrupolar carbon-13-nitrogen-14 couplings and nitrogen-14 relaxations in aggregated and nonaggregated choline phospholipids*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/ja00395a052>.
- (171) Pati, D.; Das, S.; Patil, N. G.; Parekh, N.; Anjum, D. H.; Dhaware, V.; Ambade, A. V.; Sen Gupta, S. Tunable Nanocarrier Morphologies from Glycopolypeptide-Based Amphiphilic Biocompatible Star Copolymers and Their Carbohydrate Specific Intracellular Delivery. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (2), 466–475. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01354>.
- (172) Rivera-Antonio, A.; Rosales-Hernández, M. C.; Balbuena-Rebolledo, I.; Santiago-Quintana, J. M.; Mendieta-Wejebe, J. E.; Correa-Basurto, J.; García-Vázquez, J. B.; García-Báez, E. V.; Padilla-Martínez, I. I. Myeloperoxidase Inhibitory and Antioxidant Activities of (E)-2-Hydroxy- $\alpha$ -Aminocinnamic Acids Obtained through Microwave-Assisted Synthesis. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (6), 513. <https://doi.org/10.3390/ph14060513>.
- (173) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255. <https://doi.org/10.1002/anie.200705456>.
- (174) Liu, C.; Li, T.; Rosi, N. L. Strain-Promoted “Click” Modification of a Mesoporous Metal–Organic Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (46), 18886–18888. <https://doi.org/10.1021/ja307713q>.
- (175) Longo, B.; Zanato, C.; Piras, M.; Dall’Angelo, S.; Windhorst, A. D.; Vugts, D. J.; Baldassarre, M.; Zanda, M. Design, Synthesis, Conjugation, and Reactivity of Novel *Trans,Trans* -1,5-Cyclooctadiene-Derived Bioorthogonal Linkers. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (9), 2201–2210. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00375>.
- (176) Mongin, C.; Ardoy, A. M.; Méreau, R.; Bassani, D. M.; Bibal, B. Singlet Oxygen Stimulus for Switchable Functional Organic Cages. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (6), 1478–1484. <https://doi.org/10.1039/C9SC05354A>.
- (177) Wen, W.-H.; Lin, M.; Su, C.-Y.; Wang, S.-Y.; Cheng, Y.-S. E.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. Synergistic Effect of Zanamivir–Porphyrin Conjugates on Inhibition of Neuraminidase and Inactivation of Influenza Virus. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (15), 4903–4910. <https://doi.org/10.1021/jm900515g>.
- (178) Lanie, J. A.; Ng, W.-L.; Kazmierczak, K. M.; Andrzejewski, T. M.; Davidsen, T. M.; Wayne, K. J.; Tettelin, H.; Glass, J. I.; Winkler, M. E. Genome Sequence of Avery’s Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus Pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (1), 38–51. <https://doi.org/10.1128/JB.01148-06>.

- 
- (179) Sung, C. K.; Li, H.; Claverys, J. P.; Morrison, D. A. An RpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus Pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (11), 5190–5196. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001>.